Implication du stress oxydatif, de l'inflammation, du dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal dans le vieillissement musculaire : Aspects Biologiques et Cliniques

Imen Ghzaiel

▶ **To cite this version:**

Imen Ghzaiel. Implication du stress oxydatif, de l'inflammation, du dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal dans le vieillissement musculaire : Aspects Biologiques et Cliniques. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté; Université de Tunis El Manar, 2022. Français. NNT : 2022UBFCK056 . tel-04355052

HAL Id: tel-04355052
https://theses.hal.science/tel-04355052

Submitted on 20 Dec 2023

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 DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université Tunis El Manar

Spécialité : Sciences Biologiques

Docteur de l'Université Bourgogne Franche-Comté (ED : ES n°554)

Spécialité : Biochimie & Biologie Moléculaire

Laboratoires :

Laboratoire de Biochimie, LR12ES05 'Nutrition –Aliments Fonctionnels et Santé Vasculaire' Faculté de Médecine, Monastir, Tunisie

Laboratoire Bio-PeroxIL, 'Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique' EA7270 / INSERM, Faculté des Sciences Gabriel, Dijon, France

Implication du stress oxydatif, de l'inflammation et du dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal dans le vieillissement musculaire : aspects biologiques et cliniques

Soutenue publiquement le 20/10/2022

Par : Imen GHZAIEL

Devant le jury composé de

Taoufik GHRAIRI	**Professeur, Université Tunis El Manar, Tunisie**	**Président**
Elham HASSEN	**Professeure, Université de Monastir, Tunisie**	**Rapporteur**
Jean-Marc LOBACCARO	**Professeur, Université Clermont Auvergne, France**	**Rapporteur**
Isabelle DELTON	**Professeure, INSA de Lyon, France**	**Examinatrice**
Mohamed HAMMAMI	**Professeur, Université de Monastir, Tunisie**	**Directeur de thèse**
Gérard LIZARD	**Docteur, Université de Bourgogne Franche-Comté, France**	**Directeur de thèse**
William J. GRIFFITHS	**Professeur, Université de Swansea, Swansea, UK**	**Invité**

AVANT PROPOS

Ce travail de Thèse de Doctorat a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre:

- Laboratoire Bio-peroxIL « Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique » EA7270 (Université de Bourgogne-Franche-Comté / INSERM, Dijon - France), sous la direction du Dr Gérard LIZARD

- Laboratoire de Biochimie, LR12ES05 « Nutrition, Aliments Fonctionnels et Santé Vasculaire » à la faculté de médecine de Monastir (Tunisie), sous la direction du Pr Mohamed HAMMAMI et du Dr Amira ZARROUK

- Département de Biologie Cellulaire, Computationnelle et Intégrative (CIBIO) et Institut Dulbecco-Téléthon (Université de Trento, Italie), sous la direction du Dr Stefano BIRESSI

Ce travail a été rendu possible financièrement par le soutien du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (Tunisie), de l'Université de Tunis El Manar, de l'Université de Bourgogne-Franche-Comté (Dijon-France), de l'Université de Trento (Italie), de l'Institut Européen des Antioxydants (Neuves-Maisons, France) et d'ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine, Dijon, France).

REMERCIEMENTS

C’est avec plaisir que je dédie ces lignes en signe de gratitude et de profonde reconnaissance à tous ceux qui, de prés ou de loin, ont contribué à la réalisation et à l’aboutissement de ce travail de Thèse.

J’exprime mon estime et mes remerciements aux membres de jury :

- Madame la Professeure **Elham HASSEN** (Université de Monastir, Tunisie) et Monsieur le Professeur **Jean-Marc LOBACCARO** (Université de Clermont Auvergne, France) pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette Thèse. Votre expertise et vos suggestions sont un honneur pour moi.
- Madame la Professeure **Isabelle DELTON** (INSA Lyon / INSERM, Lyon, France) pour avoir accepté, sans hésitation, de faire partie de mon jury de Thèse au titre d’examinatrice.
- Monsieur **Taoufik GHRAIRI** (Université Tunis El Manar) pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la Présidence du jury.

J’adresse mes sincères remerciements à mes directeurs de Thèse :

- Monsieur **Mohamed HAMMAMI** (Université de Monastir, Tunisie) de m’avoir fait confiance depuis l’année 2017 en m’acceptant en Master au sein de votre laboratatoire et en veillant à ce que je continue mon projet de Thèse dans des bonnes conditions. Je vous remercie pour la confiance que vous m’avez témoignée au cours de ces années et pour m’avoir permis de travailler dans un cadre scientifique enrichissant avec beaucoup de liberté.
- Monsieur **Gérard LIZARD** (INSERM / Université de Bourgogne, Dijon, France) pour m’avoir donné la chance de réaliser une Thèse en cotutelle dans votre laboratoire. Les mots me manquent vraiment pour vous remercier et vous exprimer ma grande reconnaissance. Sans votre aide, je n’aurai pas pû continuer ma Thèse dans des très bonnes conditions. Mon séjour dans votre laboratoire depuis 2020 m’a donné la possibilité de mettre en pratique mes connaissances acquises et de perfectionner mes compétences en Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire. Votre intuition scientifique et votre humanité sont pour moi des exemples. Je vous remercie vivement de m’avoir confié ce sujet de Thèse passionnant et de m'avoir accompagné tout au long de ce projet. Je suis aussi reconnaissante pour le temps que vous avez consacré à la correction de ce manuscrit.

- Madame **Amira ZARROUK** (Université de Sousse, Tunisie) pour m'avoir co-encadré, formé et encouragé tout au long de ces années. Vous avez su me transmettre vos connaissances scientifiques et techniques. Vous m'avez appris à être rigoureuse et méthodique et c'est grâce à votre aide précieuse et vos remarques pertinentes que j'ai pu mener à bien ce travail de Thèse. Je vous remercie de m'avoir donné le goût de la Biologie Cellulaire et Moléculaire. Je vous remercie de ne m'avoir jamais laissé tomber malgré les situations difficiles que j'ai vécues. Je me considère chanceuse de vous avoir eu à mes côtés lors de cette aventure.

Tous mes remerciements vont également à Madame **Sonia HAMMAMI**, la Directrice du laboratoire « Nutrition-Aliments Fonctionnels et Santé Vasculaire (NAFS) », pour m'avoir accueilli au sein de laboratoire et avoir eu la patience de répondre à mes innombrables questions sur la nature du suivi médical des personnes âgées.

Les résultats que j'ai la chance de présenter dans cette Thèse sont le fruit d'un travail qui a impliqué plusieurs équipes sur la base de nombreuses collaborations. Je voudrais adresser mes remerciements sincères à tous les personnels et collègues des équipes ci-dessous:

- Département de chimie, Université de Metz, France (Prof. **Mohammad SAMADI**)
- Plateforme lipidomique UBFC (Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne Franche Comté-CHU Dijon - INSERM, Responsable : Dr **Jean-Paul PAIS de BARROS**, Dijon, France).
- Plateforme lipidomique INRAe (Mme **Lucy MARTINE** / Dr **Niyazi ACAR**, Dijon, France).
- Plateforme de microscopie électronique DimaCell (Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, Mr **Franck MENETRIER** et Mme **Laure AVOSCAN**).
- Plateforme DimaCell (Faculté de Médecine, UBFC, Dijon, Mme **Amandine BATAILLE**).
- Institut Jules Guyot de la Vigne et du Vin (Cytométrie en Flux, Prof. **Hervé ALEXANDRE**, Dijon, France).
- Laboratoire de chimie analytique (Université de Milan-Bicocca, Monza, Italie ; Prof **Valerio LEONI**, Mr **Claudio CACCIA**).
- Plateforme de cytométrie de l'Université de Bourgogne à Dijon (Dr **Anabelle SEQUEIRA-LE GRAND**) pour la cytométrie spectrale.

- Laboratoire Lara-Spiral (Dr **Philippe DURAND,** Mme **Emmanuelle PROST-CAMUS** / Dr **Michel PROST**, Couternon, France)

Je remercie aussi l'Université Trento - Italie pour m'avoir attribué une bourse de mobilité Erasmus+ afin de réaliser une partie *in vitro* de cette Thèse. Je remercie infiniment Monsieur **Stefano BIRESSI** pour m'avoir accueilli au sein du Département de CIBIO (Biologie Cellulaire, Computationnelle et Intégrative), ainsi que les membres de CIBIO particulièrement **Michela LIBERGOLI** et **Francesca FLORIO** pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Je remercie les membres du laboratoire NAFS (Monastir, Tunisie) pour leurs conseils, leur confiance et leur aide technique. Un remerciment particulier à Monsieur **Imed CHREIF** et Madame **Samia AGUIR**.

Je remercie également tous les membres du laboratoire Bio-PreoxIL (EA7270, Biochimie du Peroxysome, Inflammation et Métabolisme Lipidique, Université de Bourgogne, Dijon, France), pour leur gentillesse. Merci en particulier à **Thomas NURY** pour sa disponibilité, son aide, et ces conseils.

La vie d'un thésard ce n'est pas que du travail, c'est aussi quelques pauses astucieusement disséminées dans la journée avec les ami(e)s.

- Merci **Oumaima** pour ton amitié, ton aide et ta bonne compagnie durant notre séjour dijonnais. J'espère que nos routes se recroiseront un jour.
- Merci à mes colocataires de bureau : **Khouloud** et **Ali**, pour leur sympathie, leur appui amical et pour leur aide spontanée. Merci everybody pour vos choix de musique et vos mots réconfortants quand ça devenait si difficile.
- Merci à mes amies (**Wided**, **Souha**, **Soukaina**, **Mounia** et **Aline**) pour tous les bons moments passés ensemble et nos discussions interminables dont je ne me lasserai jamais.

La formation d'un docteur commence dès le plus jeune âge, pratiquement dès la maternelle, et à cet égard mes parents se sont montrés exemplaires. Je ne peux même pas les remercier assez ; ce sera toujours en dessous de ce que je pense et souhaite. Merci à vous de m'avoir permis de réaliser de longues études, mais aussi pour votre soutien et pour tout l'amour témoigné dans les moments forts. Merci à ma sœur, à mes frères, et à Yessine d'avoir été là pour m'encourager. Ma vie aurait été bien vide sans vous, merci d'avoir toujours cru en moi.

Imen GHZAIEL

RÉSUMÉ

Le vieillissement se caractérise par une augmentation progressive du stress oxydant, qui favorise la peroxydation des lipides et la formation de dérivés d'oxydation du cholestérol, dont le 7β-hydroxycholestérol (7β-OHC ; CID 473141) et le 7-cétocholestérol (7KC ; CID 91474). Ces oxystérols, connus pour activer le stress oxydant, l'inflammation et la mort cellulaire, pourraient contribuer au processus de vieillissement et aux maladies liées à l'âge, comme la sarcopénie qui est une perte de la masse, de la force et de la fonction musculaire. L'identification de molécules ou de mélanges de molécules prévenant la toxicité du 7β-OHC et du 7KC est donc un enjeu important.

Dans ce contexte, une étude clinique (cas-témoin) sur le plasma et les érythrocytes de patients sarcopéniques et non sarcopéniques de la région de Monastir et Sousse (Tunisie) a été réalisée pour rechercher des paramètres de stress oxydant, d'inflammation non spécifique (TNF-α, IL-6, IL-8, LTB-4) et spécifique (myokine : apeline) et des marqueurs lipidiques (acides gras, oxystérols) en association avec la sarcopénie. Par la suite, une étude sur la composition chimique et les propriétés antioxydantes de deux huiles Méditerranéennes (*Pistacia lentiscus* seed oil (PLSO) ; *Sylibum marianum* / milk thistle seed oil (MTSO)) a été réalisée. De plus, sur des myoblastes et des myotubes C2C12 murins, les effets cytotoxiques du 7β-OHC et 7KC (50 µM ; 24 h) incluant le stress oxydant, les effets sur les organites (mitochondrie, peroxysome) et/ou l'activation de la mort cellulaire ont été caractérisés ainsi que les activités cytoprotectrices de PLSO et MTSO et de l'α-tocophérol.

Dans l'étude clinique, les résultats ont montré une augmentation significative des activités enzymatiques antioxydantes, des produits de peroxydation lipidique et protéique et des marqueurs d'inflammation chez les patients sarcopéniques avec une altération du profil des acides gras et une augmentation d'oxystérols (7β-OHC, 7KC). Les huiles (PLSO, MTSO) sont riches en composés bioactifs ; acides gras polyinsaturés, et nutriments aux propriétés antioxydantes : phytostérols, α-tocophérol, caroténoïdes, flavonoïdes et composés phénoliques. Quand ces huiles sont associées au 7β-OHC et 7KC, les effets cytotoxiques induits par ces oxystérols sont très fortement atténués et semblables à ceux observés avec l'α-tocophérol. Ces effets cytoprotecteurs sont caractérisés par : une inhibition du stress oxydant (diminution de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène au niveau mitochondrial et sur cellule entière ; diminution de la peroxydation lipidique et la carbonylation protéique ; normalisation des activités enzymatiques antioxydantes) ; une atténuation des dysfonctionnement mitochondriaux et peroxysomaux et une inhibition de la mort cellulaire indépendante des caspases (ferroptose) associée à une autophagie de survie.

Cette étude apporte des informations sur le stress oxydant, l'inflammation et le statut lipidique chez les patients sarcopéniques. *In vitro*, l'utilisation de cellules C2C12 différenciées ou non, a permis de démontrer que le 7β-OHC et le 7KC, augmentés dans le plasma des patients sarcopéniques, sont cytotoxiques et que leurs effets sont fortement atténués par le PLSO et le MTSO ainsi que l'α-tocophérol.

Les résultats obtenus apportent des informations nouvelles sur la physiopathologie de la sarcopénie et ouvrent de nouvelles perspectives de traitement pour cette maladie liée à l'âge.

Mots clés : sarcopénie, oxystérols, cellules C2C12, peroxysome, ferroptose, autophagie.

ABSTRACT

Aging is characterized by a progressive increase in oxidative stress, which promotes lipid peroxidation and the formation of oxidative derivatives of cholesterol, including 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC; CID 473141) and 7-ketocholesterol (7KC; CID 91474). These oxysterols, known to activate oxidative stress, inflammation, and cell death, may contribute to the aging process and age-related diseases, such as sarcopenia, which is a loss of muscle mass, strength, and function. The identification of molecules or mixtures of molecules preventing 7β-OHC and 7KC toxicity is, therefore, an important issue.

In this context, a clinical study (case-control) on plasma and erythrocytes of sarcopenic and non-sarcopenic patients from the area of Monastir and Sousse (Tunisia) was performed. Different parameters were studied: oxidative stress biomarkers, non-specific (TNF-α, IL-6, IL-8, LTB-4) and specific (myokine: apelin) inflammation and lipid biomarkers (fatty acids, oxysterols). Subsequently, a study on the chemical composition and antioxidant properties of two Mediterranean oils (*Pistacia lentiscus* seed oil (PLSO); *Sylibum marianum* / Milk thistle seed oil (MTSO)) was performed. In addition, on murine C2C12 myoblasts and myotubes, the cytotoxic effects of 7β-OHC and 7KC (50 µM; 24 h) were studied (oxidative stress, effects on organelles (mitochondria, peroxisome), cell death) and the cytoprotective activities of PLSO, MTSO and α-tocopherol were characterized.

In the clinical study, the results showed a significant increase in antioxidant enzyme activities, lipid and protein peroxidation products, and inflammation markers in sarcopenic patients as well as altered fatty acid profile and increased oxysterols levels (7β-OHC, 7KC). The oils (PLSO, MTSO) are rich in bioactive compounds; polyunsaturated fatty acids, and nutrients with antioxidant properties: phytosterols, α-tocopherol, carotenoids, flavonoids, and phenolic compounds. When PLSO and MTSO are associated with 7β-OHC and 7KC, the cytotoxic effects induced by these oxysterols are strongly attenuated and similar to those observed with α-tocopherol. These cytoprotective effects are characterized by: inhibition of oxidative stress (decrease of reactive oxygen species overproduction at the mitochondrial level and on whole-cell; decrease of lipid peroxidation and protein carbonylation; normalization of antioxidant enzymatic activities); an attenuation of mitochondrial and peroxisomal dysfunction and an inhibition of caspase-independent cell death associated with survival autophagy.

These studies provide information on oxidative stress, inflammation, and lipid status in sarcopenic patients. On differentiated and undifferentiated C2C12 cells, 7β-OHC and 7KC induce an important oxidative stress associated with organelles dysfunction leading to a mode of cell death considered as ferroptosis. These different cytotoxic effects are strongly attenuated by PLSO and MTSO as well as α-tocopherol.

All the results provide new information on the pathophysiology of sarcopenia and open new perspectives for the treatment of this frequent age-related disease.

Keywords: sarcopenia, oxysterols, C2C12 cells, peroxisome, ferroptosis, autophagy.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Publications de Recherche (Les publications en relation avec la Thèse sont surlignées en gris)

- Rezig L, **Ghzaiel I**, Ksila M, Yammine A, Nury T, Zarrouk A, Samadi M, Chouaibi M, Vejux A, Lizard G. Cytoprotective activities of representative nutrients from the Mediterranean diet and of Mediterranean oils against 7-ketocholesterol-and 7β-hydroxycholesterol-induced cytotoxicity: application to age-related diseases and civilization diseases. **Steroids**. 2022 : 109093. *https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109093.*
- Ksila M, Vejux A, Prost-Camus E, Durand P, **Ghzaiel I**, Nury T, Duprey D, Meziane S, Masmoudi-Kouki O, Latruffe N, Ghrairi T, Prost M, Lizard G, Vervandier-Fasseur D .Cytotoxic and Antioxidant Activities of Imine Analogs of Trans-Resveratrol towards Murine Neuronal N2a Cells. **Molecules**. 2022 : 27(15), 4713. *https://doi.org/10.3390/molecules27154713.*
- **Ghzaiel I**, Sassi K, Zarrouk A, Ghosh S, Dias I, Nury T, Ksila M, Essadek S,Tahri Joutey M, Brahmi F, Mihoubi W, Rup-Jacques S, Samadi M, Rezig L, Meziane S, Ghrair T, Masmoudi-Kouki O, Hammami S, Nasser B, Hammami M, Wang Y, Griffiths W , Vejux, Lizard G. Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies: food and biomedical. **Redox Experimental Medicine.** 2022. R40-R56. *https://doi.org/10.1530/REM-22-0005.*
- Brahmi F, Vejux A, **Ghzaiel I**, Ksila M, Zarrouk A, Ghrairi T, Essadek S, Mandard S, Leoni V, Poli G, Vervandier-Fasseur D, Kharoubi O, El Midaoui A, Atanasov A, Meziane S, Latruffe N, Nasser B, Bouhaouala-Zahar B, Masmoudi-Kouki O, Madani K, Boulekbache-Makhlouf L, Lizard, G. Role of Diet and Nutrients in SARS-CoV-2 Infection: Incidence on Oxidative Stress, Inflammatory Status and Viral Production. **Nutrients**. 2022 : 14(11), 2194. *https://doi.org/10.3390/nu14112194.*
- **Ghzaiel I**, Zarrouk A , Essadek S , Martine L, Hammouda S , Yammine A, Ksila M , Nury T , Meddeb W , Tahri Joutey M, Mihoubi W , Caccia K , Leoni V, Samadi M, Acar N , Andreoletti P , Hammami S , Ghrairi T , Vejux A , Hammami M, Lizard G. Protective Effects of Milk Thistle (Sylibum marianum) Seed Oil and α-tocopherol against 7β-hydroxycholesterol-induced Peroxisomal Alterations in Murine C2C12 Myoblasts: Nutritional Insights Associated with the Concept of Pexotherapy. **Steroids**. *2022 : 183, 109032. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109032.*
- El Midaoui A, **Ghzaiel I**, Vervandier-Fasseur D, Ksila M, Zarrouk A, Nury T, Khallouki F, El Hessni A, Ouazzani Ibrahimi S, Latruffe N, Couture R, Kharoubi O, Brahmi F,

Hammami S, Masmoudi-Kouki O, Hammami M, Ghrairi T, Vejux A, Lizard G. Saffron (Crocus sativus L.): A Source of Nutrients for Health and for the Treatment of Neuropsychiatric and Age-Related Diseases. **Nutrients**. *2022: 14(3), 597. https://doi.org/10.3390/nu14030597.*

- Kessas K, Chouari Z, **Ghzaiel I**, Zarrouk A, Ksila M, Ghrairi T, El Midaoui A, Lizard G, Kharoubi O. Role of Bioactive Compounds in the Regulation of Mitochondrial Dysfunctions in Brain and Age-Related Neurodegenerative Diseases. **Cells**. 2022: 11(2), 257. *10.3390/cells11020257*.
- **Ghzaiel I**, Zarrouk A, Nury T, Libergoli M, Florio F, Hammouda S, Ménétrier F, Avoscan L, Yammine A , Samadi M , Latruffe N , Biressi S , Levy D , Bydlowski S, Hammami S, Vejux A, Hammami M, Lizard G. Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of Pistacia Lentiscus L. Seed oil against 7β-hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 myoblasts: Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death. **Antioxidants**. 2021: 10(11), 1772. *10.3390/antiox10111772*.
- Charrière K, **Ghzaiel I**, Lizard G, Vejux A. Involvement of Microglia in Neurodegenerative Diseases: Beneficial Effects of Docosahexahenoic Acid (DHA) Supplied by Food or Combined with Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021: 22(19), 10639. *10.3390/ijms221910639*.
- **Ghzaiel I**, Sassi K, Zarrouk A, Nury T, Ksila M, Leoni V, Bouhaouala-Zahar B, Hammami S, Hammami M, Mackrill J, Samadi M, Ghrairi T, Vejux A, Lizard, G. 7- ketocholesterol: Effects on Viral Infections and Hypothetical Contribution in COVID-19. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 2021: 105939. *https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105939.*
- Vejux A, **Ghzaiel I**, Nury T, Schneider V, Charriere K, Sghaier R, Zarrouk A, Leoni V, Moreau T, Lizard G. The Oxysterols and Multiple Sclerosis: Physiopathology, Evolutive Biomarkers and Therapeutic Strategy. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. 2021; 210, 105870. *https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105870.*
- Hammouda S, **Ghzaiel I**, Picón-Pagès P, Meddeb W, Khamlaoui W, Hammami S, Munoz F, Hammami M, Zarrouk A. Nigella and Milk Thistle Seed Oils: Potential Cytoprotective Effects against 7β-Hydroxycholesterol-Induced Toxicity on SH-SY5Y Cells. **Biomolecules**. 2021; 11(6), 797. *https://doi.org/10.3390/biom11060797.*

- Nury T, Yammine A, **Ghzaiel I**, Sassi K., Zarrouk A, Brahmi F, Samadi M , Rup-Jacques S , Vervandier-Fasseur D , Pais de Barrosi JP , Bergasi V , Ghosh S , Majeed M , Pande A, Atanasov A, Hammami S, Hammam M, Mackrill J, Nasser B , Andreoletti P , Cherkaoui-Malki M, Vejux A, Lizard, G. Attenuation of 7-ketocholesterol-and 7β-hydroxycholesterol-induced Oxiapoptophagy by Nutrients, Synthetic Molecules and Oils: Potential for the Prevention of Age-related Diseases. **Ageing research reviews**. 2021: 101324. *https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101324.*
- Zarrouk A, Hammouda S, **Ghzaiel I**, Hammami S, Khamlaoui W, Ahmed S, Lizard G, Hammami, M. Association Between Oxidative Stress and Altered Cholesterol Metabolism in Alzheimer's Disease Patients. **Current Alzheimer Research**. 2020; 17(9), 823-834. *10.2174/1567205017666201203123046*.
- Hammami S, **Ghzaiel I**, Hammouda S, Sakly N, Hammami M, Zarrouk A. Evaluation of Pro-inflammatory Cytokines in Frail Tunisian Older Adults. **PLoS ONE**. 2020; 15(11): e0242152. *https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242152.*
- Hammouda S, **Ghzaiel I**, Khamlaoui W, Hammami S, Younes mhenni S, Samet S, Hammami M, Zarrouk A. Genetic Variants in FADS1 and ELOVL2 Increase Level of Arachidonic Acid and The Risk of Alzheimer's Disease in the Tunisian Population. **PLEFA**. 2020. 160: 102159. *10.1016/j.plefa.2020.10215*.

Publication électronique

- **Ghzaiel I**, Ksila M, Latruffe N, Vejux A, Vervandier-Fasseur D, Lizard G. Interest of polyphenols in the prevention of age-related diseases and in regenerative medicine. **Science & Wine**, 2022 . URL : https://www.ciencia-e-vinho.com/2022/09/18/interest-of-polyphenols-in-the-prevention-of-age-related-diseases-and-in-regenerative medicine.

Résumés Scientifiques

- **Ghzaiel I**, Zarrouk A, Sassi K, Nury T, Hammami S, Vejux A, Lizard G. Oxysterols-induced oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunctions: potential consequences on age-related diseases. **Free Radical Biology and Medicine**. 2022 : 189, 12. *https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.06.065.*
- **Ghzaiel I**, Zarrouk A, Hammouda S, Hammami M, Lizard G, Hammami S. Redox homeostasis and antioxidant response defense in skeletal muscle performance in the

elderly. **BMJ Journals**. 2022: 1845-1845. *http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2022-eular.3882.*

Communications orales et sur panneaux

➢ Communications orales

- **Ghzaiel I**, Zarrouk A, Nury T, Leoni V, Hammami S, Hammami M, Lizard G. 7β-hydroxycholesterol-induced oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunctions: attenuation with Milk thistle seed oil. **European Network for Oxysterol Research (ENOR) 2022**, web meeting, 21-22 Septembre 2022.
- **Ghzaiel I**, Zarrouk A, Nury T, Hammami S, Hammami M, Lizard G. Biochemical composition and antioxidant properties of Milk Thistle seed oil: nutritional interest in sarcopenia. **NutRedOx COST Action 2021, web meeting, 19-20 Septembre 2021**.
- **Ghzaiel I**, Yammine A, Nury T, Libergoli M , Florio F , Hammouda S, Hammami S, Hammami M, Biressi S, El Midhaoui A, Leoni V, Lizard G, Zarrouk A. 7β-hydroxycholesterol-induced oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunctions: attenuation with Milk thistle seed oil. **European Network for Oxysterol Research (ENOR) 2021, web meeting, 16-17 Septembre 2021**.
- **Ghzaiel I**, Yammine A, Nury T, Hammouda S, Hammam S, Hammami M, Lizard G, Zarrouk A. Effect of 7β-hydroxycholesterol and 7-Ketocholesterol on In vitro skeletal muscle and its clinical relevance for frailty in older adults. **Forum des Jeunes Chercheurs ED-UBFC, web meeting, 2021; 23-24 Juin 2021**.
- **Ghzaiel I**, Hammouda S, Hammami S, Hammami M, Zarrouk A. Correlation between Inflammatory and Oxidative Stress Biomarkers, and Frailty in an Elderly Tunisian Population. **Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB) 2019, 25-28 Mars 2019, Sousse-Tunisie**.

➢ Communications sur panneaux

- **Ghzaiel I**, Zarrouk A, Nury T, Latruffe N, Vejux A, Lizard. Pistacia lentiscus L. seed oil attenuates oxysterol-induced autophagy in C2C12 myoblasts: nutritional interest in the prevention of sarcopenia. **Club Francophone de l'Autophagie (CFATG 10), 31 Mai-02 Juin 2022, Besançon-France**.

- **Ghzaiel I**, Hammouda S, Hammami S, Hammami M, Zarrouk A. Evidence of RedOx homeostasis disruption on red blood cells of patients with Frailty. **International Day for Biological (IDB) 2019, 18-21 Décembre 2019, Sousse-Tunisie.**
- Zarrouk A, Hammouda S, **Ghzaiel I**, Hammami M, Lizard G. Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols, and Polyphenols Profiles in Mediterranean Oils and Evaluation of their Antioxidant and Cytoprotective Activities. **IDB 2019, 18-21 Décembre 2019, Sousse-Tunisie.**
- Hammouda S, **Ghzaiel I**, Hammami S, Hammami M, Zarrouk A. Changes of the desaturases and elongases activities are implicated in alteration of polyunsaturated fatty acid metabolism in Alzheimer Disease patients. **IDB 2019, 18-21 Décembre 2019, Sousse-Tunisie.**
- Hammami S, Bennour I, **Ghzaiel I**, Elghali M, Sakly N, Hammami M. Are rheumatoid factors and antinuclear antibodies associated with frailty in elderly Tunisian population? **European Alliance of Associations for Rheumatology (EULAR) 2019, 12-15 Juin 2019, Madrid-Spain.**
- **Ghzaiel I**, Hammami S, Hammouda S, Sakly N, Hammami M, Zarrouk A. Evaluation of pro-inflammatory cytokines in frailty among Tunisian older adults. **IDB 2018, 20-23 Décembre 2018, Sousse-Tunisie.**

Prix Scientifique

- Prix Romanée-Conti de l'association Nutrition Méditerranéenne et Santé (NMS) pour la mobilité universitaire, année 2021.

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 1
I. Vieillissement 1
II. Vieillissement musculaire 4
1. Structure du muscle squelettique 5
2. Myogenèse d'une fibre musculaire 8
3. Sarcopénie 9
3.1. Définition 9
3.2. Méthodes de mesure de la sarcopénie 10
3.2.1. Méthodes d'évaluation de la masse musculaire 10
3.2.2. Méthodes de mesure de la force musculaire 11
3.2.3. Méthodes de mesure de la performance physique 11
3.2.4. Méthode diagnostique à l'aide de questionnaire 12
3.3. Facteurs de risques associés au développement de la sarcopénie 12
3.3.1. Aspect nutritionnel 12
3.3.2. Activité physique 13
3.3.3. Dépression 13
3.3.4. Facteurs environnementaux : isolement et solitude 13
4. Mécanisme cellulaires et systémiques à l'origine de la sarcopénie 14
4.1. Altération de la régénérescence musculaire 14
4.2. Altération du 'turnover' protéique 17
4.2.1. Synthèse protéique 17
4.2.2. Dégradation protéique 19
4.2.2.1. Mort cellulaire 19
4.2.2.2. Autophagie 23
4.3. Système ubiquitine-protéasome 25
5. Implication de l'inflammation dans la sarcopénie 26
6. Intervention du stress oxydant dans la sarcopénie 28
6.1. Généralité sur le stress oxydant 28
6.2. Stress oxydant dans le muscle âgé 29
6.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) 29
6.2.1.1. Les sources d'ERO au niveau mitochondrial 29

6.2.1.2. Les sources d'ERO au niveau peroxysomal 32
6.2.1.3. Les sources d'ERO au niveau du réticulum endoplasmique 33
6.2.1.4. Les NADPH oxydases (NOX) 34
6.2.2. Systèmes de défenses antioxydants 34
6.2.2.1. Les antioxydants enzymatiques 35
6.2.2.2. Les antioxydants non enzymatiques 36
6.2.3. Dommages oxydatifs : cibles moléculaires 37
6.3. Stress oxydant et mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie 39
6.3.1. Rôle des ERO dans la régénérescence musculaire 39
6.3.2. Rôle des ERO dans le 'turnover' protéique 39
6.3.2.1. Rôle des ERO dans la synthèse protéique 39
6.3.2.2. Rôle des ERO dans la dégradation protéique 40
7. Sarcopénie et dysfonctions des organites 41
7.1. Dysfonctions mitochondriales 41
7.2. Dysfonctions peroxysomales 44
7.3. Dysfonctions lysosomales 44
8. Métabolisme lipidique et sarcopénie 45
8.1. Métabolisme des acides gras 46
8.1.1. Structure des acides gras 46
8.1.2. Acides gras et sarcopénie 47
8.2. Métabolisme du cholestérol 48
8.3. Dérivés oxydés du cholestérol : les oxystérols 50
8.3.1. Origine et structure des oxystérols 50
8.3.1.1. Source exogène liée à l'alimentation 51
8.3.1.2. Source endogène 51
8.3.2. Oxystérols et maladies liées à l'âge 54
9. Prévention de la sarcopénie : approche nutritionnelle 57
9.1. Restriction calorique 57
9.2. Régime Méditerranéen et régime d'Okinawa 58
9.2.1.1. Régime Méditerranéen 58
9.2.1.2. Régime d'Okinawa 60
10. Traitements de la sarcopénie 61
OBJECTIFS DE LA THESE 63

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE 65
I. Etude clinique 65
1. Population étudiée 65
1.1. Recrutement des patients sarcopéniques et des sujets témoins 65
1.2. Prélèvement et préparation des échantillons sanguins 66
2. Evaluation du stress oxydant 67
2.1. Dosage de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires 67
2.1.1. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase érythrocytaire 67
2.1.2. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase érythrocytaire 68
2.1.3. Dosage de l'activité de la catalase érythrocytaire 69
2.2. Dosage des marqueurs de la peroxydation lipidique plasmatique et/ou érythrocytaire 70
2.2.1. Dosage des diènes conjugués plasmatiques et érythrocytaires 70
2.2.2. Dosage du taux de malondialdéhyde plasmatique 70
2.3. Dosage des protéines carbonylées plasmatiques 71
3. Evaluation des marqueurs de l'inflammation 72
3.1. Cytokine pro-inflammatoires : facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), interleukine-6 (IL-6), et interleukine-8 (IL-8) 72
3.2. Médiateur lipidique de l'inflammation : leucotriène B 4 73
3.3. Quantification de myokine (apeline) 73
4. Quantification des marqueurs lipidiques 74
4.1. Dosage des acides gras érythrocytaires par chromatographie en phase gazeuse 74
4.1.1. Extraction des lipides totaux 74
4.1.2. Méthylation des acides gras 74
4.1.3. Analyse en chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides gras 74
4.2. Dosage des oxystérols plasmatiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse 75
4.2.1. Saponification des acides gras 75
4.2.2. Extraction des oxystérols plasmatiques 75
4.2.3. Dérivation (silylation) des stérols 75
4.2.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse 75
II. Caractérisation des huiles Méditerranéennes : huile de lentisque et huile de chardon-marie 76

1. Préparation des huiles 76
1.1. Huile de lentisque (Pistacia lentiscus seed oil : PLSO) 76
1.2. Huile de chardon-marie (Milk thistle seed oil : MTSO) 77
2. Détermination de la composition chimique des huiles 78
2.1. Dosage des composés phénoliques 78
2.1.1. Dosage des polyphénols totaux 78
2.1.2. Dosage des flavonoïdes 78
2.1.3. Dosage des caroténoïdes 79
2.2. Analyse du profil des polyphénols 79
2.3. Analyse du profil des acides gras 80
2.4. Analyse des phytostérols 80
2.4.1. Isolement de la fraction insaponifiable 80
2.4.2. Silylation de la fraction insaponifiable 81
2.4.3. Identification des stérols 81
2.5. Analyse de l'α-tocophérol 81
3. Détermination de l'activité antioxydante des extraits d'huiles 82
3.1. Test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) 82
3.1. Test de la réduction du fer : FRAP (Ferric reducing-antioxidant power) 83
3.2. Test de chélation des ions ferreux (Fe2+) 84
3.3. Test KRL (Kit radicaux libres) 85
III. Etude *in vitro* 86
1. Matériel biologique : cellules musculaires squelettiques murines C2C12 (myoblastes murins) 86
1.1. Choix du modèle cellulaire 86
1.2. Culture cellulaire 86
2. Substances pro et antioxydantes 87
2.1. Oxystérols 87
2.2. Huiles Méditerranéennes 87
2.3. α-tocophérol 87
3. Traitements cellulaires 87
4. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie à contraste de phase 88
5. Evaluation de la viabilité cellulaire 88
5.1. Mesure de l'activité de l'enzyme succinate déhydrogénase par le test MTT 88
5.2. Mesure de l'activité estérase par le test FDA 89

5.3. Quantification des cellules adhérentes par le test Sulforhodamine 101 89
5.4. Quantification de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium 90
6. Evaluation du stress oxydant 90
6.1. Mesure de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène avec le dihydroéthidium (DHE) 90
6.2. Dosage des activités des enzymes antioxydantes et des marqueurs de l'oxydation des lipides et des protéines 91
7. Evaluation du statut mitochondrial 91
7.1. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par coloration au 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3)) 91
7.2. Dosage de l'ATP intracellulaire 92
7.3. Mesure de la masse mitochondriale par coloration au MitoTracker Red 93
7.4. Mesure de la production d'anions superoxydes mitochondriaux par coloration au MitoSOX Red 93
8. Evaluation du statut peroxysomal : Etude de la quantité et de la topographie du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3 par immunofluorescence indirecte 94
8.1. Évaluation de la topographie et de la distribution d'ABCD3 par microscopie à illumination structurée (Apotome) 94
8.2. Quantification d'ABCD3 par cytométrie en flux 94
9. Caractérisation et analyse des acides organiques, des stérols et des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse couplée en spectrométrie de masse 95
9.1. Extraction des acides organiques 95
9.2. Extraction des acides gras 95
9.3. Extraction des stérols 96
10. Evaluation et caractérisation de la mort cellulaire 96
10.1. Détection des cellules en Sub-G1 96
10.2. Quantification des cellules apoptotiques par coloration au Hoechst 33342 et coloration de May-Grünwald-Giemsa 97
10.2.1. Morphologie des noyaux colorés au Hoechst 33342 97
10.2.2. Morphologie des noyaux colorés au May-Grünwald-Giemsa 97
10.2.3. Marquage Annexine-V / Iodure de propidium 97
10.3. Identification des vacuoles autophagiques 98
11. Etude de l'ultrastructure cellulaire par microscopie électronique à transmission . 98
12. Identification des gouttelettes lipidiques par coloration à l'huile rouge (Oil Red O (ORO)) 99

13. Analyse protéique par Western blot 99
13.1. Extraction et dosage des protéines 99
13.2. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) 100
13.1. Transfert des protéines sur la membrane de PVDF 101
13.2. Détection et révélation des protéines 101
14. Analyse des ARNm par RT-qPCR 102
14.1. Extraction et dosage des ARN totaux 102
14.2. RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction 103
14.3. qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction 103
14.4. Analyse des résultats de qPCR 105
IV. Analyses Statistiques 105
RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 107
I. Etude clinique 107
1. Description de la population étudiée 107
1.1. Caractéristiques démographiques de la population 107
1.2. Caractéristiques médicales de la population 108
1.3. Caractéristiques gériatriques de la population 109
2. Evaluation des marqueurs du stress oxydant plasmatique et/ou érythrocytaire 110
2.1. Mesure de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires 110
2.2. Evaluation des marqueurs de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées plasmatiques et/ou érythrocytaires 111
3. Evaluation des marqueurs inflammatoires sériques 112
4. Evaluation d'apeline (myokine) plasmatique 114
5. Analyse des marqueurs lipidiques 115
5.1. Evaluation du profil des acides gras érythrocytaires 115
5.2. Evaluation du taux du cholestérol et de certains de ses dérivés oxydés (oxystérols) au niveau plasmatique 117
6. Evaluation de la corrélation entre score SARC-F, stress oxydant, inflammation, myokine, acides gras, cholestérol et dérivés oxydés (oxystérols) 119
7. Régression logistique 121
II. Etude *in vitro* 122
1. Caractéristiques des huiles Méditerranéennes : huile de lentisque et huile de chardon-marie 122
1.1. Composition biochimique des huiles de graines de lentisque et de chardon-marie 122

1.1.1. Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en caroténoïdes 122

1.1.2. Identification et quantification des polyphénols par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) 123

1.1.3. Composition en acides gras..... 123

1.1.4. Composition en phytostérols..... 125

1.1.5. Identification et quantification d'α-tocophérol 125

2. Evaluation des activités antioxydantes des huiles de graines de lentisque et de chardon-marie 126

3. Effet cytoprotecteurs des huiles de lentisque et de chardon-marie sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 non différenciées..... 127

3.1. Choix des concentrations optimales des différents traitements..... 127

3.2. Evaluation des effets cytoprotecteurs de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la viabilité et l'adhésion cellulaire 130

3.2.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité estérase par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) 130

3.2.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'adhésion cellulaire 132

3.2.3. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la morphologie cellulaire..... 133

3.2.4. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la perméabilité la membrane plasmique..... 135

3.3. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et 7-cétocholestérol sur le stress oxydant..... 136

3.3.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) 136

3.3.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le système de défense antioxydant 138

3.3.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la peroxydation lipidique..... 141

3.3.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la production de protéines carbonylées 141

3.3.1. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'expression de protéine Nrf2 144

3.4. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité mitochondriale 146

3.4.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial 146

3.4.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le taux d'ATP mitochondrial 148

3.4.3. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la masse mitochondriale 149

3.4.4. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la production d'anion superoxyde au niveau mitochondrial . 151

3.4.5. Effet de MitoQ et de MitoTempol associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité estérase par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) 152

3.4.6. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la glycolyse et le cycle de Krebs 154

3.4.7. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur les niveaux d'expression de gènes codants pour les protéines de la dynamique mitochondriale 156

3.4.8. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la biogenèse mitochondriale 158

3.5. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité peroxysomale 162

3.5.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'expression et la topographie du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3 163

3.5.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le niveau d'expression d'ARNm du gène Abcd3 166

3.5.3. Effet de MTSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le niveau d'expression des peroxines 167

3.5.4. Effet de MTSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol sur la quantité de protéine ABCD3 et d'enzymes impliquées dans la β-oxydation des acides gras à très long chaine (ACOX1, MFP2) 169

3.5.5. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le profil des acides gras à très long chaîne (AGTLC) 171

3.6. Visualisation en microscopie à transmission électronique des modifications ultrastructurales des myoblastes murins C2C12 173

3.7. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le métabolisme du cholestérol 176

3.8. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO sur la mort cellulaire induite par le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol 178

3.8.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le pourcentage de cellules en Sub-G1 178

3.8.2. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'apoptose et l'autophagie..... 180

3.9. Mécanisme de cytoprotection des huiles Méditerranéennes et d'α-tocophérol 188

4. Effet cytoprotecteur d'huile de lentisque sur les cellules musculaires C2C12 différenciées en myotubes..... 190

4.1. Différenciation des myoblastes en myotubes..... 190

4.1. Effet sur la viabilité et l'adhésion cellulaire du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 en cours de différenciation et en fin de différenciation 191

4.2. Effet cytoprotecteur d'huile de lentisque sur la viabilité et l'adhésion cellulaire sur les cellules C2C12 en cours de différenciation et en fin de différenciation..... 193

DISCUSSION 195

I. Etude clinique..... 195

II. Composition biochimique et activité antioxydante des huiles de graines de lentisque et de chardon-marie 202

III. Etude *in vitro* 204

CONCLUSION & PERSPECTIVES..... 213

BIBLIOGRAPHIE 219

ANNEXES 262

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Réparation de la population par tranches d'âges: 2015-2050 (W. He et al., 2016).. 1
Figure 2 : Jeunes enfants et personnes âgées en pourcentage de la population mondiale: 1950-2050 2
Figure 3 : Effet du vieillissement sur le muscle squelettique. Imagerie par Résonnance Magnétique à mi-cuisse d'un jeune âgé de 25 ans (à gauche) et d'une personne âgée de 65 ans (à droite) 5
Figure 4 : Représentation schématique du muscle squelettique 7
Figure 5 : Différenciation myogénique et myofibrillogenèse 8
Figure 6 : Cellules satellites et régénération des muscles squelettiques 15
Figure 7 : Voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt /mTOR. 18
Figure 8 : Les deux principales voies apoptotiques : voie extrinsèque et voie intrinsèque 20
Figure 9 : La ferroptose et ses voies 22
Figure 10 : Autophagie et activation de LC3 24
Figure 11 : Système ubiquitine-protéasome 26
Figure 12 : Schéma représentatif de la chaîne de transport des électrons et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative 31
Figure 13: β-oxydation peroxysomale 33
Figure 14 : Les défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques 35
Figure 15 : Mécanisme de la peroxydation lipidique 37
Figure 16 : Structure des acides gras. 46
Figure 17 : Configuration cis et trans de la double liaison et exemple des deux isomères cis et trans de l'acide gras C18:1 n-9 (acide oléique) 47
Figure 18 : Structure du cholestérol. 49
Figure 19 : Disposition du cholestérol et des oxystérols dans la bicouche phospholipidique . 49
Figure 20 : Voie de synthèse du 7KC et du 7β-OHC 53
Figure 21 : Schéma du protocole expérimental de l'étude clinique. 66
Figure 22 : Principe du dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD). 68
Figure 23 : Principe du dosage du malondialdéhyde (MDA). 71
Figure 24 : Principe de l'ELISA de type Sandwich. 73
Figure 25 : Différentes étapes d'extraction de l'huile de graines de Pistacia lentiscus (PLSO). 77

Figure 26 : Principe du test DPPH•. 82
Figure 27: Principe du test FRAP. 83
Figure 28 : Principe du test KRL 85
Figure 29 : Réaction de réduction du MTT en cristaux de formazan. 88
Figure 30 : Oxydation du Dihydroéthidium (DHE) en Ethidium fluorescent. 91
Figure 31 : Répartition de la population non sarcopénique et sarcopénique selon le temps TUG (Time Up and Go). 110
Figure 32 : Taux de leucotriène B 4 sérique dans la population étudiée 113
Figure 33 : Taux d'apeline plasmatique dans la population étudiée 114
Figure 34 : Taux de cholestérol et de ses dérivés oxydés (oxystérols) dans le plasma de patients sarcopéniques et de sujets non sarcopéniques 118
Figure 35 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres dans le groupe des patients sarcopéniques. 119
Figure 36 : Evaluation des effets de différentes concentrations de 7β-OHC et 7KC sur les cellules C2C12 après 24 h de traitement. La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test FDA. 128
Figure 37 : Evaluation des effets de différentes concentrations des huiles Méditerranéennes (PLSO : pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : milk thistle seed oil) et d'α-tocophérol sur la viabilité des cellules C2C12 après 24 h de traitement. 129
Figure 38 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 131
Figure 39 : Mesure de l'adhésion cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 132
Figure 40 : Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des myoblastes C2C12 134
Figure 41 : Mesure de la mortalité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 135
Figure 42 : Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 137

Figure 43 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associé ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur le niveau d'expression des gènes antioxydants (SOD1, SOD2, GPx, catalase). 140
Figure 44 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associé ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de protéine Nrf2 totale et phosphorylée. 145
Figure 45 : Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial (ΔΨm) permettant la détermination du pourcentage de cellules C2C12 avec des mitochondries dépolarisées en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes et d'α-tocophérol. 147
Figure 46 : Mesure de la concentration cellulaire d'ATP en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 148
Figure 47 : Mesure de la masse mitochondriale en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 150
Figure 48 : Mesure de la production d'anion superoxyde au niveau mitochondrial permettant la détermination du pourcentage de cellules surproduisant l'anion superoxyde en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol 151
Figure 49 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs de mitoQ et de mitoTempol. 153
Figure 50 : Représentation schématique de la dynamique mitochondriale. 156
Figure 51: Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de gènes impliqués dans la fusion (Mfn1, Mfn2, Opa1) et la fission (Drp1, Fis1) mitochondriale. 157
Figure 52 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de Tfam1 et de Nrf1. 158
Figure 53 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de Sirt3 et de Ampk α1. 160
Figure 54 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur la quantité de protéines mitochondriales (Sirt1 et AMPK α1). 161

Figure 55 : Heatmap réalisée sur cellules C2C12 comparant la differences entre les deux oxystérols étudiés (7β-OHC et 7KC). 162
Figure 56 : Analyse par microscopie à fluorescence (Apotome) de la quantité et de la topographie de la protéine peroxysomale ABCD3. 164
Figure 57 : Mesure de la quantité de la protéine peroxysomale ABCD3 en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 165
Figure 58 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol associé ou non aux huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et à l'α-tocophérol sur le niveau d'expression d'Abcd3. 166
Figure 59 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol associé ou non au MTSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse peroxysomale (Pex5, Pex13, Pex14). 168
Figure 60 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol associé ou non au MTSO et à l'α-tocophérol sur la quantité de protéines peroxysomales (ABCD3, ACOX1, MFP2). 170
Figure 61 : Analyse par microscopie électronique à transmission de la morphologie des myoblastes C2C12. 174
Figure 62 : Visualisation par microscopie électronique à transmission des mitochondries, des peroxysomes et du réticulum endoplasmique dans les myoblastes C2C12 175
Figure 63 : Evaluation de l'effet du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associé ou non au PLSO, au MTSO, ou à l'α-tocophérol sur la répartition des cellules C2C12 dans les différentes phases du cycle cellulaire. 179
Figure 64 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur la quantité de protéines apoptotiques (Caspase-3 et PARP), et de protéines autophagiques (LC3-II et LC3-I). 181
Figure 65 : Caractérisation de la mort cellulaire induite par le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol. 182
Figure 66 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol sur la quantité de protéines autophagiques : Atg 13 et P62. 183
Figure 67 : Résultats du test Annexine V-Iodure de propidium. 184
Figure 68 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets du z-VAD-fmk, de la 3-méthyladénine, et de la rapamycine : test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA). . 185

Figure 69 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la ferroptose (GPx 4 totale et GPx 4 mitochondriale). 186
Figure 70 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation d'effet de la déféroxamine: test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA). 187
Figure 71 : Effet de MTSO et d'α-tocophérol sur la formation de gouttelettes lipidiques. ... 188
Figure 72 : Evaluation des effets de différentes concentrations de7β-OHC et 7KC sur les cellules C2C12 après 24 h de traitement. La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test FDA. 189
Figure 73 : Protocole expérimental pour évaluer l'effet cytoprotecteur de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur les myoblastes en cours de différenciation (J4) et en fin de différenciation (J7). 190
Figure 74 : Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules C2C12 en cours de différenciation. 191
Figure 75 : Evaluation des effets de différentes concentrations de 7β-OHC et de 7KC sur les cellules C2C12 en cours de différenciation (J4) et en fin de différenciation (J7) après 72 h de traitement. La viabilité et l'adhésion cellulaire ont été respectivement évaluées avec le test FDA et le test sulforhodamine 101 (SR101). 192
Figure 76 : Morphologie des cellules C2C12 en cours de différenciation (J4) et après 72 h de traitement avec le 7β-OHC et le 7KC. 193
Figure 77 : Mesure de la viabilité et de l'adhésion cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol sur des cellules C2C12 en cours de différenciation (J4) et à la fin de différenciation (J7) et après 72 h de traitement et évaluation des effets cytoprotecteurs de PLSO et d'α-tocophérol : test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) et test de coloration à la suforhodamine 101 (SR101). 194
Figure 78 : Schéma récapitulatif des résultats de l'étude clinique. 213
Figure 79: Schéma récapitulatif des résultats de l'étude in vitro. Sur cellules C2C12, le 7β-OHC et le 7KC induisent une mort cellulaire indépendante des caspases avec des caractéristiques de ferroptose associée à l'autophagie de survie. 216

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Critères d'inclusion et d'exclusion de la population étudiée. 65
Tableau 2 : Composition des différents types de gel d'acrylamide. 101
Tableau 3 : Conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires. 102
Tableau 4 : Séquences des différentes amorces utilisées pour les qPCR. 104
Tableau 5 : Caractéristiques démographiques de la population étudiée. 108
Tableau 6 : Caractéristiques médicales de la population étudiée. 108
Tableau 7: Caractéristiques gériatriques de la population étudiée. 109
Tableau 8 : Activité catalytique des enzymes antioxydantes érythrocytaires GPx, SOD et CAT dans la population étudiée. 111
Tableau 9 : Taux des marqueurs de peroxydation lipidique et de protéines carbonylées plasmatiques et/ou érythrocytaires dans la population étudiée. 112
Tableau 10 : Taux de marqueurs inflammatoires sériques dans la population étudiée. 113
Tableau 11 : Profil érythrocytaire des acides gras chez les patients sarcopéniques et les sujets non sarcopéniques étudiés. 116
Tableau 12 : Profil érythrocytaire des acides gras Trans chez les patients sarcopéniques et les sujets non sarcopéniques étudiés. 117
Tableau 13 : Régression logistique. 121
Tableau 14 : Teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en caroténoïdes des extraits de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO). 123
Tableau 15 : Composition en polyphénols des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO). 123
Tableau 16 : Composition en acide gras des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO). 124
Tableau 17 : Composition en phytostérols des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO). 125
Tableau 18 : Teneur en α-tocophérol des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon - marie (MTSO). 126
Tableau 19 : Mesure de l'activité antioxydante des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO). 127

Tableau 20 : Mesure des activités des enzymes antioxydantes, SOD et GPx, en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 139
Tableau 21 : Mesure des produits de peroxydation lipidique (MDA, DC) en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 142
Tableau 22 : Mesure de protéines carbonylées en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 143
Tableau 23 : Mesure des acides organiques en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7 cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol. 155
Tableau 24 : Mesure des acides gras à très long chaîne en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 172
Tableau 25 : Mesure des taux de cholestérol, de ses précurseurs et de ses dérivés oxydés en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol..... 177

LISTE DES ABRÉVIATIONS

•NO : Monoxyde d'azote

11β-HSD1 : 11β-hydroxysteroide dehydrogenase de type 1

11β-HSD2 : 11β-hydroxysteroide dehydrogenase de type 2

24S-OHC : 24S-hydroxycholestérol

25-OHC : 25-hydroxycholestérol

27-OHC : 27-hydroxycholestérol

4-HNE : 4- hydroxynonenal

4α-OHC : 4α-hydroxycholestérol

5α-OHC : 5α -hydroxycholestanol

5β-OHC : 5β-hydroxycholestanol

6α-OHC : 6α -hydroxycholestanol

6β-OHC : 6β-hydroxycholestanol

7KC : 7-cétocholestérol

7α-OHC : 7α-hydroxycholestérol

7β-OHC : 7β-hydroxycholestérol

8-OH-dG : 8-hydroxy-2'désoxyguanosine

AAPH : 2′–azo bis (2-amidinopropane)

ABCD3 : ATP-binding cassette transporter sub-type D3

ACOX1 : Acyl-CoA oxydase-1

ADNmt : ADN mitochondriale

AG : Acides gras

AGI : Acides insaturés

AGMI : Acides gras monoinsaturés

AGPI : Acides gras polyinsaturés

AGS : Acides gras saturés

AH : Atome d'hydrogéne

ALA : Acide alpha-linolénique

$AlCl_3$: Chlorure d'aluminium

AMPK : Adenosine monophosphate-activated protein kinase

ANT : Adenine nucleotide translocator

ATF : Acide trifluoroacétique

Atgs : Autophagy linked genes

ATP : Adénosine triphosphate

BF_3 : Méthanol-trifluorure de bore

BHT : Butylhydroxytoluène

BIA : Analyse de l'impédance bioélectrique

BID : BH3 interacting-domain death agonist

BSTFA : N, O-Bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide

CAD : Caspase Activated DNAse

CAT : Catalase

CH25H : Cholestérol 25-hydroxylase

CH_3COCl : Chlorure d'acétyle

CHOP : C/EBP-homologous protein

CMH : Chaîne lourde de la myosine

Co Q10 : Coenzyme Q10

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CPG-FID : Chromatographie en phase gazeuse - couplée à un détecteur à ionisation de flamme

CPG-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse

CRP : C-Reactive Protein

CS : cellules satellites

DC : Dièns conjugués

DCM : Dichlorométhane

DFO : Déféroxamine

DHA : Acide docosahexaénoïque

$DiOC_6$ (3) : Iodure de 3,3′-dihexyloxacarbocyanine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNPH : 2,4-dinitrophénylhydrazine

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl

Drp1 : Dynamin-related protein 1

DTNB : 5,5′-Dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)

DXA : Absorption biphotonique à rayons X

ECA : Enzyme de conversion de l'angiotensine

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

eIF2α : eukaryotic initiation factor 2 alpha

ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay

EPA : Acide eicosapentaénoïque

ERN : Espèces réactives de l'azote

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ETC : Chaîne de transport d'électrons

EWGSOP : European Working Group on Sarcopenia in Older People

FDA : Fluorescéine diacétate

Fe^{+2} : Fer ferreux

Fe^{+3} : Fer ferrique

$FeCl_2$: Chlorure ferreux

$FeCl_3$: Chlorure ferrique

FGF2 : Facteur de croissance des fibroblastes-2

FID : Flamme ionisation detection

Fis1 : Mitochondrial fission 1 protein),

FP : Force de préhension

FRAP : Ferric reducing-antioxidant power

GPx : Glutathion peroxydase

GPx1 : Glutathion peroxydase 1

GPx4 : Glutathion peroxydase 4

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion-disulfure

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

$H_3PMo_{12}O_{40}$: Acide phosphomolybdique

$H_3PW_{12}O_{40}$: Acide phosphotungstique

Hb : Hémoglobine

HDL : High Density Lipoprotein

HO˙ : Radical hydroxyl

HOCl : Acide hypochloreux

HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

HRP : Horse Radish Peroxidase

IC50 : 50% Inhibiting Concentration

ICAD : Inhibitor of Caspases Activated DNAse

IGF-1 : Insulin-like growth factor-1

IL-18 : Interleukine-18

IL-1β : Interleukine-1 beta

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

IMC : Indice de Masse Corporelle

IMF : Inter- myofibrillaires

IP : Iodure de propidium

IRM : Imagerie par résonance magnétique

IRS1 : Insulin receptor substrate 1

$K_3Fe(CN)_6$: Hexacyanoferrate de potassium

LDL : Low Density Lipoprotein

LTB-4 : Leucotriène B 4

LXR : Liver X receptor

MAFbx : Muscle Atrophy F-box

MDA : Malondialdéhyde

Mff : Mitochondrial fission factor

Mfn 1/2 : Mitofusin 1/2

MFP2 : Enzyme multifonctionnelle

Mn-SOD : SOD dépendante du manganèse

mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

MTSO : Milk thistle seed oil

MTT : Bromure de sel de tétrazolium 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5 diphényltétrazoilum

MuRF-1 : Muscle RING-finger protein-1

Na_2CO_3 : Carbonate de sodium

$Na_2HPO_412H_2O$: Phosphate de sodium dibasique dodécahydraté

$NaNO_2$: Nitrite de sodium

NBT : Nitro Bleu de Tétrazolium

NOX : NADPH oxydases

Nrf-2 : Facteur nucléaire E2

$O_2^{\bullet-}$: Anion superoxyde

O_3 : Ozone

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OPA1/2 : Mitochondrial Optic Atrophy 1/2

OXPHOS : Complexes de phosphorylation oxydative

PARP : Poly-ADP ribosome polymerase

PBS : Phosphate Buffered Saline

PC : Protéines carbonylées

PDK1 : Phosphoinositide-dependent protein kinase-1

PERK : Protein Kinase R-like ER Kinase

PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-OH kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PIPs : Phosphatidylinositol Phosphates

PKB : Protein Kinase B

PLSO : Pistacia lentiscus L seed oil

PMP70 : peroxisomal membrane protein 70-kD

RC : Restriction calorique

RE : Réticulum endoplasmique

Rheb : Ras homolog enriched in brain

ROR : Retinoic acid receptor-related orphan receptor

RS : Réticulum sarcoplasmique

RT : Retention time

SARC-F : Strength, Assistance in walking, Rise from a chair, Climb stairs, Falls

SC : Sérum de cheval

SFGG : Société Française de Gériatrie et Gérontologie

SIRT1 : Sirtuin 1

SOD : Superoxyde dismutase

SPPB : Short Physical Performance Battery'

SR101 : Sulforhodamine 101

SS : Sous-sarcolemme

SVF : Sérum de veau fœtal

TBA : thiobarbituric acid

TCA : Acide tricholoacétique

Tfam : Mitochondrial transcription factor A

TFEB : Transcription Factor EB

TfR1 : Transferrin Receptor 1

TG : Triglycéride

TLR4 : Toll-like receptor 4

TMB : Tétraméthylbenzine

TMCS : Trimethylsilyl chloride

TNF- α : Tumor necrosis factor-α

TORN : Targeted Organelle Nano Therapy

TSC1 : Tuberous Sceloris protein 1

TSC2 : Tuberous Sceloris protein 2

TUG : Timed Up & Go

Ulk1 : Unc-51-like kinase 1

UPR : Unfolded protein response

UPS : Système ubiquitine-protéasome

VDAC : Voltage-dependent anion channel

VLCFA : Acides gras à très longue chaîne

X-ALD : Adrénoleucodystrophie liée à l'X

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Vieillissement

Le vieillissement mondial s'accélère à un rythme sans précédent. Le nombre de personnes âgées de 65 ans et plus passera de 617,1 millions en 2015 à 1 milliard en 2035 **(W. He et al., 2016)**. La part de la population âgée continuera d'augmenter au cours des 20 années suivantes. En 2050, 16,7 % de la population mondiale sera composée de personnes âgées de 65 ans et plus, soit 1,6 milliards des personnes âgées dans le monde. Cela équivaut à une augmentation annuelle moyenne de 27,1 millions de personnes âgées entre 2015 et 2050. Contrairement à l'augmentation de la population âgée de 65 ans et plus, au cours des 33 prochaines années, la population des jeunes de moins de 20 ans devrait rester pratiquement stable, soit 2,5 milliards en 2015 et 2,6 milliards en 2050 **(W. He et al., 2016) (Figure 1)**. En 2018, pour la première fois dans l'humanité, le nombre de personnes âgées a dépassé celui des enfants âgés de moins de 5 ans **(Figure 2)** et, d'ici à 2050, il dépassera celui des adolescents et des jeunes (15-24 ans).

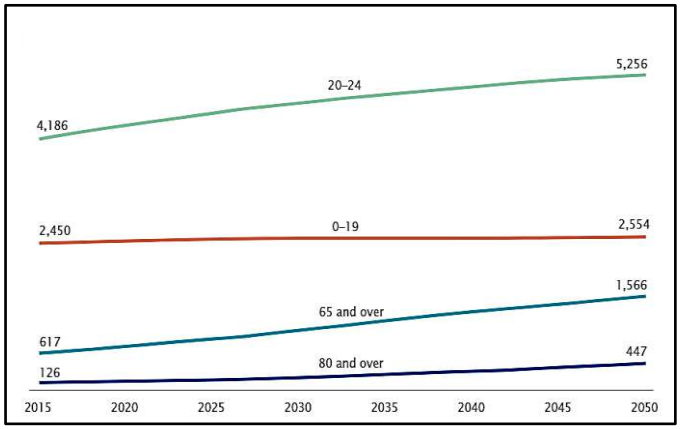


Figure 1 : Réparation de la population par tranches d'âges: 2015-2050 **(W. He et al., 2016).**

Le vieillissement mondial de la population observé est lié à deux causes principales : la baisse de la fécondité et l'augmentation de l'espérance de vie à la naissance et à un âge plus avancé. Au cours du dernier demi-siècle, l'indice de fécondité a diminué de près de 50 %, passant de 5,0 à 2,7 enfants par femme, et au cours du prochain demi-siècle, ce chiffre devrait encore baisser, pour atteindre 2,1 enfants par femme **(Puts et al., 2005)**. Une meilleure nutrition, une meilleure qualité de vie, la vaccination des enfants et l'amélioration du traitement médical des maladies chroniques, en particulier les maladies cardiovasculaires, ont permis

d'augmenter l'espérance de vie de la population d'âge moyen et de déplacer la mortalité vers les segments plus âgés de la population **(Fried et al., 2001)**.

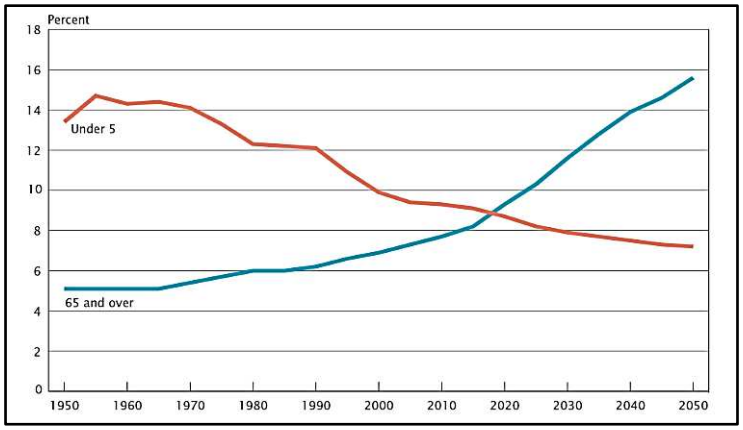


Figure 2 : Jeunes enfants et personnes âgées en pourcentage de la population mondiale: 1950-2050 **(W. He et al., 2016)**.

Le vieillissement est associé à la détérioration des cellules, à l'affaiblissement du système immunitaire et à la réduction de la capacité de l'organisme à se réparer, ce qui accroît la vulnérabilité aux maladies et à la mort **(Vasto et al., 2010)**. Parmi les affections courantes liées à l'âge figurent les troubles de la vision, la perte d'audition, l'arthrose, le diabète de type 2, les maladies pulmonaires chroniques, la dépression et les démences (**(Owsley, 2016) (Sesti et al., 2018) (Cho & Stout-Delgado, 2020) (Grande et al., 2020))**. Les personnes âgées sont aussi plus susceptibles de présenter des comorbidités et plusieurs états de santé complexes qui n'entrent pas dans des catégories de maladies spécifiques, plus communément appelés syndromes gériatriques **(Kurmaev et al., 2021)**. Les syndromes gériatriques sont les conséquences de multiples facteurs sous-jacents, notamment la fragilité. La Société Française de Gériatrie et Gérontologie (SFGG) a proposé en 2011 la définition suivante de la fragilité : « La fragilité est un syndrome clinique. Il reflète une diminution des capacités physiologiques de réserve qui altère les mécanismes d'adaptation au stress. Son expression clinique est modulée par les comorbidités et des facteurs psychologiques, sociaux, économiques et comportementaux. Le syndrome de fragilité est un marqueur de risque de mortalité et d'événements péjoratifs, notamment d'incapacités, de chutes, d'hospitalisation et d'entrée en institution. L'âge est un déterminant majeur de fragilité mais n'explique pas à lui seul ce syndrome. La prise en charge des déterminants de la fragilité peut réduire ou retarder ses conséquences. Ainsi, la fragilité s'inscrirait dans un processus potentiellement réversible » **(ROLLAND et al., 2011)**.

Ces syndromes gériatriques sont associés à un risque accru de chutes réduisant l'autonomie mais aussi à de l'incontinence urinaire et des comportements délirants. Chez les personnes âgées à mobilité réduite le risque d'escarres est fortement augmenté et réduit la durée de vie en augmentant le risque infectieux **(Polero et al., 2020)**. Récemment, la perte progressive de la masse, de la force et de la fonction musculaires, appelée sarcopénie, a été ajoutée à la liste des syndromes gériatriques **(Cruz-Jentoft, et al., 2010)**.

Dans le vieillissement, nous distinguons le vieillissement chronologique défini par l'âge de la personne et le vieillissement biologique qui est la résultante de facteurs génétiques et épigénétiques. Le vieillissement biologique n'est que relativement associé à l'âge, et seule une petite partie de la variation de la santé des personnes âgées est reflétée par les différences génétiques **(Brooks-Wilson, 2013)**. La plupart des résultats en matière de santé des personnes âgées sont le reflet des habitudes de vie (comportement alimentaires, activités physiques, liens sociaux), de l'environnement physique et social (pollution environnementale, pollution neuro-émotionnelle) **(Salazar-Barajas et al., 2017)**. S'attaquer aux problèmes liés au vieillissement est l'une des plus grandes priorités de santé publique actuelle, car le vieillissement de la population entrainent des transformations démographiques, médicales et sociales très importantes. C'est pourquoi l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a approuvé la proposition d'une "décennie du vieillissement en bonne santé 2020-2030" **(*Decade of Healthy Ageing (2021-2030*)**. L'OMS définit le vieillissement en bonne santé comme étant le processus de développement et de maintien des capacités fonctionnelles qui permet aux personnes âgées de jouir d'un état de bien-être et d'autonomie **(*Decade of Healthy Ageing (2021-2030)*)**.

Si nous souhaitons avoir un impact significatif sur les défis que représentent la réduction des handicaps et le maintien des capacités fonctionnelles au cours du vieillissement, nous devons prendre en compte que les déterminants de bon nombre de ces conditions peuvent commencer à tous les âges de la vie. L'OMS estime que plus de la moitié des problèmes de santé dont souffrent les personnes âgées pourraient être évités en modifiant leur mode de vie à un stade précoce. Bien vieillir consiste à prévenir les problèmes de santé et les handicaps, à maximiser la santé physique et mentale, le bien-être, l'indépendance, la capacité fonctionnelle, la résilience, la capacité intrinsèque et les liens sociaux **(Akiyama, 2020)**. Les zones bleues, la province sarde de Nuoro, l'île grecque d'Ikaria, l'île japonaise d'Okinawa, la péninsule de Nicoya au Costa Rica et Loma Linda en Californie, un terme inventé par Dan Buettner du National Geographic en 2005, sont des régions géographiques connues pour leur longévité exceptionnelle **(Buettner & Skemp, 2016)**. Il semble que l'activité physique modérée régulière

est l'une des principales raisons pour lesquelles les habitants des zones bleues vivent plus longtemps et en bonne santé **(Buettner & Skemp, 2016)**.

L'activité physique ralentit les changements physiologiques du vieillissement et améliore la qualité de vie liée à la santé **(Izquierdo et al., 2021)**. Dans l'optique d'un vieillissement sain, l'âge moyen (45-64 ans) est le moment idéal pour être actif, car l'inactivité physique à la fois à la mi-vie et à la vieillesse augmente de 1,6 fois les risques de déclin physique à partir de 65 ans **(Pluijm et al., 2007)**. Les adultes d'âge moyen, ayant une activité physique plus élevée à 46 ans, ont 1,5 fois plus de chances d'avoir une bonne santé à un âge plus avancé **(Niemelä et al., 2019)**.

L'augmentation rapide du nombre d'adultes âgés exerce une pression sur les systèmes de soins de santé dans le monde entier. Des interventions ciblées axées sur la prévention des syndromes gériatriques sont nécessaires pour réduire la charge sur le système de soins de santé et améliorer la qualité de vie des personnes âgées. Dans le cas de la sarcopénie, intervenir plus tôt dans la vie et plus tôt dans la progression de la maladie pourrait avoir d'importantes implications en matière de santé publique, car les personnes âgées atteintes de sarcopénie sont régulièrement signalées comme ayant une fonction physique, une santé globale et une survie plus faibles que les personnes non sarcopéniques **((Santilli et al., 2014) (Dhillon & Hasni, 2017))**.

II. Vieillissement musculaire

Le corps humain est composé au total d'environ 700 muscles qui représentent près de 40 % de la masse corporelle **(Collins, 2017)**. Les muscles se divisent en trois grandes familles : les muscles lisses, squelettiques et le muscle cardiaque.

Au sein de l'organisme, les muscles squelettiques représentent la grande majorité des muscles du corps humain. Ce sont eux qui sont concernés par la sarcopénie. Ils assument plusieurs fonctions corporelles. D'un point de vue mécanique, la principale fonction du muscle squelettique est de transformer l'énergie chimique en énergie mécanique (ou contraction musculaire) afin de générer de la force et de la puissance, de maintenir la posture et de produire des mouvements qui influencent l'activité, permettent de participer à la vie sociale et professionnelle, maintiennent ou améliorent la santé et contribuent à l'indépendance fonctionnelle. D'un point de vue métabolique, les rôles des muscles squelettiques incluent une contribution au métabolisme énergétique de base, le stockage de substrats importants tels que les acides aminés et les hydrates de carbone, la production de chaleur pour le maintien de la

température centrale, et la consommation de la majorité de l'oxygène et du carburant utilisés pendant l'activité physique et pendant l'exercice **(Frontera & Ochala, 2015)**.

Alors que la masse et la fonction musculaires augmentent au cours des premières années de la vie, nous observons une perte progressive de la masse musculaire à partir de 40 ans environ **(Casati et al., 2019)**. Cette perte de masse musculaire liée à l'âge est un fait normal dans le processus de vieillissement. L'être humain perd entre à 1 à 2 % de masse musculaire par an entre 50 et 60 ans, ce qui peut entraîner une diminution de 25 à 30 % de la masse musculaire à l'âge de 70 ans **(von Haehling et al., 2012)**.

Le déclin de la force musculaire est plus rapide que le déclin de la masse musculaire, s'élevant à 1,5 % par an entre 50 et 60 ans, pour atteindre 3% par an à partir de 60 ans **(von Haehling et al., 2010)**. Cette perte progressive de muscle squelettique est définie comme la sarcopénie et se caractérise par une atrophie musculaire et une réduction de la performance métabolique. Ces caractéristiques de la sarcopénie entrainent mauvaise qualité de vie liée à une augmentation des chutes et des factures, au handicap et à la perte d'autonomie ce qui favorise la mortalité **(Dhillon & Hasni, 2017)**. Ce phénomène d'atrophie est associé à des modifications du tissu musculaire, notamment une réduction du nombre et de la taille des fibres musculaires. Des coupes transversales des muscles ont montré une réduction plus marquée pour les fibres de type IIa (oxydatives et glycolytiques) et de type IIb (glycolytique) que pour les fibres de type I (oxydatives) au cours du vieillissement **(Jubrias et al., 1997) (Figure 3)**.

Jeune âgé de 25 ans Personne âgée de 65 ans

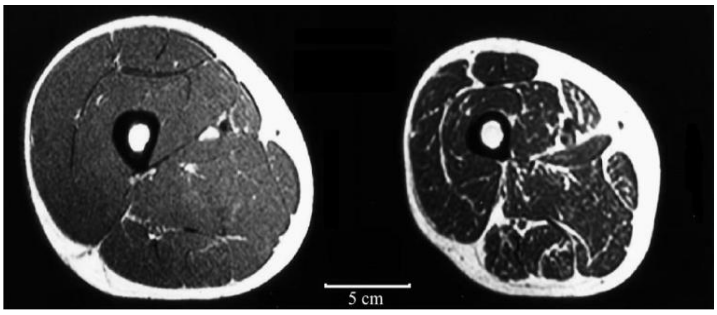


Figure 3 : Effet du vieillissement sur le muscle squelettique. Imagerie par Résonnance Magnétique à mi-cuisse d'un jeune âgé de 25 ans (à gauche) et d'une personne âgée de 65 ans (à droite) **(Jubrias et al., 1997)**. *En noir les fibres de type I, en blanc les fibres de type IIA, et en gris les fibres de type IIB. Nous notons une réduction de la taille des fibres avec l'âge plus marquée pour les fibres de type II.*

Au niveau anatomique, le muscle squelettique est composé d'un ensemble d'unités contractiles élémentaires appelées fibres musculaires (myofibres), disposées en faisceaux et composées elles même de petites fibres nommées myofibrilles. Les fibres musculaires (actine, myosine) sont responsables de la structure et de l'intégrité du cytosquelette, de la régulation homéostatique et de la performance contractile du tissu **(Hoppeler et al., 1973)**.

Chaque fibre musculaire est délimitée par une membrane cellulaire appelée sarcolemme, qui abrite le sarcoplasme contenant des nombreux noyaux répartis à la périphérie de la cellule, des myofibrilles qui constituent le support de la contraction musculaire, des mitochondries ainsi que d'autres organites plus ou moins spécialisés. Chaque myofibrille est composée d'une chaîne d'unités contractiles répétitives appelées sarcomères. Ces derniers se caractérisent par l'association, en une trame hexagonale, de filaments protéiques fins (actine) et épais (myosine). C'est le glissement des filaments les uns sur les autres qui réalise la contraction des myofibrilles. L'unité sarcomère est définie comme la distance entre les disques Z adjacents. Les disques Z (Zwischen-Scheibe, qui signifie disque intermédiaire) divisent en deux les bandes I (bandes isotropes). Les bandes I sont la région qui se compose uniquement de filaments fins. La zone H (zone Hele-Scheibe) ne contient que des filaments épais et la ligne centrale M (ligne médiane). La bande A (anisotrope) comprend la zone H et les parties sombres de part et d'autre qui montrent les régions où les filaments épais et fins interagissent.

Pendant la contraction, chaque unité de sarcomère est raccourcie par la traction des filaments fins vers le centre du sarcomère. Le raccourcissement combiné de chaque unité de sarcomère entraîne la contraction musculaire. Le muscle, les faisceaux ainsi que les fibres musculaires sont délimités par des lames basales conjonctives respectivement appelées épimysium, périmysium, et endomysium. Toutes ces enveloppes conjonctives fusionnent entre elles à l'extrémité du muscle pour former les tendons qui attachent le muscle à l'os **(Figure 4)**.

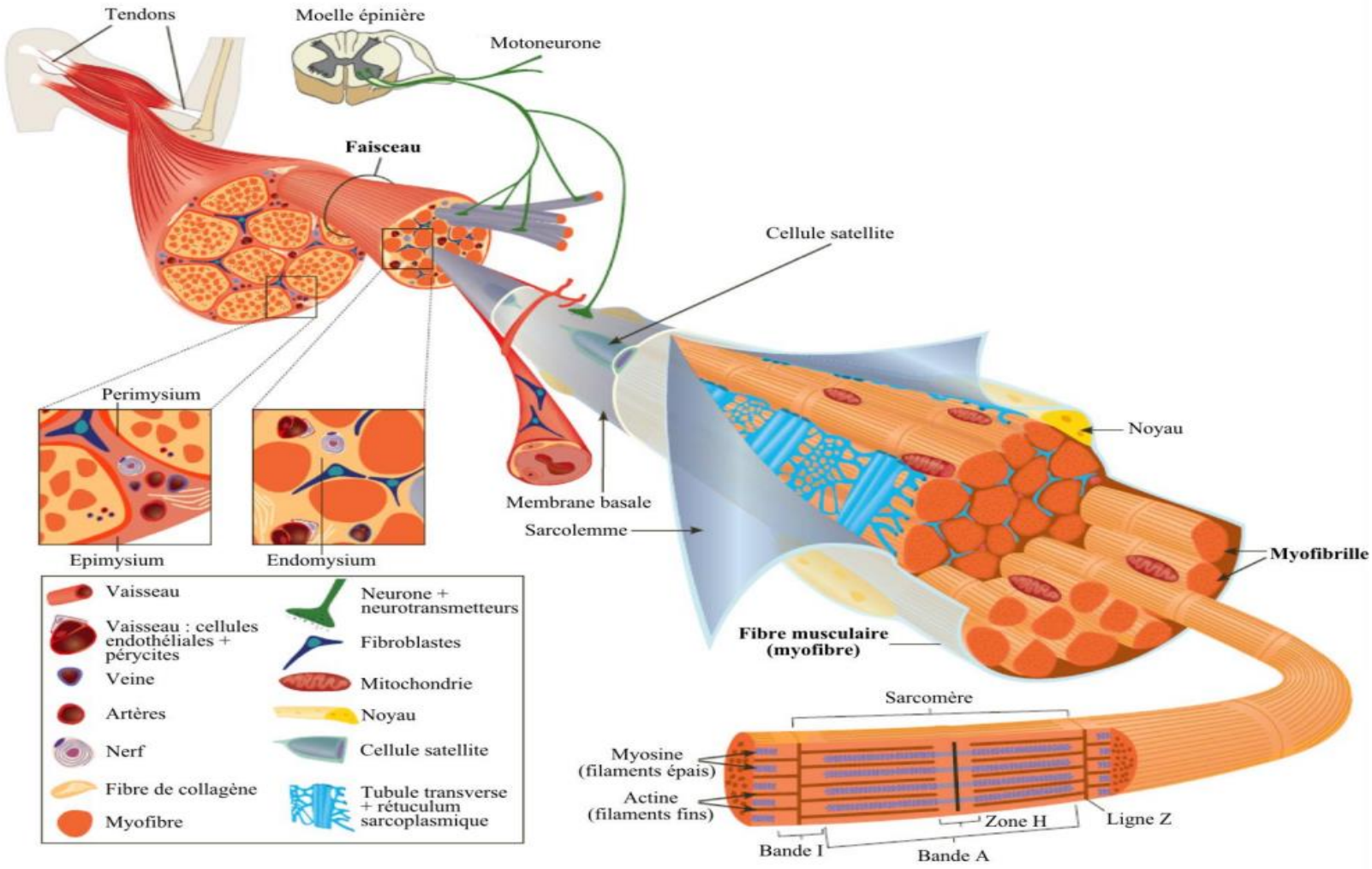


Figure 4 : Représentation schématique du muscle squelettique **(Tajbakhsh, 2009)**.

2. Myogenèse d'une fibre musculaire

La différenciation myogénique est un processus séquentiel hautement régulé qui permet de générer des muscles squelettiques matures. Ce processus est initié à partir de précurseurs musculaires appelés myoblastes, qui proviennent du mésoderme somatique **(Hughes, 2001).** Les myoblastes fusionnent entre elles en myotubes multinucléés. Ces derniers se différencient en fibres musculaires matures et synthétisent des protéines myofibrillaires (myosine, actine, titine, α-actinine, etc) pour former des myofilaments fonctionnels **(Lluís et al., 2006)**, où les noyaux sont déplacés contre le sarcolemme **(Figure 5)**.

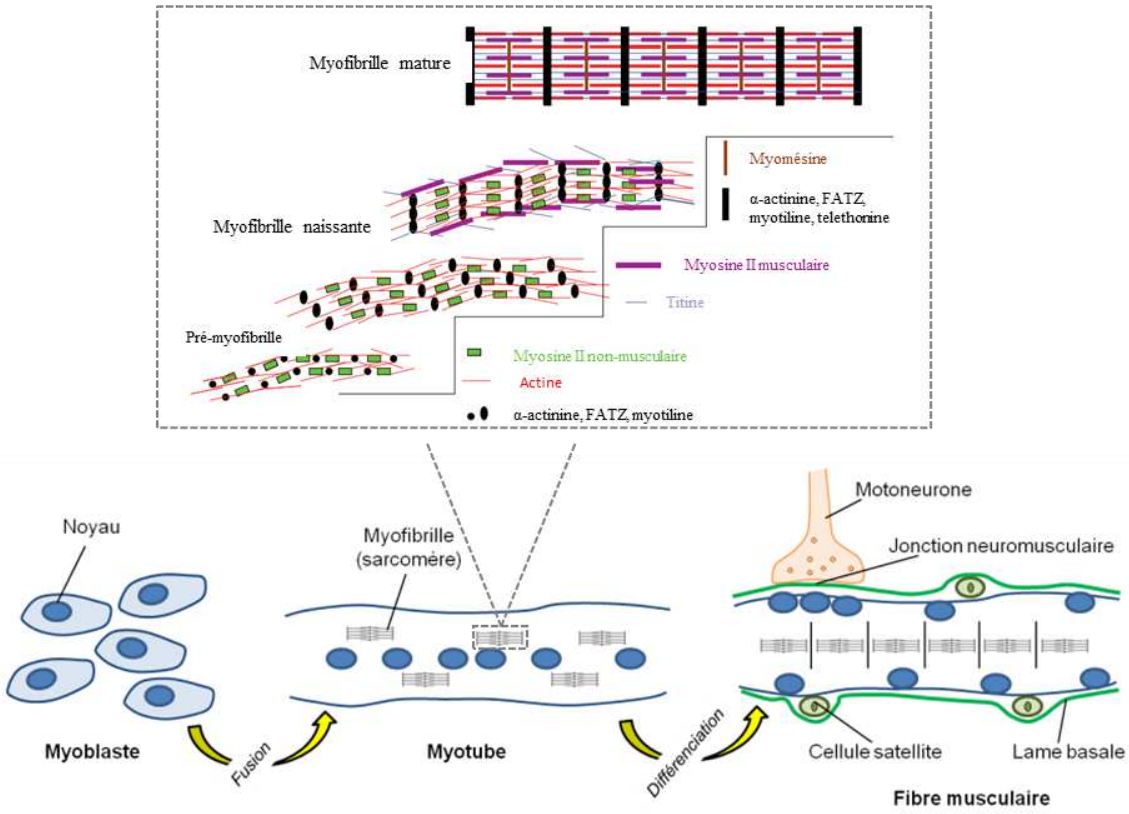


Figure 5 : Différenciation myogénique et myofibrillogenèse **(Sanger et al., 2010)**.

Au tout début de la différenciation, les myotubes en croissances indiquent la présence de fines fibres le long des surfaces membranaires aux extrémités et sur les côtés. Ces fibres fines sont appelées pré-myofibrilles. Ces derniers sont caractérisés par des mini-sarcomères délimités par des corps en Z contenant de l'α-actinine qui se présente sous forme de points denses espacés régulièrement le long de pré-myofibrilles **(Sanger et al., 1986)**. Les filaments

d'actine sont reliés à ces corps en Z et aux mini-bandes A composées de filaments de myosine II non-musculaires. Les myofibrilles naissantes se forment lorsque les pré-myofibrilles s'alignent et sont modifiées par l'ajout de filaments de titine et de myosine II musculaire **(Sanger et al., 2010)**. Au fur et à mesure que les myofibrilles matures se forment, les points denses d'α-actinine fusionnent pour former les lignes Z, la myosine non-musculaire est perdue et les protéines de liaison à la myosine (protéine C et myomésine) sont incorporées dans des bandes A alignées **(Figure 5)**. Ces changements permettent d'aboutir à des myofibrilles matures composées de sarcomères fonctionnels **((Rhee et al., 1994) (J. W. Sanger et al., 2010)**). Des cellules satellites sont également trouvées entre le sarcolemme et la lame basale de chaque myofibrille. En cas de lésions, ces cellules-souches passent d'un état de quiescence à un stade de multiplication et réenclenchent la myogenèse **(Relaix & Zammit, 2012)**.

3. Sarcopénie

3.1. Définition

De nombreuses définitions de la sarcopénie ont été introduites depuis que le nom sarcopénie a été proposé en 1988. La sarcopénie est souvent décrite comme une pathologie associée au vieillissement caractérisée par la diminution progressive et généralisée de la masse et de la fonction musculaire squelettique liée à l'âge, associée à un risque accru d'effets indésirables, chutes en particulier **(Cruz-Jentoft, Baeyens, et al., 2010)**. Il n'existe toujours pas de consensus sur la définition exacte, sur les critères spécifiques et sur les outils de dépistage de la sarcopénie.

L'une des premières définitions de la sarcopénie a été donnée en 1988 par Baumgartner et al. qui ont défini la sarcopénie comme étant la diminution d'au moins deux écarts-types de la masse musculaire squelettique (Masse musculaire appendiculaire [kg]/taille^2 [m^2]) par rapport à une population de référence âgée d'environ 30 ans pour diagnostiquer la sarcopénie **(Baumgartner et al., 1998)**. Près de 12 ans plus tard, le Groupe de Travail Européen sur la Sarcopénie des Populations âgées (EWGSOP : European Working Group on Sarcopenia in Older People) a proposé la définition suivante : « La sarcopénie est un syndrome caractérisé par une perte progressive et généralisée de la masse, la force, et la fonction musculaire squelettique, avec un risque d'effets indésirables tels que l'incapacité physique, une mauvaise qualité de vie et la mort » **(Cruz-Jentoft et al., 2010).** Cette nouvelle définition ne limite plus la sarcopénie à une simple diminution de la masse musculaire, mais l'élargit à une altération de la force et de la performance fonctionnelle du muscle. L'EWGSOP a mis à jour sa définition

début 2019, afin de refléter les preuves scientifiques et cliniques publiées depuis sa première définition en 2010. Cette révision du consensus met la force musculaire au cœur du diagnostic, et la performance physique comme indice de gravité **(Cruz-Jentoft et al., 2019).**

3.2. Méthodes de mesure de la sarcopénie

Du fait de l'absence de consensus dans la définition du modèle de sarcopénie, il existe une multitude de méthodes de mesures pour estimer les trois aspects de la sarcopénie : la masse musculaire, la force musculaire et la performance physique. Or, il est nécessaire de trouver une méthode de mesure fiable, reproductible et pratique en situation clinique pour dépister ce syndrome gériatrique, pour pouvoir suivre son évolution et prévenir les complications du vieillissement par des mesures adaptées aux personnes âgées.

3.2.1. Méthodes d'évaluation de la masse musculaire

Un large panel de techniques peut être utilisé pour estimer la masse musculaire ou la masse maigre d'un individu : la tomographie (CT-scan), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'analyse de l'impédance bioélectrique (BIA), et l'absorption biphotonique à rayons X (DXA).

Le CT-scan et l'IRM sont considérés comme étant les techniques d'imagerie médicale les plus précises et les seules capables de mesurer l'infiltration de graisse et les composants non contractiles dans le muscle squelettique et donc de déterminer la qualité du muscle **((Simoneau et al., 1995) (Kent-Braun et al., 2000))**. En raison de l'exposition à des radiations ionisantes associées à ces techniques, du matériel sophistiqué est nécessaire et du personnel spécialisé est requis ; ces techniques ne sont pas utilisées en pratique clinique courante.

La BIA est une méthode couramment utilisée pour mesurer la résistance des tissus biologiques au passage d'un courant de faible intensité à travers des électrodes et des algorithmes permettent de distinguer la composition des masses grasses et maigres. Cependant, la BIA présente une grande erreur de prédiction individuelle pour l'estimation de la masse musculaire squelettique, car sa fiabilité est influencée par de multiples facteurs tels que des facteurs liés à l'appareil (la variabilité intra-instrumentale / inter-instrumentale), des facteurs liés à l'opérateur (la variabilité intra-opérateur / inter-opérateur), les facteurs liés au sujet (l'âge, l'origine ethnique, le poids corporel et la température, l'activité récente, l'état de jeûne mais surtout l'hydratation,), et les facteurs liés à l'environnement (la température ambiante) **(Kiefer et al., 2022)**.

La DXA reste la méthode de référence la plus attrayante à la fois pour la recherche et pour l'utilisation clinique afin de mesurer la composition corporelle, dont les masses osseuses, grasses et maigres **(Buckinx et al., 2018)**. Cette méthode expose à des niveaux de radiation moins élevés que l'IRM et le CT-scan avec une bonne exactitude de la mesure. Malheureusement, l'équipement n'est pas portable, ce qui limite son utilisation aux grands hôpitaux.

3.2.2. Méthodes de mesure de la force musculaire

La force de préhension (FP), également appelée la force de la poignée main, mesurée à l'aide d'un dynamomètre, est un bon indicateur de la force maximale volontaire de la main (Grip Strength Test). Ce test d'agrippement est aussi un test de référence chez la souris et le rat (gripping test). Cette méthode présente une corrélation avec la force des autres parties du corps évaluées parle couple de force de l'extension du genou et par la coupe transversale en imagerie de la surface du muscle du mollet. La FP est un substitut fiable pour des mesures plus complexes de la force des bras et des jambes **(Lauretani et al., 2003)**. En raison de sa facilité d'utilisation, la FP est recommandée pour une utilisation de routine dans les hôpitaux, dans les établissements cliniques spécialisés et dans les maisons de santé **((Leong et al., 2015) (Ibrahim et al., 2016) (Cruz-Jentoft et al., 2019))**.

3.2.3. Méthodes de mesure de la performance physique

La performance physique peut être mesurée par plusieurs tests proposés par l'EWGSOP **(Cruz-Jentoft et al., 2010)** comme le 'Short Physical Performance Battery' (SPPB), la vitesse de marche et le 'Timed-Up and Go' (TUG) test.

Le SPPB est un test composite d'évaluation des performances physiques, évaluant la présence d'une instabilité posturale (test d'équilibre), d'une faiblesse musculaire des membres inférieurs (test de lever de chaise) et une réduction de la vitesse de marche (test de vitesse de marche). Un score inférieur à 8 sur un total de 12 est en faveur d'une sarcopénie **((Cruz-Jentoft, et al., 2010) (Beaudart et al., 2016))**.

La vitesse de marche sur 4 mètres est le test le plus facile et rapide à réaliser ; c'est le test le plus utilisé en pratique **(Cruz-Jentoft, et al., 2010)**. Selon des études menées sur des différentes cohortes de populations, une vitesse maximale inférieure à 0,8 m/s sur un test de 4 m est associée à une sarcopénie

Le test TUG est la version chronométrée du 'get up and go' test. Celui-ci est validé et recommandé pour évaluer le risque de chute. Il consiste à faire se lever le patient pour se rendre à un point situé à trois mètres, faire demi-tour puis revenir s'asseoir sur la chaise **(Barry et al., 2014)**. Un temps supérieur à 20 secondes est un indicateur de risque de chute élevé.

3.2.4. Méthode diagnostique à l'aide de questionnaire

Le questionnaire 'Strength, Assistance in walking, Rise from a chair, Climb stairs, Falls' SARC-F **(Annexe I)** a été validé pour le dépistage des patients sarcopéniques **(Woo et al., 2014)**. Il comporte une série de cinq questions évaluant la force musculaire, les troubles de la marche, le lever de chaise, la montée des escaliers et les chutes. Un score de quatre ou plus, sur dix, indique une personne à risque de sarcopénie. Cet outil a une moyenne sensibilité (75 %) mais une bonne spécificité (85 %) **(Joerger et al., 2016)**. Par conséquent, ce questionnaire n'est pas un bon outil pour le dépistage précoce de la sarcopénie. Son utilisation est néanmoins recommandée afin de commencer à intégrer le dépistage de la sarcopénie en pratique clinique.

Parmi ces méthodes, pour le travail de Thèse, le questionnaire SARC-F et le test du 'Timed Up & Go' ont été choisis pour dépister et déterminer la sévérité de la sarcopénie.

3.3. Facteurs de risques associés au développement de la sarcopénie

Les facteurs conduisant à la sarcopénie sont complexes, multidimensionnels et reposent à la fois sur l'aspect nutritionnel, l'activité physique, la dépression, et les facteurs environnementaux (isolement et solitude).

3.3.1. Aspect nutritionnel

La malnutrition est considérée comme un facteur contributif important dans l'étiologie de la sarcopénie **(Lardiés-Sánchez & París, 2017)**. Les personnes âgées ont besoin de plus de protéines alimentaires que les adultes. Un déséquilibre entre l'apport en protéines et les besoins en protéines peut entraîner une perte de masse musculaire squelettique en raison d'une perturbation chronique de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines musculaires. En conséquence, les personnes âgées peuvent perdre de la masse musculaire et de la force et éventuellement présenter une faible masse musculaire et osseuse **((X. Meng et al., 2009) (Houston et al., 2009) (Cruz-Jentoft et al., 2017))**. Un apport protéique alimentaire est indispensable pour lutter contre le développement de la sarcopénie. La supplémentation en acides aminés essentiels, notamment la leucine, semble particulièrement prometteuse contre la sarcopénie. La leucine est un déclencheur clé de la synthèse protéique musculaire postprandiale,

agissant via la voie mTOR **(Ge et al., 2009)**. La consommation d'acides aminés essentiels enrichis en leucine, augmente la synthèse protéique musculaire et atténue les douleurs musculaires après l'exercice **(Kato et al., 2015)**. Par conséquent, la supplémentation en leucine a des effets remarquables sur la préservation de la masse musculaire et la fonction physique chez les personnes âgées dont leur apport alimentaire est réduit **(Yoshimura et al., 2019)**.

3.3.2. Activité physique

L'activité physique joue également un rôle majeur. Plusieurs études montrent que l'exercice et l'activité physique sont efficaces pour diminuer le déclin de la masse, de la force et de la fonction musculaires **((Cruz-Jentoft et al., 2010) (Cruz-Jentoft et al., 2014) (Morley et al., 2014))**. L'activité physique entraîne une contraction des muscles, et cette contraction stimule la libération de facteurs de croissance musculaire (facteurs biochimiques et mécaniques). La libération des facteurs de croissance musculaire active les cellules satellites et permet la synthèse des protéines, ce qui entraîne la régénérescence musculaire (**(Kamel, 2003) (Cruz-Jentoft et al., 2010) (Morley et al., 2014))**. Les personnes physiquement inactives ou ayant un mode de vie sédentaire sont moins à même de stimuler le processus de régénérescence musculaire, ce qui les rend plus susceptibles pour développer une sarcopénie **((Morley, 2012) (Gianoudis et al., 2015))**.

3.3.3. Dépression

La dépression est aussi très fréquente chez les personnes âgées. La littérature indique que la dépression peut activer le système immunitaire, ce qui augmente la production de cytokines inflammatoires et de protéine C-réactive (CRP). L'activation des processus inflammatoires amplifie les conditions cataboliques chroniques et réduit la masse musculaire chez les personnes âgées **(da Silva Alexandre et al., 2014)**. La dépression amplifie les facteurs de risques associés à la sarcopénie (inactivité physique, malnutrition et processus inflammatoires). La dépression, lorsqu'elle est combinée à d'autres facteurs, tels que l'âge avancé, les comorbidités et un soutien social inadéquat, peut aggraver et accélérer les difficultés relatives concernant la masse, la force et la fonction musculaire.

3.3.4. Facteurs environnementaux : isolement et solitude

L'isolement et la solitude des personnes âgées sont des phénomènes fréquents qui ont des conséquences néfastes sur leur santé physique et mentale. En effet, la famille et les amis sont une source importante de soutien pour les personnes âgées atteintes de maladies chroniques, ce qui conduit à une plus grande adhésion à l'autogestion **(S.-Y. Chen & Wang,**

2007). Le système de soutien social fonctionne comme une ressource environnementale qui facilite l'autogestion en répondant aux besoins d'interaction sociale et en renforçant la motivation de l'individu. Le soutien social est considéré comme l'un des facteurs les plus importants qui influent sur la relation entre l'auto-efficacité (self-efficacy) et les comportements d'autogestion et qui permettent de prédire la santé physique des personnes âgées **(Gallant, 2003)**. L'appartenance à un réseau social de soutien a des effets bénéfiques sur la motivation, le bien-être psychologique et l'autogestion **((Gallant, 2003) (S.-Y. Chen & Wang, 2007))**. Les personnes âgées qui ont un mauvais système de soutien social sont plus à même à s'isoler, à déprimer et à être inactives, alors que les aînés qui bénéficient d'un fort soutien social sont moins susceptibles de mener un mode de vie inactif et à être déprimés **(Wallace et al., 2015)**. Ces conséquences négatives d'un mauvais soutien social et l'isolement peuvent avoir un impact négatif sur la fonction physique et le statut musculaire chez les personnes âgées. Des systèmes de soutien sociaux forts pour les personnes âgées sont liés à un risque réduit de déficits de mobilité et de dépression, ce qui suggère qu'un soutien social fort peut réduire ou prévenir l'invalidité chez les personnes âgées **(Wallace et al., 2015)**.

4. Mécanisme cellulaires et systémiques à l'origine de la sarcopénie

Le développement de traitements ou de stratégies efficaces pour prévenir et/ou lutter contre la sarcopénie nécessite une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et systémiques impliquées dans son apparition et son développement.

Bien que la physiopathologie exacte de ce syndrome gériatrique ne soit pas encore claire, une combinaison de facteurs et de mécanismes est associée à l'apparition et à la progression du déclin de la masse, de la force et de la fonction musculaire. L'altération de la régénérescence musculaire, le déséquilibre du turnover protéique ainsi que le dérèglement du processus apoptotique sont considérés comme les mécanismes cellulaires centraux responsables du développement de la sarcopénie. Ces derniers sont eux-mêmes dépendants de plusieurs facteurs systémiques et cellulaires : altération de la fonction des mitochondries et du métabolisme des lipides, élévation du stress oxydant, augmentation de cytokines pro-inflammatoires. La compréhension de ces mécanismes constitue un véritable enjeu dans la prévention de la sarcopénie.

4.1. Altération de la régénérescence musculaire

Les cellules-souches musculaires, également appelées cellules satellites (CS), sont les principaux contributeurs à la régénérescence musculaire après une blessure ou une maladie

(Domingues-Faria et al., 2016). Les CS ont été découvertes par Alexander Mauro en 1961 **(Mauro, 1961)**. Ces cellules sont situées dans une niche fermée par une membrane entre le sarcolemme et la lame basale entourant les myofibres. Ces dernières jouent un rôle fondamental dans la réparation et la croissance des muscles **(Narici & Maffulli, 2010)**. Les CS musculaires restent quiescentes dans des conditions normales **(Chang & Rudnicki, 2014)**. Lorsque le muscle est endommagé par une blessure ou une maladie dégénérative comme la dystrophie musculaire, les CS s'activent et commencent le processus de régénérescence.

Le processus de régénérescence des muscles squelettiques peut être divisé en plusieurs phases : la nécrose de la cellule musculaire lésée, la phase inflammatoire, la phase d'activation et de différenciation des CS musculaires, et la phase de maturation des fibres musculaires, au cours de laquelle se produit le remodelage de fibres musculaires **(Figure 6)**.

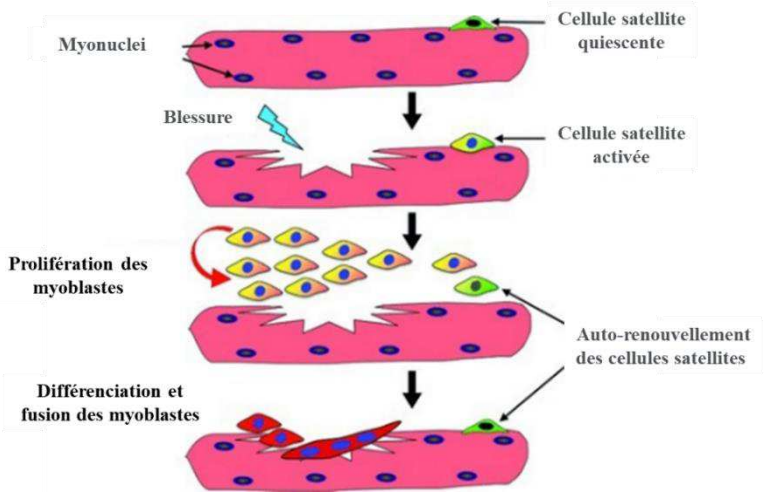


Figure 6 : Cellules satellites et régénération des muscles squelettiques **(Olguín & Pisconti, 2012)**.

Au stade précoce de la régénérescence musculaire, les cellules musculaires lésées subissent une nécrose en réponse à un traumatisme. Cela s'accompagne d'une augmentation de l'influx de calcium et de la libération de calcium du réticulum sarcoplasmique de la myofibre endommagée, ce qui induit à son tour l'infiltration de nombreux types de cellules immunitaires **((Chazaud et al., 2003) (W. Yang & Hu, 2018b))**. Les cellules immunitaires infiltrées, telles que les mastocytes et les neutrophiles, peuvent aider à éliminer les myofibres endommagées au site de la blessure. Pendant ce temps, les cellules immunitaires peuvent également sécréter divers types de cytokines pour recruter davantage de cellules immunitaires comme les macrophages. Ces cellules immunitaires peuvent déclencher une cascade de réponses

cellulaires pour réguler les CS, la prolifération, la différenciation et finalement la fusion et la réinnervation des fibres musculaires régénérées **(Tidball et al., 2014)**. Les changements liés à l'âge, tant dans le microenvironnement que dans les myoblastes, peuvent entraver ces processus importants chez les personnes atteintes de sarcopénie.

Avec le vieillissement, le nombre de cellules satellites par myofibre diminue ainsi que sa capacité de régénérescence **(Domingues-Faria et al., 2016)**. Chez l'Homme, il semble que le pool de CS se maintienne jusqu'à environ 70 ans puis décline **((Sajko et al., 2004) (Kadi et al., 2004) (Dreyer et al., 2006) (Verdijk et al., 2007) (Petrella et al., 2008))**. Cette diminution a été spécifiquement observée pour les cellules satellites associées aux myofibres de type II, ce qui coïncide avec le développement préférentiel de la sarcopénie **((Verdijk et al., 2007) (Domingues-Faria et al., 2016))**. Très probablement, cela serait associé à une diminution du taux de prolifération et de croissance en raison de plusieurs phénomènes liés à l'âge tels que le temps de doublement prolongé des cellules satellites, une réponse réduite aux stimuli proliférants et une réduction de la longueur des télomères tout au long des cycles de prolifération **((Cade & Yarasheski, 2006) (Domingues-Faria et al., 2016))**. La diminution de la capacité prolifération des CS musculaires avec l'âge est encore favorisée par l'augmentation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire. Les cellules satellites âgées produisent constitutivement le facteur de croissance des fibroblastes-2 (FGF2), même en l'absence de blessure, entraînant une quiescence perturbée des cellules souches et une altération de la capacité d'auto-renouvellement **(Domingues-Faria et al., 2016)**. Outre la prolifération, la capacité de différenciation des cellules satellites est également diminuée avec l'âge **(Domingues-Faria et al., 2016)**, et elle est associée à un nombre réduit de cellules en différenciation et à une expression altérée des protéines de différenciation tels que Myf-5, MyoD, Myogénine et MRF4/Myf6 **((Domingues-Faria et al., 2016) (Wiedmer et al., 2021))**. La rupture de la quiescence des CS et l'initiation de la prolifération sont médiées par Notch, un récepteur transmembranaire **(Carlson et al., 2009)**. Avec le vieillissement, l'activation de Notch diminue en raison d'une baisse de l'activité de la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK), ce qui réduit l'activation des cellules satellites. Ce processus est aggravé par une augmentation des niveaux du TGF-β qui provoque l'accumulation de la kinase dépendante de la cycline, ce qui inhibe les cellules satellites et réduit leur capacité régénératives **(Carlson et al., 2009)**.

4.2. Altération du 'turnover' protéique

Le déséquilibre du 'turnover' protéique, c'est-à-dire la balance entre la synthèse et la dégradation des protéines, constitue aussi un facteur clé la sarcopénie. La synthèse et la dégradation des protéines sont régulées par des voies différentes présentant certains chevauchements.

4.2.1. Synthèse protéique

La voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt (PKB)/ mTOR (Phosphatidyl Inositol-3-OH kinase - Protein Kinase B - mammalian Target Of Rapamycin) constitue la principale voie de régulation de la synthèse des protéines dont l'activation par l'entraînement en résistance ou l'ingestion de protéines garantit le maintien ou l'augmentation de la masse musculaire **(Bodine et al., 2001)**.

L'activation de la PI3K est stimulée par le facteur de croissance IGF-1 (Insulin-like growth factor-1). Cela conduit à une augmentation de l'activité d'Akt **(Rommel et al., 2001).** Cette liaison permet la phosphorylation du récepteur, qui est nécessaire au recrutement de son substrat IRS1 (Insulin receptor substrate 1) **(François & Trojan, 2001)**. Cela conduit à stimuler la protéine PI3K qui phosphoryle les PIPs (Phosphatidylinositol Phosphates) localisés dans la membrane cellulaire, transformant le PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) qui à son tour active la PDK1 (Phosphoinositide-dependent protein kinase-1) qui finalement active la protéine kinase B (Akt) **(Schiaffino & Mammucari, 2011)**. Ensuite, Akt inhibe le complexe TSC1 (Tuberous Sceloris protein 1) / TSC2 (Tuberous Sceloris protein 2) **(Inoki et al 2003)** permettant à la GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain) de stimuler la protéine mTOR **(J. Huang & Manning, 2009)**. L'interaction de mTOR avec différentes protéines permet la formation des complexes mTORC1 et mTORC2, qui jouent un rôle central dans la cascade de signalisation **(Laplante & Sabatini, 2009)**. Les cibles finales de mTOR, comme 4E-BP1 et P70S6K permettent la biogenèse ribosomale et la traduction protéique **(Laplante & Sabatini, 2009)**. De plus, l'activation de PI3K/Akt empêche la dégradation des protéines dans le muscle squelettique en phosphorylant les facteurs de transcription FOXO qui deviennent alors inactifs (Fork head box O). Lorsque ces facteurs FOXO sont phosphorylés, ils sont incapables de transloquer dans le noyau, empêchant l'expression des gènes liés à la protéolyse, tels que les ligases musculaires MuRF-1 (Muscle RING-finger protein-1) et MAFbx (Muscle Atrophy F-box) **(Figure 7)**. Par

conséquent, l'IGF-1 stimule à la fois la synthèse des protéines et la prolifération des cellules satellites, tout en supprimant la dégradation des protéines **(Philippou et al., 2007).**

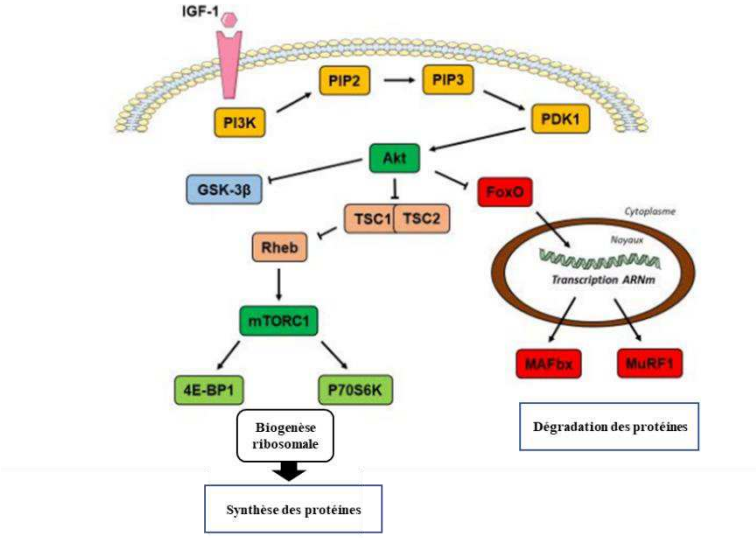


Figure 7 : Voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt /mTOR.

Au cours du vieillissement, la diminution de la masse musculaire caractéristique de la sarcopénie est associée à une diminution de la sensibilité des myocytes à l'insuline. Cette diminution observée chez les personnes âgées peut être due à une augmentation du stockage ectopique des lipides, par exemple des céramides, dans le muscle **((Slawik & Vidal-Puig, 2007) (Tardif et al., 2014))**, accompagnée d'une altération de l'activité mitochondriale et de la synthèse des protéines musculaires **(Tardif et al., 2014)**. De plus, une fonction endothéliale réduite peut contribuer à une diminution de la sensibilité à l'insuline, mais elle peut être restaurée par la co-administration de nitroprussiate de sodium (un vasodilatateur) avec un repas riche en protéines **(Tardif et al., 2014)**. D'autres données suggèrent que la signalisation réduite du coactivateur PGC-1α, impliquée dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, résulte d'une sensibilité réduite à l'insuline et d'une diminution de l'expression d'Akt et de mTOR **(Wiedmer et al., 2021)**. De multiples études menées chez les rongeurs et chez l'humain ont rapporté des taux plus faibles de synthèse protéique musculaire chez les personnes âgées et les rongeurs âgés **((Haddad & Adams, 2006) (Léger et al., 2008) (Paturi et al., 2010) (Fry & Rasmussen, 2011))**. Il a été rapporté une diminution de la synthèse de protéines de contraction (chaîne lourde de la myosine, CMH) au cours du vieillissement, qui a été corrélée avec les concentrations plasmatiques d'IGF-1, la masse musculaire et la force **(Balagopal et al., 1997)**.

Cette diminution de la synthèse du CMH est au moins due à une diminution de la transcription, car les quantités d'ARN des différentes isoformes sont diminuées au cours du le vieillissement, en particulier les isoformes du CMH IIa et CMH IIx **(Short, Vittone, et al., 2005)**, mais il est également bien établi que l'efficacité de la traduction est diminuée chez les personnes âgées **(Haddad & Adams, 2006)**. Dans l'ensemble, cela met en évidence l'importance de la fonction anabolique protéique dans la pathologie de la sarcopénie.

4.2.2. Dégradation protéique

La dégradation intracellulaire des protéines ou protéolyse musculaire peut être la conséquence de plusieurs mécanismes : mort cellulaire (apoptose, ferroptose, pyroptose), autophagie, et système ubiquitine-protéasome.

4.2.2.1. Mort cellulaire

- **Apoptose**

L'apoptose est un processus de mort cellulaire contrôlée par deux voies : une voie extrinsèque impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs de mort (TNF (Tumor necrosis factor), Fas, TRAIL), et une voie intrinsèque (spécifique de l'inducteur utilisé) aboutissant aux mitochondries. Les deux voies conduisent à l'activation de caspases qui sont des protéases spécifiques contenant une cystéine au niveau de leur site actif et clivant les protéines cibles en aval des aspartates **(Marzetti et al., 2012)**. L'initiation de l'apoptose par la voie extrinsèque active des caspases initiatrices, comme la caspase-8 et la caspase-10. La voie intrinsèque, active la caspase-3 ou -7 via la caspase-9 activée par l'apoptosome, une structure multimèrique constituée d'APAF-1, de dATP et de cytochrome-c. La voie extrinsèque est connectée à la mitochondrie par la protéine cytosolique BID (BH3 interacting-domain death agonist). Ces voies extrinsèques et intrinsèques aboutissent à la dégradation d'ICAD (Inhibitor of Caspases Activated DNAse) qui libère CAD (Caspase Activated DNAse) ce qui conduit à la fragmentation internucléosomale de l'ADN (multiple de 100-200 paires de bases). Ces caspases -3 et -7 dégradent aussi PARP (poly-ADP ribosome polymerase) qui contribuent à la réparation de l'ADN. Ces caspases dégradent aussi la lamine (protéine de la membrane nucléaire) ce qui conduit à la fragmentation nucléaire qui fait suite à la condensation nucléaire, elle-même précédée d'une marginalisation périnucléaire de la chromatine. L'étape ultime est la formation de corps apoptotiques associée à une protéolyse (nécrose secondaire faisant suite à l'apoptose). Les corps apoptotiques et les cellules dégradées sont ensuite phagocytés par les macrophages ou des cellules avoisinantes normales. Les deux grandes voies extrinsèques et intrinsèques sont

connectées par l'intermédiaire d'une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (la protéine BID). Ces deux voies se rejoignent au niveau de la mitochondrie pour contribuer à sa dépolarisation **(Figure 8)**.

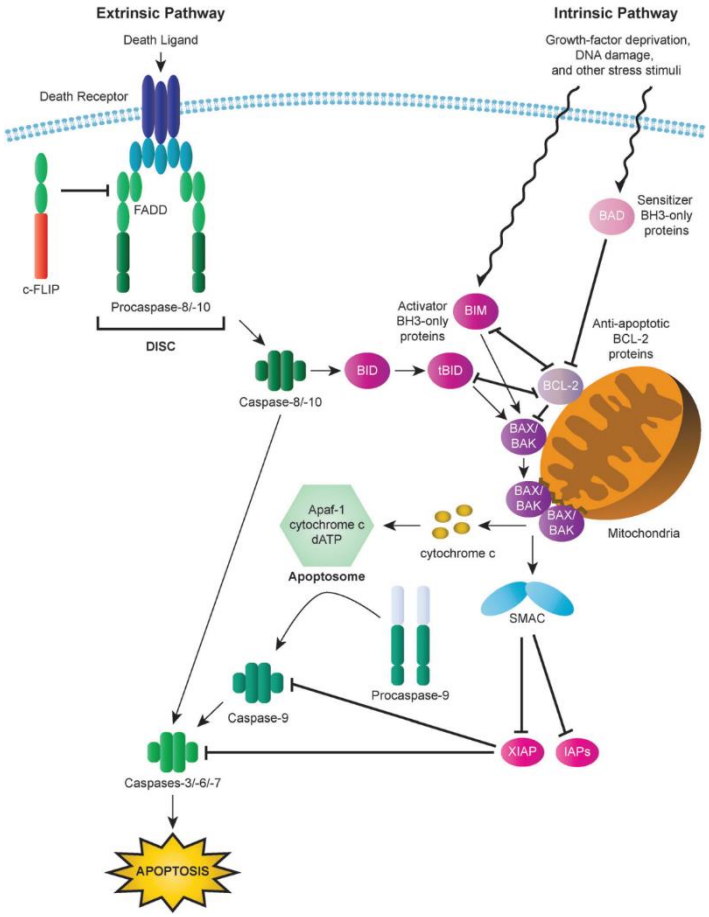


Figure 8 : Les deux principales voies apoptotiques : voie extrinsèque et voie intrinsèque **(Plati et al., 2011).**

Au cours de la sarcopénie, l'apoptose dans le muscle squelettique vieillissant pourrait impliquer les voies extrinsèques et intrinsèques. L'implication de la voie extrinsèque fait intervenir le TNF-α qui peut déclencher l'apoptose dans les fibres musculaires squelettiques de type II par rapport à celles de type I. L'apoptose induite par le TNF-α est liée à une réduction de la masse musculaire, de la surface de section transversale et du nombre de fibres **(Phillips & Leeuwenburgh, 2005)**. La voie intrinsèque mitochondriale a également été étudiée dans les muscles squelettiques âgés. En effet, par rapport aux muscles jeunes, les mitochondries des muscles squelettiques âgés présentent une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et d'espèces réactives de l'azote (ERN) plus élevée et une internalisation de Ca^{2+} plus faible, avec pour conséquence l'ouverture du mPTP (mitochondrial permeability transition

pore), la libération de cytochrome-c et la fragmentation internucléosomale de l'ADN, marqueurs de l'apoptose **((Chabi et al., 2008) (Gouspillou et al., 2014))**. Il est à noter que l'entraînement (activité physique) diminue la libération de protéines pro-apoptotiques mitochondriales et la fragmentation internucléosomale de l'ADN qui en résulte (**(Song et al., 2006) (Adhihetty et al., 2007))**. Dans les muscles squelettiques âgés, le dysfonctionnement mitochondrial déclenche aussi une voie indépendante des caspases qui favorise la perte de qualité du muscle **(Otera & Mihara, 2011)**. De plus, la signalisation apoptotique dans le muscle squelettique est associée à une altération de la masse et des performances musculaires chez les personnes âgées **(Mishra & Chan, 2016)**. L'apoptose provoquée par le dysfonctionnement des mitochondries dans les cellules musculaires squelettiques représente une cible thérapeutique pour lutter contre la sarcopénie, comme l'indiquent des études *in vitro* et *in vivo* **((Salucci et al., 2017) (Sayed et al., 2018))**.

D'autres types de mort cellulaire en relation avec la sarcopénie mériteraient plus d'attention à savoir : la ferroptose et pyroptose.

- **Ferroptose**

La ferroptose est une forme de mort cellulaire récemment décrite ; l'érastine est une imidazole cétone qui induit ce type de mort sur des cellules tumorales **(Dixon et al., 2012)**. La ferroptose est une mort cellulaire dépendante du fer, caractérisée par l'accumulation intracellulaire de peroxydes lipidiques et un déséquilibre de l'homéostasie RedOx **(Dixon et al., 2012)**. Elle représente des caractéristiques morphologiques, biochimiques et génétiques différentes des autres formes de mort cellulaire , qui sont notamment l'apoptose et la nécrose **((Dixon & Stockwell, 2014) (W. S. Yang et al., 2016))**. La perte de protection contre la peroxydation lipidique par la glutathion peroxydase 4 (GPx4), la présence de fer libre et l'oxydation des phospholipides contenant des acides gras polyinsaturés sont considérées comme les caractéristiques de la ferroptose. Cette dernière peut être inhibée par la ferrostatine-1 (antioxydant neutralisant les radicaux peroxyls) et la déféroxamine (DFO) (chélateur du fer intracellulaire) **((Friedmann Angeli et al., 2014) (W. S. Yang & Stockwell, 2016))**. L'induction de la ferroptose implique divers événements, notamment l'activation des canaux ioniques mitochondriaux et des protéines kinases activées par les mitogènes, la régulation positive du stress du réticulum, l'inhibition d'un antiport cystine / glutamate entraînant finalement la peroxydation lipidique **(Y. Xie et al., 2016) (Figure 9)**. Un nombre croissant d'études ont démontré que la ferroptose contribue aux processus physiopathologiques de multiples maladies, y compris les cancers **(W. S. Yang et al., 2014),** les maladies

neurodégénératives **(Skouta et al., 2014),** l'insuffisance rénale aiguë **(Linkermann et al., 2014)** et la sarcopénie **(Y. Huang et al., 2021)**.

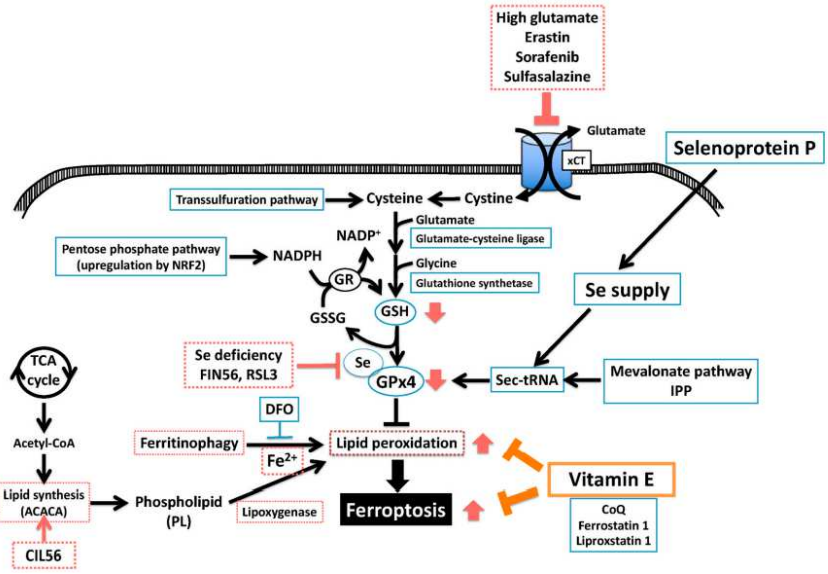


Figure 9 : La ferroptose et ses voies **(Saito, 2021).** La ferroptose est une forme distincte de mort cellulaire impliquant une peroxydation lipidique dépendante du fer. Les antioxydants lipophiles piégeurs de radicaux, tels que la vitamine E et le coenzyme Q (CoQ), le chélateur du fer, la déféroxamine (DFO), la sélénoprotéine glutathion (GSH) peroxydase 4 (GPx4) et la voie de synthèse du GSH ont été identifiés comme des inhibiteurs de la ferroptose. La voie de la transsulfuration (apport de cystéine), la voie du pentose phosphate (apport de NADPH) et la voie du mévalonate (apport d'isopentényl diphosphate [IPP], pour la synthèse de l'ARNt sélénocystéine) sont liées à la protection contre la ferroptose. La lipoxygénase, la ferritinophagie (la dégradation du fer) et la synthèse des lipides via l'acétyl-CoA carboxylase 1 (ACACA) sont liées à l'exécution de la ferroptose.

- **Pyroptose**

La pyroptose est une forme de mort cellulaire pro-inflammatoire associée à une activation de l'inflammasone conduisant à une surproduction d'IL 1-β qui peut conduire à des lésions musculaires squelettiques **(L. Wang et al., 2021)**. Ce type de mort cellulaire est souvent observée dans des macrophages et peut être déclenchée par des infections bactériennes et des pathogènes. L'une des caractéristiques essentielles de la pyroptose est la nécessité d'une activation de la caspase-1. La caspase-1 est responsable de la maturation de cytokines pro-inflammatoires telles que L'IL-1β (Interleukine-1 beta) et l'IL-18 (Interleukine-18) par des voies dépendantes de l'inflammation faisant intervenir l'inflammasome. Les cellules qui

subissent une pyroptose libèrent des quantités élevées d'IL-1 β et d'IL-18. L'exécution de la pyroptose peut également nécessiter la caspase-7. La mort cellulaire par pyroptose s'accompagne de la formation de pores membranaires, de gonflement du cytoplasme et de la fuite du contenu cytosolique. Les cellules en pyroptose peuvent également présenter une fragmentation de l'ADN et une condensation nucléaire **(Ryter & Choi, 2014)**.

4.2.2.2. Autophagie

Sous le terme "autophagie" nous trouvons trois types de processus: la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes **(Xu et al., 2021)**. La plupart des données sur le rôle du processus autophagique dans le muscle squelettique sont liées à la macro-autophagie. La macro-autophagie est une voie majeure du catabolisme lysosomale qui apparaît comme un régulateur important de la masse musculaire. Elle recycle les organites endommagés (mitochondrie, peroxysome, réticulum endoplasmique) et génère des substrats métaboliques nécessaires au maintien de l'activité cellulaire basale **((Sandri, 2010) (Xia et al., 2021))**. L'autophagie est la seule voie capable de dégrader massivement les organites et les macromolécules pour fournir des nutriments, c'est un processus de recyclage physiologique pour prévenir des déficits nutritionnels **(Klionsky & Emr, 2000)**. Elle repose sur l'action de deux vésicules, i) l'autophagosome formé à partir du phagophore issu du réticulum endoplasmique, qui capture les organites et/ou les macromolécules, et ii) le lysosome, qui dans une étape ultérieure fusionne avec l'autophagosome pour donner l'autophagolysosome (ou autolysosome) qui permet de dégrader les éléments qu'il contient (organites, macromolécules) grâce aux enzymes protéolytiques fournies par le lysosome **(Levine & Klionsky, 2004)**. Le complexe Ulk1-Atg13-FIP200 joue un rôle clé dans l'initiation de l'autophagie. Ulk1 (Unc-51-like kinase 1) peut être phosphorylé par mTORC ou AMPK, ce qui conduit à l'inhibition de l'autophagie ; lorsque mTORC est inhibé (rapamycine, resvératrol, tamoxifène), l'autophagie est activée au niveau de Ulk **(C. H. Jung et al., 2010)**. La formation de l'autophagosome implique l'action de divers protéines Atgs (Autophagy linked genes, gènes liés à l'autophagie) telles que LC3-I et LC3-II, essentiel à l'allongement du phagophore et à la formation d'un autophagosome mature. Ensuite, la fusion autophagosome et lysosome conduit à la formation de l'autolysosome. Cette étape fait intervenir une proteine membranire lysosomale, Lamp-2 **(Huynh et al., 2007)**. Cette fusion conduit à l'exposition du contenu de l'autophagosome aux protéases lysosomales, comme par exemple les cathepsines, ce qui entraine une dégradation protéolytique **(Bechet et al., 2005) (Figure 10)**.

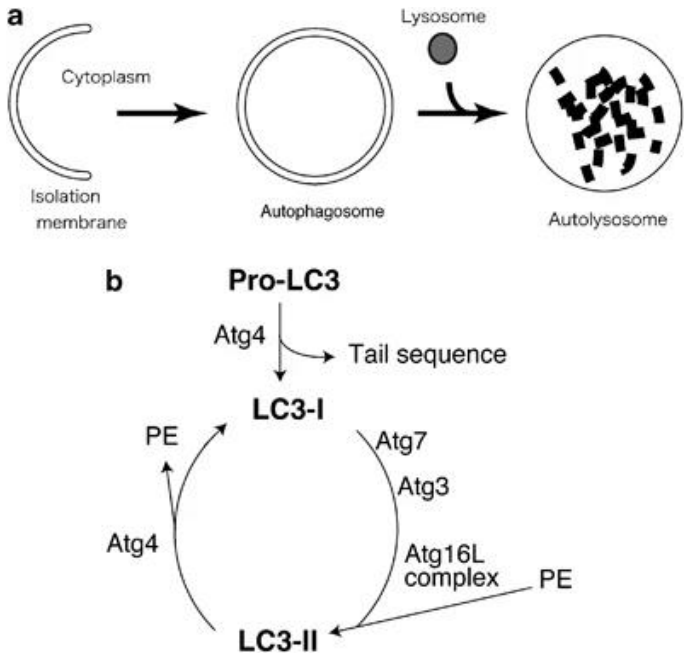


Figure 10 : Autophagie et activation de LC3 (Noda et al., 2009). a) Étapes représentatives de l'autophagie. La membrane du phagophore piège une partie du cytosol et conduit à la formation d'un autophagosome. L'autophagosome fusionne avec le lysosome pour devenir un autolysosome (aussi appelé autophagolysosome) et son contenu est dégradé. **b)** Voie d'activation de LC3. La traduction de LC3 à partir de l'ARNm conduit à pro-LC3 dont la structure C-terminale sera clivée par la protéase Atg4 pour générer LC3-I, qui possède une glycine C-terminale. Ensuite, LC3-I est activée par Atg7 (E1) pour devenir un intermédiaire thio-ester à haute énergie conjugué à l'enzyme Atg3 (E2). Le conjugué Atg3-LC3 est recruté sur le site où se produit la lipidation en se liant directement au complexe Atg16L, et l'extrémité C-terminale de LC3 pour former une liaison la phosphatidyléthanolamine (PE), générant la forme LC3-II. LC3-II peut alors se fixer à la membrane du phagophore. Dans certains cas, LC3-II peut redonner LC3-I via Atg4.

L'autophagie est essentielle au maintien de l'homéostasie musculaire. Un déficit de ce processus déclenche l'accumulation de protéines endommagées et favorise l'augmentation d'ERO et d'ERN dans le muscle, l'activation de l'apoptose et une détérioration des structures intracellulaires ce qui a pour conséquence une atrophie musculaire et, dans certains cas, une dégénérescence musculaire et des myopathies **((Carnio et al., 2014) (Pal et al., 2014) (Xia et al., 2021))**. Toutefois, la suractivité du système autophagique peut conduire à l'amyotrophie **((J. Zhao et al., 2007) (Sandri, 2010) (Lai et al., 2022))**.

Une autophagie excessive est fortement associée à la perte de muscle squelettique **(Petrovski & Das, 2010)**. Comme les processus autophagiques favorisent l'atrophie des myofibres chez les jeunes, son inhibition pourrait être une stratégie efficace pour prévenir la sarcopénie. Des études ont montré que la voie lysosomale autophagique diminue au cours du vieillissement musculaire **(J. Zhou et al., 2017)**. En conséquence, stimuler l'autophagie basale protégerait contre le dysfonctionnement musculaire lié à l'âge en favorisant la dégradation sélective des protéines mal repliées et des organites endommagés **(Jiao & Demontis, 2017)**.

4.3. Système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) constitue la principale voie de dégradation des protéines intracellulaires et non lysosomales jouant un rôle clé dans l'atrophie des muscles squelettiques **(Chopard et al., 2009)**. 70 à 90 % des protéines mal repliées ou endommagées sont dégradées par l'UPS **((T. Jung et al., 2009) (Wiedmer et al., 2021))**. Ce système est un processus bien régulé comprenant plusieurs étapes **(Figure 11)**. La première étape consiste à activer l'ubiquitine libre par une enzyme d'activation, l'ubiquitine (E1) via une réaction dépendante de l'ATP. Ensuite, l'ubiquitine active est transférée à une enzyme de conjugaison l'ubiquitine (E2) et fixée à une protéine cible par l'action d'une enzyme ubiquitine-ligase (E3) (par exemple MuRF1 (Muscle Ring Finger Protein 1) et MAFbx (Muscle Atrophy F-box également connue sous le nom d'Atrogin 1) aboutissant à la formation d'une chaine polyubiquitinée. Enfin, la protéine polyubiquitinée est reconnue par le protéasome 26S et dégradée en petits peptides et en acides aminés. Les enzymes de désubiquitination (DUBs) inversent le processus d'ubiquitination en détachant les chaînes de polyubiquitine des protéines afin de maintenir stables les niveaux d'ubiquitine intracellulaires **(Zou & Lin, 2021)**.

Les données existantes concernant le fonctionnement de ce système ubiquitine-protéasome dans le muscle âgé suggèrent son implication dans le développement de la sarcopénie. En effet, plusieurs études ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de cette voie avait la capacité de limiter la perte de la masse musculaire liée à l'inactivité physique **((Beehler et al., 2006) (Caron et al., 2011) (Jamart et al., 2011))**. Cette ubiquination des protéines est assurée par un système complexe d'enzymes dans lequel les E3-ubiquitine ligases MAFbx et MuRF-1 jouent un rôle important au cours de l'atrophie musculaire **((de Palma et al., 2008) (Haberecht-Müller et al., 2021))**. De manière intéressante, plusieurs études ont ainsi montré que le niveaux d'expression des gènes MAFbx et MuRF-1 augmentaient dans le muscle âgé **((Clavel et al., 2006) (Hepple et al., 2008) (Altun et al., 2010))**. Cependant,

d'autres études ont montré que le contenu du protéasome 26S était augmenté dans le muscle avec l'âge **(Altun et al., 2010)**.

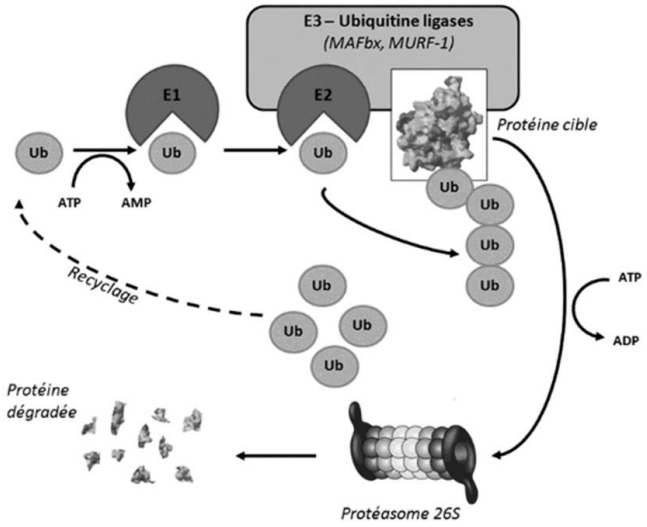


Figure 11 : Système ubiquitine-protéasome **(Brioche, 2014).**

5. Implication de l'inflammation dans la sarcopénie

L'inflammation chronique est l'une des principales causes contribuant au développement de la sarcopénie **((Fan et al., 2016) (Han et al., 2018))**. Les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α (tumor necrosis factor-α) et l'IL-6 (interleukine-6), et la protéine C-réactive (CRP) sont considérés comme les marqueurs cytokiniques inflammatoires les plus puissants associés à la sarcopénie **(Chhetri et al., 2018)**. Ainsi, des taux sériques élevés d'IL-6 **((Ershler & Keller, 2000) (Bian et al., 2017) (Rachim et al., 2020))** , de TNF-α (**(Greiwe et al., 2001) (Bian et al., 2017) (Hammami et al., 2020))**, et de CRP **((Bano et al., 2017) (Hammami et al., 2020))** ont été constatés chez les patients âgés sarcopéniques.

Le rôle potentiel de l'IL-6 dans la sarcopénie est complexe. Chez les personnes non infectées, le muscle est considéré comme une source majeure d'IL-6 circulante. L'expression de l'IL-6 augmente de manière aiguë lors de la contraction du muscle squelettique et est libérée après l'exercice **(Steensberg et al., 2000)**, améliorant le métabolisme musculaire, l'oxydation des acides gras et l'absorption du glucose **(Kelly et al., 2009)**. Cependant, il existe de plus en plus de preuves qui montrent que l'IL-6 peut agir via le système ubiquitine-protéasome, avec une augmentation de l'IL-6 associée à une augmentation de la protéine ubiquitine **(DeJong et**

al., 2005), de la protéine ligase E3 **(White et al., 2012)** et de l'activité du protéasome **(Ebisui et al., 1995)**. De plus, l'IL-6 peut induire une résistance à l'insuline qui supprime l'activité Akt-mTOR contribuant à diminuer le taux de protéines musculaires **(Franckhauser et al., 2008)**.

Le TNF-α est une autre cytokine pro-inflammatoire présente dans le microenvironnement du muscle squelettique **(W. Yang & Hu, 2018a)**. Il est impliqué dans la perturbation métabolique de l'inflammation chronique, la lipolyse et la protéolyse conduisant à une diminution des protéines, des lipides et de glycogène dans le muscle squelettique **(Girven et al., 2016).** Au cours des étapes de régénérescence musculaire, le TNF-α est observé dans le muscle lésé associé à une accumulation de macrophages **((Otis et al., 2014) (Fan et al., 2016) (Fan et al., 2016))**. Plusieurs études ont confirmé que le TNF-α à un niveau élevé peut augmenter le catabolisme protéique dans le muscle squelettique en réprimant la voie Akt/mTOR **(D.-T. Wang et al., 2014).** Le TNF-α et ses récepteurs solubles ont été décrits comme d'importants contributeurs ou biomarqueurs de la perte de masse et de la force dans le muscle squelettique âgé **(Schaap et al., 2009)**. Il existe une corrélation négative entre la dégradation des protéines et la concentration en TNF-α chez les personnes âgées **(Greiwe et al., 2001)**. L'injection de TNF-α à des souris a révélé l'activation du système ubiquitine-protéasome et la diminution de la fonction musculaire squelettique **(Song et al., 2006)**. *In vivo*, le taux de synthèse de la chaîne lourde de la myosine (CMH) est corrélé négativement avec l'expression du TNF-α dans le muscle squelettique. Le TNF-α induit une perte de muscle squelettique par une dégradation accrue des protéines myofibrillaires et une apoptose cellulaire, entraînant ainsi une atrophie musculaire et l'inhibition de la régénérescence musculaire (Q. Zhao et al., 2015) **(Coletti et al., 2005).** De plus, il semble que le TNF-α puisse antagoniser l'effet anabolisant du facteur de croissance de l'insuline-1 (IGF-1), en raison du développement de la résistance à l'hormone de croissance, qui diminue à la fois l'IGF-1 circulant et musculaire **((Frost & Lang, 2007) (Lang et al., 2007))**.

Des niveaux élevés de CRP, reflétant une inflammation chronique, sont aussi associés à une réduction de la masse et de la force musculaire **(Carmeli, 2020)**, et à une diminution de la capacité physiologique ainsi qu'à davantage de difficultés à effectuer les activités de la vie quotidienne **((Schaap et al., 2009) (Hammami et al., 2020))**. Les niveaux de CRP sont négativement associés à la masse corporelle maigre appendiculaire **(Cesari et al., 2004)**. De plus, les niveaux accrus de peroxydation lipidique entraînent la dégradation des phospholipides dans le sarcolemme et la membrane mitochondriale, réduisant l'activité mitochondriale, la β-oxydation des acides gras et la production d'ATP. Les dommages aux mitochondries

augmentent également la formation d'espèces réactives de l'oxygène telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyl ($HO^{\bullet}$), et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), suivis par une augmentation de la production et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α et IL-1, -6, et -8 qui déclenchent une cascade de production de cytokines inflammatoires ce qui aggravent la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique, entraînant une diminution de la capacité aérobie **(Bano et al., 2017)**.

Il est donc important d'explorer les cytokines pro-inflammatoires liées à la sarcopénie, car elles sont d'une grande valeur pour le diagnostic et la mise en place de mesures d'interventions cliniques.

6. Intervention du stress oxydant dans la sarcopénie

6.1. Généralité sur le stress oxydant

Notre organisme produit en permanence des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des espèces réactives de l'azote (ERN) appelées radicaux libres résultant du métabolisme oxydatif de l'oxygène et de l'azote. Ces dernières peuvent être de nature radicalaire (par exemple, l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le radical hydroxyle $HO^{\bullet}$, le monoxyde d'azote $^{\bullet}NO$ ou non radicalaires (par exemple, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2). Les espèces radicalaires sont des atomes ou des molécules, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dans leur orbitale externe. La présence d'un électron célibataire (non apparié) confère aux radicaux libres une grande réactivité. En raison de cette grande réactivité, les ERO et ERN ont une durée de vie moyenne très courte, allant d'un milliardième de seconde (par exemple 10^{-9}s pour le $HO^{\bullet}$) à quelques secondes (par exemple 3-5s pour le $^{\bullet}NO$).

Dans les conditions physiologiques normales, les ERO et les ERN sont produits en faibles quantités pour intervenir dans les processus de signalisation cellulaire qui régulent diverses fonctions physiologiques, telles que la production d'énergie, la fonction immunitaire ou la contraction musculaire **((Reid et al., 1993) (Gomes et al., 2017))**. Cette production basale est contrôlée par les défenses antioxydantes enzymatiques (GPx, SOD, Catalase, glutathion réductase) ou non-enzymatiques (Vitamines A, C et E, caroténoïdes et polyphénols) limitant les dommages oxydatifs. Nous parlons alors d'un équilibre de la balance "oxydants-antioxydants". Si les défenses antioxydantes ne sont plus à même de contrôler la production de radicaux libres, une surproduction d'ERO et ERN contribue aux dysfonctionnements cellulaires en réagissant avec les macromolécules cellulaires, induisant l'altération des acides nucléiques, la peroxydation lipidique, ou encore la modification des protéines (carbonylation protéique). Il

se produit alors un déséquilibre de la balance "oxydants-antioxydants" conduisant à une rupture de homéostasie RedOx aboutissant au stress oxydant.

6.2. Stress oxydant dans le muscle âgé

Le stress oxydant est un facteur déterminant de la perte de masse et de force musculaire liée à l'âge. Les ERO peuvent provoquer la perte progressive ou la dégradation de la structure et/ou de la fonction des muscles squelettiques ce qui mène au développement de la sarcopénie. En fait, le muscle squelettique est un organe particulièrement vulnérable au stress oxydant, son besoin accru en oxygène par rapport à d'autres organes, favorise l'augmentation de la production des radicaux libres. L'équilibre "oxydants-antioxydants" joue un rôle décisif dans le maintien de l'homéostasie RedOx dans le muscle squelettique.

6.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Une grande variété d'ERO est constamment produite dans le muscle squelettique pendant le repos et la contraction **(Henríquez-Olguín et al., 2019).** Les espèces les plus importantes sont $O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, et H_2O_2. De nombreuses données indiquent que le vieillissement et l'inactivité physique sont associés à un déséquilibre la balance "oxydants-antioxydants", en faveur des oxydants dans le muscle squelettique. Chez l'Homme comme chez les rongeurs, de nombreuses études ont montré que le muscle squelettique âgé présente une production accrue d'$O_2^{\bullet-}$, et d'H_2O_2 **((Capel et al., 2005) (Vasilaki et al., 2006) (Thompson, 2009) (Derbré et al., 2014) (Pileggi et al., 2018))**. Le muscle squelettique possède plusieurs sources d'ERO : de multiples organites, notamment les mitochondries, les peroxysomes, et le réticulum endoplasmique en produisent **(Dickinson & Chang, 2011)**. De nombreuses enzymes cytosoliques telles que les NADPH oxydases, les xanthine oxydases et les monoamine oxydases génèrent également de l'$O_2^{\bullet-}$ localement **(Powers & Jackson, 2008)**.

6.2.1.1. Les sources d'ERO au niveau mitochondrial

La mitochondrie est considérée comme la principale source de production d'$O_2^{\bullet-}$ dans les fibres musculaires squelettiques. En effet, 2-5 % de la totalité de l'oxygène consommé par les mitochondries pouvaient subir une réduction monovalente aboutie à la génération d'$O_2^{\bullet-}$ (Inoue et al., 2003). L'anion $O_2^{\bullet-}$ est le chef de file des ERO. En effet, cet anion va conduire à la formation de nombreuses autres ERO dans de la matrice ou dans l'espace intermembranaire mitochondriale. L'$O_2^{\bullet-}$ est rapidement et spontanément converti en H_2O_2 sous l'action de la SOD dépendante du manganèse (Mn-SOD ; SOD2) qui est principalement située dans la matrice mitochondriale **(Boveris & Chance, 1973)**. Ensuite, H_2O_2 peut être dégradé en O_2 et

H_2O par l'action de la glutathion peroxydase 1 (GPx1). H_2O_2 peut être aussi transformée en $HO^{\bullet}$ en présence de fer (Fe^{2+}) par la réaction de Fenton :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{\bullet -} + Fe^{3+}$$

L'homéostasie du fer est donc très importante et peut être considérée comme un co-modulateur de la signalisation et des effets des ERO. Étant donné que le muscle squelettique contient 10 à 15 % du fer corporel, principalement dans la myoglobine et les mitochondries, le muscle squelettique pourrait être particulièrement sensible aux altérations de l'homéostasie du fer. Ainsi, il a été rapporté que les niveaux de fer non héminique musculaire et la transferrine (protéine de transport du fer) étaient élevés au cours de la sénescence, ce qui suggère que la charge en fer est une composante importante de la sarcopénie **(Altun et al., 2007)**. Des nombreux études menées chez l'Homme et chez l'animal ont montré une augmentation de la production mitochondriale d'ERO, notamment d'$O_2^{\bullet -}$ et de H_2O_2 au cours du vieillissement, associée à une diminution de la masse, de la fonction musculaire et de la performance physique **((Ryan et al., 2008) (Chabi et al., 2008) (Andersson et al., 2011, p. 20) (Miller et al., 2012) (Diolez et al., 2015))**.

La surproduction mitochondriale d'$O_2^{\bullet -}$ observée avec l'âge peut s'expliquer par un dysfonctionnement de la chaîne de transport d'électrons au niveau mitochondrial (ETC) **(Ji, 2001)**. L'ETC consiste en un groupe de cinq complexes multi-enzymatiques qui fonctionnent comme transporteurs d'électrons : à savoir le complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe II (succinate-coenzyme Q oxydoréductase), le complexe III (coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase), le complexe IV (cytochrome c oxydase) et le complexe V (ATPase) situés sur la membrane mitochondriale interne. Le coenzyme Q (ubiquinone) localisé au niveau du complexe II et le cytochrome-c localisé au niveau du complexe III sont des transporteurs mobiles de la chaîne respiratoire **(Figure 12)**.

- Le complexe I est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Il fournit $O_2^{\bullet -}$ et facilite le transfert des électrons du NADH vers le coenzyme Q, tout en utilisant l'énergie pour pomper les protons vers l'espace intermembranaire mitochondrial.
- Le complexe II est responsable de l'oxydation du $FADH_2$, formé par le cycle de Krebs, libérant des électrons qui sont dirigés vers le complexe III via l'ubiquinone. Il est l'unique complexe qui n'est pas codé par l'ADN mitochondriale (ADNmt).
- Le complexe III transfert les électrons au cytochrome-c et pompe plus de protons vers l'espace intermembranaire.

- Le complexe IV reçoit les électrons du cytochrome-c et les transmet à la molécule d'oxygène (O_2) qui se combine avec deux atomes d'hydrogène et forme une molécule d'eau (H_2O). Il pompe aussi de protons vers l'espace intermembranaire, ce qui génère une force proto-motrice à travers la membrane mitochondriale interne au niveau des complexes I, III et IV.
- Le complexe V utilise cette force proto-motrice pour produire de l'ATP à partir d'ADP et de Pi. L'ATP est ensuite libéré dans le cytosol via le transporteur ANT (Adenine nucleotide translocator) et le canal ionique VDAC (Voltage-dependent anion channel).

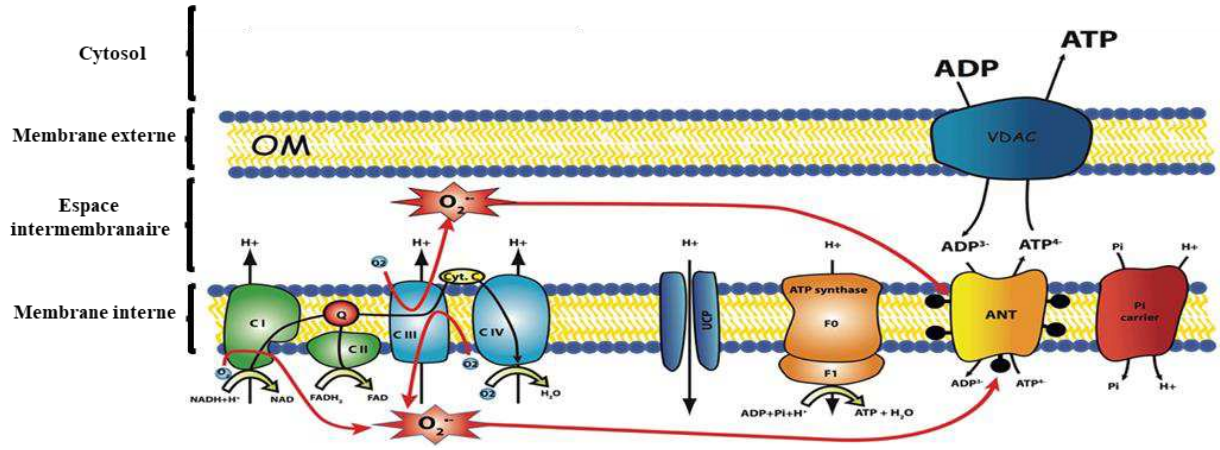


Figure 12 : Schéma représentatif de la chaîne de transport des électrons et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative **(Diolez et al., 2015).**

Au niveau des complexes I et III, une fuite d'électrons peut avoir lieu ce qui conduit à la production d'$O_2^{\bullet-}$. Capel et al. ont démontré que la surproduction mitochondriale d'$O_2^{\bullet-}$ observée avec l'âge s'explique principalement par un dysfonctionnement de l'ETC **(Capel et al., 2005)**. Les complexes I et III pourraient être la cause de la surproduction d'ERO mitochondriale dans le muscle âgé **(Chabi et al., 2008).** Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} mitochondrial observée au cours du vieillissement entrainerait une perturbation du potentiel de la membrane mitochondriale, ce qui pourrait affecter la synthèse d'ATP **((Brookes et al., 2004) (Feissner et al., 2009))**. Lors d'une production accrue d'ATP, une consommation d'O_2 plus élevée et un flux d'électrons accru à travers la chaîne de transport d'électrons augmentent la teneur en ERO dans le muscle âgé **((Brookes et al., 2004) (Feissner et al., 2009))**.

6.2.1.2. Les sources d'ERO au niveau peroxysomal

Les peroxysomes sont également considérés comme une source de production d'ERO. Les peroxysomes sont des organites cellulaires ubiquitaires de 0,1 à 1 µm de diamètre présents dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Ce sont de petites structures souvent sphériques ou ovoïdes, dépourvu de matériel génétique, constitués d'une membrane simple de type bicouche lipidique. Ils sont visibles uniquement en microscopie à fluorescence et électronique lorsque cette dernière est associée à une coloration à la diaminobenzidine. Les peroxysomes sont très dynamiques, dotés d'une plasticité marquée, et se déplacent le long des microtubules **((Schrader et al., 1996) (Schrader & Fahimi, 2006) (Schrader & Fahimi, 2008))**. Leur rôle dans le métabolisme lipidique est bien établi. Ils sont responsables de la dégradation des acides gras à très longue chaîne ($C \geq 22$) par β-oxydation. Les peroxysomes sont aussi le siège de la biosynthèse d'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3), des deux premières étapes de synthèse des plasmalogènes, de la dégradation des acides gras branchés et de la production d'acides biliaires à partir de métabolites du cholestérol. Les peroxysomes interviennent aussi dans le métabolisme des eicosanoïdes et le catabolisme des polyamines **((Wanders & Waterham, 2006) (Wanders, 2014) (Wanders et al., 2020))**.

Les acides gras à longue chaîne ($C \geq 22$) sont transportés dans les peroxysomes sous forme d'ester d'acyl-CoA par des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) essentiellement transporteurs ABCD1 et ABCD2 **(Roermund et al., 2012)**. La β-oxydation peroxysomale comprend plusieurs réactions enzymatiques successives **(Figure 13)**.

- L'étape initiale de la β-oxydation est catalysée par l'acyl-CoA oxydase-1 (ACOX1). Cette dernière convertit l'ester d'acyl-CoA en α,β-énoyl-CoA avec formation de H_2O_2, qui est toxique pour la cellule. Le peroxysome contient une enzyme, la catalase, qui converti H_2O_2 en eau (H_2O) et en oxygène (O_2) pour préserver la cellule. En cas de baisse du niveau de catalase, la quantité de H_2O_2 augmente ce qui peut entraîner un déséquilibre de la balance "oxydants-antioxydants' au niveau de muscle squelettique **((Sandalio et al., 2013) (M.-M. Chen et al., 2022))**.
- Les deux étapes suivantes sont catalysées par l'enzyme multifonctionnelle (MFP2), qui agit à la fois comme énoyl-CoA hydratase et β-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, pour produire du β-hydroxyacyl-CoA et du β-cétoacyl-CoA.
- Dans la dernière étape, une β-cétoacyl-CoA thiolase sépare une unité acétyl-CoA. L'ester d'acyl-CoA gras raccourci restant peut subir un cycle supplémentaire jusqu'à dégradation complète en acétyl-CoA. L'acétyl-CoA peut entrer dans le cycle du glyoxylate, qui est lié à

la gluconéogenèse cytoplasmique et au cycle de Krebs, ou il peut être exporté du peroxysome via le système de navette carnitine-acyltransférase et transféré sous forme d'acétyl-carnitine sur la membrane mitochondriale pour la synthèse d'ATP dans le cycle de Krebs **(Werner & Zibek, 2017)**.

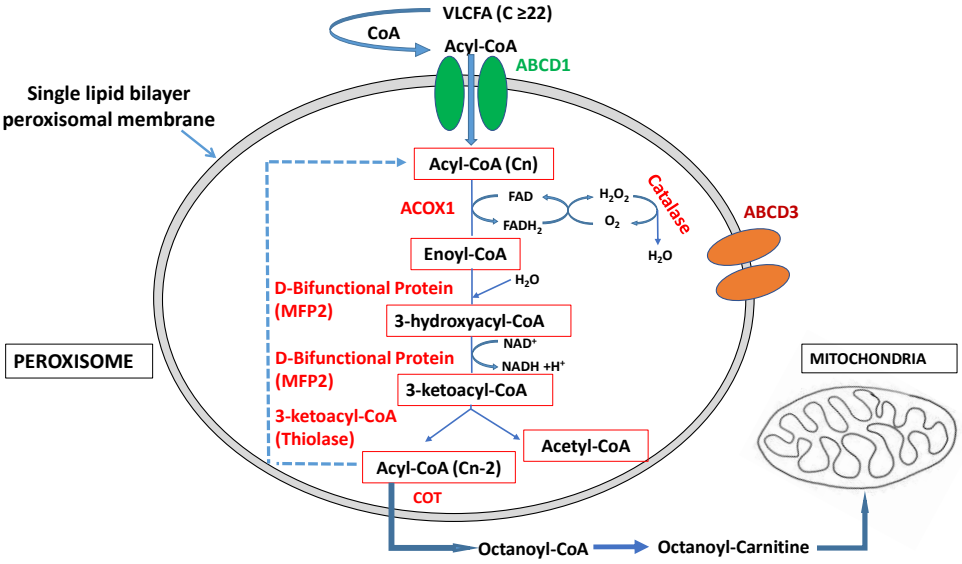


Figure 13: β-oxydation peroxysomale. *La β-oxydation peroxysomale nécessite l'internalisation des acides gras à très longue chaîne (C ≥ 22) dans le peroxysome ; cela fait intervenir le transporteur peroxysomel ABCD1 et éventuellement ABCD2* ***((Kemp et al., 2011) (Ghzaiel et al., 2022b)).*** *Au cours d'un cycle de β-oxydation peroxysomale la chaine carbonée est réduite de deux carbones à partir de l'extrimité carboxyterminale. Les acides gras générés peuvent soit retourner dans le cycle de β-oxydation peroxysomale soit être orienté vers la mitochondrie. Le transporteur ABCD3 est aussi impliqué dans l'internalisation des acides gras dans le peroxysome ; ce transporteur est majoritairement présent au niveau de la membrane peroxysomale : il est donc utilisé pour évaluer la masse peroxysomale* ***(Kemp et al., 2011)***.

6.2.1.3. Les sources d'ERO au niveau du réticulum endoplasmique

Le réticulum sarcoplasmique (RS) est un réticulum endoplasmique (RE) spécialisé des cellules musculaires squelettiques. Il constitue le principal lieu de stockage de calcium intracellulaire dans le muscle et remplit une fonction cruciale dans le couplage excitation-contraction et le maintien des concentrations de calcium intracellulaires stables tout au long de la contraction et de la relaxation.

Le RE est également impliqué dans le contrôle de l'état RedOx des cellules **(Amodio et al., 2018)**. L'accumulation de protéines non repliées ou mal repliées dans le RE entraîne un

stress oxydant et l'activation des voies de signalisation de la réponse aux protéines non repliées (UPR : unfolded protein response) comme réponse adaptative. Dans le but de rétablir la protéostase du RE, la voie UPR réduit la charge protéique du RS et améliore la qualité du RS en agissant aussi sur l'autophagie. La réponse adaptative de la voie UPR induit la transcription de gènes antioxydants par l'activation du facteur nucléaire E2 (Nrf-2). Cependant, la voie UPR peut augmenter la production d'ERO; en effet, l'augmentation du repliement des protéines pendant le stress du RS entraîne une augmentation des niveaux de radicaux HO$^{\bullet}$ par la voie PERK (Protein Kinase R-like ER Kinase) / CHOP (C/EBP-homologous protein), augmentant ainsi l'expression d'Ero1, codant pour une peroxydase du RE. Cette voie conduit au stress oxydant et à l'apoptose **(Marciniak et al., 2004)**.

Le stress du RE et la réponse UPR jouent également un rôle important dans la sarcopénie **(Bohnert et al., 2018)**. Le stress du RE peut avoir un impact direct sur la masse musculaire car un stress prolongé du RE entraîne la mort cellulaire des cellules musculaires **(Deldicque, 2013)**, qui est médiée par une augmentation des ROS au niveau du RE. Le stress du RE peut également inhiber mTORC qui régule la réponse au stimulus anabolique des nutriments et de l'activité contractile, induisant ainsi une résistance anabolique et une réduction du potentiel de régénérescence du muscle squelettique observé au cours du vieillissement. De plus, dans le modèle de sarcopénie par la toxine urémique, le stress du réticulum et les voies UPR sont impliqués dans l'inhibition de la différenciation des myoblastes et dans l'induction de l'atrophie myotubulaire par activation d'un axe ERO-eIF2α (eukaryotic initiation factor 2 alpha) **(Jheng et al., 2018)**.

6.2.1.4. Les NADPH oxydases (NOX)

Une autre source d'ERO dans le muscle squelettique inclut la famille d'enzymes NADPH oxydases NOX (NOX 1 , NOX 2 et NOX 4) localisée dans le RS, les tubules T ou dans le sarcolemme **(Sullivan-Gunn & Lewandowski, 2013)**. Ces enzymes ont la capacité de transporter des électrons à travers la membrane du sarcoplasme et de générer d'$O_2^{\bullet-}$ et d'autres ERO. Comme ces enzymes jouent un rôle important dans le couplage excitation-contraction, l'hyper-expression ou la surproduction de NOX altère les contractions musculaires **(Carmeli, 2020)**.

6.2.2. Systèmes de défenses antioxydants

Pour se protéger contre le développement et la propagation du stress oxydant dans tous ses compartiments, la cellule met en œuvre divers systèmes de défense antioxydants. Ces

systèmes peuvent être divisés en deux types : enzymatiques et non-enzymatiques. Le premier type (enzymatique) empêche la production d'ERO tandis que le second (non enzymatique) intervient dans la capture et dans la destruction des radicaux libres **(Figure 14)**.

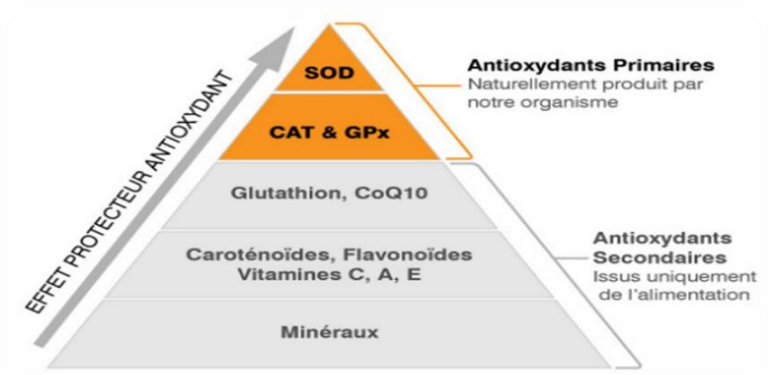


Figure 14 : Les défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques (**Menvielle-Bourg, 2005**). *SOD: Superoxyde dismutase ; CAT: Catalase ;GPx: Glutathion peroxydase ; Co Q10: Coenzyme Q10.*

6.2.2.1. Les antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques (superoxydes dismutases (SOD), glutathion peroxydase (GPX) et catalase (CAT)) sont considérés comme la première ligne de défense de notre organisme contre les ERO. Ces enzymes sont localisées dans différents compartiments cellulaires, incluant le cytosol, les mitochondries et les peroxysomes.

- Les SOD sont les métallo-enzymes les plus importantes dans la défense contre le stress oxydant **(Bułdak et al., 2014)**, elles catalysent la réaction de dismutation de l'anion $O_2^{\bullet-}$ en H_2O et H_2O_2. Chez l'Homme, nous distinguons trois isoformes des SOD selon la localisation cellulaire et le cofacteur métallique : la Cu/Zn-SOD (SOD1) localisée dans cytosol ou le nucléole, la Mn-SOD (SOD2) localisée au niveau de la matrice mitochondriale et la SOD extracellulaire (SOD3).
- Les GPx agissent en synergie avec les SOD puisque leur rôle est d'accélérer la dismutation du H_2O_2 en H_2O et O_2. Lors de cette réaction, deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG) **(Matés et al., 1999)**. Elles sont localisées dans le cytosol et/ou dans les membranes mitochondriales. Nous distinguons cinq isoformes de GPx séléno-dépendantes caractérisées par la présence d'un atome de sélénium au niveau de leur site actif (GPx 1, 2, 3, 4 et 6) et trois isoformes non-séléno-dépendantes

(GPx 5, 7 et 8), qui ont de la cystéine au lieu de sélénocystéine **(Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013)**.

- La catalase est une enzyme héminique, présente préférentiellement au niveau des peroxysomes. Elle est également responsable de l'élimination du H_2O_2 par une transformation en H_2O et O_2. L'affinité de la catalase pour l'H_2O_2 dépend de sa concentration dans le milieu **(Bułdak et al., 2014)**.

6.2.2.2. Les antioxydants non enzymatiques

Les systèmes antioxydants non enzymatiques complètent l'action des enzymes antioxydantes. Les antioxydants non enzymatiques comprennent de nombreuses substances endogènes, la plus importante est le glutathion qui d'ordre de 1 mM dans le plasma **(Raffa et al., 2021)**. Le glutathion joue un rôle important dans la réparation des protéines oxydées et peut aussi interagir da manière spontanée avec les ERO. L'ensemble de ces réactions transforment la forme réduite du glutathion (GSH) en forme oxydée (GSSG). Le rapport du GSH/GSSG doit être maintenu stable dans la cellule pour prévenir les dommages **(H. Zhang & Forman, 2012)**.

Des substances exogènes, apportées par les aliments, telles que la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique) et les caroténoïdes, agissent en piégeant les radicaux libres et en neutralisant l'électron non apparié, neutralisant ainsi ces espèces radicalaires en molécules ou ions stables **(Guéye et al., 2006)**. La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. À titre d'exemple, la vitamine E (α-tocophérol) est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases. D'autres composés comme les polyphénols présents en quantité importantes dans le régime méditerranéen (resvératrol, apigénine, quercétine) jouent un rôle similaire comme piégeurs d'ERO **(Bors et al., 1990)**.

Les systèmes de défenses antioxydants semble être altérés dans le muscle âgé, contribuant à une augmentation du stress oxydant et à l'atrophie musculaire. Cependant, les résultats concernant l'altération des enzymes antioxydantes dans le muscle âgé sont contradictoires : certains montrent une diminution de l'activité des enzymes SOD, GPX, et Catalase **((Kumaran et al., 2004) (Senthil Kumaran et al., 2008))**, alors que d'autres ne montrent aucun changement, ou bien une augmentation **((Ryan et al., 2008) (J.-H. Kim et al., 2008) (J. R. Jackson et al., 2010) (Ryan et al., 2011))**. Par ailleurs, le rapport du taux de GSH reste constant alors que le taux de GSSH est significativement augmenté dans le muscle

squelettique âgé **(Marzani et al., 2003)**. Le rapport GSH/GSSH serait alors réduit ce qui signifie que les défenses antioxydantes seraient amoindries.

6.2.3. Dommages oxydatifs : cibles moléculaires

La sarcopénie survient pendant une période de vie où les défenses antioxydantes sont affaiblies et où la production d'ERO est augmentée. Cela conduirait à la perturbation de l'équilibre "oxydants-antioxydants" entraînent des dommages aux macromolécules, notamment aux lipides, aux protéines et à l'ADN **(Bellanti et al., 2020)**.

- Les lipides, notamment les acides gras polyinsaturés (AGPI) présents dans les membranes cellulaires associés aux phospholipides **((Pamplona et al., 2000) (Hulbert, 2005))** sont des cibles privilégiées des ERO. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation des lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Parmi les produits finaux formés lors de la peroxydation lipidique figurent le malondialdéhyde (MDA) et le 4- hydroxy-2-nonenal (4-HNE) souvent utilisés comme marqueurs de stress oxydant **(Michel et al., 2009) (Figure 15).**

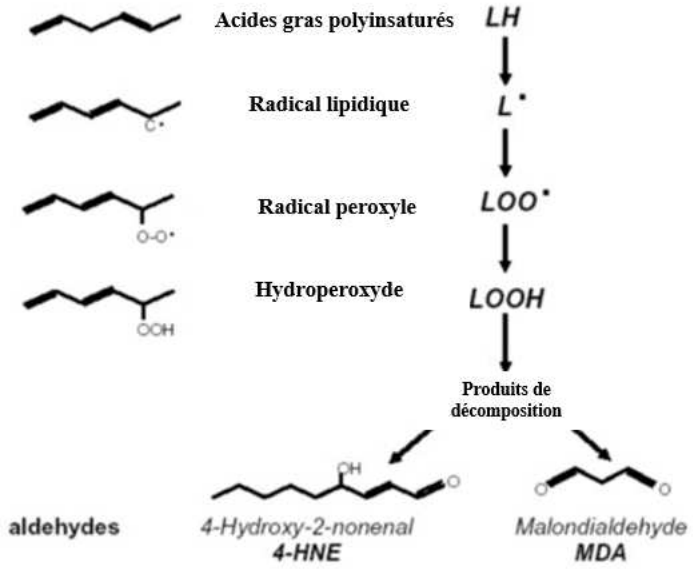


Figure 15 : Mécanisme de la peroxydation lipidique **(Laouafa, 2018).**

- Les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ERO **(Beal, 2002) (Peng et al., 2000)**, principalement au niveau d'acides aminés bien déterminés (arginine,

lysine) ayant une fonction amine libre quand ils sont dans une séquence protéique **(Dalle-Donne et al., 2006)**. Les attaques radicalaires peuvent provoquer l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaines peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaines **(Haleng et al., 2007)**. Les carbonyles sont utilisés comme des marqueurs de l'oxydation des protéines et de façon générale comme des marqueurs de stress oxydant **(Nakamura et al., 2010)**. Les produits de la peroxydation lipidique, 4-HNE et MDA, contribuent à l'oxydation des protéines en formant des bases de Schiff **((Grimsrud et al., 2008) (Maier et al., 2010))**.

- L'ADN est aussi une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux oxygénés **(Grandjean, 2005)**. Les ERO peuvent réagir avec la guanine, base constitutive de l'ADN pour former la 8-hydroxy-2'désoxyguanosine (8-OH-dG) qui, au lieu de s'apparier avec la cytosine, s'associera avec l'adénine, entrainant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique. Les ERO peuvent aussi attaquer la liaison entre la base azotée et l'ose créant un site abasique, et peuvent également attaquer l'ose lui-même créant une coupure de la chaîne simple brin.

La surproduction d'ERO dans le muscle squelettique âgé entraîne une augmentation des dommages oxydatifs des macromolécules **(Bellanti et al., 2020)**. Chez l'Homme et les rongeurs, cette augmentation est corrélée négativement avec les paramètres de la sarcopénie tels que la masse musculaire **(Murakami et al., 2012)**, la force **(Howard et al., 2007)** et la vitesse de la marche **(Semba et al., 2007)**. Dans le muscle au cours du vieillissement, les protéines sont affectées par les dommages causés par les radicaux libres. Une augmentation de leurs niveaux de carbonylation est observée dans les muscles de rongeurs et d'humains âgés **((Barreiro et al., 2006) (Hepple et al., 2008) (S. P. Jackson & Bartek, 2009) (Safdar et al., 2010) (Barreiro, 2016))**. Les lésions de l'ADN induites par les radicaux libres (principalement mesurées par la teneur en 8-OHdG) sont augmentées dans les muscles des animaux vieillissants **((Mansouri et al., 2006) (Muller et al., 2006) (Ryan et al., 2008))** et des personnes âgées **((Mecocci et al., 1999) (Fanò et al., 2001))**. Dans ces deux dernières études, l'analyse de biopsies du muscle vaste latéral (situé à la partie antéro-externe de la cuisse) des sujets âgés par rapport à des sujets jeunes a montré une augmentation significative, liée à l'âge, des dommages oxydatifs de l'ADN et des lipides. Dans le muscle squelettique, diverses études ont confirmé l'augmentation de la teneur en marqueurs de peroxydation lipidique associée à la sarcopénie **((Barreiro et al., 2006) (J.-H. Kim et al., 2008) (Safdar et al., 2010) (Ryan et al., 2011))**.

6.3. Stress oxydant et mécanismes cellulaires impliqués dans la sarcopénie

L'excès d'ERO peut endommager le muscle squelettique en affectant les mécanismes cellulaires impliqués dans son activité.

6.3.1. Rôle des ERO dans la régénérescence musculaire

Avec le vieillissement, et en grande partie en raison du stress oxydant, la fonction des cellules satellites (cellules souches situées entre la lame basale et les cellules musculaires striées dans le tissu musculaire) est dérégulée. Dans le muscle squelettique âgé, les cellules satellites présentent une capacité réduite à proliférer et à différencier. La diminution du pool de cellules satellites peut entraîner une diminution de la capacité de régénérescence musculaire **(Szentesi et al., 2019)**. De nombreuses études indiquent que l'excès d'ERO entraîne une altération de la régénérescence musculaire, principalement en affectant la fonction des cellules satellites du muscle squelettique. Par exemple, la délétion de TfR1 (Transferrin Receptor 1) dans les cellules satellites entraîne une déplétion irréversible des cellules satellites et un défaut de la prolifération et de la différenciation. Cela conduit à une déficience de la régénérescence du muscle squelettique, suivie d'une accumulation de fer, d'une lipogenèse et d'une diminution des niveaux de protéines GPx4 et Nrf-2, ce qui entraîne des défauts dans le piégeage des ERO **(Ding et al., 2021)**. L'abrogation de la signalisation antioxydante Nrf-2 favorise le stress oxydant et nuit également à la régénérescence du muscle squelettique **(Rajasekaran et al., 2020)**. D'autres études ont montré que les activités d'enzymes antioxydantes étaient diminuées dans les cellules satellites provenant de personnes âgées de plus de 70 ans par rapport aux personnes jeunes âgées de 30 à 40 ans **(Fulle et al., 2005)**.

6.3.2. Rôle des ERO dans le 'turnover' protéique

La perte de masse musculaire, qui accompagne le vieillissement, est influencée par les ERO via un contrôle du turnover protéique médié par le statut RedOx. En effet, plusieurs études soulignent que le stress oxydant contribue à l'atrophie musculaire, d'une part en déprimant la synthèse protéique, et d'autre part en stimulant la protéolyse (dégradation des protéines) **(Powers et al., 2016)**.

6.3.2.1. Rôle des ERO dans la synthèse protéique

La production d'ERO associée aux muscles squelettiques âgés joue un rôle important dans la modulation de la voie de synthèse des protéines **(Powers et al., 2011)**. Une diminution de la voie de synthèse protéique PI3K/Akt/mTOR induite par le stress oxydant a été démontrée dans diverses expériences animales. Des études ont trouvé une association entre les produits

d'oxydation des ERO (produits de peroxydation lipidique et de carbonylation protéiques) et les concentrations d'ARNm de l'IGF-1 dans les muscles squelettiques de rats âgés **((Clavel et al., 2006) (Kovacheva et al., 2010))**. Ces deux dernières équipes ont également mis en évidence qu'une augmentation de l'activation d'Akt est associée à une diminution des dommages oxydatifs **((Clavel et al., 2006) (Kovacheva et al., 2010))**. Par ailleurs, Marzani et al. ont mis en lumière qu'une supplémentation en antioxydants chez des rats âgés restaurait la synthèse protéique postprandiale **(Marzani et al., 2008)**. Les mécanismes sous-jacents à l'inhibition de la synthèse protéique par les ERO ne sont pas encore bien compris, mais certains travaux indiquent une déficience de la traduction de l'ARNm au niveau du processus d'initiation **((O'Loghlen et al., 2006) (Shenton et al., 2006))**. L'équipe de Zhang a décrit dans des cellules musculaires en culture que H_2O_2 pouvait inhiber la phosphorylation médiée par mTOR de 4E-BP1 et p70S6K, deux cibles essentielles à la croissance musculaire **(L. Zhang et al., 2009)**. De plus, certaines études ont révélé le rôle des dommages à l'ADN dans la répression de mTORC1, un des deux complexes de mTOR qui est le plus impliqué dans la synthèse protéique **((Tee & Proud, 2000) (Feng et al., 2005))**. Tan et al. ont aussi observé dans des myotubes de cellules musculaires C2C12 que l'exposition chronique à de faibles niveaux de H_2O_2 génère un stress oxydant et une baisse de la phosphorylation d'Akt, ce qui entraînerait une diminution de la synthèse protéique **(Tan et al., 2015)**. Dans leur ensemble, ces études suggèrent que le stress oxydant diminue la synthèse protéique globale dans le muscle squelettique via une inhibition de la signalisation Akt/mTORC1 médiée par les ERO. Cela contribue à la perte de masse musculaire caractéristique de la sarcopénie.

6.3.2.2. Rôle des ERO dans la dégradation protéique

Concernant la protéolyse, dont la suractivation entraîne une perte de masse musculaire, de nombreuses études révèlent un rôle critique des ERO dans la stimulation de l'autophagie et des systèmes ubiquitine-protéasome. Certaines travaux indiquent l'implication des ERO dans l'activation de l'autophagie, via l'inhibition de mTOR, et l'augmentation de l'expression des composants clés de l'autophagie tels que LC3, Beclin-1 et Atg4 **((Pajares et al., 2015) (Navarro-Yepes et al., 2014) (Z. Yang & Klionsky, 2010) (Kundu & Thompson, 2008))**. Dans la sarcopénie, de nombreuses études ont rapporté une dégradation des protéines musculaires via la voie autophagique **((McMullen et al., 2009) (Fry et al., 2013) (Y. A. Kim et al., 2013) (O'Leary et al., 2013) (Scherz-Shouval et al., 2019))**. Dans le muscle atrophié des rats âges, l'augmentation des niveaux de peroxydation lipidique est associée à une régulation à la hausse des protéines régulatrices de l'autophagie situées en en amont (Beclin-1),

et à une régulation à la baisse de celles situées en aval (LC3 ; LAMP-2) **(Wohlgemuth et al., 2010)**. Par ailleurs, dans les muscles squelettiques humains inactifs, le stress oxydant favorise l'expression des protéines liées à l'autophagie **(Hussain et al., 2010)**.

En ce qui concerne la dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome, de plus en plus d'arguments suggèrent que son activation est induite par une augmentation des ERO dans le tissu musculaire squelettique. Des expériences *in vitro* ont révélé que le stress oxydant dans les myotubes (induit par exposition à H_2O_2) augmentait l'expression des gènes des ligases E3 spécifiques aux muscles, telles que MAFbx et MuRF 1 (**(Y.-P. Li et al., 2005) (Y.-P. Li et al., 2003) (McClung et al., 2009))**. Les résultats *in vivo* ont démontré que la génération de H_2O_2 induite par l'immobilisation conduit à une augmentation de l'expression de la ligase E3 dans les fibres musculaires atrophiées. De plus, un traitement avec un antioxydant ciblant les mitochondries (SS-31) s'oppose au déclin de la signalisation anabolique contrôlée par Akt/mTOR, et réduit l'expression de MAFbx et de MuRF 1, deux principaux gènes spécifiques de l'atrophie musculaire **((Powers et al., 2011) (Talbert et al., 2013))**. Des résultats similaires concernant l'expression élevée des effecteurs d'ubiquitine-protéasome ont été confirmés dans d'autres études, et une activité plus élevée du protéasome a été corrélée avec la perte de masse musculaire **((Clavel et al., 2006) (Hepple et al., 2008))**. Par ailleurs, l'accumulation de radicaux libres peut accélérer la dégradation des protéines, notamment des protéines myofibrillaires (MyHC, α-actinine, actine et troponine I) de manière dose-dépendante, et donc contribuer à l'atrophie **(Smuder et al., 2010)**. Enfin, l'accumulation des ERO stimule la dégradation des protéines via une régulation à la hausse des composants clés du système ubiquitine-protéasome, contribuant ainsi à l'atrophie musculaire.

7. Sarcopénie et dysfonctions des organites

7.1. Dysfonctions mitochondriales

La dysfonction mitochondriale joue un rôle central dans le développement des maladies liées à l'âge, notamment la sarcopénie. Les mitochondries dysfonctionnelles sont associées à la fois à une diminution de la production d'ATP et à une augmentation de la production mitochondriale d'ERO, avec pour conséquence l'activation de voies cellulaires nocives **(Ferri et al., 2020)**. Une diminution de la masse mitochondriale, de l'activité des enzymes du cycle de Krebs, ainsi que de la consommation d'O_2 et de la synthèse d'ATP se produit dans le tissu musculaire squelettique âgé **(Marzetti et al., 2013)**. Des changements dans la fonction, la dynamique, la biogenèse et la mitophagie (autophagie de la mitochondrie) pourraient expliquer

en partie l'altération de la capacité oxydative et du contenu des mitochondries du muscle squelettique âgé **(Bellanti et al., 2021)**.

Plusieurs fonctions mitochondriales sont altérées dans les muscles squelettiques âgés par rapport aux jeunes, notamment l'activité des enzymes métaboliques et des complexes de phosphorylation oxydative (OXPHOS) (c'est-à-dire la citrate synthase et la cytochrome-c oxydase), la respiration, la synthèse des protéines et la production d'ATP (**(Boffoli et al., 1994) (Marcinek et al., 2005) (Short, Bigelow, et al., 2005) (Chabi et al., 2008)**). L'intensité et la durée de l'activité physique peuvent être déterminantes pour la préservation de la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique âgé **((Kent-Braun & Ng, 2000) (Picard et al., 2011) (Johnson et al., 2013))**. L'analyse comparative du transcriptome entre les muscles squelettiques jeunes et âgés chez l'Homme et l'animal a montré une diminution de l'expression des gènes mitochondriaux **(Carter et al., 2015)**. Le contenu mitochondrial réduit dans le muscle squelettique âgé peut également être lié à une expression plus faible du gène et de la protéine PGC-1α, le principal régulateur de la biogenèse mitochondriale dans les fibres à contraction lente et rapide **((Beregi et al., 1988) (Rooyackers et al., 1996) (Joseph et al., 2012))**. Des études dans le muscle squelettique âgé ont montré des résultats divergents sur les niveaux de Tfam (Mitochondrial transcription factor A), qui agit sur la stabilité et la réplication de l'ADN mitochondrial **((Lezza et al., 2001) (Masuyama et al., 2005) (Pesce et al., 2005))**. Les changements liés au contenu et à la fonction des mitochondries dans le muscle squelettique âgé peuvent également être liés à une augmentation des mutations et des délétions de l'ADNmt **(López-Otín et al., 2013)**. L'accumulation des lésions de l'ADNmt entraîne l'ETC, ce qui conduit à une diminution de la production d'ATP et à une augmentation de la production mitochondriale d'ERO **(Harman, 1956)**.

Des études morphologiques sur des muscles squelettiques âgés montrent des mitochondries géantes avec des crêtes perturbées **(Beregi et al., 1988)**. Au niveau du muscle squelettique, deux localisations des mitochondries sont identifiées. Les mitochondries peuvent être localisé au niveau sous-sarcolemme (SS) ou bien entre les myofibrilles (inter-myofibrillaires : IMF). Les mitochondries SS et IMF présentent des caractéristiques biochimiques et morphologiques différentes, avec des capacités d'adaptation différentes à l'exercice et à la maladie (sarcopénie) **(Picard et al., 2013)**. Au cours de la sarcopénie, les mitochondries SS apparaissent fragmentées et disposées en couche mince, tandis que les mitochondries IMF sont moins réticulaires par rapport au muscle jeune **(Iqbal et al., 2013)**. La morphologie altérée des mitochondries du muscle squelettique âgé peut être la conséquence

d'une dynamique mitochondriale altérée, avec un déséquilibre en faveur de la fission plutôt que de la fusion **(Joseph et al., 2012)**. La fusion mitochondriale est régulée par des protéines telles que les Mfn1 et 2 (Mitofusin), OPA1 et 2 (Mitochondrial Optic Atrophy) **(Mishra & Chan, 2016)**. Au contraire, la fission mitochondriale est modulée par la Drp1 (Dynamin-related protein 1), le Mff (mitochondrial fission factor) et la Fis1 (Mitochondrial fission 1 protein), qui coopèrent pour favoriser la fission des mitochondries **(Losón et al., 2013)**. Dans la sarcopénie, les mutations de l'ADNmt peuvent entraîner une dérégulation de la dynamique mitochondriale. Des résultats de souris âgées exprimant un ADNmt polymérase gamma défectueux ont montré une fission mitochondriale plus élevée dans le muscle squelettique **(Joseph et al., 2013)**. Cependant, une comparaison entre les souris jeunes et âgées a révélé un indice de fusion mitochondriale plus élevé (rapport Mfn2/Drp1) dans le muscle squelettique âgé **(Leduc-Gaudet et al., 2015)**. Un changement vers la fusion mitochondriale plutôt que la fission a également été rapporté dans le muscle squelettique de patients très âgés avec fracture de la hanche **(Picca et al., 2017)**. Un modèle murin déficient en Mfn1/2, lié à la fusion dans le muscle squelettique, a montré des mutations d'ADNmt plus élevées et une atrophie tissulaire **(Correia-Melo et al., 2017)**. Néanmoins, une atrophie et une dégénérescence des muscles squelettiques ont également été signalées à la suite de l'inactivation génétique de Drp1 liée à la fission **(Favaro et al., 2019)**.

La biogenèse mitochondriale altérée joue également un rôle crucial pour déterminer la perte de qualité du muscle squelettique et la sarcopénie. Dans le muscle squelettique, l'homéostasie mitochondriale et la phosphorylation oxydative (OXPHOS) sont régulés par PGC-1α, qui est stimulé par l'activité contractile et induit le changement du phénotype : fibres glycolytiques (rapides) vers fibres oxydatives (lentes) **(Akimoto et al., 2005)**. La réduction liée à l'âge de la biogenèse mitochondriale se traduit par une réponse altérée de PGC-1α à l'entraînement physique (Derbré et al., 2012). Le rôle potentiel de la biogenèse mitochondriale induite par PGC-1α en tant que cible thérapeutique de la sarcopénie est suggéré par plusieurs études précliniques, qui ont utilisé des agents tels que la ghréline **(Tamaki et al., 2017)**, la trimétazidine **(Molinari et al., 2017)**, l'exerkine **(Vinel et al., 2018)** et la 5,7-diméthoxyflavone **(C. Kim & Hwang, 2020)** pour prévenir la sarcopénie. Par ailleurs, la protéine AMPK (Adenosine monophosphate-activated protein kinase) et la protéine SIRT1 (Sirtuin 1) peuvent affecter directement l'activité de PGC-1α par le biais de la phosphorylation et de la désacétylation, respectivement. Les résultats de modèles transgéniques *in vivo* montrent que l'AMPK, la SIRT1 et PGC-1α agissent comme un réseau orchestré pour

contrôler la dépense énergétique cellulaire et améliorer l'aptitude métabolique **(Foreman et al., 2021)**. Ces effets positifs sur le métabolisme et la protéostase ouvrent la voie à de futurs essais cliniques sur la sarcopénie.

Les mitochondries dysfonctionnelles sont normalement éliminées par mitophagie. Ce phénomène semble moins efficace avec le vieillissement, et tout particulièrement dans le muscle squelettique en raison d'altérations du fonctionnement des lysosomes **(Foreman et al., 2021)**.

7.2. Dysfonctions peroxysomales

L'implication de dysfonctions peroxysomales dans la sarcopénie n'a pas encore été étudiée. Le rôle des peroxysomes au niveau des muscles est peu connu. L'altération des fonctions peroxysomales peut conduire à des modifications des mitochondries avec des altérations de leur ultrastructure, de leur activité et des changements dans l'expression des complexes de la chaîne respiratoire, ce qui peut entrainer des dommages cellulaires observés dans la sarcopénie **(Baumgart et al., 2001)**. Nous pouvons considérer que le statut peroxysomal en influençant la mitochondrie pourrait intervenir dans l'activité musculaire squelettique. En effet, chez les patients atteints de peroxysomopathies congénitales (adrénomyéloneuropathies, maladie de Refsum), des lésions musculaires squelettiques sont présentes et se caractérisent par une intolérance à l'exercice et des myalgies suggérant que les anomalies peroxysomales affectent la fonction musculaire **(D'amico & Bertini, 2013)**.

Dans le métabolisme des acides gras, les peroxysomes sont impliqués dans la synthèse des acides biliaires, des plasmalogènes et du DHA (C22:6 n-3) **((Brites et al., 2004) (Savary et al., 2012))**. Il est important de souligner que le DHA a des effets bénéfiques sur la fonction des muscles squelettiques en atténuant l'atrophie musculaire (**J. H. Lee et al., 2020)**, en améliorant l'endurance à l'exercice **(C.-C. Wang et al., 2020)** et la récupération **(W. Chen et al., 2022) (Ochi & Tsuchiya, 2018)**. Il faut souligner que le DHA endogène associé aux phospholipides en position sn2 est un précurseur de neuroprotectines avec des activités anti-apoptotiques **(Bazan, 2005).**

7.3. Dysfonctions lysosomales

Les lysosomes sont des organites acides qui contiennent beaucoup d'enzymes protéolytiques pour aider à la dégradation de substrats au cours de la phagocytose ou de l'autophagie. Généralement considéré comme l'organite 'digestif', la littérature a impliqué le lysosome comme un composant important dans la surveillance et la réponse aux changements

du milieu cellulaire, tels que la disponibilité des nutriments (**(Lawrence & Zoncu, 2019) (Ballabio & Bonifacino, 2020))**.

Dans les tissus vieillissants, nous observons une augmentation progressive de la lipofuscine, communément appelée "pigment de l'âge", qui indique un dysfonctionnement de la clairance lysosomale **((Brunk & Terman, 2002) (Terman et al., 2010))**. Le muscle squelettique n'échappe pas à ce phénomène, puisque des granules de lipofuscine sont visibles dans les muscles des rongeurs **(O'Leary et al., 2013)** et des humains **(Hütter et al., 2007)**. L'étude sur le muscle tibialis anterior de rats âgés, a révèle une augmentation des protéines lysosomales Lamp2 et Cathepsin D, ce qui pourrait être dû à l'augmentation observée du gène clé de la biogenèse lysosomale, TFEB (Transcription Factor EB), et à sa fonction de contrôle de la synthèse lysosomale **(Carter et al., 2018)**. D'autres ont fait état de résultats similaires dans le muscle extenseur du grand dorsal de la souris **(Fernando et al., 2020)**. Actuellement, les recherches sur la fonction lysosomale dans le muscle sont encore peu nombreuses. Les perturbations de la fonction lysosomale dans le muscle âgé auraient des implications à grande échelle pour l'autophagie et la mitophagie. Cela pourrait expliquer pourquoi les mitochondries dysfonctionnelles et les protéines oxydées s'accumulent dans les muscles des animaux et des humains âgés. Comme le suggère la "théorie lysosomale du vieillissement", cette capacité autophagique et mitophagique émoussée pourrait favoriser l'aggravation des lésions. Dans cette optique, il est établi que l'apoptose induite par les mitochondries est accrue dans les muscles squelettiques âgés **((A. Dirks & Leeuwenburgh, 2002) (Marzetti & Leeuwenburgh, 2006) (Cheema et al., 2015))**, mais nous ne savons pas si l'apoptose médiée par les lysosomes est un facteur contribuant à déterminer le degré de sarcopénie.

8. Métabolisme lipidique et sarcopénie

Les lipides sont un ensemble hétérogène de composés essentiels aux tissus biologiques, notamment le muscle squelettique. Ils ont comme propriété commune d'être insoluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques apolaires (méthanol, hexane, benzène, chloroforme) **(Folch et al., 1957)**. Les lipides exercent de multiples rôles biologiques: ce sont des constituants importants des membranes biologiques, ils servent d'isolant thermique, contribuent à la production des hormones et constitue une forme de réserve énergétique importante pour l'organisme. Parmi les lipides, nous distinguons les acides gras, lipides simples (glycérides, stérols et stéroïdes, cérides), Lipides complexes (phospholipides, sphingolipides, plasmalogènes), et Lipides isopréniques (carbures isopréniques (polymères d'isoprènes: terpènes), quinones et vitamines liposolubles).

8.1. Métabolisme des acides gras

8.1.1. Structure des acides gras

La majorité des lipides sont composés d'acides gras (AG). Les AG sont des acides carboxyliques formés par une chaîne aliphatique, un groupement carboxyle terminal (-COOH) en position alpha, et d'un groupement méthyle (CH_3) en position oméga **(Figure 16).** Les divers AG se distinguent entre eux par la longueur de leur chaîne et la position des éventuelles doubles liaisons entre les atomes de carbone.

La nomenclature des acides gras utilise la représentation suivante : C a:x Δ (m,n,o)

Avec : **a** : le nombre d'atomes de carbone

x : le nombre de doubles liaisons carbone-carbone dans la chaîne hydrocarbonée

m, n, o : les positions de doubles liaisons en partant de la fonction COOH

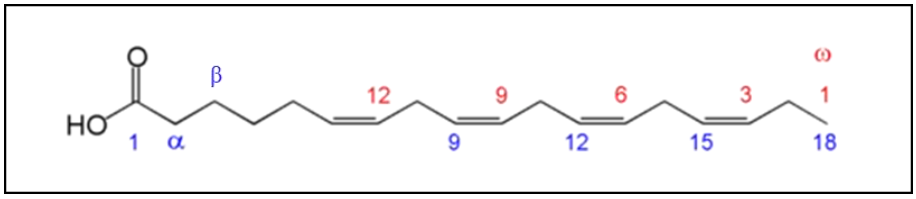


Figure 16 : Structure des acides gras.

Les AG sont classés, en deux grands groupes en fonction de la présence ou non des doubles liaisons. Nous distinguons les AG saturés (AGS) et les AG insaturés (AGI). Les AGI se répartissent en deux sous-groupes : les AG monoinsaturés (AGMI) et les AG polyinsaturés (AGPI) **(Savary et al., 2012)**.

- **Les acides gras saturés (AGS)**

Ces AGS sont constitués d'une chaîne hydrocarbonée ; ils sont saturés en molécules d'hydrogène ce qui confère une forme incurvée à la chaîne. Leur formule générale est : CH_3 – (CH_2) n – COOH.

- **Les acides insaturés (AGI)**

Ces AGI ont au moins une double liaison au sein de leur chaîne hydrocarbonée. Selon la présence d'une seule double liaison ou plusieurs, nous distinguons :

- **Acides gras monoinsaturés (AGMI)**

La présence d'une double liaison dans les AGMI peut faire apparaître une configuration isomérique **Cis** ou les deux atomes d'hydrogène (H) sont localisés de même côté par rapport à la double liaison, ou au contraire de part et d'autre, dans la configuration dite **Trans (Figure 17).**

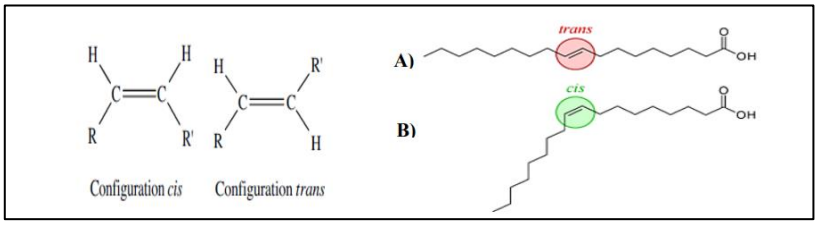


Figure 17 : Configuration cis et trans de la double liaison et exemple des deux isomères cis et trans de l'acide gras C18:1 n-9 (acide oléique). *L'acide oléique existe sous deux isoformes **A)** l'acide élaïdique, isomère trans; **B)** l'acide oléique, isomère cis.*

- **Acides gras polyinsaturés (AGPI)**

Les AGPI comportent dans leur chaîne hydrocarbonée deux ou plusieurs doubles liaisons. Ces AGPI peuvent aussi être Cis ou Trans. Ils se subdivisent en 3 familles selon la position de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle terminale de l'AG : les AGPI oméga-3 (n-3), les AGPI oméga-6 (n-6), et les AGPI oméga-9 (n-9).

8.1.2. Acides gras et sarcopénie

Les AG, en particulier les AGPI, contribuent à un grand nombre de processus biologiques. L'implication des AG dans le processus de vieillissement et dans la pathogenèse des maladies liées à l'âge tel que les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2 et la sarcopénie a été rapportée par diverses études **((Y.-H. Huang et al., 2020) (Y. He et al., 2021) (Lemaitre & King, 2022))**. En effet, le déficit en AGPI n-3 et plus particulièrement en acide alpha-linolénique (ALA, C18:3 n-3), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, C20:5 n-3) et le DHA (C22:6 n-3), est impliqué dans la sarcopénie **(Y.-H. Huang et al., 2020)**. L'étude de Rodacki *et al*. a montré que la supplémentation en AGPI n-3 augmente le taux de synthèse des protéines musculaires chez les personnes âgées **(Rodacki et al., 2012)**. En effet, la supplémentation en huile de poisson entraîne une amélioration significative de la force musculaire et de la capacité fonctionnelle des personnes âgées, par rapport aux contrôles non supplémentés **(Rodacki et al., 2012)**. Une autre étude a

montré que l'ALA diminue les niveaux de cytokines inflammatoires plasmatiques, telles que le TNF-α et l'IL-6, ce qui peut encore améliorer la masse et la force musculaires chez les personnes âgées **(Cornish & Chilibeck, 2009)**. En tant que facteur modifiable du mode de vie, la supplémentation en AGPI n-3 est une cible potentielle pour prévenir la sarcopénie chez les personnes âgées **(S. R. Gray & Mittendorfer, 2018)**.

Les altérations du métabolisme lipidiques pourraient contribuer à un déséquilibre RedOx. En effet, une forte consommation d'AG Trans industriel et/ou naturel provoque un stress oxydant. L'étude de Smit *et al.* a montré une augmentation de 20 % du taux d'isoprostane (8-iso-PGF2α) dans l'urine des sujets sains après trois semaines d'une alimentation riche en AG Trans industriels par rapport au régime pauvre en AG Trans **(Smit et al., 2011)**. En outre, le phénomène inverse et l'impact des événements oxydatifs sur la production d'AG Trans reste à déterminer. L'étude de Zambonin *et al.* a suggéré que les radicaux libres, formés dans des conditions stressantes, induisent la formation d'AG Trans *in vivo* via l'isomérisation cis-trans de leur précurseur cis **(Zambonin et al., 2006)**. *In vivo*, le stress radicalaire couplé à des systèmes des défenses affaiblis peut modifier la forme moléculaire des résidus des AGPI. Le rôle des ERO et des radicaux NO_2 en tant que médiateurs importants dans l'isomérisation des lipides a été mis en évidence **(Zghibeh et al., 2004)**. En fait, les AGPI et les phospholipides dans les membranes cellulaires peuvent être modifiés chimiquement dans des conditions oxydatives. Ainsi, Zghibeh *et al*. ont démontré que certains isomères de l'acide trans-arachidonique peuvent provenir de l'isomérisation de l'acide arachidonique médiée par le NO_2, chez l'Homme **(Zghibeh et al., 2004)**. Au total, ce processus est également envisagé comme un facteur clé dans le développement de la sarcopénie, car le stress oxydant est largement décrit comme un inducteur de plusieurs troubles observés au cours de vieillissement **(Zarrouk et al., 2015).**

8.2. Métabolisme du cholestérol

Le cholestérol (Cholest-5-en-3beta-ol ; $C_{27}H_{46}O$; masse molaire : 386,65 g/mole ; PubChem CID 5997) est l'un des principaux constituants des membranes plasmiques. Il a été découvert par le français Michel Eugène Chevreul en 1815 **(Massaad et al., 2017)**. Il est impliqué dans les processus physiologiques de signalisation, de prolifération etde mort cellulaire. Il est formé d'un noyau tétracyclique stérol, comprenant trois cycles de type cyclohexane (A, B, C) et un cycle de type cyclopentane (D), d'une chaine iso-octyl flexible en position 17, et d'une fonction alcool en position 3. Le cholestérol est une molécule hydrophobe,

à l'exception de son groupement hydroxyle sur le carbone 3, qui constitue la tête polaire et donc la partie hydrophile de la molécule, ce qui lui donne son caractère amphiphile **(Figure 18)**.

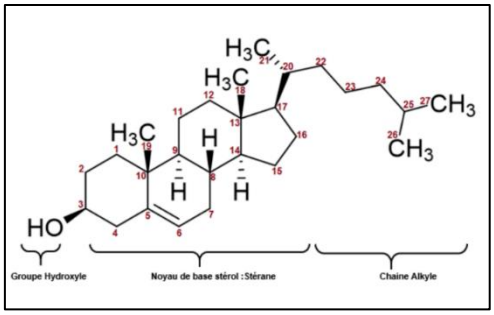


Figure 18 : Structure du cholestérol.

Le cholestérol est un régulateur majeur de la fluidité des bicouches phospholipidiques. La tête hydroxyle polaire du cholestérol se positionne à peu près en parallèle des phospholipides, formant un ensemble serré avec les chaînes d'AGS des sphingolipides et des glycérophospholipides ; sa chaîne latérale hydrophobe pointe vers la partie interne de la bicouche lipidique ; et son groupement hydroxyle se situe à l'interface membrane-eau avec les têtes polaires des phospholipides. Ces caractéristiques structurelles lui permettent de rigidifier la membrane plasmique et de diminuer sa fluidité **(S.-T. Yang et al., 2016) (Figure 19)**.

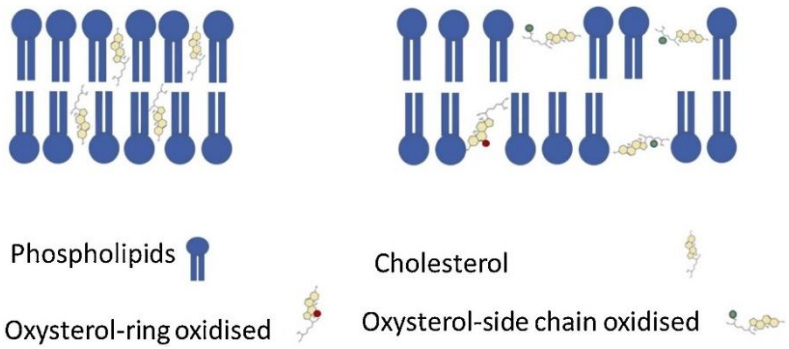


Figure 19 : Disposition du cholestérol et des oxystérols dans la bicouche phospholipidique **(Dias et al., 2019).**

En raison de la distribution corporelle élevée du cholestérol et de sa structure, cette molécule peut être oxydée, pour former des oxystérols. En effet, l'oxydation du cholestérol modifie sa polarité ; la présence d'un groupement oxygéné en plus de l'hydroxyle présent sur le carbone 3 en position β, permet aux oxystérols de s'insérer dans la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique **(Olkkonen & Hynynen, 2009)**. Cette orientation des oxystérols

contribue à la formation de membranes plasmiques plus rigides et donc moins fluides (**(Kulig et al., 2016) (Dias et al., 2019))**.

8.3. Dérivés oxydés du cholestérol : les oxystérols

8.3.1. Origine et structure des oxystérols

Les oxystérols sont des molécules de 27 atomes de carbones qui, comme le cholestérol, sont composées d'un noyau stérane et d'une chaîne latérale **(Nury, Yammine, et al., 2021)**. Ces composés sont différenciés par leur site d'oxydation. Certains sont oxydés au niveau de la structure stérane (cycle B) du cholestérol, tels que ceux oxydés au niveau de la position C7 du cholestérol menant à la formation du 7α-hydroxycholestérol (7α-OHC) ou du 7β-hydroxycholestérol (7β-OHC) ou encore du 7-cétocholestérol (7KC); d'autres sont oxydés sur la chaîne latérale tels que le 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC), le 25-hydroxycholestérol (25-OHC) et le 27-hydroxycholestérol (27-OHC) pour les plus connus.

Les oxystérols peuvent s'accumuler au niveau des membranes plasmiques et/ou à l'intérieur des cellules **(Mutemberezi, Guillemot-Legris, et al., 2016)**. À l'état physiologique normal, ces dérivés oxydés du cholestérol sont présents en très faible quantité (de l'ordre du nanomolaire dans le plasma ; 5-10 nM) et ils sont impliqués dans divers processus biologiques (métabolisme des lipides, réponse immunitaire, activité anti-virale, prolifération et différenciation cellulaire). Néanmoins, à fortes concentrations (de l'ordre du micromolaire identifiées dans le plasma de patients avec des maladies cardiovasculaires ou atteints de peroxysomopathies sévères), ces composés deviennent toxiques (induction de stress oxydant et d'inflammation, activation de la mort cellulaire) et pourraient ainsi être impliqués dans de nombreuses maladies liées à l'âge : maladies neurodégénératives (Alzheimer), dégénérescence maculaire liée à l'âge, cataracte, ostéoporose, diabète de type 2 et certains cancers (cancer de la prostate) **((Vejux & Lizard, 2009) (Zarrouk et al., 2014))**.

Les oxystérols, présents *in vivo*, peuvent être synthétisées par voie endogène, soit à la suite de l'auto-oxydation du cholestérol par des attaques radicalaires (voie non-enzymatique), soit par oxydation enzymatique (voie enzymatique), soit par les deux voies. Les oxystérols peuvent résulter d'un apport exogène avec des aliments riches en cholestérols. Généralement, les oxystérols oxydés sur le noyau stérane sont formés par voie non-enzymatique tandis que ceux oxydés sur la chaîne latérale sont issus de voies enzymatiques **(Mutemberezi, Guillemot-Legris, et al., 2016)**.

8.3.1.1. Source exogène liée à l'alimentation

Les oxystérols sont souvent présents en grande quantité dans les produits alimentaires industriels riches en cholestérol tels que le beurre, la crème, le lait, les œufs, la charcuterie, les viennoiseries et le chocolat **((Clariana & García-Regueiro, 2011) (Risso et al., 2021) (Risso et al., 2022))**. Lors des processus industriels, la hausse de température par chauffage et l'exposition à l'air, ainsi que le stockage prolongé de ces aliment favorisent l'oxydation du cholestérol **(Sabolová et al., 2017)**. Il est important de souligner que plusieurs oxystérols ont été identifiés en grande quantité dans les aliments pour les bébés et pour les enfants **((Sander et al., 1989) (Kilvington et al., 2021))**. Certaines données confirment les conséquences graves des oxystérols sur le développement intellectuel et physique des enfants **(Kilvington et al., 2021)** et suggèrent qu'ils pourraient favoriser le syndrome métabolique et l'obésité **((Guillemot-Legris et al., 2016) (Mutemberezi, Masquelier, et al., 2016))**, ainsi que les maladies inflammatoires de l'intestin **(Guina et al., 2015)**. Par conséquent, dans l'industrie alimentaire, il semble important de prendre des mesures appropriées pour contrôler et limiter les niveaux d'oxystérols dans les aliments. Dans un premier temps, le profil des oxystérols (réalisé par chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse ou par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) pourrait être mis en œuvre comme une garantie de qualité, de sécurité et de valeur nutritionnelle lors de la sélection des ingrédients, mais aussi pendant la transformation et le stockage **((van de Bovenkamp et al., 1988) (Razzazi-Fazeli et al., 2000) (Gorassini et al., 2017))**. Par ailleurs, les oxystérols présents dans le tube digestif peuvent également provenir d'aliments riches en cholestérol et être la conséquence de la digestion dans l'estomac. En effet, le pH acide de ce dernier, la présence de fer libre et de protéines hémiques, comme la myoglobine apportée par les viandes rouges, en font un milieu très pro-oxydant qui peut favoriser l'oxydation du cholestérol **((Kanner & Lapidot, 2001) (Lapidot et al., 2005))**.

8.3.1.2. Source endogène

- **Voie non-enzymatique**

Cette voie, nommée également auto-oxydation, peut s'effectuer dans les membranes cellulaires ou encore dans les lipoprotéines (LDL ; Low Density Lipoprotein) **(Iuliano, 2011)**. Ces dernières transportent le cholestérol libre et estérifié, circulant dans le sang, depuis le foie vers les tissus périphériques. L'auto-oxydation du cholestérol a lieu sur les carbones des cycles A et B du noyau stérane, en particuliers les carbones 4, 5, 6, et 7, qui sont les plus vulnérables

aux attaques radicalaires, la probabilité étant la plus importante au niveau du carbone (C7). Nous distinguons deux types d'auto-oxydation, celle de type I et celle de type II.

- L'auto-oxydation de type I est induite par les ERO ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$), les ERN (NO, $ONOO^-$ (peroxynitrite)), la réaction de Fenton ($H_2O_2 + Me^{n+} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{\bullet-} + Me^{(n+1)+}$; où Me est un métal de transition comme par exemple le cuivre, le fer ou l'aluminium) ou la réaction de Haber-Weiss ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{\bullet-} + O_2$). Le site privilégié de cette oxydation se situe au niveau C7 où la liaison carbone-hydrogène est faible **(Iuliano, 2011)**. Cette oxydation forme principalement le 7 α/β-hydroperoxycholestérol (7-OOHC) qui va former à son tour le 7KC, le 7β-OHC et le 7α-OHC. Le 7KC et le 7β-OHC peuvent être interconvertis ; la 11β-hydroxysteroide dehydrogenase de type 1 (11β-HSD1), est une enzyme qui catalyse la conversion réversible de la cortisone en cortisol et du 7KC en 7β-OH, alors que la 11β-hydroxysteroide dehydrogenase de type 2 (11β-HSD2) convertit le 7β-OH en 7KC **(Figure 20) ((Larsson et al., 2007) (Anderson et al., 2020) (Vejux et al., 2020) (Nury et al, 2021) (Ghzaiel, Sassi, et al., 2021))**. Les hydroperoxycholestérols C4, C5 et C6 sont également produits par une auto-oxydation de type I et donnent respectivement du 4α-hydroxycholestérol (4α-OHC), du 5α- ou 5β-hydroxycholestanol (5α-OHC ou 5β-OHC) et du 6α- ou 6β-hydroxycholestanol (6α-OHC ou 6β-OHC) **(Zerbinati & Iuliano, 2017)**.
- L'auto-oxydation de type II est induite par l'ozone (O_3), l'acide hypochloreux (HOCl) et les singulets d'oxygéne ($^1\Delta_gO_2$) **(Iuliano, 2011)**. Les époxydes de cholestérol (5α,6α-epoxycholestérol, 5β,6β-epoxycholestérol) peuvent être formés soit par une auto-oxydation de type I et/ou une auto-oxydation de type II, et peuvent donner spontanément du cholestane 3β, 5α,6β-triol (cholestane-triol) en milieu acide qui peut également être formé enzymatiquement à partir du 5α,6α-époxycholestérol par la cholestérol époxyde hydrolase (Ch-EH) **((Iuliano, 2011) (Zerbinati & Iuliano, 2017))**.

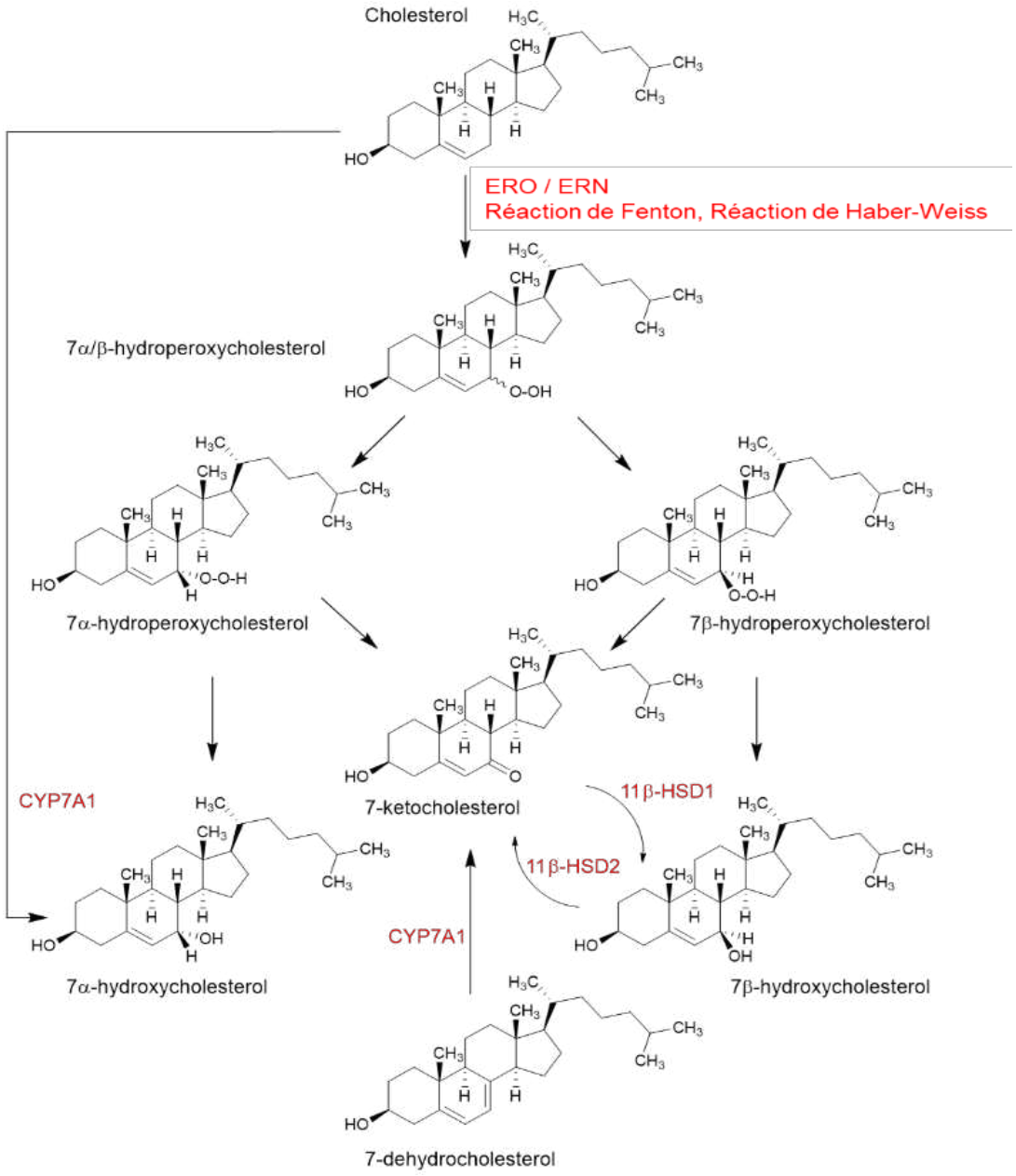


Figure 20 : Voie de synthèse du 7KC et du 7β-OHC **(Nury, Yammine, et al., 2021).**

- **Voie enzymatique**

L'oxydation enzymatique induit l'addition d'un groupe hydroxyle à la chaine latérale du cholestérol pour former par exemple le 24-, 25- ou 27- hydroxycholestérol par des enzymes à cytochrome P450 pour le 24- et 27-hydroxycholesterol **((Russell, 2000) (Mutemberezi, Guillemot-Legris, et al., 2016))**. En revanche pour le 25-hydroxycholestérol, qui peut être aussi formé par auto-oxydation, celui-ci est produit enzymatiquement par la cholestérol 25-

hydroxylase (CH25H), une enzyme contenant du fer non hémique localisée dans le RE et le Golgi, et qui est exprimée dans de nombreux tissus **(Lund et al., 1998)**. Le 24- et le 27-hydroxycholestérol sont des produits des cytochromes P450s cholestérol 24-hydroxylase (CYP46A1) et stérol 27-hydroxylase (CYP27A1), respectivement. CYP46A1 est fortement exprimé dans les neurones du système nerveux central et se localise dans le RE, tandis que CYP27A1 qui est ubiquitaire est principalement exprimé dans le foie et les macrophages en étant localisé au niveau des mitochondries **(Mutemberezi, Guillemot-Legris, et al., 2016)**.

8.3.2. Oxystérols et maladies liées à l'âge

Les oxystérols assurent plusieurs fonctions physiologiques importantes au niveau de la régulation de la différenciation et de la réponse immune, dans le contrôle de l'équilibre RedOx et de la mort cellulaire **((Zarrouk et al., 2014) (de Freitas et al., 2021))** et sont impliqués dans de nombreuses maladies. Ainsi, ils participent à la constitution des membranes sous leur forme estérifiée. Leur aspect hydrophile, comparé au cholestérol, leur permet de circuler et de traverser facilement les membranes lipophiles, ce qui leur permet de jouer un rôle important dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol. Ils participent ainsi au rétrocontrôle de la synthèse de cholestérol pour limiter son accumulation **(Meaney et al., 2002)**. Par ailleurs, ils permettent le contrôle des gènes impliqués dans la régulation et l'homéostasie du cholestérol via l'interaction avec des récepteurs nucléaires particuliers, les récepteurs LXR (Liver X receptor) et ROR (Retinoic acid receptor-related orphan receptor) (**(Javitt, 2008) (Ma & Nelson, 2019) (Nixon & Andrew, 2021))**. Le cholestérol et les oxystérols sont aussi essentiels pour la biosynthèse des hormones stéroïdiennes et la synthèse des acides biliaires **(Griffiths et al., 2017)**.

Les oxystérols, tout comme le cholestérol, peuvent s'accumuler au niveau des membranes cellulaires, conduisant à des changements de la fluidité membranaire, de la perméabilité membranaire, et de l'activité de protéines transmembranaires telles que des enzymes du type tyrosine kinase et Na/K ATPase **(Bezine et al., 2018)**. De plus, ils peuvent s'accumuler dans les radeaux lipidiques ce qui pourrait induire des changements biophysiques et biochimiques néfastes au niveau de la signalisation cellulaire **((Olkkonen & Hynynen, 2009) (Zakyrjanova et al., 2021))**.

En raison de leur capacité à perturber les activités physiologiques normales, il est bien admis que les oxystérols contribueraient à l'apparition et au développement de maladies liées à l'âge ainsi que de maladies de civilisation **(de Medina et al., 2022)**. Les oxystérols les plus

couramment générés par auto-oxydation (7KC ; 7β-OHC) sont les plus nuisibles pour la viabilité cellulaire **((Zarrouk et al., 2014) (Vejux et al., 2020) (Nury, Yammine, et al., 2021))**.

Le 7KC et le 7β-OHC sont fortement augmentés dans la paroi vasculaire, la rétine et le cortex de patients atteints de maladies cardiovasculaires, de dégénérescence maculaire liée à l'âge, de maladie d'Alzheimer et de maladie de Parkinson **(Zarrouk et al., 2014)**, mais aussi dans le plasma de patients avec des formes sévères d'adrénoleucodystrophie liée à l'X (X-ALD) associée à un important stress oxydant **((Deon et al., 2016) (Nury et al., 2017))**. Par ailleurs, des augmentations plasmatiques de 7β-OHC et 7KC ont été observées chez les patients sarcopéniques âgées de 65 ans et plus **(Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2021)**.

Actuellement, il est bien établi que ces oxystérols, qui déclenchent un stress oxydant et une inflammation conduisant à de nombreux dommages cellulaires, jouent des rôles clé dans la physiopathologie et dans l'issue des maladies liées à l'âge **(Samadi et al., 2021)**. De nombreuses recherches soutiennent également que le 7KC ainsi que le 7β-OHC peuvent contribuer au vieillissement **(de Medina et al., 2022)** ainsi qu'aux maladies de civilisation telles que le diabète de type 2 (**(Endo et al., 2008) (Samadi et al., 2019))**, les maladies intestinales **(Poli et al., 2013)**, le syndrome métabolique et l'obésité **(Murdolo et al., 2016)** résultant des habitudes de vie (alimentation, activité physique), de la pollution environnementale (perturbateurs endocriniens et obésogènes) et de la pollution neuro-émotionnelle (stress chronique).

Le 7KC et le 7β-OHC qui sont de puissants inducteurs du stress oxydant activent également l'inflammation et déclenchent aussi des dysfonctionnements des organites (mitochondrie, peroxysome, lysosome, réticulum endoplasmique), conduisant à la mort cellulaire **(Nury, Yammine, et al., 2021) (Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2021)**. De nombreuses études ont montré que le 7KC et le 7β-OHC activent la mort cellulaire sur différents types de cellules (cultures primaires, lignées cellulaires) de différentes espèces dans une gamme de concentration de 25 à 50 µM après 24 à 48 h de culture. La mort cellulaire induite par ces oxystérols peut être un mode de mort cellulaire par apoptose (mort cellulaire dépendante des caspases) ou un processus de mort cellulaire indépendant des caspases.

L'apoptose induite par le 7KC ou le 7β-OHC a été décrite sur des cellules de la paroi vasculaire, des monocytes/macrophages et des cellules nerveuses (neurones, cellules gliales (oligodendrocytes) et cellules microgliales). Sur les cellules monocytaires humaine THP-1, la mort cellulaire induite par le 7KC est associée à une augmentation soutenue du Ca^{2+} qui

déclenche la voie mitochondriale de l'apoptose **(Berthier et al., 2004)**. Une mort cellulaire non-apoptotique, sans activation des caspases, a été décrite sur des fibroblastes humains, des cellules tumorales mammaires MCF-7 déficientes en caspase-3, des cellules de glioblastome de rat C6 **(Vejux et al., 2020)** et, dans certains cas, sur ARPE-19, une lignée humaine différenciée de cellules épithéliales pigmentaires de la rétine **(Dugas et al., 2010)**. Une mort cellulaire indépendante des caspases est également observée sur des myoblastes murins C2C12 **(Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2021).** Dans tous les cas, qu'il s'agisse d'un mode de mort cellulaire apoptotique ou d'un processus de mort cellulaire indépendant des caspases, d'importantes altérations mitochondriales et peroxysomales ont été constatées. Ainsi, des modifications topographiques et morphologiques des mitochondries ont été observées ; ces modifications ont été associées à une chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi m$). Sur des cellules musculaires lisses d'aorte de rat A7r5, il a été montré que la chute du $\Delta\Psi m$ induite par le 7KC précède l'activation de l'apoptose associée à une perte d'adhésion cellulaire **(Zahm et al., 2003)**. De plus, sous traitement par le 7KC ou par le 7β-OHC, le cycle de Krebs ainsi que la phosphorylation oxydative sont fortement altérés conduisant à une baisse de la glycolyse et à une diminution de la production d'ATP **((Leoni et al., 2017) (Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2021))**. Une surproduction d'ERO, notamment d' $O_2^{\bullet-}$, est également observée au niveau des mitochondries **(Nury, Yammine, et al., 2021)**. Comme les mitochondries, le peroxysome, qui est fonctionnellement connecté aux mitochondries et vice versa **(Fransen et al., 2017)**, est également sujet à d'importantes modifications topographiques, morphologiques et fonctionnelles. De plus, une réduction de la masse peroxysomale est toujours observée ainsi qu'une diminution de la β-oxydation peroxysomale qui se traduit par une accumulation cytoplasmique d'acides gras à très longue chaîne ($C \geq 22$) connus pour leurs activités cytotoxiques et pro-oxydantes **(Zarrouk *et al.*, 2012)**. Cette altération du peroxysome, en particulier la diminution des niveaux des protéines peroxysomales ABCD1et ACOX1 pourrait contribuer au stress oxydant induit par le 7KC et le 7β-OH **(Trompier et al., 2014).** En effet, sur les myoblastes C2C12, il a été montré que la diminution de l'expression des enzymes peroxysomales ACOX1 et MFP2, déclenchait une accumulation des acides gras à très longue chaîne ($C \geq 22$) et une forte surproduction d'ERO (Ghzaiel et al., 2022).

Ainsi, quel que soit le type de mort cellulaire induite par le 7KC ou 7β-OHC (mort dépendante ou indépendante des caspases), les dysfonctionnements mitochondriaux et peroxysomaux pourraient favoriser le stress oxydant. De plus, parmi les événements associés à la mort cellulaire induits par le 7KC et le 7β-OHC, une activation de l'autophagie est aussi

observée. Avec le 7KC et le 7β-OHC, l'autophagie est observée dans la mort cellulaire dépendante des caspases (apoptose) mais aussi dans la mort cellulaire indépendante des caspases. Lorsque l'autophagie est associée au stress oxydant et à l'apoptose, le terme oxiapoptophagie (OXIdation + APOPTOsis + autoPHAGIE) est utilisé pour définir la mort cellulaire induite par les oxystérols **(Nury, Zarrouk, et al., 2021)**. Dans le cas de l'oxiapoptophagie, l'autophagie observée (mitophagie, pexophagie et/ou réticulophagie) correspond à une autophagie de survie. En effet, lorsque le 7KC et le 7β-OHC sont associés à la 3-méthyl adénine (un inhibiteur d'autophagie) la mort cellulaire augmente, alors que lorsqu'ils sont associés à la rapamycine (un activateur d''autophagie), la mort cellulaire diminue **(Yammine, Zarrouk, et al., 2020).** Le 7KC et le 7β-OHC ont également des activités pro-inflammatoires en interagissant avec le récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4) **((Erridge et al., 2007) (J.-D. Huang et al., 2014))**. Le 7KC et le 7β-OHC favorisent alors la production de cytokines et de leucotriènes **(Prunet et al., 2006)**, diminuent le taux de molécules d'adhésion **(Shimozawa et al., 2004)**, et favorisent la transition du phénotype M1 anti-inflammatoire au phénotype M2 pro-inflammatoire sur les macrophages **(Buttari et al., 2013)**.

9. Prévention de la sarcopénie : approche nutritionnelle

La santé musculaire fait partie intégrante du vieillissement. Il est important de trouver une stratégie efficace pour prévenir ou retarder la sarcopénie où le vieillissement musculaire est exacerbé, et ainsi améliorer la qualité de la vie des personnes âgées. La restriction calorique, le régime Méditerranéen, et le régime d'Okinawa ont montré des effets positifs sur la santé, la longévité et le bien-être des personnes âgées.

9.1. Restriction calorique

La restriction calorique (RC) est définie comme une alimentation réduite en calories, sans malnutrition et sous nutrition. La RC est l'une des interventions les plus efficaces pour retarder l'apparition et la progression de maladies liées à l'âge **(Redman & Ravussin, 2011)** et prolonger la durée de vie **(Fontana et al., 2010)**. La RC est étroitement impliquée dans la régulation de l'état d'oxydoréduction cellulaire et systémique et dans la modulation de l'expression des gènes liés au renouvellement des macromolécules et des organites, au métabolisme énergétique, à la mort et à la survie des cellules **((A. J. Dirks & Leeuwenburgh, 2004) (López-Lluch et al., 2006))**. La RC atténue l'induction de gènes inflammatoires **(Chung et al., 2006)** qui peuvent être associés au stress oxydant interne et extracellulaire. La RC réduit également la signalisation inflammatoire et le stress oxydant dans les muscles squelettiques

vieillissants **((Fontana et al., 2004) (Dalle et al., 2017) (W.-Q. Xie et al., 2020))**. Parmi les propriétés antivieillissement bien connues de la RC, des preuves solides indiquent qu'elle protège contre la perte musculaire liée à l'âge. En effet, plusieurs études ont montré de manière cohérente que la RC atténue de manière significative les taux de déclin fonctionnel et de perte du nombre de fibres musculaires qui surviennent avec l'âge **((Payne et al., 2003) (Phillips & Leeuwenburgh, 2005))**. Ces effets protecteurs découlent probablement de la capacité de la RC à réduire l'incidence des anomalies mitochondriales, à atténuer le stress oxydant et à contrer l'augmentation liée à l'âge de la signalisation pro-apoptotique dans le muscle squelettique **(Marzetti et al., 2008)**. Il a été rapporté que la RC réduit significativement la fuite d'électrons mitochondriaux qui favorisent la génération d'ERO dans le muscle squelettique **(Bevilacqua et al., 2004)** et augmente l'expression des gènes antioxydants **(Lambert & Merry, 2004)**.

9.2. Régime Méditerranéen et régime d'Okinawa

Les habitudes alimentaires à base de plantes peuvent contribuer à un vieillissement en bonne santé. Les deux régimes alimentaires les plus étroitement liés à la longévité, le régime Méditerranéen et le régime japonais d'Okinawa, sont tous deux caractérisés par une abondance d'aliments à base de plantes et des quantités faibles à modérées de viande.

9.2.1.1. Régime Méditerranéen

Le régime Méditerranéen est principalement basé sur les aliments et les boissons traditionnels, souvent faits maison, caractéristiques des pays qui entourent la mer Méditerranée. Au cours des dernières décennies, le régime Méditerranéen a montré un rôle protecteur contre les facteurs de risque des maladies liées à l'âge. Il a été promu dans le monde entier comme le modèle alimentaire le plus sain, caractérisé par une consommation élevée de céréales non raffinées, de fruits, de légumes, et d'huile d'olive, une consommation modérée de produits laitiers et d'alcool, ainsi qu'une faible consommation de viande **(Bach-Faig et al., 2011)**. Il a été démontré que ces habitudes alimentaires exercent des propriétés protectrices grâce à la teneur élevée en AGMI et en polyphénols provenant des huiles Méditerranéennes, en AGPI contenus dans les poissons et en différents antioxydants contenus dans les fruits, les légumes et le vin rouge **((Bach-Faig et al., 2011) (Grosso et al., 2017))**, substances toutes directement liées à une réduction du risque d'apparition de maladies chroniques **(Schwingshackl & Hoffmann, 2014)** et favorisant un vieillissement sain **(Bonaccio et al., 2018)**. Une méta-analyse a confirmé une incidence plus faible de la fragilité et de l'incapacité fonctionnelle chez les personnes âgées caractérisées par une adhésion élevée au régime Méditerranéen **(Silva et**

al., 2018). En effet, les micronutriments ingérés grâce à l'adhésion au régime Méditerranéen, tels que les vitamines C et E ou les caroténoïdes, grâce à leurs propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, garantissent la préservation des fonctions des muscles squelettiques **(Granic et al., 2019)**. Récemment, une étude systématique a été menée sur le rôle protecteur du régime Méditerranéen en matière d'incapacité fonctionnelle chez les personnes âgées **(Granic et al., 2019)**. Cette étude montre que le régime Méditerranéen exerce des effets myoprotecteurs par le biais de différents mécanismes d'action découlant de multiples composants alimentaires. Il est donc raisonnable de penser qu'une plus grande adhésion au régime Méditerranéen contribuerait à prévenir la réduction de la masse musculaire, avec un rôle direct dans le métabolisme musculaire grâce aux nutriments et micronutriments présents dans les aliments du régime méditerranéen **((Welch et al., 2013) (Welch, 2014) (Guasch-Ferré et al., 2017) (Granic et al., 2019))**. D'autres recherches ont montré que les régimes alcalins (riches en légumes (y compris les fines herbes) et en fruits (frais et secs)) ont des effets positifs sur la masse musculaire maigre chez les personnes âgées en bonne santé **((Dawson-Hughes et al., 2008) (Welch et al., 2013) (Welch, 2014))**. Par conséquent, un meilleur équilibre de la charge acido-basique du régime Méditerranéen **(Chauveau et al., 2018)** et une réduction potentielle de l'acidose métabolique induite par le régime pourraient être un autre élément bénéfique de régime Méditerranéen sur le mécanisme "myoprotecteur" impliqué dans le vieillissement musculaire et la sarcopénie.

Il est bien connu que les plantes Méditerranéennes sont une source précieuse d'antioxydants naturels, jouant un rôle crucial dans l'amélioration de la santé humaine **(Vergallo, 2020)** et dans la prévention de l'atrophie musculaire **(Kang et al., 2020).** Dans ce cadre, nous nous sommes intéressées à l'études de deux plantes, largement utilisées dans la médecine traditionnelle : le lentisque et le chardon-marie.

- Le lentisque (*Pistacia lentiscus L.*), est l'un des arbustes aromatiques de la famille des Anacardiacées précieux et importants dans le bassin Méditerranéen. L'utilisation de lentisque en médecine traditionnelle s'est accrue au fil du temps et il est utilisé comme agent thérapeutique dans le traitement de la gale, des rhumatismes, des diarrhées et des brûlures mineures **((Daoued et al., 2015) (Khedir et al., 2017))**. Des extraits de différentes parties de cette plante présentent diverses activités, telles que des effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-prolifératifs et neuroprotecteurs **((Mezni et al., 2016) (Saidi et al., 2017) (Ammari et al., 2018) (Milia et al., 2021))**. Les graines de lentisque donnent une huile comestible (PLSO : *Pistacia lentiscus* L seed oil*)* à haute

valeur nutritionnelle en raison de sa richesse en acides gras insaturés, tels que l'acide oléique (C18:1 n−9) et l'acide linoléique (C18:2 n−6) **(Trabelsi et al., 2012).** La PLSO a également une teneur en caroténoïdes et en polyphénols totaux comparable à celle de l'huile d'olive **((Gimeno et al., 2002) (Matos et al., 2007))**, et il a été démontré qu'elle a des effets antioxydants et protecteurs contre diverses maladies associées au stress oxydant **((Debbabi et al., 2017) (Yammine, Nury, et al., 2020))**.

- Le chardon-marie (*Silybum marianum*), une plante de la famille des Astéracées, est largement connue en phytothérapie surtout dans le traitement des troubles hépatiques **(Abenavoli et al., 2010)**. Les graines de chardon-marie (MTSO : milk thistle seed oil) donnent une huile qui peut être exploitée en alimentation. La MTSO contient plusieurs composants bioactifs, notamment les tocophérols en quantité élevée qui peuvent expliquer une partie de son effet thérapeutique. Elle contient aussi un mélange de flavonolignanes appelé silymarine, dont la silibinine est le principal constituant actif **(Bijak, 2017)**. La silibine a une activité antioxydante et anti-proliférative sur plusieurs lignées cancéreuses **(Singh et al., 2002)**.

9.2.1.2. Régime d'Okinawa

Le régime d'Okinawa est un modèle d'alimentation traditionnel des habitants de l'île japonaise d'Okinawa. Cette île appartient au club très sélectif des cinq « zones bleues » du monde, connues pour leur longévité exceptionnelle **(Buettner & Skemp, 2016).** Le régime d'Okinawa, comme le régime Méditerranéen, est riche en légumes et pauvre en graisses et en produits laitiers. Plus précisément, le régime d'Okinawa contient une grande quantité de légumes et de fruits, en particulier de patates douces, de légumes à feuilles vertes ou à racines jaunes, de soja et de légumineuses, de petites portions de poisson, de nouilles et de viande maigre. Il est également assaisonné d'herbes, d'épices et d'huile de cuisson, et contient très peu de desserts et de sucreries **(Willcox et al., 2014)**. Les caractéristiques spécifiques du régime d'Okinawa sont les suivantes : faible teneur en calories, forte teneur en fibres provenant des légumes et des légumineuses, consommation modérée de poisson, faible consommation de viande et de produits laitiers, faible consommation de graisses malsaines (faible teneur en AGS, forte teneur en AGMI et AGPI), consommation de glucide à faible indice glycémique (IG), qui contribuent à une augmentation plus lente du glucose plasmatique par rapport à l'ingestion de glucose, et consommation modérée d'alcool. Les avantages du régime d'Okinawa en matière de longévité peuvent provenir de la consommation de quantité élevée de fibres alimentaires, de glucides à faible IG, de niveaux élevés d'antioxydants (vitamines A et C), de potassium, de fer,

de calcium, de peu de sodium et de faibles quantités de graisses et de cholestérol **(Wichansawakun & Buttar, 2019)**. Ces propriétés nutritionnelles du régime d'Okinawa semblent diminuent le risque de maladies chroniques, de cancers et de maladies cardiovasculaires **(Willcox et al., 2009)**.

10. Traitements de la sarcopénie

La prise en charge de la sarcopénie doit être basée sur une compréhension de la physiopathologie et sur l'inclusion d'approches non-pharmacologiques et pharmacologiques.

Les approches non pharmacologiques de la gestion de la sarcopénie comprennent l'exercice régulier et la consommation d'aliments riches en protéines, en vitamine D, et en antioxydants **(Robinson et al., 2018)**. La pratique d'une activité physique régulière renforce et améliore la masse, la force musculaire ainsi que la performance physique **(Suetta et al., 2008).** De plus, l'activité physique est l'approche la plus efficace et la plus abordable pour prévenir la progression de la sarcopénie et améliore de multiples aspects de la santé globale **(McKendry et al., 2020)**. Notamment, au moins 3 mois ou plus d'exercices peuvent être nécessaires pour obtenir une amélioration significative des paramètres cliniques pertinents **(McKendry et al., 2020)**. La supplémentation en protéines enrichies en leucine ou en protéines de lactosérum est efficace pour augmenter la masse musculaire et, dans une moindre mesure, la fonction musculaire **((Gryson et al., 2014) (Martínez-Arnau et al., 2020)).** Alors que la supplémentation en vitamine D augmente la force musculaire mais n'a aucun effet sur la masse musculaire **(Gryson et al., 2014)**, une combinaison de protéines et de vitamine D associée à la montée d'escaliers (ou à d'autres activités physiques quotidiennes) peut améliorer la fonction musculaire en développant aussi la masse musculaire **((Bauer et al., 2015) (Yoo et al., 2021))**.

Actuellement, aucun médicament spécifique n'a été approuvé par la Food and Drug Administration pour le traitement de la sarcopénie. Plusieurs agents, dont l'hormone de croissance, les stéroïdes anabolisants (androgènes), les modulateurs sélectifs des récepteurs androgènes, les stimulants de l'appétit, les inhibiteurs de la myostatine, les médicaments activateurs des récepteurs de l'activine II, les β-bloquants, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et les activateurs de la troponine, sont recommandés. Cependant, ces traitements ont une efficacité variable.

L'hormone de croissance augmente la synthèse des protéines musculaires et la masse musculaire mais n'améliore pas la force ou la fonction musculaire **(Sakuma & Yamaguchi, 2012).** Les effets de la supplémentation en stéroïdes anabolisants diffèrent selon le sexe, avec

une augmentation du poids et de la masse maigre chez les hommes et une augmentation du poids, largement due à une augmentation de la masse grasse, chez les femmes **(Meriggioli & Roubenoff, 2015)**. Chez les hommes comme chez les femmes, la supplémentation en testostérone augmente la force musculaire **(Morley, 2011)**. Notamment, l'effet de la testostérone sur la masse musculaire était plus important chez les hommes ayant un faible taux sérique de testostérone **(Snyder et al., 2018)**. Les suppléments à base de plantes tels que la curcumine, les alcaloïdes, les catéchines, la proanthocyanidine, les gingérols et les 'shogaols' ont montré des effets modestes sur la fonction musculaire squelettique **(Gryson et al., 2014)**. La ghréline et l'acétate de mégestrol, utilisés comme stimulants de l'appétit, peuvent augmenter la masse corporelle et la masse musculaire **(Rondanelli et al., 2016)**. La myostatine est produite par le muscle et empêche l'anabolisme musculaire et la synthèse des cellules satellites **(Argilés & Stemmler, 2013)**. La myostatine réduit aussi la perte de la masse musculaire **((Elkina et al., 2011) (Morley, 2016) (Jang et al., 2021))**. Le bimagrumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de l'activine II, augmente le volume musculaire, la masse musculaire maigre et l'état fonctionnel **(Yoo et al., 2021)**. Les β-récepteurs, les inhibiteurs de l'ECA et les activateurs de la troponine peuvent avoir des effets positifs sur la masse musculaire et la préhension **(Stewart Coats et al., 2016)**.

Il existe encore de nombreuses lacunes sur la sarcopénie. Les recherches futures devraient se concentrer sur les mécanimes biologiques de la sarcopénie et sur l'amélioration des approches diagnostiques telles que les biomarqueurs pour une détection précoce, le développement de nouveaux traitements pour les patients atteints de sarcopénie sévère, et l'identification de paramètres pour prédire la réponse au traitement. La recherche avancée et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la sarcopénie sera prépondérante pour aboutir à des traitements ciblés et à des stratégies préventives et curatives.

OBJECTIFS DE LA THESE

La sarcopénie est une maladie invalidante conduisant à une perte d'autonomie liée au processus de vieillissement. La sarcopénie se caractérise par une perte de la masse, de la force et de la fonction musculaire. Elle peut s'observer dès 40 ans mais sa fréquence augment beaucoup à partir de 65 ans. Un mode de vie sédentaire et une mauvaise nutrition favorisent un vieillissement pathologique avec l'émergence de maladies lées à l'âge comme la sarcopénie. Cette dernière affecte sérieusement la santé et la qualité de vie des personnes âgées. Chez les sujets âgés, la sarcopénie est une maladie de plus en plus fréquente avec des conséquences majeures en santé publique. En effet, les personnes atteintes de sarcopénie doivent être prises en charge dans des structures gériatriques spécialisées en raison du risque important de chutes et de fractures pour les malades qui en plus d'une diminution de mobilité peuvent aussi être atteints de déclin cognitif. Comment mieux identifier, prévenir et soigner la sarcopénie est donc devenu un enjeu médical majeur en recherche gériatrique au niveau mondial. Au cours de la dernière décennie, il a été bien établi qu'au cours du vieillissement l'augmentation du stress oxydant conduit à des dommages tissulaires qui ont des conséquences majeures dans le déclin du muscle squelettique. Nous avons cherché à savoir si l'augmentation du stress oxydant, qui favorise la peroxydation lipidique ; pouvait entraîner la production d'oxystérols formés par auto-oxydation du cholestérol, en particulier des oxystérols oxydés en position C7 : 7-cétocholestérol (7KC) et 7β-hydroxycholestérol (7β-OHC). Par ailleurs, il est bien connu que ces oxystérols ont des activités prooxydantes et pro-inflammatoires qui accélèrent le vieillissement et sont des caractéristiques des maladies liées à l'âge.

Nos objectifs, ont donc été de mieux caractériser ce syndrome gériatrique qu'est la sarcopénie afin de proposer des stratégies préventives et thérapeutiques nouvelles et efficaces. L'aspect nutritionnel de la sarcopénie a été abordé en s'interessant à des huiles (huile de lentisque et huile de chardon-marie) et à leurs nutriments.

Pour cela, le travail de Thèse inclut une étude clinique et des études *in vitro* (analyses chimiques d'huiles et travaux sur lignée cellulaire de mucle squelettique C2C12).

Les principaux objectifs du travail de Thèse sont de :

- ✓ Déterminer les paramètres associés à la sarcopénie incluant les marqueurs du stress oxydant, d'inflammation non spécifique (TNF-α, IL-6, IL-8, LTB-4) et spécifique (myokine : apeline) et du métabolisme lipidique (profil d'acides gras et d'oxystérols)

grace à une étude clinique cas-témoins menée sur 97 patients sarcopéniques et 63 sujets non sarcopéniques.

- ✓ Définir les caractéristiques biochimiques de deux huiles Méditerranéennes (lentisque et chardon-marie : profils en polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes, acides gras, phytostérols et tocophérols) et évaluer leurs potentiels antioxydants.

- ✓ Étudier les effets d'oxystérols (7β-OHC, 7KC), trouvés à des niveaux élevés dans le plasma des patients sarcopéniques, sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 non différenciées (myoblastes) et différenciées (myotubes), en prenant en comptent les paramètres associés au développement de la sarcopénie : stress oxydant, dysfonctions des organites (mitochondrie, peroxysomes), et mort cellulaire.

- ✓ Étudier la capacité cytoprotectrice des huiles Méditerranéennes (lentisque et chardon-marie) et de l'α-tocophérol.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

I. Etude clinique

1. Population étudiée

1.1. Recrutement des patients sarcopéniques et des sujets témoins

Une étude cas-témoins a été menée durant la période allant de mars 2017 à fin février 2019, chez des personnes âgées de 65 ans et plus recrutées au service de médecine interne de l'Hôpital Universitaire Fattouma Bourguiba-Monastir (Tunisie) et au niveau de la maison de retraite de Sousse (Tunisie). Le recrutement des sujets âgés a été basé sur le dépistage de la sarcopénie évalué par le questionnaire SARC-F.

Les personnes âgées recrutées ont été choisies selon les critères décrits dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Critères d'inclusion et d'exclusion de la population étudiée.

	Critères d'inclusion	**Critères d'exclusion**
Patients sarcopéniques	Patients âgés de plus de 65 ans et ayant un score SARC-F supérieur ou égal à 4.	Patients âgés de moins de 65 ans et refusant de participer à l'étude. Patients âgés avec démence sévère empêchant de répondre aux questions du score SARC-F.
Sujets non sarcopéniques (témoins)	Sujets âgés de plus de 65 ans et ayant un score SARC-F inférieur à 4.	Sujets âgés de moins de 65 ans et refusant de participer à l'étude. Sujets âgés avec démence sévère empêchant de répondre aux questions du score SARC-F.

La collecte des données a été faite par utilisation d'un questionnaire minutieux comprenant différents Items telles que l'âge, le sexe, l'indice de masse corporelle (IMC), le lieu de vie (domicile ou institution), le niveau d'étude, les paramètres gériatriques (la mobilité, l'humeur, la nutrition, et les fonctions cognitives) **(Annexe II)**.

Le dossier médical des personnes incluses a servi de support à toute information complémentaire concernant leurs antécédents médicaux et les analyses biologiques (protéine C-réactive (CRP), glycémie, cholestérol, High density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) et triglycéride (TG)).

1.2. Prélèvement et préparation des échantillons sanguins

Dans toute la population d'étude, les prélèvements sanguins sont réalisés le matin à jeun sur différents tubes : 1 tube EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), 1 tube héparine et 1 tube sec (**Figure 21**).

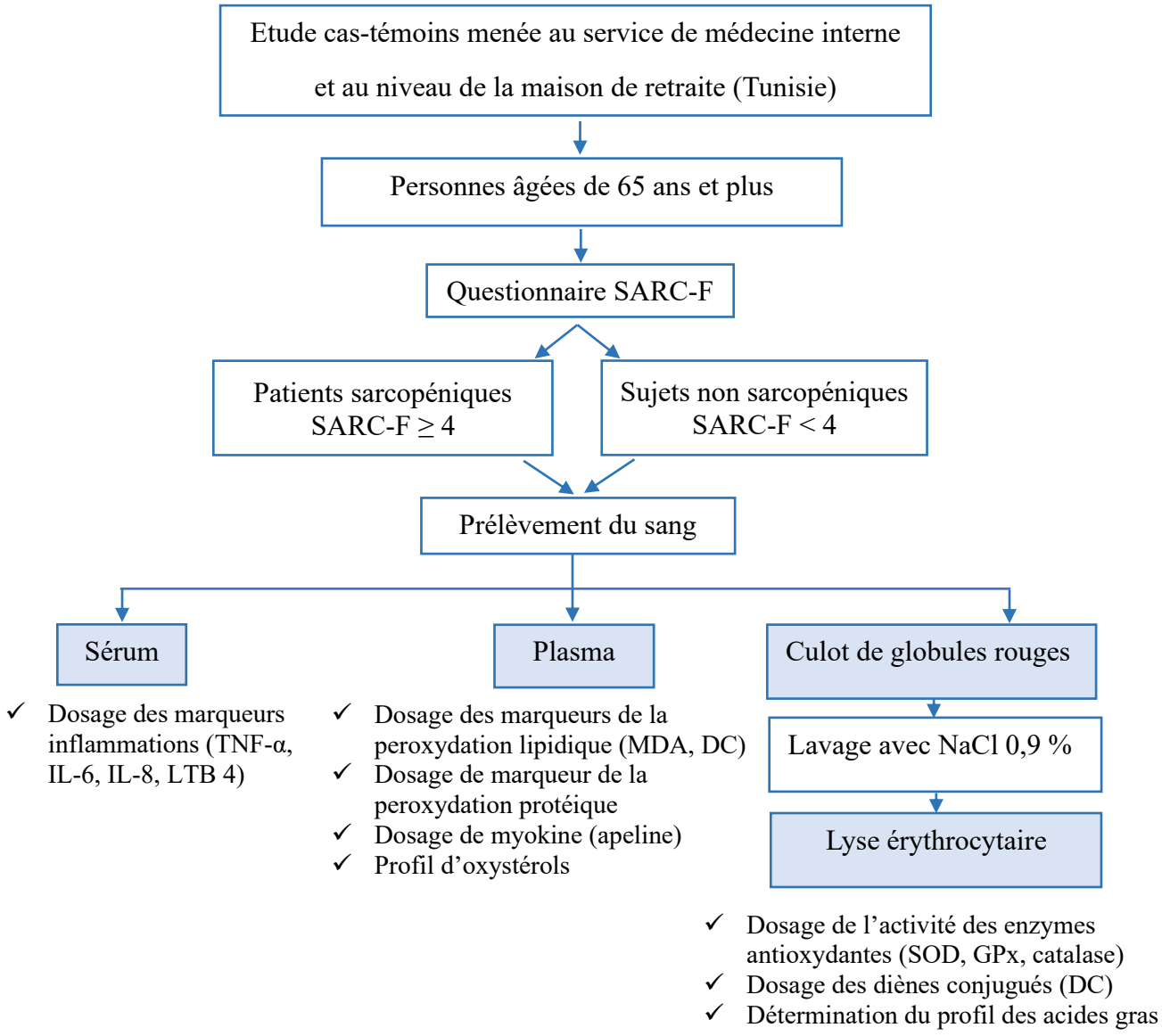


Figure 21 : Schéma du protocole expérimental de l'étude clinique.

Les plasmas et le sérum sont séparés par centrifugation à 1 400 g à +4 °C pendant 10 min puis récupérés et aliquotés dans des tubes Eppendorfs. Le sérum est utilisé pour le dosage des marqueurs inflammations (facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), interleukine-6 (IL-6), et interleukine-8 (IL-8), et leucotriène B 4 (LTB-4). Les aliquots plasmatiques sont utilisés pour le dosage des marqueurs de la peroxydation lipidique et protéique (dienes conjugués, malondialdéhyde (MDA), et protéines carbonylées), de myokine (apeline) et des oxystérols (7-cétocholestérol (7KC), 7β-hydroxycholestérol (7β-OHC), 7α-hydroxycholestérol (7α-OHC), 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC), 25-hydroxycholestérol (25-OHC), et 27-hydroxycholestérol (27-OHC)). Le culot de globules rouges restant est lavé 3 fois avec du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) afin d'éliminer le plasma résiduel. Les érythrocytes sont lysés avec quatre volumes d'eau déionisée glacée puis incubée à +4 °C pendant 15 min. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 1 400 g à +4 °C pendant 5 min. Le surnageant récupéré, constituant le lysat érythrocytaire, est utilisé pour l'analyse des activités enzymatiques, de marqueurs de peroxydation lipidique (dienes conjugués (DC)) et du profil des acides gras.

2. Evaluation du stress oxydant

2.1. Dosage de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires

2.1.1. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase érythrocytaire

L'activité de la glutathion peroxydase (GPx) a été effectuée selon la méthode de Flohé & Günzler **(Flohé & Günzler, 1984)**. Le principe de cette méthode consiste à mesurer la diminution du taux du glutathion réduit (GSH) en utilisant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) comme substrat. Cette activité est exprimée en µmoles de GSH/min/mg d'hémoglobine (U/mg d'Hb).

Le mélange réactionnel contient 200 µL d'hémolysât, 400 µL de glutathion réduit 0,1 mM (GSH), 200 µL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,8), 200 µL de peroxyde d'hydrogène 1,3 mM (H2O2), ensuite ce mélange est incubé pendant 10 min à température ambiante. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 1 mL d'acide tricholoacétique (TCA 1 %). Après une incubation de 30 min dans la glace, les tubes sont centrifugés à 1 000 g pendant 10 min. Sur 480 µL de surnageant, 2,2 mL de phosphate de sodium dibasique dodécahydraté ($Na_2HPO_412H_2O$) et 320 µL du 5,5′-Dithiobis (acide 2- nitrobenzoïque) (DTNB) sont ajoutés. Une fois la couleur jaune développée une lecture au spectrophotomètre à λ= 412 nm est

immédiatement faite par rapport à un blanc (tous les réactifs sauf le lysat remplacé par le tampon phosphate).

Calcul de l'activité enzymatique spécifique de la GPX :

Quantité du GSH consommée µmol/min/mg de d'hémoglobine (U/mg d'Hb) =

$$\frac{0{,}04 \times (DOE - DOB) \times 5 \times 1\,000 \times d}{DOB \times 10 \times X}$$

Avec :
0,04 : Nombre de moles de GSH (0,1 mmol/l $\times 400 \times 10^{-6} = 4 \times 10^{-5}$ mmol= 0,04 µmol)
DOB : Densité optique du Blanc
DOE : Densité optique de l'échantillon
d : Facteur de dilution
10 : Temps en min
X : Quantité d'hémoglobine (mg/mL)

2.1.2. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase érythrocytaire

L'activité de la superoxyde dismutase érythrocytaire (SOD) a été effectuée selon la méthode de Beauchamp & Fridovich **(Beauchamp & Fridovich, 1971)**. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de l'inhibition de la réduction photochimique du Nitro Bleu de Tétrazolium (NBT) par l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$). En aérobie, le mélange riboflavine, méthionine et NBT donne une coloration bleue. En présence de SOD, l'oxydation du NBT est inhibée d'où l'atténuation de la coloration bleuâtre. Une unité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour une inhibition de 50 % du taux de réduction du NBT. Cette activité est exprimée en Unité SOD/mg d'hémoglobine (**Figure 22**).

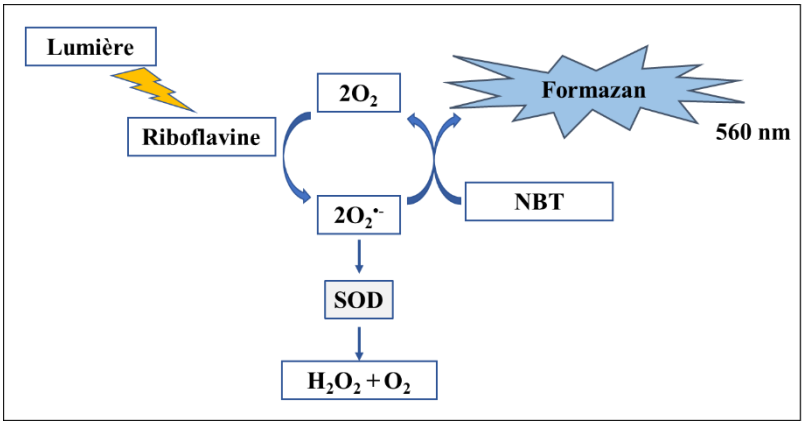


Figure 22 : Principe du dosage de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD).

Le mélange réactionnel contient 50 µL d'hémolysât, 1 mL Méthionine (13 mM)-Na_2EDTA (0,1 mM), 1,8 mL de tampon phosphate (50 mM, pH 7,8), 85,2 µL NBT (75 mM), et 22,6 µL riboflavine (2 µM). Après incubation de 20 min à la lumière, la couleur bleue développée est mesurée à λ= 516 nm. En parallèle, un tube contrôle (blanc) qui contient le même mélange réactionnel à l'exception de lysat est préparé.

Calcul de l'activité enzymatique spécifique de la SOD :

$$\text{SOD (U/mg d'Hb)} = \frac{Y}{50}$$

Avec :

$Y = \frac{(DOB - DOE) \times 100 \times 20 \times d}{DOB \times X}$

DOB : Densité optique du Blanc
DOE : Densité optique de l'Echantillon
d : Facteur de dilution
X : Quantité d'hémoglobine (mg/mL)

2.1.3. Dosage de l'activité de la catalase érythrocytaire

L'activité de la catalase (CAT) a été effectuée selon la méthode de Claibone **(Claiborne, 1985)**. Le principe de cette méthode est basé sur la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution H_2O_2 en fonction du temps.

Le mélange réactionnel contient 80 µL d'hémolysât, 780 µL de tampon phosphate (100 mM, pH 7,8), et 200 µL de H_2O_2 (75 mM). Une lecture continue du changement d'absorbance à 240 nm est effectuée toute les 15 s dans un intervalle de temps de 1 min 30 s. La cinétique de la courbe de la DO en fonction du temps est ensuite tracée pour le calcul de l'activité catalase. Cette dernière est exprimée en µmoles de H_2O_2/min/mg d'hémoglobine (U/mg d'Hb).

Calcul de l'activité enzymatique spécifique de la CAT :

$$\text{CAT (U/mg d'Hb)} = \frac{\Delta DO \times d}{0{,}02 \times \varepsilon \times L \times X}$$

Avec :

ΔDO : La différence de la DO entre deux temps où la chute de la DO est exponentielle
d : Facteur de dilution
ε= coefficient d'extinction molaire du H2O2= 0,043 µM-1/ mL.cm-1
0,02 = Facteur de dilution du H2O2 dans le tampon
L= Longueur de la cuve =1 cm
X= Quantité d'hémoglobine (mg/mL)

2.2. Dosage des marqueurs de la peroxydation lipidique plasmatique et/ou érythrocytaire

2.2.1. Dosage des dienes conjugués plasmatiques et érythrocytaires

Le dosage des dienes conjugués (DC) a été réalisé selon la méthode de Esterbauer et al. **(Esterbauer et al., 1989)**. Les DC sont considérés comme les produits primaires de l'oxydation lipidique, qui se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoyle des acides gras polyinsaturés (AGPI) suite à l'abstraction radicalaire d'un hydrogène malonique, caractérisés par une absorption dans l'ultraviolet à 234 nm.

Un volume de 100 µL de plasma ou d'hémolysât est homogénéisé avec 1 mL de NaCl (0,9 %) et 3 mL chloroforme/méthanol (2v/1v). Après agitation (au vortex pendant 2 min) et centrifugation (à 1 000 g pendant 10 min), la phase chloroformique inférieure est récupérée puis évaporée sous flux d'azote la phase inférieure. L'extrait sec est ensuite solubilisé dans 1 mL d'Hexane et une lecture de DO a été effectuée à 234 nm.

Calcul de la concentration des dienes conjugués

La concentration des dienes conjugués a été calculée selon la loi de Beer-Lambert :

$$\text{DC (nmol/mg de protéine } \textbf{ou} \text{ d'Hb)} = \frac{\text{DO} \times \text{d} \times 1\,000\,000}{\varepsilon \times \text{L} \times \text{X}}$$

Avec
DO = Densité optique lue à 243 nm
d = Facteur de dilution
ε= Coefficient d'extinction molaire du DC =2,8.104 M^{-1} cm^{-1}
L= Longueur de la cuve =1 cm
X= Concentration de l'extrait en protéines ou en hémoglobine (mg/mL)

2.2.2. Dosage du taux de malondialdéhyde plasmatique

Le dosage du taux de malondialdéhyde (MDA) a été réalisé selon la méthode de Yoshioka et al. **(Yoshioka et al., 1979)**. Le MDA représente le produit terminal de peroxydation lipidique issu de l'action des espèces réactives de l'oxygène (ERO) sur les acides gras polyinsaturés. Le principe de cette méthode repose sur la formation en milieu acide et à chaud entre le MDA et deux molécules d'acide thiobarbiturique (TBA), d'un chromophore de couleur rose absorbant à 532 nm et extractible par des solvants organiques comme le butanol **(Figure 23)**.

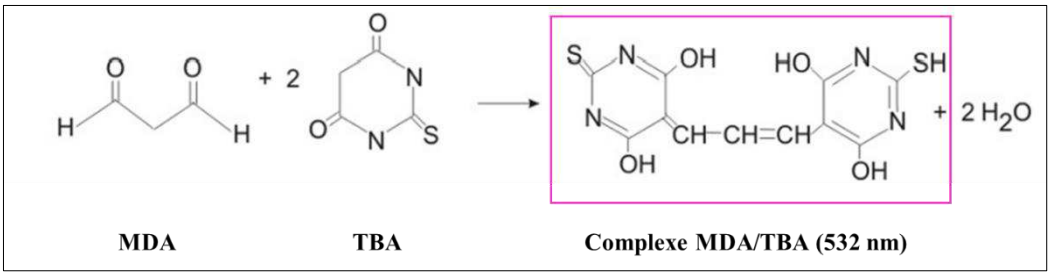


Figure 23 : Principe du dosage du malondialdéhyde (MDA).
TBA : acide thiobarbiturique

Un volume de 250 µL de plasma est incubé 30 min à 95°C avec 1,25 mL de solution de TCA 20 % et 500 µL de TBA 0,67 %. Après refroidissement dans la glace, 4 mL de n-butanol sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 900 g pendant 10 min. La lecture d'absorbance est mesurée à 532 nm. Les concentrations plasmatiques de MDA sont exprimées en nmol/mg de protéine.

Calcul de la concentration du MDA

La concentration du MDA a été calculée selon la loi de Beer-Lambert (DO = Ɛ. C. L) :

$$\text{MDA (nmol/mg de protéine)} = \frac{\text{DO} \times \text{d} \times 1\,000}{\varepsilon \times \text{L} \times \text{X}}$$

Avec :
DO = Densité optique lue à 532 nm
d = Facteur de dilution
ε= Coefficient d'extinction molaire du MDA =155 mM^{-1} cm^{-1}
L= Longueur de la cuve =1 cm
X= Concentration de l'extrait en protéines (mg/mL)

2.3. Dosage des protéines carbonylées plasmatiques

Le dosage des protéines carbonylées (PC) plasmatiques a été réalisé selon la méthode d'Olivier et al. **(Oliver et al., 1987)**. Les protéines carbonylées sont des produits d'oxydation des protéines, qui se forment par réaction des aldéhydes issus de la peroxydation lipidiques avec les résidus lysines des protéines **(Grimsrud et al., 2008)**. Le principe de cette méthode repose sur la formation entre les protéines carbonylées et la 2,4- dinitrophénylhydrazine (DNPH), d'un dinitrophénylhydrazone de couleur orange absorbant à 370 nm.

Un volume de 200 µL de plasma est homogénéisé avec DNPH (10 mM), dissous dans du HCl (2,5 M) pendant une heure à l'abri de la lumière avec une agitation toutes les 15 min. Ensuite, les protéines sont précipitées avec 1 mL de TCA (20 %) et incubées dans la glace

pendant 10 min. Une centrifugation 1 600 g pendant 5 min a eu lieu et le surnagent est éliminé, deux lavages du culot protéique sont effectués avec le TCA (10 %) et de l'éthanol-éthylacétate (1v/1v). Chaque lavage est suivi d'une centrifugation afin d'éliminer les traces de DNPH. Le précipité final est solubilisé dans 500 µL de guanidine hydrochloride (6 M) puis incubé à 37 °C pendant 10 min. La DO a été ensuite lue à 370 nm.

Calcul de la concentration des protéines carbonylées

La concentration des protéines carbonylées a été calculée selon la loi de Beer-Lambert :

$$\text{PC (nmol/mg de protéine)} = \frac{\text{DO} \times \text{d} \times 1\,000}{\varepsilon \times \text{L} \times \text{X}}$$

Avec
DO = Densité optique lue à 370 nm
d = Facteur de dilution
ε= Coefficient d'extinction molaire = 22 mM^{-1} cm^{-1}
L= Longueur de la cuve =1 cm
X=Concentration de l'extrait en protéines (mg/mL)

3. Evaluation des marqueurs de l'inflammation

3.1. Cytokine pro-inflammatoires : facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), interleukine-6 (IL-6), et interleukine-8 (IL-8)

Les taux sériques des cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumorale alpha (TNF-α), interleukine-6 (IL-6), et interleukine-8 (IL-8)) ont été dosés par la technique « Enzyme-linked immunosorbent assay » (ELISA) de type sandwich, à l'aide de kits commercialisés ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (réf : KHC3011, réf : KHC0061, réf : EH2IL8, Invitrogen Human, USA) en suivant les instructions du fabricant (Thermo Fisher Scientific).

Le principe de cette technique consiste à piéger, entre un anticorps de capture et un anticorps de détection, les antigènes d'intérêt. Chaque puits de la plaque fournie avec le kit est recouvert d'un anticorps de capture, absorbé par des liaisons covalentes sur le fond du puits, spécifique à la cytokine recherchée. Les échantillons ou les étalons sont incubés sur la microplaque revêtue d'anticorps de capture. Le second anticorps de révélation conjugué à la biotine (anticorps de détection) est ajouté, se lie à la cytokine capturée par le premier anticorps. La HRP (Hors Radish Peroxidase) conjuguée à la streptavidine est ajoutée pour reconnaître « les sandwiches ». La concentration de chaque cytokine sérique est déterminée en mesurant l'activité enzymatique de HRP en utilisant le substrat chromogène TMB (Tétraméthylbenzine). Après une période d'incubation, la réaction est arrêtée avec l'acide phosphorique, formant un

produit avec une coloration jaune mesurable à 450 nm (**Figure 24**). L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la concentration de cytokine dans le sérum du patient.

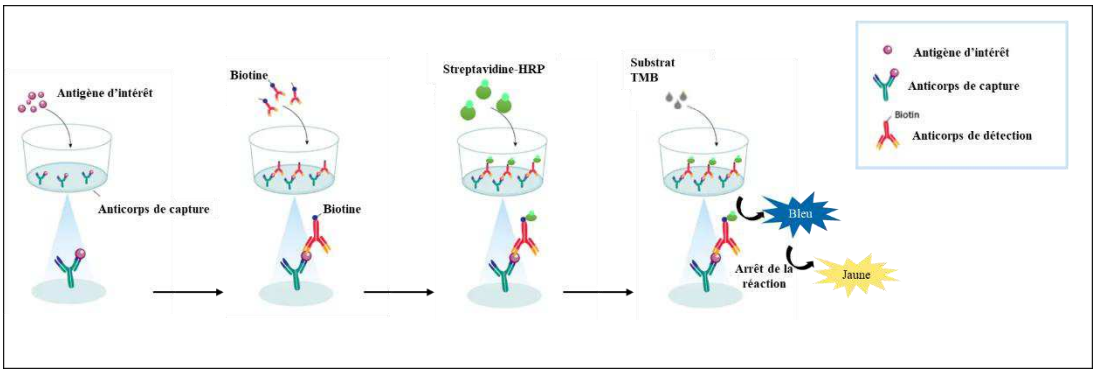


Figure 24 : Principe de l'ELISA de type Sandwich.

3.2. Médiateur lipidique de l'inflammation : leucotriène B 4

Les taux sériques de leucotriène B 4 (LTB-4) ont été dosés par le test ELISA compétitif, à l'aide d'un kit commercialisé ELISA (réf: EHLTB4, Invitrogen Human, USA) en suivant les instructions du fabricant (Thermo Fisher Scientific).

Le principe de ce test est basé sur la compétition entre le LTB-4 du sérum et le LTB-4 du kit qui est conjuguée à la phosphatase alcaline (LTB 4-AP). La concentration du LTB 4-AP est constante et la concentration de LTB-4 des échantillons varie. Quand la quantité de LTB-4 de l'échantillon augmente, la quantité de LTB 4-AP qui se fixe à l'antisérum de lapin diminue. Après l'incubation, la plaque est lavée pour retirer tous les réactifs non liés, puis le substrat est ajouté aux puits. Le produit de cette réaction enzymatique qui a une couleur jaune absorbe à 405 nm. L'intensité de cette couleur est inversement proportionnelle à la quantité de LTB-4 de l'échantillon.

3.3. Quantification de myokine (apeline)

Les taux plasmatiques d'apeline ont été dosés par une technique ELISA de type sandwich, à l'aide d'un kit commercialisé ELISA (réf : CSB-E14334h, Cusabio, USA) en suivant les instructions du fabricant. Le principe de dosage d'apeline est comparable à celle du dosage des cytokines pro-inflammatoires.

4. Quantification des marqueurs lipidiques

4.1. Dosage des acides gras érythrocytaires par chromatographie en phase gazeuse

4.1.1. Extraction des lipides totaux

Les lipides totaux sont extraits selon la méthode de Folch et al. **(Folch et al., 1957)**. Cette méthode repose sur l'utilisation de solvants organiques pour extraire la totalité des lipides polaires et apolaires. Un volume de 200 µL de lysat érythrocytaire est mélangé avec 1 mL de méthanol, 500 µL de dichlorométhane (DCM), 50 µL de standard interne (acide heptadécanoique C17:0 ; 1 mg/mL) et 40 µL Butylhydroxytoluène (BHT, 5 mM). Après 2 min de vortex, 500 µL d'eau désionisé et 500 µL de DCM sont ajoutés et une centrifugation à 1 200 g pendant 10 min est réalisée. La phase inférieure chloroformique est alors transférée dans un tube à hémolyse en verre et vaporisée sous flux d'azote. Une deuxième extraction est réalisée en ajoutant 1 mL de DCM à la phase supérieure suivie d'une centrifugation à 1 200 g pendant 10 min. Appliquant la même méthode, la phase inférieure est récupérée et vaporisée sous flux d'azote.

4.1.2. Méthylation des acides gras

Les extraits lipidiques sont ensuite méthylés en présence de 1 mL du chlorure d'acétyle (CH_3COCl, 8 % méthanol) à 70 °C pendant 1 h. Après refroidissement, 1 mL d'hexane et 1 mL de l'eau désionisée sont ajoutés à l'extrait. Suite à une agitation et centrifugation (à 1 200 g pendant 10 min), la phase supérieure hexanique, contenant les esters méthyliques, est récupérée et séchée sous flux d'azote. Cette étape de récupération des acides gras méthylés est répétée deux fois.

4.1.3. Analyse en chromatographie gazeuse des esters méthyliques des acides gras

Les acides gras ainsi extraits et méthylés ont été identifiés et quantifiés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). 1 µL d'extrait est injecté dans le chromatographe (Hewlett Packard, Palo Alto, Calif.) muni d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire polaire en silice de type HP Innowax (Crabowax 20M) (30 m × 0.25 mm diamètre intérieur) et de 0.25 µm épaisseur du film). La durée d'injection (ou temps de rétention) est fixée à 45 min afin de permettre la détection des acides gras à très longues chaine . Le programme de température de l'injecteur et du détecteur est respectivement de 280 °C et

220 °C, et celle du four est maintenue à 180 °C puis programmée à raison de 10°C/min jusqu'à 250 °C pendant 10 min. La quantification des différents acides gras est déterminée grâce au logiciel HP-Chemstation en comparant les pics obtenus avec celui du standard interne (acide heptadécanoique C17:0) et leur identification est faite par comparaison avec des chromatogrammes des standards commerciaux injectes séparément dans la colonne.

4.2. Dosage des oxystérols plasmatiques par chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse

4.2.1. Saponification des acides gras

Cette étape est effectuée pour neutraliser les acides gras, présents en grande quantité dans le plasma. Un volume de 200 µL de plasma est incubé 45 min à 56 °C avec 10 µL de mixte des standards internes (7KC (d7) et le 7β-OHC (d7) (Avanti Polar Lipids, 700 Industrial Park Drive Alabaster, AL, USA)), 2,4 mL d'éthanol absolu contenant du BHT (50 µg/mL), et 120 µL de KOH (10 M).

4.2.2. Extraction des oxystérols plasmatiques

Le mélange réactionnel est ensuite lavé avec 800 µL de H_2O afin d'ajuster le pH à 7 et les stérols sont extraits avec 6 mL d'hexane. Après agitation (au vortex pendant 5 min) et centrifugation (à 1 000 g pendant 5 min), la phase hexanique supérieure est récupérée dans un tube à hémolyse en verre et évaporée sous flux d'azote.

4.2.3. Dérivation (silylation) des stérols

Cette étape consiste à rendre les échantillons moins polaires, plus volatiles et plus stable thermiquement afin d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse (CPG-MS). L'extrait sec est repris avec 100 µL d'un mélange de N, O-Bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA)/chlorure de triméthylsilyle (TMCS) (4v/1v) préparé extemporanément. Après une incubation 1 h à 80 °C, les échantillons sont vaporisés sous flux d'azote puis repris dans 100 µL d'hexane et transférés dans des tubes en verre pour être injectés dans le chromatographe (CG-MS).

4.2.4. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse

Cette technique d'analyse combine à la fois les performances de la chromatographie en phase gazeuse pour la séparation des composés d'un échantillon et celles de la spectrométrie de masse pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur

charge (m/z). La CPG-MS est réalisée à l'aide d'un GC Agilent Technology 6890 équipé d'un injecteur HP7683 et d'un détecteur sélectif de masse 5973 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). La quantification des différents oxystérols (7β-OHC, 7α-OHC, 7KC, 24S-OHC, 25-OHC et 27-OHC) est faite à partir du rapport entre les surfaces des pics correspondant aux ions choisis pour les composés à doser et à celles des ions choisis pour les étalons internes. Ce rapport est comparé à des courbes d'étalonnage réalisées dans les mêmes conditions d'analyse à partir de produits standards. Ces analyses de CG-MS ont été réalisées sur la plateforme lipidomique (Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne - CHU Dijon – INSERM, Responsable : Jean-Paul Pais de Barros, Dijon, France).

II. Caractérisation des huiles Méditerranéennes : huile de lentisque et huile de chardon-marie

1. Préparation des huiles

Deux huiles utilisées dans l'alimentation et relativement peu étudiées, l'huile de lentisque (Pistacia lentiscus : Taxonomy ID: 371726 ; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=371726 site consulté le 24-10-2022) et l'huile de chardon-marie (Sylibum marianum : Taxonomy ID: 92921 ; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?lvl=0&id=92921 site consulté le 24-10-2022) ont été choisies sur la base de leurs diverses utilisations en médecine traditionnelle, et de leurs richesses en molécules bioactives notamment les acides gras, les phytostérols, les tocophérols et les polyphénols.

1.1. Huile de lentisque (Pistacia lentiscus seed oil : PLSO)

L'huile de lentisque a été extraite de graines du *Pistacia lentiscus* selon la méthode traditionnelle à froid (**Figure 25**).

Cette méthode se déroule en plusieurs étapes distinctes à savoir :

- **Récolte :** Les graines de lentisque sont récoltées à la fin du mois de novembre 2019 dans la région de Tabarka située au Nord-ouest de la Tunisie.
- **Broyage et malaxage :** Les fruits récoltés sont ensuite broyés manuellement à l'aide d'un mortier, et malaxés pour les transformer en une pâte homogène. La pâte résultante est reposée pendant une nuit au réfrigérateur.

- **Macération et filtration :** Le lendemain, la pâte est trempée dans de l'eau froide, et laissée macérer pendant 24 h. Le mélange est placé dans un bain-marie afin d'éviter l'exposition directe du broyat à la chaleur et ainsi la dégradation de la qualité d'huile. Ensuite, le mélange est filtré à l'aide d'un papier filtre.
- **Décantation :** Le filtrat récupéré est décanté, afin de récupérer la phase supérieure contenant l'huile, puis centrifugé pour éliminer la margine.
- **Stockage :** L'huile obtenue est conservée à +4 °C et à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

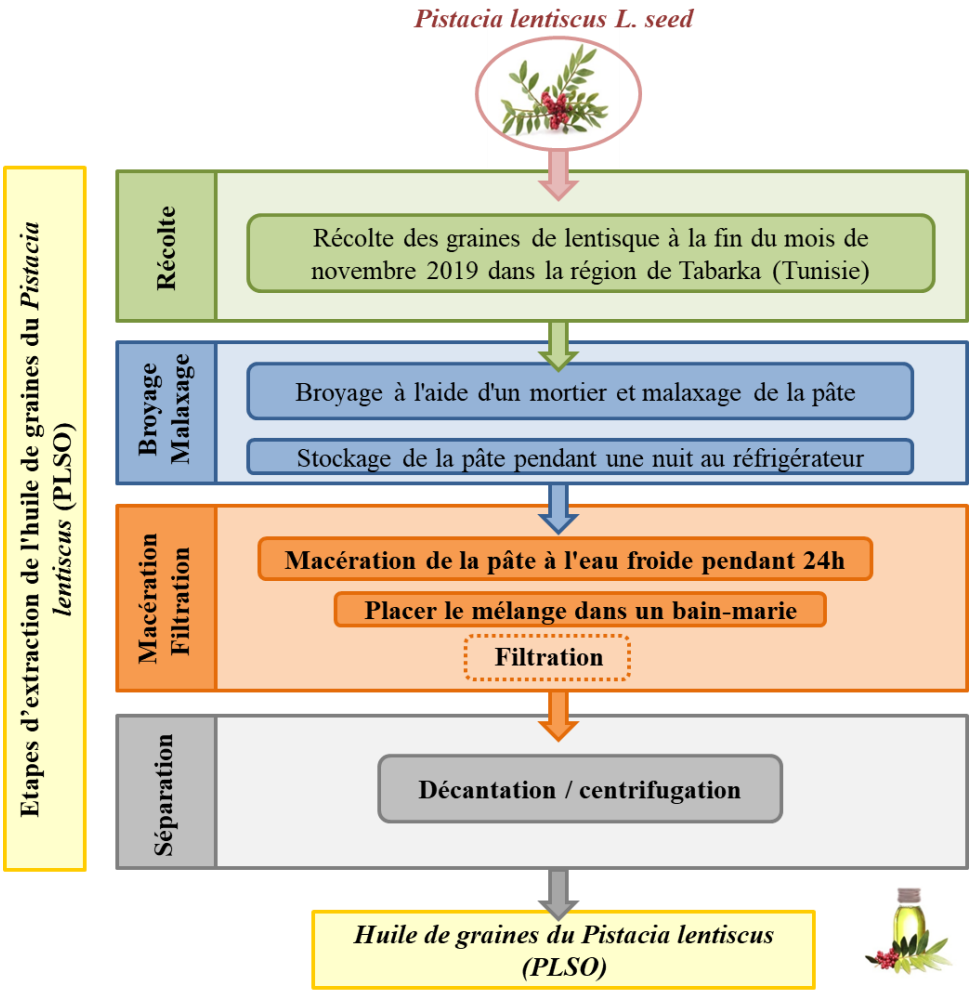


Figure 25 : Différentes étapes d'extraction de l'huile de graines de Pistacia lentiscus (PLSO).

1.2. Huile de chardon-marie (Milk thistle seed oil : MTSO)

L'huile de chardon-marie (Sylibum marianum) a été préparée et caractérisée par Dr. Wiem MEDDEB au laboratoire de Bio-PeroxIL (Extraction, caractérisation physicochimique,

profil lipidique et activité cytoprotectrice d'huile de chardon-marie de Tunisie, 2018). L'extraction de cette huile est faite par pression à froid.

2. Détermination de la composition chimique des huiles

La quantification des composés phénoliques est précédée par une étape de préparation des extraits méthaloniques des huiles. 4 g des huiles sont soigneusement mélangés avec 2 mL de n-hexane et de 4 mL de méthanol/eau 60 % (v/v), suivi d'une vigoureuse agitation pendant 10 min. Le mélange est centrifugé à 1 490 g pendant 15 min pour séparer les deux phases. La phase méthalonique supérieure, contenant les polyphénols, est récupéré, et la phase n-hexanique, contenant les résidus d'huile, est ré-extraite deux fois avec du méthanol 60 % (v/v). Les extraits méthanoliques obtenues sont combinées, lavées avec 4 mL de n-hexane et stockées à -20 °C jusqu'à l'analyse.

2.1. Dosage des composés phénoliques

2.1.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué avec le réactif colorimétrique Folin-Ciocalteu, mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune, selon le protocole de Singleton & Rossi **(Singleton & Rossi, 1965)**. Le principe de ce dosage est basé sur la réduction de Folin-Ciocalteu par les groupements oxydables des composés phénoliques en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits.

Pour le dosage, 200 µL de chaque extrait ou de la molécule standard (acide gallique) est mélangé avec 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé et 800 µL de carbonate de sodium à 7,5 % (Na_2CO_3). Après 30 min d'incubation dans l'obscurité à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 765 nm. La concentration des polyphénols totaux, exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g d'extrait, est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0,016 - 2 mg/mL).

2.1.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été effectué selon le protocole décrit par Kim et al. **(D.-O. Kim et al., 2003)**. Le principe de ce dosage repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes avec le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$).

Un volume de 100 µL de chaque extrait ou de la molécule standard (catéchine) est mélangé avec 400 µL d'H_20, puis avec 30 µL de nitrite de sodium ($NaNO_2$, 5 %). Après 5 min, 20 µL d'une solution de $AlCl_3$ (10 %) fraichement préparée est ajouté. Après 5 min de repos à température ambiante, 200 µL de Na_2CO_3 (1 M) et 200 µL d'H_2O sont additionnées. L'absorbance du mélange est mesurée à 510 nm. La concentration des flavonoïdes, exprimée en mg d'équivalent de catéchine par g d'extrait, est déduite à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la catéchine (0,016 - 2 mg/mL).

2.1.3. Dosage des caroténoïdes

Le dosage des caroténoïdes a été mesuré par un dosage colorimétrique selon la méthode décrite par Dhibi et al. **(Dhibi et al., 2014)**.

Un volume de 50 µL d'huiles a été homogénéisé avec 1 mL d'éther de pétrole. Après 2 min d'agitation, la teneur en caroténoïdes a été mesurée à des longueurs d'onde comprises entre 440 et 480 nm. La concentration des caroténoïdes a été déterminée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Caroténoïdes (mg/kg)} = A_{max} \times (10^5/2650)$$

Avec

A_{max} : Maximum d'absorption compris entre 440 et 480 nm

2.2. Analyse du profil des polyphénols

Les analyses qualitative et quantitative des polyphénols ont été réalisées par chromatographie en phase liquide à haute performance HPLC (Perkin Elmer série 200) équipée d'un injecteur automatique, d'une pompe quaternaire, d'un four à colonne à effet Peltier, et d'un détecteur DAD. La séparation des composés phénoliques est réalisée sur une colonne Licrospher 100 RP-18 (150 × 4,6 mm de diamètre, 5 µm de taille de particules, Merck). La phase mobile est composée d'un système de solvant binaire (A et B). Le premier système (A) est constitué de l'eau distillée à pH ajusté à 2,2 et d'acide trifluoroacétique (ATF) et le deuxième système (B) d'acétonitrile. Le gradient d'élution est programmé comme suit : 0 à 5 min avec le solvant A 100 %, et 5 à 50 min avec le solvant A 100 à 45 %. Le débit est fixé à 1 mL/min tout au long du gradient et la température de la colonne est maintenue à 25 °C. Le volume d'injection était de 20 µL. La quantification des composés phénoliques des huiles est faite grâce à l'utilisation des étalons à une longueur d'onde de 280 nm. La courbe d'étalonnage est construite

en utilisant une solution standard de quercétine à différents niveaux de concentration (25 à 400 mg de quercétine/L). Les données sont exprimées en équivalents mg de quercétine/100 g d'huile. L'analyse des polyphénols est réalisée par le laboratoire Lara-Spiral (Emmanuelle Camus-Prost / Dr Michel Prost, Couternon, France).

2.3. Analyse du profil des acides gras

Les lipides totaux ont été extraits à partir des huiles selon la méthode décrite par Moilanen & Nikkari **(Moilanen & Nikkari, 1981)**. Les lipides sont trans-méthylés avec du méthanol-trifluorure de bore (BF_3 à 14 %) en utilisant la méthode de Morrison & Smith **(Morrison & Smith, 1964)**. Par la suite, les esters méthyliques d'acides gras (FAME) sont analysés par CPG. 1 µL de chaque échantillon est injecté dans le système de CPG (Hewlett Packard Modèle 5890, Palo Alto, CA, USA) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne CP-88 SIL (100 mx 0,25 mm de diamètre interne, l'épaisseur du film de 0,20 mm, Varian, Les Ulis, France). La température du four est maintenue à 60 °C pendant 5 min, augmentée jusqu'à 165 °C à 15°C/min et maintenue pendant 1 min, puis à 225°C à 2°C/min et enfin maintenue à 225°C pendant 17 min. L'hydrogène est utilisé comme gaz vecteur. L'injecteur et le détecteur sont maintenus à 250°C. Le pourcentage de chaque acide gras est exprimé en rapportant l'aire de chaque pic d'acide gras à la somme des aires de tous les pics d'acides gras détectés. Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme lipidomique (Lucy Martine / Dr Niyazi Acar, INRAe, Dijon, France).

2.4. Analyse des phytostérols

L'analyse des phytostérols est basée sur un isolement de la fraction insaponifiable puis une silylation de la fraction insaponifiable avant une injection directe en chromatographie en phase gazeuse (CPG).

2.4.1. Isolement de la fraction insaponifiable

Le principe de cette méthode repose sur la saponification d'une prise d'essai de 50 mg de l'huile par 5 mL d'une solution de d'hydroxyde de potassium méthanolique (1 N), et 25 µL de cholestanol utilisé comme standard interne (1 mg/mL). Le mélange est resté à température ambiante pendant une nuit. Après l'ajout de 10 mL d'eau distillée et 10 mL de dichlorométhane, le mélange est mélangé vigoureusement et centrifugé à 1 120 g pendant 3 min. La fraction organique est transférée dans un deuxième flacon. La matière insaponifiable est extraite deux fois avec du dichlorométhane (10 mL). Les extraits de dichlorométhane sont

lavés avec 5 mL de l'eau distillée jusqu'à neutralité. Le solvant est ensuite évaporé sous flux d'azote à 40 °C.

2.4.2. Silylation de la fraction insaponifiable

Les dérivés de stérol ont été préparés selon Park & Addis **(Park & Addis, 1985)**. Après élimination du dichlorométhane, le résidu a été mélangé avec 300 µL de bis-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (BSTFA) (avec 1 % trimethylchlorosilane) (TMCS) et 50 µL de pyridine. Le mélange est chauffé à 60 °C pendant 30 min.

2.4.3. Identification des stérols

L'analyse des stérols est effectuée par chromatographie en phase gazeuse - couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID). Le système de CPG utilisé est un Hewlett-Packard HP-4890D équipé d'un DB-5MS, fusionné à une colonne capillaire de silice (30 m x 0,25 mm d'épaisseur de film de 0,25 um de diamètre interne). Les températures de l'injecteur et du détecteur sont à 290 °C. L'hélium est utilisé comme gaz porteur à une pression d'entrée de 120 kPa. L'injection se fait en mode avec division avec un rapport de 1/20. Les stérols sont identifiés par leurs temps de rétention par rapport à l'étalon interne (cholestanol). Les résultats obtenus sont confirmés par la suite par couplage à la spectrométrie de la masse en opérant les mêmes conditions que celle de la CPG-FID. Ces analyses sont réalisées sur la plateforme lipidomique (Lucy Martine / Dr Niyazi Acar, INRAe, Dijon, France).

2.5. Analyse de l'α-tocophérol

L'analyse de l'α-tocophérol a été réalisée sur la plateforme d'analyse lipidomique (Lipidomic Analytical Platform, Université de Bourgogne-CHU Dijon- INSERM, Responsable : Jean-Paul Pais de Barros, Dijon, France). Les échantillons d'huile sont dilués 10 fois avec de l'hexane. Une quantité de 5 mg de chaque échantillon dilué est mélangée pendant 1 min avec 200 µL de solution saline, 200 µL d'éthanol/BHT (50 mg/L) contenant du Tocol utilisé comme standard interne (1 ng/µL) et 500 µL d'hexane. Les extraits sont centrifugés à 10 000 g pendant 5 min à 4 °C. La couche supérieure est recueillie dans un nouveau tube et évaporée à sec sous un flux d'azote. Les extraits séchés sont mis en suspension avec 50 µL de méthanol/BHT (50 mg/L) et centrifugés à 10 000 g pendant 5 min à 4 °C. Les surnageants sont finalement transférés dans un flacon d'injection. 2 µL de chaque extrait sont injectées à l'aide d'un passeur automatique dans un Poroshell 120 EC-C18 (3 x 50 mm, 2,7 µm) maintenu à 35 °C. La séparation est réalisée avec une pompe HPLC 1260 (Agilent Technologies) en utilisant un gradient linéaire de méthanol (90 % jusqu'à 100 % en 5 min, et maintenu à 100 % pendant 3

min). La détection est réalisée avec un détecteur de lumière à fluorescence (Agilent Technologies) à λ_{Exmax} 292 nm et λ_{Emmax} 325 nm. Les étalons d'α-tocophérol (0-800 ng) sont extraits avec le même protocole que les échantillons. Les rapports de surface de l'α -tocophérol (Temps de rétention (RT) = 5,4 min) au tocol (RT = 4,0 min) sont calculés pour les échantillons et les standards de calibrage.

3. Détermination de l'activité antioxydante des extraits d'huiles

L'activité antioxydante des différents extraits méthanoliques d'huile de lentisque (PLSO) et d'huile de chardon-marie (MTSO) ont été quantifiées en utilisant les tests complémentaires : DPPH, FRAP, chélation des ions ferreux, et KRL.

3.1. Test de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

L'activité de piégeage de radicaux libres des extraits méthanoliques a été réalisé suivant la méthode décrite par Molyneux **(Molyneux, 2004)** en utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Le principe de ce test est basé sur la capacité d'un composé antioxydant à réduire le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), qui est un radical stable et de coloration violette. Le maximum de son absorption dans le visible se situe à 517 nm en solution alcoolique. La réduction de ce radical par un donneur l'atome d'hydrogéne (AH), provenant du composé antioxydant, conduit à la formation de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazine (DPPHH) de coloration jaune. L'activité antioxydante des extraits est alors corrélée à sa capacité à réduire le DPPH• (**Figure 26**).

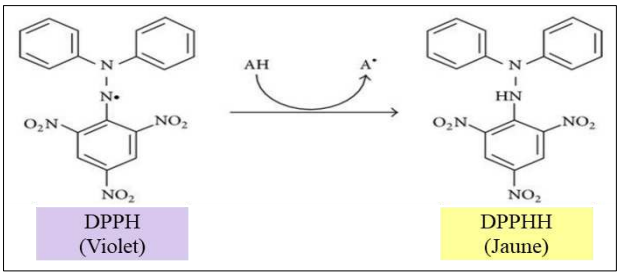


Figure 26 : Principe du test *DPPH•*.

À différentes concentrations (de 0,016 mg/mL à 2 mg/mL), 50 µL de chaque extrait méthanolique ou du standard (acide ascorbique) sont mélangés avec 950 µL d'une solution méthanolique de DPPH (10^{-4} M). Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'activité antioxydante liée à l'effet de piégeage des radicaux DPPH• est exprimée en pourcentage d'inhibition à l'aide de la formule suivante :

$$\text{L'activité anti-radicalaire (\%)} = \frac{A0-A1}{A0} \times 100$$

Avec

A0= Absorbance de la solution de DPPH

A1= Absorbance de l'extrait ou standard

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer les concentrations qui correspondent à 50 % d'inhibition (IC50) ; la valeur d'IC50 la plus faible correspond à l'activité anti-radicalaire de l'extrait la plus élevée. La valeur de l'IC50 a été exprimée en mg/mL.

3.1. Test de la réduction du fer : FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)

Le pouvoir réducteur du fer présent dans les extraits méthanoliques a été déterminé selon la méthode de Bassene **(Bassene, 2012)**. Le principe de ce test est basé sur la capacité des extraits à donner un électron tout en convertissant le fer ferrique (Fe^{+3}), présent dans le complexe hexacyanoferrate de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) , en fer ferreux (Fe^{+2}). La réaction se manifeste par le virement de couleur jaune du Fe^{+3} en couleur bleue du Fe^{+2} mesurable à 700 nm (**Figure 27**). Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur de l'extrait n'est important.

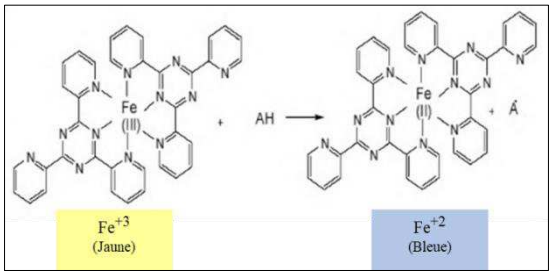


Figure 27: Principe du test FRAP.

À différentes concentrations (de 0,016 mg/mL à 2 mg/mL), 400 µL de chaque extrait méthanolique ou du standard (acide ascorbique) sont mélangés avec 1 mL de tampon phosphate (0,2 M ; pH 6,6) et 1 mL de $K_3Fe(CN)_6$ à 1 %. Après 30 min d'incubation à 50 °C, 1 mL de TCA 10 % a été ajouté pour stopper la réaction, puis le mélange est centrifugé à 1750 × g pendant 10 min. Ensuite, 1 mL du surnageant obtenu est incubé avec 200 µL d'une solution de chlorure ferrique ($FeCl_3$; 0,1 %) fraîchement préparé. Après 30 min d'incubation à l'obscurité, l'absorbance du mélange réactionnel est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm

contre un blanc sans échantillon préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par méthanol. L'activité antioxydante liée pouvoir réducteur des extraits est exprimée en pourcentage de pouvoir réducteur à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Le pouvoir réducteur de fer (\%)} = \frac{Aa - Ab}{Aa} \times 100$$

Avec

Aa= Absorbance de l'extrait ou standard

Ab= Absorbance bu blanc

Les résultats sont exprimés en concentrations (mg/mL) en fonction des absorbances obtenues.

3.2. Test de chélation des ions ferreux (Fe2+)

La capacité chélatrice des extraits méthanoliques a été déterminée selon la méthode de Dinins et al. **(Dinis et al., 1994)**. Le principe de ce test est basé sur l'inhibition de la formation du complexe Fe^{+2}-Ferrozine, chromophore de couleur violette mesurable à 562 nm. En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution intense du couleur violette. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur est important.

À différentes concentrations (de 0,016 mg/mL à 2 mg/mL), 100 µL de chaque extrait méthanolique ou du standard (EDTA) sont mélangés avec 50 µL de solution de chlorure ferreux ($FeCl_2$, 2 mM). Après 10 min, 100 µL de ferrozine (5 mM dans l'éthanol) sont additionnés au milieu réactionnel, le mélange est bien agité puis laissé pour réagir pendant 10 min à température ambiante permettant ainsi la formation de complexe avec une couleur violet (Fe^{+2} - Ferrozine). L'absorbance du complexe formé est mesurée à 562 nm contre un blanc sans échantillon préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par méthanol. L'effet séquestrant des extraits vis-à-vis du fer est exprimé en pourcentage de chélation selon la formule suivante :

$$\text{L'activité chélatrice (\%)} = \frac{Aa - Ab}{Aa} \times 100$$

Avec

Aa= Absorbance de l'extrait ou standard

Ab= Absorbance bu blanc

Les résultats sont exprimés en concentrations (mg/mL) en fonction des absorbances obtenues.

3.3. Test KRL (Kit radicaux libres)

Le potentiel global de défense antioxydante des huiles a été mesuré avec le test KRL (Kit Radicaux Libres) (**(Rossi et al., 2013) (Zarrouk et al., 2019)**). Ce test consiste à soumettre le sang total à une attaque radicalaire pour mobiliser les capteurs de radicaux présents dans le sang et neutraliser les processus d'oxydation **(Rossi et al., 2013)**. Les défenses antioxydantes intra- et extra-cellulaires contribuent au maintien de l'intégrité membranaire et des fonctions cellulaires jusqu'à la lyse des globules rouges. Ce test biologique permet donc de mesurer de façon dynamique la capacité globale de défense antiradicalaire d'un individu. Cette capacité est donnée par l'augmentation de la durée de résistance à l'hémolyse par rapport à un témoin. A l'aide de ce test, nous pouvons également déterminer *in vitro*, dans des conditions biologiques, la capacité antioxydantes des huiles. Des échantillons de sang témoin dilués en présence ou en l'absence des huiles, diluées dans du DMSO, sont oxydés par l'oxygène moléculaire dans une suspension aqueuse à l'aide d'une solution de dichlorhydrate de 2,2′–azobis (2-amidinopropane) (AAPH). La résistance globale du sang témoin à l'attaque radicalaire en présence ou non du produit AAPH est exprimée par le temps au bout duquel 50% des cellules sanguines sont lysées (T ½ en min) (**Figure 28**).

L'hémolyse a été enregistrée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 96 puits en mesurant la décroissance de la densité optique turbidimétrique à 620 nm. L'efficacité antioxydante de l'huile est exprimée en équivalent Trolox. La même analyse est réalisée avec l'α-tocophérol

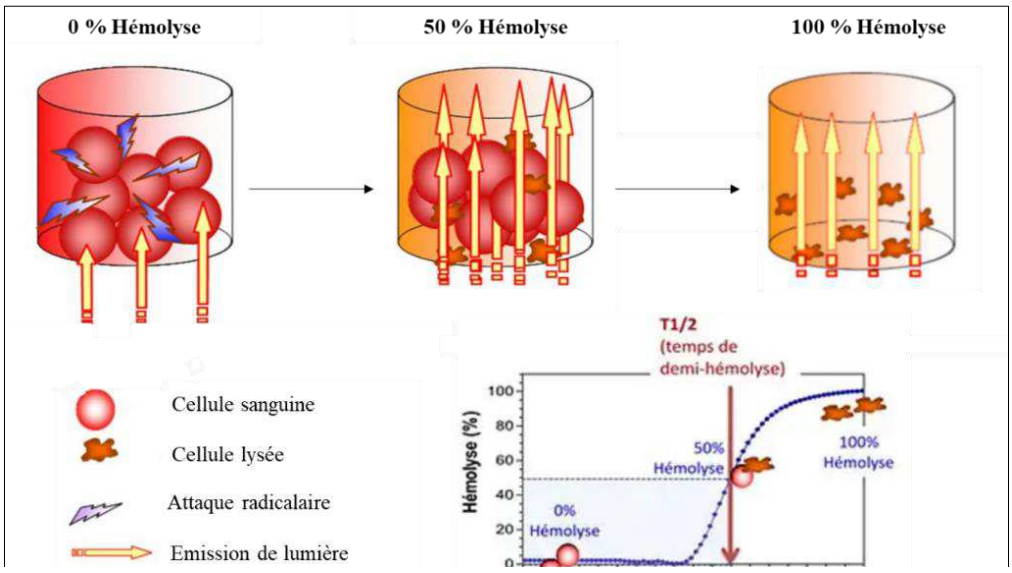


Figure 28 : Principe du test KRL (Kit Radicaux Libres ; Société Lara-Spiral, Couternon, France).

(Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) utilisé comme contrôle. Le test KRL a été réalisé par le laboratoire Lara-Spiral (Dr Philippe Durand / Dr Michel Prost, Couternon, France).

III. Etude *in vitro*

1. Matériel biologique : cellules musculaires squelettiques murines C2C12 (myoblastes murins)

1.1. Choix du modèle cellulaire

Les cellules C2C12 sont une lignée cellulaire de myoblastes de souris immortalisées, obtenues à partir de muscles des pattes arrières de souris femelles C3H après une blessure par écrasement **(Yaffe & Saxel, 1977)**. Ces myoblastes présentent l'avantage de proliférer rapidement dans un milieu à concentration sérique élevée (10 % de sérum de veau fœtal (SVF)) et de se différencier en myotubes plurinucléés dans des conditions à faible pourcentage de sérum de cheval (2% de sérum de cheval (SC)). Cette lignée cellulaire constitue un bon modèle pour étudier les aspects de la myogenèse dans différentes conditions environnementales (absence ou présence d'oxystérols associés ou non à des nutriments ou à des huiles).

1.2. Culture cellulaire

Les cellules C2C12 sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) renfermant tous les nutriments indispensables à la survie cellulaire (minéraux, vitamines, acides aminés, glucose) et le rouge de phénol. Le milieu de culture est supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) decomplémenté et avec 1 % d'un mélange d'antibiotique (10 000 U/mL pénicilline, 10 000 µg/mL streptomycine). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO_2. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours afin que les nutriments du milieu ne deviennent pas limitants pour le bon développement des cellules.

Lorsque les cellules atteignent 80 % de confluence, le milieu de culture est éliminé et le tapis cellulaire est rincé avec du PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) stérile afin d'éliminer les débris cellulaires et le milieu contenant du SVF qui pourrait inhiber l'action ultérieure de la trypsine pour décoller le tapis cellulaire. Le PBS 1X est ensuite remplacé par 2 mL d'un mélange de trypsine (0,5 mg/mL) et d'EDTA (0,2 mg/mL). Une fois les cellules détachées, l'action de la trypsine est bloquée par ajout de 8 mL de milieu de culture complet. Les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 300 g puis reprises dans 10 mL de milieu de culture. Elles

sont ensuite comptées grâce à une cellule de Malassez et redistribuées dans de nouvelles des boîtes de Pétri à raison de 1,2 × 10^6 cellules par boîte. Toutes les expériences sont réalisées avec des cultures n'excédant pas 20 passages.

2. Substances pro et antioxydantes

2.1. Oxystérols

Les deux oxystérols (7β-OHC : CID 473141, et 7KC : CID 91474) sont fournis soit par le Prof. Mohammad Samadi (Université de Lorraine, Metz, France), soit par Sigma-Aldrich. Ils sont préparés à la concentration de 2 mM (800 µg/mL) comme suit : 5 mg d'oxystérols (7β-OHC, ou 7KC) sont solubilisés dans 250 µL d'éthanol absolu, puis mélangés avec 6 mL de milieu de culture. Les solutions sont bien agitées et conservées à 4 °C. Ces dernières sont ensuite diluées dans du milieu de culture afin d'obtenir les concentrations souhaitées.

2.2. Huiles Méditerranéennes

Les deux huiles Méditerranéennes (PLSO et MTSO) sont préparées à la concentration de 80 mg/mL comme suit : 80 mg d'huiles (PLSO et MTSO) sont solubilisés dans 1 mL du diméthylsulfoxyde (DMSO), vortexés puis conservés à 4 °C. Ces dernières sont ensuite diluées dans du milieu de culture afin d'obtenir les concentrations souhaitées.

2.3. α-tocophérol

Une solution d'α-tocophérol (80 mM) (réf : T 3251, Sigma Aldrich) est préparée par dissolution de 0,34 g dans 1 mL d'éthanol absolu. La solution mère sont ensuite bien agitée et conservée à 4 °C. Cette dernière est ensuite diluée dans du milieu de culture aux concentrations désirées.

3. Traitements cellulaires

Selon l'expérimentation, les cellules C2C12 sont ensemencées pendant 12 h soit dans des boîtes Pétri de à raison de 1,2 × 10^6 cellules par boite, soit dans des plaques 6 puits (1,6 × 10^5 cellules par puits), soit dans des plaques 12 puits (8 × 10^4 cellules par puits), soit dans des plaques 24 puits (4 × 10^4 cellules par puits), soit dans des plaques 96 puits (10^4 cellules par puits). Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) ou de 7KC (50 µM) associés ou non au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL) ou à l'α-tocophérol (400 µM).

- Le 7β-OHC et le 7KC sont utilisés à 50 µM. À cette concentration, les deux oxystérols sont cytotoxiques **((Sghaier, Zarrouk, et al., 2019) (Yammine, Nury, et al., 2020) (Nury, Yammine, et al., 2021))**.
- Les huiles de graines de lentisque « PLSO » et de chardon-marie « MTSO » sont utilisées à 100 µg/mL (plus faible concentration qui protège les C2C12 des effets toxiques de 7β-OHC (50 µM) et de 7KC (50 µM)).
- L'α-tocophérol est utilisée à 400 µM comme contrôle positif pour la cytoprotection, en raison de sa capacité à réduire les effets toxiques d'oxystérols **(Ragot et al., 2013)**.

4. Analyse de la morphologie cellulaire par microscopie à contraste de phase

La morphologie et la densité de myoblastes C2C12 ont été étudiées en plaque de 24 puits après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM) à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Les images sont digitalisées grâce à une caméra Axiocam (Zeiss).

5. Evaluation de la viabilité cellulaire

5.1. Mesure de l'activité de l'enzyme succinate déhydrogénase par le test MTT

L'impact de différents traitements sur la viabilité cellulaire et/ou l'activité mitochondriale ont été déterminé par l'utilisation du MTT (Bromure de sel de tétrazolium 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl) -2,5 diphényltétrazoilum). Ce test consiste à mesurer l'activité de la succinate déhydrogénase mitochondriale qui n'est observée que sur des cellules vivantes. Cette enzyme, par coupure du cycle tétrazolium, transforme le MTT, de couleur jaune, en cristaux de formazan de couleur violet foncé. La membrane des cellules est imperméable aux cristaux de formazan conduisant ainsi à leur accumulation intracellulaire (**Figure 29**).

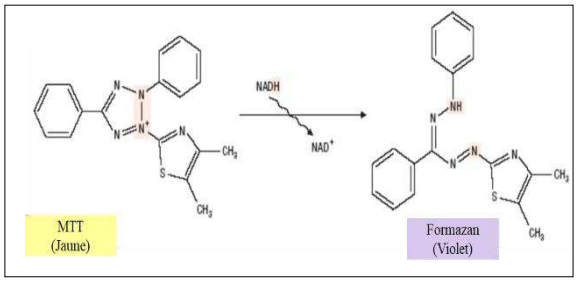


Figure 29 : Réaction de réduction du MTT en cristaux de formazan.

Les cellules C2C12 sont ensemencées dans des plaques de 96 puits à raison de 10^4 cellules par puits. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), une solution MTT (0,05 mg/mL) dilué dans de milieu DMEM) est ajoutée dans chacun des puits et incubée pendant 3 h à 37 °C sous atmosphère humide et en présence de 5 % (v/v) de CO_2. La solution de MTT est ensuite éliminée et 100 µL de DMSO sont ajoutés pour dissoudre les cristaux de formazan. Après agitation, l'absorbance est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France). L'activité succinate déhydrogénase est déterminée par rapport à celle des cellules contrôles (cellules non traitées).

5.2. Mesure de l'activité estérase par le test FDA

La viabilité cellulaire a été étudiée à l'aide de la fluorescéine diacétate (FDA). La FDA est une molécule non fluorescente modifiée par l'acétylation de ses deux groupements hydroxyles. Une fois mise en contact avec les cellules, la FDA pénètre rapidement dans les cellules. Si la cellule est vivante, la FDA est hydrolysée par des estérases produisant de la fluorescéine, une molécule qui fluoresce selon un couple excitation-émission (485nm-528 nm). La fluorescence FDA est liée à la viabilité cellulaire.

Les cellules C2C12 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules adhérentes sont incubées à l'obscurité à 37 °C avec 15 µg/mL de FDA (Sigma-Aldrich). La solution de FDA est ensuite éliminée et les cellules sont lysées en présence de 100 µL de Tris-HCl (10 mM) contenant 1 % de dodécylsulfate (SDS). L'intensité de fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à fluorescence (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France). La viabilité cellulaire mesurée avec le FDA est évaluée par rapport à celle des cellules contrôles.

5.3. Quantification des cellules adhérentes par le test Sulforhodamine 101

La Sulforhodamine 101 (SR101) qui colore les protéines cellulaires a été utilisée pour quantifier les cellules adhérentes et évaluer la confluence **(Namsi et al., 2019)**.

Les cellules C2C12 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits. À la fin de la période de traitement, les cellules adhérentes sont fixées avec de l'éthanol froid 70 % pendant 20 min à 4 °C, rincées deux fois dans du PBS 1X, colorées avec une solution de SR101 (1,5 µg/mL, 30 min, 4 °C) puis lavées deux fois avec du PBS 1X. La

fluorescence est mesurée avec un lecteur de microplaques à fluorescence (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France) en utilisant λ_{Ex} max = 535 nm / λ_{Em} max= 610 nm.

5.4. Quantification de la mortalité cellulaire par coloration à l'iodure de propidium

La mortalité cellulaire tardive a été évaluée par coloration à l'iodure de propidium (IP). Ce dernier est un agent fluorescent capable de pénétrer dans les cellules aux membranes cytoplasmiques endommagées, considérées comme des cellules mortes **(Yeh et al., 1981)**. L'IP s'intercale de manière irréversible au niveau des acides nucléiques (ADN, ARN) produisant une fluorescence orange/rouge (λ_{Ex} max = 538 nm ; λ_{Em} max = 617 nm).

Les cellules C2C12 sont ensemencées en plaques 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules C2C12 (cellules adhérentes et non adhérentes) sont colorées avec une solution IP (1 µg/mL de PBS) pendant 5 min à 37 °C, puis immédiatement analysées sur un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). La fluorescence d'IP est sélectionnée sur un filtre passe-bande de 590 ± 20 nm, en prenant en compte 10 000 cellules par échantillons. Les données collectées sur une échelle logarithmique sont analysées avec le logiciel FlowJo. Le pourcentage de cellules mortes correspond aux cellules IP positives.

6. Evaluation du stress oxydant

6.1. Mesure de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène avec le dihydroéthidium (DHE)

La coloration au dihydroéthidium (DHE) permet d'évaluer la surproduction des espèces réactives de l'oxygène (ERO), principalement les anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$). Le DHE, est un fluorochrome lipophile non fluorescent, traversant librement les membranes cellulaires et qui est rapidement oxydé en présence d'ERO en éthidium fluorescent **(Figure 30)**. Ce dernier s'intercale de façon covalente au niveau des bases de l'ADN et émet une fluorescence orange/rouge (λ_{Em} max = 575 nm) en réponse à une excitation bleue (488 nm) **(Rothe & Valet, 1990)**.

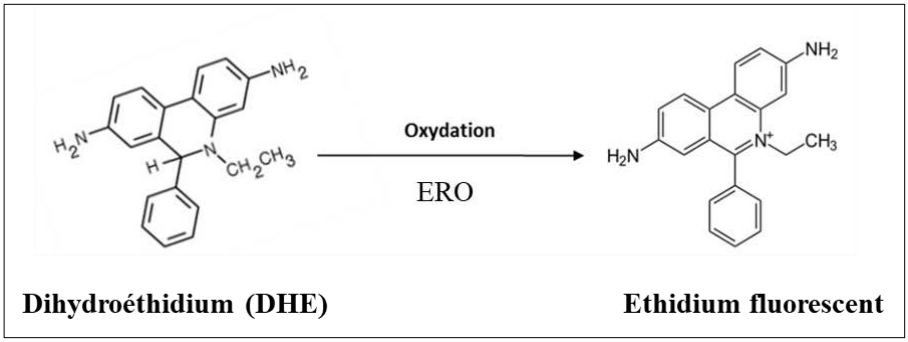


Figure 30 : Oxydation du Dihydroéthidium (DHE) en Ethidium fluorescent.

Les cellules C2C12 sont ensemencées en plaques 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules adhérentes et non-adhérentes sont collectées par trypsination, lavées et puis centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS 1X contenant 2 µM de DHE. Après 15 min d'incubation à 37 °C, les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Les signaux fluorescents des cellules colorées par le DHE sont collectés par un filtre passe-bande de 580 nm, en prenant en compte 10 000 cellules. Les données collectées sur une échelle logarithmique sont analysées avec le logiciel FlowJo.

6.2. Dosage des activités des enzymes antioxydantes et des marqueurs de l'oxydation des lipides et des protéines

Les méthodes utilisées pour le dosage de l'activité enzymatiques GPx et SOD, pour la peroxydation des lipides (DC, MDA) et des protéines (PC) sur lysats cellulaires sont les mêmes que dans la partie clinique « Evaluation du stress oxydant ».

7. Evaluation du statut mitochondrial

7.1. Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial par coloration au 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3))

Le potentiel transmembranaire mitochondrial (ΔΨm) est essentiel pour maintenir la fonction physiologique de la chaîne respiratoire pour produire l'ATP. La détermination de son état est largement utilisée pour caractériser le métabolisme, et la mort cellulaire à un stade précoce **(L. B. Chen, 1988)**. Une différence de potentiel existe de part et d'autre de la membrane

interne mitochondriale. Cette différence est créée par les pompes à protons qui réalisent un gradient électrochimique (ΔΨm) entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Cette variation du potentiel transmembranaire mitochondrial (ΔΨm) est détectée à l'aide de l'iodure de 3,3′-dihexyloxacarbocyanine ($DiOC_6(3)$). Le $DiOC_6(3)$ (λ_{Ex} max= 488 nm ; λ_{Em} max= 501 nm) est un fluochrome cationique, lipophile, son accumulation dans la mitochondrie dépend du ΔΨm. Plus le ΔΨm est élevé, plus la fluorescence associée au $DiOC_6(3)$ est forte et vice-versa **(Vejux et al., 2020)**.

Les cellules C2C12 sont ensemencées en plaques 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules adhérentes et non-adhérentes sont collectées, lavées, puis centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est repris dans 1 mL de PBS 1X contenant 40 nM de $DiOC_6(3)$ et incubé pendant 15 min à 37 °C **(Ragot et al., 2013)**. Les cellules sont ensuite analysées au cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). La chute de ΔΨm est indiquée par une diminution de l'intensité de fluorescence verte qui est recueillie à travers un filtre passe-bande de 520 ± 10 nm. Les données collectées sur une échelle logarithmique sont analysées avec le logiciel FlowJo en prenant en compte 10 000 cellules.

7.2. Dosage de l'ATP intracellulaire

L'adénosine triphosphate (ATP) est le majeur vecteur d'énergie utilisé dans toutes les activités cellulaires. Il est produit par la mitochondrie au cours de la phosphorylation oxydative.

Le dosage de l'ATP a été réalisé à l'aide du kit « ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II », en suivant les instructions du fabricant (réf: 11699695001, Roche).

Les cellules C2C12 sont ensemencées en plaques 12 puits à raison de 8 x 10^4 cellules par puits. À la fin des traitements, les cellules sont trypsinées et centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est ensuite repris par 100 µL de tampon de lyse. Après 10 min d'incubation à température ambiante, une centrifugation est réalisée à 1000 g pendant 5 min. Ensuite, 50 µL de luciférase sont ajoutés à 50 µL de chaque lysat cellulaire pour mesurer la bioluminescence des échantillons à l'aide d'un lecteur de microplaques (Tecan Infinite M200 Pro). Une courbe d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère d'ATP (10,5 mg/mL) en utilisant l'ATP lyophilisé fourni par le kit pour déterminer la concentration d'ATP cellulaire.

7.3. Mesure de la masse mitochondriale par coloration au MitoTracker Red

La masse mitochondriale a été quantifiée par cytométrie en flux après coloration avec le MitoTracker Red (Thermo Fisher Scientific). Le MitoTracker Red est un fluorochrome qui a la capacité à traverser la membrane par diffusion passive pour s'accumuler dans les mitochondries des cellules vivantes **(Zarrouk et al., 2012)**.

Les cellules C2C12 sont cultivées dans des plaques 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées par trypsination puis lavées avec du DMEM sans SVF, et 100 nM d'une solution de Mitotracker Red, préparée dans du DMEM sans SVF, sont ajoutés. Après 30 min d'incubation à 37 °C, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et re-suspendues dans 1 mL de PBS 1X pour être analysées avec un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Les signaux fluorescents sont recueillis avec un filtre passe-bande de 580 ± 20 nm. Pour chaque échantillon, la fluorescence est quantifiée sur 10 000 cellules et les données collectées sur une échelle logarithmique sont analysées avec le logiciel FlowJo.

7.4. Mesure de la production d'anions superoxydes mitochondriaux par coloration au MitoSOX Red

La production d'anions superoxydes mitochondriaux ($O_2^{\bullet-}$) a été mesurée par cytométrie en flux après coloration au MitoSOX Red, qui cible particulièrement les mitochondries dans les cellules vivantes **(Zarrouk et al., 2012)**. Une fois dans les mitochondries, cette molécule est oxydée par l'$O_2^{\bullet-}$ et émet une fluorescence orange/rouge (λ_{Ex} max = 510 nm ; λ_{Em} max = 580 nm).

Les cellules C2C12 sont ensemencées en plaques 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules adhérentes et non-adhérentes sont détachées par la trypsine et lavées dans du PBS 1X et marquées avec 5 µM de MitoSOX Red à 37 °C pendant 15 min. Les signaux fluorescents sont collectés avec un filtre passe-bande de 580 ± 20 nm et mesurés avec un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences), en prenant en compte10 000 cellules échantillons. Les analyses sont réalisées à l'aide du logiciel FlowJo.

8. Evaluation du statut peroxysomal : Etude de la quantité et de la topographie du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3 par immunofluorescence indirecte

Le transporteur peroxysomal ABCD3 (ATP-binding cassette transporter D3) / PMP70 (70-kDa peroxisomal membrane protein) est un constituant majeur de la membrane peroxysomale utilisé pour mesurer la masse peroxysomale **((Schrader & Fahimi, 2008) (Tawbeh et al., 2021))**. La topographie et la distribution d'ABCD3 sont identifiées par microscopie à illumination structurée (Apotome) et le niveau d'ABCD3 est mesuré par cytométrie en flux.

8.1. Évaluation de la topographie et de la distribution d'ABCD3 par microscopie à illumination structurée (Apotome)

ABCD3 a été visualisé par immunofluorescence indirecte **((E. Gray et al., 2014) (Nury et al., 2018))**. Pour analyser l'aspect de l'immunomarquage, les cellules sont cultivées sur des lames de verre dans des plaques à 6 puits à raison de 2 x 10^5 cellules par puits. À la fin du traitement, des cellules C2C12 adhérentes et non-adhérentes sont collectées, fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 2 % pendant 15 min à température ambiante, puis rincées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules sont perméabilisées et les sites non spécifiques sont ensuite saturés avec une solution de saturation « blocking buffer » (PBS, 0,05 % saponine, 10 % SVF) pendant 30 min à température ambiante. Après lavage avec du PBS 1X, les cellules sont incubées avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre ABCD3 (# 11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA) dilué (1/500) dans la solution de saturation. Après 1 h d'incubation, les cellules sont lavées et incubées dans l'obscurité pendant 30 min avec un anticorps de chèvre anti-lapin 488-Alexa (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) dilué au 1/500 dans du la solution de saturation. Après lavage avec du PBS 1X, les noyaux des cellules sont colorés avec Hoechst 33342 (1 µg/mL). Les cellules sont recouvertes de milieu de montage Dako (Dako, Copenhague, Danemark) et montées entre lame et lamelle. Les échantillons sont conservés dans l'obscurité à +4 °C jusqu'à l'observation.

8.2. Quantification d'ABCD3 par cytométrie en flux

Pour les analyses en cytométrie en flux, les cellules C2C12 en suspension sont immunomarquées selon le même protocole que celui décrit en microscopie. L'analyse est réalisée sur un cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). La fluorescence verte de l'Alexa Fluor 488 est collectée avec un filtre passe-bande de 520 ± 20 nm. Pour chaque

échantillon, 10 000 cellules sont acquises et les données collectées sur une échelle logarithmique sont analysées avec le logiciel FlowJo.

9. Caractérisation et analyse des acides organiques, des stérols et des acides gras par Chromatographie en phase gazeuse couplée en spectrométrie de masse

9.1. Extraction des acides organiques

Pour l'analyse des acides organiques, les homogénats cellulaires sont transmis dans des flacons à bouchon vissé en présence de standards internes (marqués au deutérium ou structurellement homologues), de l'hydroxy toluène butylé (BHT) et de l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA). Les flacons sont scellés avec un septum teflon et leur contenu sont rincés avec l'argon pendant 20 min pour chasser l'air. Les hydrolyses alcalines sont ensuite incubées en présence d'une solution d'hydroxyde de potassium éthanolique (0,5 M), pendant 30 min à température ambiante (20°C) sous agitation magnétique **(Leoni et al., 2017)**.

9.2. Extraction des acides gras

Les lipides totaux sont extraits selon la méthode de folch **(Folch et al., 1957)**. Après 24 h traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les culots cellulaires sont placés dans des tubes en verre en présence de diheptadecanoyl phosphatidylcholine (C17 :0) (1 mg /mL) utilisé comme standard interne. Ce composé est mélangé avec du chloroforme: méthanol (2V :1V), de BHT (50 mg/L) et de NaCl (150 mM). Les échantillons sont incubés pendant 30 min sous agitation puis centrifugés pendant 5 min à 2000 g. La phase organique inférieure est récupérée et évaporée à sec sous vide.

Pour l'analyse des acides gras, y compris les acides gras à très longue chaîne (AGTLC ; C ≥ 22) par CPG-SM, une étape de dérivation des AG doit être effectuée afin d'avoir des dérivés sous forme de pentafluorobenzyl esters (PFB). Pour cela, l'extrait sec est repris dans 100 µL d'acétonitrile, 5 µL de pentafluorobenzylebromide et 5 µL de di-iosopropylethylamine. Après agitation, le mélange est incubé pendant 30 min à température ambiante. Les PFB formés sont extraits par l'ajout de 2 mL d'hexane dans 1 mL d'eau désionisée puis centrifugés à 1 000 g pendant 5 min. À la fin de la centrifugation, la phase hexanique supérieur est récupérée puis évaporée sous vide. Ensuite l'extrait sec obtenue est repris dans 100 µL d'Hexane pour l'analyse.

9.3. Extraction des stérols

Les stérols sont recueillis par extraction liquide à liquide avec de l'hexane. Après correction du pH (<3) avec HCl, tous les métabolites sont extraits dans une extraction séquentielle liquide à liquide avec de l'hexane et de l'acétate d'éthyle. Les solvants organiques sont évaporés sous un léger courant d'argon et convertis en éthers triméthylsilyliques avec le mélange de BSTFA (Bis (triméthylsily) trifluoroacetamide) et 1 % de TMCS (Triméthylchlorosilane) (Pierce/Thermo Fisher Scientific). Après une incubation pendant 45 min à 80°C, la phase organique est évaporée et l'extrait sec obtenu est ensuite repris dans 50 µL d'hexane pour être analysé par CPG-MS.

10. Evaluation et caractérisation de la mort cellulaire

10.1. Détection des cellules en Sub-G1

La mesure du cycle cellulaire par cytométrie en flux divise le cycle en trois phases : G0/G1, phase de quiescence (G0) et d'activation (G1) des cellules ; phase de synthèse de l'ADN (S) et phase de division (G2 + M). Au cours de l'apoptose, l'analyse du cycle cellulaire peut révèler un pic Sub-G1, localisé juste avant le pic G0/G1. Ce pic contient des cellules caractérisées par une condensation et/ou une fragmentation nucléaire associée à une fragmentation internucléosomale de l'ADN, et permet de quantifier la proportion de cellules en apoptose.

Pour cette analyse, les cellules C2C12 sont ensemencées en plaque 12 puits à raison de 8 x 10^4 cellules par puits. Après 24 h traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules sont détachées par la trypsine, centrifugées, puis rincées deux fois au PBS 1X . Les cellules sont fixées dans l'éthanol 70 % froid et placées à -20 °C pendant 12 h. L'éthanol fragilise les membranes cellulaires et facilite le passage de l'IP dans les cellules. Avant l'analyse au cytomètre, les cellules sont lavées au PBS 1X, centrifugées et le culot est repris dans 100 µL de PBS 1X contenant 50 µg/mL d'IP et 100 µg/mL de RNAse A (Sigma Aldrich). Après incubation à l'obscurité et à 37 °C pendant 30 min, les cellules sont analysées au cytomètre en flux BD Accuri™ C6 (BD Biosciences), en prenant en compte 10 000 cellules. La fluorescence est collectée à l'aide d'un filtre passe-bande 590/10 nm et mesurée sur une échelle linéaire. L'analyse des données est faite avec le logiciel FlowJo.

10.2. Quantification des cellules apoptotiques par coloration au Hoechst 33342 et coloration de May-Grünwald-Giemsa

10.2.1. Morphologie des noyaux colorés au Hoechst 33342

La coloration de Hoechst 33342 est utilisée pour quantifier les noyaux apoptotiques carctérisés par des noyaux condensés et/ou fragmentés. Les cellules C2C12 sont ensemencées dans des plaques de 24 puits à raison de 4 x 10^4 cellules par puits cellules. Après 24 h de traitement, les cellules adhérentes et non adhérentes sont collectées par trypsination, centrifugées (300g x 5min) puis fixées avec du paraformaldéhyde à 2% pendant 15 min à température ambiante. Après lavage en PBS 1X, les cellules sont incubées avec du Hœchst 33342 à 1 µg/mL pendant 5 min puis lavées et une cytocentrifugation est réalisée (utilisation du cytospin 2 (Shandon/Thermo Scientific) à 1500 tours/minute pendant 5 min afin de déposer environ 40 000 cellules sur une lame de microscope. Le montage lame / lamelle est effectué avec du milieu de montage (Dako). La morphologie nucléaire est analysée sous microscope à fluorescence en utilisant une excitation ultra-violette (Axioskop fluorescent, Zeiss). Dans ces conditions, une couleur bleue des noyaux est observée.

10.2.2. Morphologie des noyaux colorés au May-Grünwald-Giemsa

La coloration de May-Grünwald Giemsa a aussi été utilisée pour quantifier des cellules avec des noyaux apoptotiques et dont le cytoplasme contient des vacuoles qui peuvent correspondre à des vacuoles d'autophagie . Environ 40 000 cellules sont déposées sur lames par cytocentrifugation (5 min, 1 500 tours / min), puis fixées avec du méthanol 100% pendant 5 min. Les lames sont ensuite incubées avec la coloration de May-Grünwald pendant 5min puis incubés avec le Giemsa pendant 15 min à température ambiante. Les préparations sont ensuite lavées à l'eau distillée, séchées puis immergées pendant 30 secondes dans du xyléne. Le montage est réalisé en EUKITT entre lame et lamelle et les échantillons stockées à + 4°C jusqu'à observation. Dans ces conditions deux couleurs sont observées en lumière blanche : noyau colloré en rose et cytoplasme coloré en bleu/violet.

10.2.3. Marquage Annexine-V / Iodure de propidium

L'analyse de l'apoptose a été réalisée sur un cytomètre en flux spectral à l'aide du kit « Annexin V-FITC/PI Apoptosis », en suivant les instructions du fournisseur (réf : CAK2001, Cohesion Biosciences).

Par rapport à un cytomètre en flux conventionnel, le cytomètre en flux spectral collecte toute la fluorescence émise sans utiliser de filtres. Toute la fluorescence, qui est émise, est

collectée puis analysée et quantifiée sur un large spectre. La fluorescence émise dans les différentes régions du spectre est quantifiée avec des photomultiplicateurs. Le cytomètre en flux spectral dispose de 8 à 16 canaux (fluorescence émise) pour chaque longueur d'onde d'excitation et permet théoriquement la détection simultanée de 50 couleurs par cellule.

10.3. Identification des vacuoles autophagiques

Les vacuoles autophagiques ont été détectées par le kit autophagie, en suivant les instructions du fabricant (réf: ab139484, Abcam).

11. Etude de l'ultrastructure cellulaire par microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique permettant de visualiser à grande résolution (1 à 2 Angstrom) des échantillons biologiques très minces ce qui permet de visualiser les organites cellulaires. Un faisceau d'électrons émis par un canon à électrons traverse l'échantillon à grande vitesse. L'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent un rayonnement transcrit en image visualisable sur un écran. L'image optique obtenue en noir et blanc présente différents contrastes dépendants de la quantité d'électrons ayant traversé l'échantillon.

Dans notre étude, la MET a été utilisée pour étudier les mitochondries et les peroxysomes **(Nury et al., 2018)** dans les cellules C2C12 cultivées pendant 24 h en présence ou en l'absence de 7β-OHC (50 µM) ou 7KC (50 µM), associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), ou α-tocophérol (400 µM). La technique utilisée est spécifique pour une détection simultanée de tous les organites y compris les peroxysomes. Les échantillons sont fixés pendant 1 h à 4 °C dans du glutaraldéhyde à 2,5 % (p/v) dilué dans un tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4), lavés deux fois dans du tampon cacodylate, incubés dans l'obscurité pendant 1 h à 21 °C dans Tris–HCl (0,05 M, pH 9,0) contenant de la diaminobenzidine (DAB : 2,5 mg/mL) et H_2O_2 (10 µL/mL d'une solution à 3 %) ; lavés dans le tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4) pendant 5 min à 21 °C; post-fixés dans du tétroxyde d'osmium à 1 % (p/v) dilué dans du cacodylate de sodium (0,1 M, pH 7,4) pendant 1 h à 21 °C dans l'obscurité ; et rincés dans du tampon cacodylate (0,1 M, pH 7,4). Les préparations sont ensuite déshydratées dans des bains croissants d'éthanol puis imprégnées dans des bains de concentration croissante d'Epon. Des coupes ultrafines sont coupées à l'aide d'un ultramicrotome, colorées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb, et examinées à l'aide d'un microscope électronique HT7800 (Hitachi, Tokyo, Japon) fonctionnant à 100 kV et équipé de deux caméras de technique

de microscopie avancée (AMT) (Woburn, MA, USA). Les images sont obtenues à la plateforme de microscopie électronique DimaCell par Laure Avoscan (Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté).

12. Identification des gouttelettes lipidiques par coloration à l'huile rouge (Oil Red O (ORO))

Les gouttelettes lipidiques sont des organites dynamiques et fonctionnent comme une structure de stockage pour les lipides neutres, y compris les triglycérides et les esters de cholestérol **(Walther & Farese, 2012)**. La présence de lipides neutres a été étudiée par coloration avec de l'Oil Red O (ORO ; Sigma Aldrich). L'ORO est soluble dans les lipides neutres et reste dissous dans les triglycérides après le lavage. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM) en présence ou en absence de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules C2C12 cultivées dans des plaques de 6 puits sont lavées avec du PBS 1X et colorées avec une solution ORO (trois volumes de colorant ORO à 0,5 % dans de l'isopropanol pour deux volumes d'eau) pendant 30 min, puis conservées dans l'obscurité à température ambiante. Les cellules colorées sont lavées trois fois avec de l'eau distillée et les observations sont toujours réalisées au centre des puits d'une plaque 6 puits sont faites sous un microscope inversé à contraste de phase (Axiovert 40 CFL, Zeiss).

13. Analyse protéique par Western blot

Le western blot aussi appelé "Immunoblotting" est une technique de biologie moléculaire employée pour identifier et quantifier une ou des protéines spécifiques dans un mélange protéique. Cette technique consiste en une électrophorèse, un électro-transfert et une révélation à l'aide d'anticorps par chimiluminescence. Les différentes étapes sont les suivantes :

13.1. Extraction et dosage des protéines

Les cellules C2C12 sont ensemencées dans des boîtes de Pétri à raison de 1,2 x 10^6 cellules par boîte. Après 24 h de traitement par le 7β-OHC (50 µM), le 7KC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), les cellules adhérentes et non-adhérentes sont collectées, lavées deux fois avec du PBS 1X, et puis centrifugées à 300 g pendant 5 min. Le culot cellulaire est suspendu dans 100 µL de tampon de lyse RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % SDS, 0,5 % sodium déoxycholate, 1 % NP40, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, pH 8) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (réf: 11697498001, Roche) pendant 30 min dans la glace, afin de

détruire les membranes et de libérer l'ensemble du contenu cellulaire notamment les protéines. Après homogénéisation et centrifugation à 20 000 g pendant 15 min à +4 °C, le surnageant, contenant l'extrait protéique, est récupéré, réparti en tubes et conservé à -20 °C.

La concentration de protéines totales est dosée à l'aide d'un kit bicinchonique (BCA) (Sigma-Aldrich). Ce kit se base sur la capacité des protéines à réduire en milieu alcalin l'ion cuivrique en ion cuivreux. Le complexe formé par l'ion cuivreux et l'acide bicinchonique (BCA) donne une couleur bleue mesurée à 570 nm. Dans une plaque de 96 puits, 1 µL d'extrait protéique est mis en présence de 24 µL d'eau distillée et de 200 µL du mélange BCA et d'ions cuivreux (50:1). Après 30 min d'incubation à 37 °C, l'intensité de la coloration est mesurée à 570 nm. L'absorbance étant proportionnelle à la concentration de protéines, la quantité de protéines totales dans les échantillons est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (BSA).

13.2. Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines totales extraites et dosées sont séparées par électrophorèses en conditions dénaturantes SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Ce type d'électrophorèse permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire sous l'effet d'un champ électrique.

70 µg d'extrait protéique est mis en présence de tampon de charge Laemmli 4X (pour 20 mL de tampon 4X : 8 mL de glycérol, 4 mL de β- mercaptoéthanol, 2 g de SDS, 5 mL de Tris 1 M pH 6,8, quelques cristaux de bleu de bromophénol qsp 20 mL eau distillée), puis dénaturées à 95°C pendant 5 min. Les extraits protéiques ainsi qu'un marqueur de taille (réf; 1610374, Precision Plus Protein, Standards, BioRad) sont déposés sur un gel d'acrylamide dont la composition est indiquée dans le **Tableau 2**. Un champ électrique de 70 V est appliqué pendant 30 min pour la migration des protéines dans le gel de concentration, suivi pendant 1h 30 min d'une migration sous une tension de 110 V dans le gel de séparation. Sous l'influence d'un courant électrique, les protéines chargées migrent vers l'anode permettant une séparation en fonction de leur poids moléculaire.

Tableau 2 : Composition des différents types de gel d'acrylamide.

Solutions mères	Pour deux gels de séparation 8 % (Vf= 15 mL)	Pour deux gels de séparation 12 % (Vf= 15 mL)	Pour deux gels de séparation 14 % (Vf= 15 mL)	Pour 2 gels de concentration 4 % (Vf= 15 mL)
Eau ultrapure	8,15 mL	7,5 mL	6 mL	7,7 mL
Tris Base 1,5 M, SDS 0,4 %, pH 8,8	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	-
Tris Base 1,5 M, SDS 0,4 %, pH 6,8	-	-	-	3 mL
Acrylamide/ Bisacrylamide 40 %	3 mL	3,75 mL	5,25 mL	1,2 mL
Persulfate d'ammonium 10 %	75 µL	75 µL	75 µL	100 µL
TEMED	18 µL	18 µL	18 µL	20 µL

13.1. Transfert des protéines sur la membrane de PVDF

La migration des protéines est suivie d'un transfert sur la membrane polyfluorure de vinylidène (PVDF). Pour cela, le gel est pris en sandwich avec la membrane de PVDF, deux éponges et deux papiers Wattman de 3 mm. La membrane est préalablement activée dans du méthanol puis équilibrée pendant 5 min dans du tampon de transfert. Un courant de 50 V est ensuite appliqué pendant 30 min pour les protéines de poids moléculaires inférieurs à 50 KDa et pendant 1 h pour celle entre 50 et 120 KDa sous agitation avec refroidissement. Sous l'effet du champ électrique, les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont piégées par la membrane suivant la même disposition que dans le gel.

13.2. Détection et révélation des protéines

Après transfert sur la membrane, cette dernière est incubée pendant 1 h sous agitation dans une solution de saturation (PBS 1X, 0,1 % Tween-20) additionnée de 5 % de lait écrémé, pour masquer les sites de liaisons aspécifiques. Cette dernière est ensuite incubée pendant une nuit à +4 °C en présence de l'un des anticorps primaires d'intérêt indiqués dans le **Tableau 3**. Après 3 lavages de 5 min par une solution de PBS-Tween 0,1 %, la membrane est incubée pendant 1 h en présence de l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (Horse Radish Peroxidase). L'excès d'anticorps est éliminé par 3 lavages consécutifs au PBS-Tween 0,1 %. Enfin, la membrane est révélée en utilisant le kit chimioluniscence (réf ; 34096, SuperSignal™

West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Fisher Scientific)) et le signal est enregistré avec l'appareil Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). L'analyse de la densitométrie des bandes obtenues est effectuée par le logiciel Image Lab (BioRad).

Tableau 3 : Conditions d'utilisation des anticorps primaires et secondaires.

Anticorps	Références	Dilution	Espèces
Anticorps primaires			
Anti-ABCD3	11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific	1/500	Lapin
Anti-MFP2	GTX114978, Gentex	1/1000	Lapin
Anti-ACOX1	Produits par le Prof. Cherkaoui-Malki (Dijon)	1/200	Lapin
Anti-Nrf2	C0279, Assay bioTech	1/1000	Lapin
Anti-P-Nrf2	MA5-32116, Invitrogen	1/1000	Lapin
Anti-Sirt1	9475, Cell signaling	1/1000	Lapin
Anti-AMPKα	2532, Cell signaling	1/1000	Lapin
Anti-Caspase-3	9662, Cell signaling	1/1000	Lapin
Anti-PARP	9532S, Cell signaling	1/1000	Lapin
Anti-LC3	L8918, Sigma-Aldrich	1/1000	Lapin
Anti-Atg13	ab201467, Abcam	1/1000	Lapin
Anti- p62	ab56416, Abcam	1/1000	Souris
Anti-β-actine	A2228, Sigma-Aldrich	1/10 000	Souris
Anticorps secondaires			
Anti-IgG de lapin	7074S, Cell signaling	1/5000	Chèvre
Anti-IgG de souris	sc-2005, Santa-Cruz Biotechnology	1/5000	Chèvre

14. Analyse des ARNm par RT-qPCR

14.1. Extraction et dosage des ARN totaux

L'extraction d'ARNm a été réalisée en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (réf; 74106, Qiagen). Une fois les cellules C2C12 préalablement ensemencées dans des boîtes de Pétri à raison de 1,2 x 10^6 cellules par boîte et traitées aux conditions désirées, les cellules adhérentes et non-adhérentes sont récupérées par trypsination, centrifugées et rincées au PBS 1X stérile.

Le culot cellulaire est lysé dans un tampon de lyse (buffer RLT) à 1 % de β-mercaptoéthanol. Le lysat est transféré sur une colonne RNeasy spin placée dans un tube de 2 mL puis centrifugé à 8 000 g pendant 30 s. Le surnageant est homogénéisé en ajoutant 350 µL d'éthanol à 70 % afin d'augmenter la spécificité de liaison des ARNs avec la membrane de la colonne. Un premier lavage avec le tampon RW1 (RNA Wash Buffer 1) est effectué et la colonne est de nouveau centrifugée 30 s à 8 000 g. Afin d'éliminer les traces d'ADN, de la DNAse est ajoutée à la colonne pendant 15 min à température ambiante. Deux nouveaux lavages sont effectués avec deux tampons successifs ((RW1 : RNA Wash Buffer 1) et (RPE : RNA Buffer Ethanol)). La colonne est ensuite centrifugée à une vitesse maximale pendant 1 min, afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Un volume de 30 µL d'eau dépourvue de RNAse est ajouté à la colonne afin d'éluer les ARN. Celle-ci est ensuite centrifugée pendant 1 min à 8 000 g afin de récupérer les ARN. La concentration en ARNs est mesurée avec un spectrophotomètre (UV-1800, Schmadzu). Un volume de 3 µL de chaque extrait d'ARN est placé sur le dispositif TrayCell (Hellma). Les concentrations sont lues à 260 nm et à 280 nm. Le rapport DO 260 nm/DO 280 nm permet de vérifier la pureté des ARNs, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2,2.

14.2. RT-PCR : Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction

La reverse transcription est l'étape qui permet la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un brin d'ARN, par l'action d'ARN Polymérase. Elle est réalisée en utilisant le kit iScript cDNA Synthesis (réf :1708891, BioRad). Dans chaque tube, un volume d'ARNs total correspondant à 1 µg d'ARN, 4 µL de tampon 5X iScript reaction mix, et 1 µL de iScript reverse transcription, 14 µL d'eau dépourvue de RNAse sont ajoutés. Dans le thermocycleur, le mélange est incubé pendant 5 min à 25 °C puis la synthèse d'ADNc s'effectue pendant 20 min à 46 °C. La réaction se termine par dénaturation des brins néosynthétisés pendant 5 min à 95 °C puis retour à 4 °C. Les ADNc sont conservés à -20 °C jusqu'à utilisation.

14.3. qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

La PCR quantitative est utilisée pour déterminer l'expression de nombreux gènes dont les séquences sont reportées dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Séquences des différentes amorces utilisées pour les qPCR.

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
SOD1	5′-AACCAGTTGTGTTGTCAGGAC-3′	5′-CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG-3′
SOD2	5′-CAGACCTGCCTTACGACTATGG-3′	5′-CTCGGTGGCGTTGAGATTGTT-3′
GPx1	5′-CCACCGTGTATGCCTTCTCC-3′	5′-AGAGAGACGCGACATTCTCAAT-3′
GPx4	5′-CGCGATGATTGGCGCT-3′	5′-CACACGAAACCCCTGTACTTATCC-3′
GPx4 Mitochondrial	5′-AGCTGGGGCCGTCTGAGCCG-3′	5′-ATGTCCTTGGCTGAGAATTCGT-3′
Catalase	5’-AGCGACCAGATGAAGCAGTG-3’	5’-TCCGCTCTCTGTCAAAGTGTG-3’
Abcd3	5′-CTGGGCGTGAAATGACTAGATTG-3′	5′-CTTCTCCTGTTGTGACACCATTG-3′
Pex5	5′-GTGGGCAGCAGAGTTTATACAG-3′	5′-CTCCCTCCTCAAGTCGATGC-3′
Pex13	5′-AACCAACACTTACAAGAGTGCC-3′	5′-CCGTAGGCTCCATATCCAGAAG-3′
Pex14	5′-ACAGCAGTGAAGTTCCTACAGA-3′	5′-GCCAGGTCAATCTCTTCGTCT-3′
Mfn1	5′-CATGGGCATCATGGTTGTTGGG-3′	5′-TCTCCACTGCTCGGGTGTAG-3′
Mfn2	5′-CAAGTGTCCGCTCCTGAAGG-3′	5′-GAACCTCCTTGGCAGACACG-3′
Opa1	5′-CAAGCATTACAGGAAGGTGTCAGAC-3′	5′-CACTGAGAGTCACCTTCACTGG-3′
Fis1	5- TGTCCAAGAGCACGCAATTTG -3	5′-CCTCGCACATACTTTAGAGCCTT-3′
Drp1	5′-GGAGTTGAAGCAGAAGAATGGGG-3′	5′-CAGTGACGGCGAGGATAATGG-3′
Tfam1	5’-CGCAGCACCTTTGGAGAA-3’	5’-CCCGACCTGTGGAATACTT-3’
NRF1	5’-GCCGTCGGAGCACTTACT-3’	5’-CTGTTCCAATGTCACCACC-3’
Sirt3	5′-GGATTCGGATGGCGCTTGA-3′	5′-CACCTGTAACACTCCCGGAC-3′
AMPKα-1	5′-CATGGCTGAGAAGCAGAAGCAC-3′	5′-CTTAACTGCCACTTTATGGCCTG-3′
36B4	5′-GCGACCTGGAAGTCCAACTA-3′	5′-ATCTGCTTGGAGCCCACAT-3′

Les 20 µL d’ADNc obtenus sont dilués en ajoutant 80 µL d’eau. Un volume de 25 µL de chaque échantillon est alors ajouté dans un même tube, qui sert à réaliser une gamme standard. Ensuite, 225 µL d’eau sont ajoutés aux 75 µL restants de chaque échantillon afin d’obtenir un volume de 300 µL. Dans une plaque 96 puits, 10 µL d’un mélange réactionnel sont déposés dans chaque puits. Ce mélange est constitué de 12,5 µL de MESA GREEN qPCR

MasterMix Plus (Eurogentec), 0,075 µL d'amorce sens (100 µM), 0,075 µL d'amorce anti-sens (100 µM), 7,35 µL d'eau. Puis, 5 µL d'ADNc dilué sont ajoutés. Le volume total dans chaque puits est de 25 µL.

La gamme standard pour chaque gène est obtenue en mélangeant un volume de 25 µL de chaque échantillon puis en réalisant une gamme de dilutions en cascades (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64). Cette gamme permet de mesurer l'efficacité de l'amplification de chaque gène sur la plaque de qPCR. En effet, pour une efficacité de 100 %, il y aura un cycle d'amplification d'écart entre chaque point de la gamme. Par exemple, le point à 1/2 aura 1 Ct (Cycle threshold) de moins que le point au 1/4 et ainsi de suite. Une gamme standard est réalisée pour chaque gène étudié.

L'amplification est réalisée via l'iCycler « StepOne Plus de (Life Technologies) » selon le programme suivant : 20 s à 90 °C pour activer la Taq polymérase, 40 cycles de 3 s à 95°C, puis 30 s à 60 °C et enfin un cycle passant de 60 °C à 95 °C pour réaliser une courbe de fusion. Le gène de référence 36B4 permet de normaliser l'expression des gènes cibles.

14.4. Analyse des résultats de qPCR

La quantification relative des ARNm se fait par la méthode de comparaison des Ct (Cycle threshold), c'est-à-dire le nombre de cycles réalisés à une fluorescence donnée. La moyenne des Ct des gènes de référence et la moyenne des Ct du gène d'intérêt sont comparées entre chaque groupe. La quantification est déterminée par la formule $2^{-\Delta Ct}$, où ΔCt correspond à la différence entre le Ct du traité et Ct du témoin : plus la différence est importante, plus le traitement a un effet sur la transcription.

IV. Analyses Statistiques

Les analyses statistiques de l'étude clinique ont été effectuées à l'aide du logiciel SPSS (Statistical Package for Social Sciences), version 22.0. Les variables qui ne suivent pas la loi normale (distribution gaussienne anormale) ont été représentées par la valeur de médiane et l'intervalle de variance (médiane [25 percentile-75 percentile]). Les variables continues qui suivent une distribution gaussienne ont été exprimées par la moyenne plus ou moins l'écart type (moyenne ± écart type). Pour les variables quantitatives, la comparaison entre les deux groupes (patients sarcopéniques et sujets non sarcopéniques) a été effectuée à l'aide du test t de Student ou par son alternative non paramétrique (test U de Mann-Whitney) selon que les variables suivent ou non une distribution gaussienne. Pour les variables qualitatives, la comparaison a été faite par le test de Chi 2 ($\chi 2$). Les corrélations ont été utilisées pour estimer le degré de liaisons

entre deux variables continus, r est le coefficient de corrélation, sa valeur est comprise entre – 1 et 1. Les tests ont été considérés comme statistiquement significatifs pour une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 et très significative pour une valeur de p inférieure ou égale à 0,001.

Les résultats expérimentaux d'étude *in vitro* ont été analysés statistiquement avec le logiciel GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Les données *in vitro* ont été exprimées en moyenne ± écart type et comparées à un test ANOVA suivi d'un test de Tukey, qui permet de multiples comparaisons et permet d'évaluer toute interaction.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Etude clinique

1. Description de la population étudiée

Notre étude clinique a porté sur une population qui comprend 160 sujets âgés de 65 ans et plus. Tous les participants ont répondu au questionnaire SARC-F. Ce questionnaire a été mis en place pour permettre un diagnostic rapide et facile de la sarcopénie en déterminant le niveau de difficulté ressenti dans 5 Items comprenant la force musculaire, les troubles de la marche, le lever de chaise, la montée des escaliers et les antécédents de chutes. Les participants sont classés en deux groupes selon leur score SARC-F : Groupe 1, sujets non sarcopéniques (n=63 ; SARC-F < 4), et Groupe 2, patients sarcopéniques (n=97 ; SARC-F ≥ 4).

1.1. Caractéristiques démographiques de la population

Les caractéristiques démographiques de la population d'étude sont résumées dans le **Tableau 5**.

Les patients sarcopéniques sont significativement plus âgés que les sujets non sarcopéniques (témoins), avec un âge médian de 77 ans [70,50 - 82,00] versus 69 ans [66,50 - 75,00] (p< 0,001). Une prédominance féminine est marquée dans le groupe des patients sarcopéniques avec 55 femmes parmi les 97 (56,70 %). Par ailleurs, l'indice de la masse corporelle (IMC) témoigne d'une diminution significative (p = 0,033) chez les patients sarcopéniques comparés aux sujets non sarcopéniques. La majorité des patients sarcopéniques est illettrée (76,29 %). Seulement 20,62 % ont un niveau primaire et secondaire. Aucun patient de ce groupe, ayant un niveau d'étude supérieur, n'a été noté. Dans le groupe des patients sarcopéniques, le pourcentage d'assistance est très fort et présente 62,29 %. Par contre, dans le groupe témoins, le pourcentage d'assistance est très faible et ne présente que 7,94 %. En outre, plus de la moitié des patients sarcopéniques (53,60 %) vivent en maison de retraite, tandis que plus de 76,19 % des participants non sarcopéniques vivent avec leur famille.

Tableau 5 : Caractéristiques démographiques de la population étudiée.

Groupe		Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
Age (années)		69,00 [66,50 – 75,00]	77,00 [71 - 81]	<0,001
IMC (Kg/m²)		26,11 ± 4,65	25,55 ± 4,77	0,033
Sexe n (%)	**Masculin**	44 (69,84)	42 (43,30)	0,002
	Féminin	19 (30,16)	55 (56,70)	
Niveau culturel n (%)	**Analphabète**	28 (44,44)	74 (76,29)	<0,001
	"Cottabe"	4 (6,35)	3 (3,1)	
	Primaire	19 (30,16)	16 (16,5)	
	Secondaire	10 (15,87)	4 (4,12)	
	Supérieur	2 (3,17)	0 (0)	
Assistance n (%)		5 (7,94)	74 (62,29)	<0,001
Lieu de vie n (%)	**Avec la famille**	48 (76,19)	45 (46,40)	NS
	Maison de retraite	15 (23,81)	52 (53,60)	

Les données sont présentées soit sous forme de moyenne ± écart-type, soit sous forme de médiane [25-75ème percentiles] pour les paramètres quantitatifs et sous forme de pourcentage pour les paramètres qualitatifs. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test t de student ou le test de Man Whitney et le test χ^2. IMC : Indice de la masse corporelle ; NS : Non significatif.

1.2. Caractéristiques médicales de la population

Dans le **Tableau 6** dérivant les antécédents médicaux de deux groupes, nous relevons que sur notre population de 160 personnes de 65 ans et plus, l'hypertension artérielle est la pathologie la plus fréquente dans le groupe des patients sarcopéniques avec une fréquence de 52,58 % suivie du diabète (32,99 %) et de la dyslipidémie (15,46 %).

Tableau 6 : Caractéristiques médicales de la population étudiée.

Groupe	Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
Diabète n (%)	24 (38,09)	32 (32,99)	NS
Hypertension artérielle n (%)	31 (49,20)	51 (52,58)	NS
Dyslipidémie n (%)	8 (12,70)	15 (15,46)	NS

L'analyse statistique des données a été réalisée par le test χ^2. n : nombre de sujets.

1.3. Caractéristiques gériatriques de la population

Tous les participants ont subi une évaluation gériatrique complète (EGC) incluant une évaluation de la dépression par l'échelle Mini-GDS (Mini Geriatric Depression Scale), de l'état cognitif par le test Mini-Cog (Mini-cognitive), de l'état nutritionnel par le test MNA-SF (Mini Nutritional Assessment Short-Form), de l'état d'autonomie fonctionnelle par le test ADL (Activities of Daily life), et de la performance physique par le test TUG (Test Timed Up and Go). L'EGC a été considéré comme anormal si le patient avait l'un des critères suivants : Mini-GDS ≥ 1/4, MNA-SF ≤ 8/14, ADL ≤ 5/6 ou TUG ≥ 20 secondes. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 7 et la Figure 41**.

Le groupe des patients sarcopéniques a une symptomatologie dépressive. 76,29 % des patients sarcopéniques ont un risque de dépression contre 53,97 % des sujets non sarcopéniques. En appliquant le test de nutrition MNA à 6 items, nous remarquons une diminution très significative du score de MNA chez le groupe des sarcopéniques comparativement au groupe des sujets non-sarcopéniques. Concernant l'autonomie, pour les activités de base de la vie quotidienne (hygiène, habillage, toilette, continence, locomotion et alimentation) de la population évaluée selon l'échelle ADL, nous notons une bonne indépendance chez les personnes âgées non sarcopéniques puisque aucun sujet de ce groupe, ayant un score ADL ≤ 5, par rapport 95,88 % des patients sarcopéniques présentant un risque élevé de perte d'autonomie. Par ailleurs, l'évaluation cognitive des participants a été réalisée à l'aide du test Mini-cog. Un score médian significativement plus faible est observé dans le groupe des patients sarcopéniques rapport au score des sujets contrôles.

Tableau 7: Caractéristiques gériatriques de la population étudiée.

Groupe	Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
Score Mini-GDS	0 [0 – 1,5]	1 [0 - 4]	<0,001
Mini-GDS ≥ 1 n (%)	34 (53,97)	74 (76,29)	<0,001
Score MNA	12 [10 - 14]	8 [5,5 - 11]	<0,001
Score MNA ≤ 8 n (%)	11 (17,46)	73 (75,26)	<0,001
Score ADL	6 [6 - 6]	4 [3 - 5]	<0,001
Score ADL ≤ 5 n (%)	0 (0)	93 (95,88)	<0,001
Score Mini-Cog	4 [3 - 5]	2 [2 - 3]	<0,001

Les données sont présentées soit sous forme de médiane [25-75ème percentiles] pour les paramètres quantitatifs et sous forme de pourcentage pour les paramètres qualitatifs. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Man Whitney et le test χ^2.

Le test TUG aide à déterminer en 20 secondes le risque de chute. Il permet d'apprécier l'équilibre, la force musculaire des membres inférieurs, la vitesse de marche, les capacités de compréhension de consignes relativement simples. Ce test permet d'évaluer la gravité de la sarcopénie **(Figure 31)**. En effet, pour les sujets non sarcopéniques, 21 personnes ont réalisé le test en une chronologie inférieure à 20 secondes. Ils ont une mobilité normale et sont considérés comme indépendants la plupart du temps. Pour les patients sarcopéniques, seulement 5 patients ont réalisé le test en plus de 20 secondes. Ils ont une mobilité réduite et sont considérés comme dépendants.

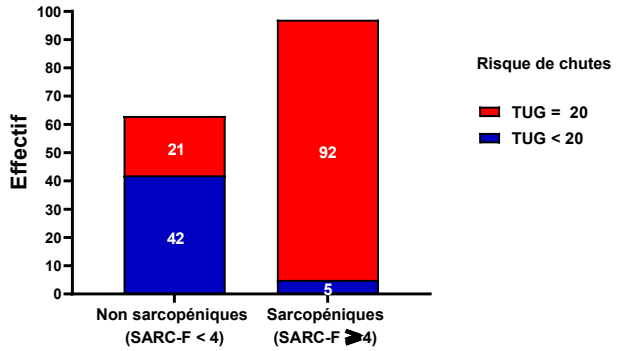


Figure 31 : Répartition de la population non sarcopénique et sarcopénique selon le temps TUG (Time Up and Go).

2. Evaluation des marqueurs du stress oxydant plasmatique et/ou érythrocytaire

Puisque le stress oxydant est reconnu comme l'accélérateur principal du vieillissement et l'un des principaux facteurs potentiellement impliqués dans la pathogenèse de la sarcopénie, une évaluation des marqueurs du système de défense antioxydant enzymatique (SOD, GPx, catalase) ainsi que les produits d'oxydation lipidique (diènes conjugués, malondialdéhyde) et protéique (protéines carbonylées) a été réalisée sur le plasma et les érythrocytes des patients âgés sarcopéniques et des sujets âgés non sarcopéniques.

2.1. Mesure de l'activité des enzymes antioxydantes érythrocytaires

Les résultats du dosage de l'activité des enzymes antioxydantes (GPx, SOD, et CAT) au niveau érythrocytaire sont présentés dans le **Tableau 8**. La comparaison des activités des enzymes antioxydantes érythrocytaires mesurés dans le groupe des patients sarcopéniques et le groupe des sujets non sarcopéniques témoigne des augmentations significatives de l'activité de GPx, SOD, et CAT chez le groupe des patients âgés sarcopéniques.

Comme le montre le tableau ci-dessous, l'activité médiane de GPx s'échelonne de 79,80 [65,16 - 100,18] U/mg Hb chez les sujets non sarcopéniques à 87,11 [81,15 - 100,79] U/mg Hb chez les patients âgés sarcopéniques. De plus, nous notons une augmentation très significative de l'activité de SOD chez le groupe des participants sarcopéniques comparés aux non sarcopéniques (2,04 [1,50 - 3,29] U/mg Hb versus 2,78 [2,40 - 3,31] U/mg Hb). De même, l'activité de catalase, est augmentée chez le groupe des seniors sarcopéniques comparé aux non sarcopéniques (0,12 [0,09 - 0,14] U/mg Hb versus 0,10 [0,09 - 0,12] U/mg Hb).

Tableau 8 : Activité catalytique des enzymes antioxydantes érythrocytaires GPx, SOD et CAT dans la population étudiée.

Groupe	Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
GPx (U/mg Hb)	79,80 [65,16 - 100,18]	87,11 [81,15 - 100,79]	0,004
SOD (U/mg Hb)	2,04 [1,50 - 3,29]	2,78 [2,40 - 3,31]	<0,001
CAT (U/mg Hb)	0,10 [0,09 - 0,12]	0,12 [0,09 - 0,14]	0,035

Les données sont présentées sous forme de médiane [25-75ème percentiles]. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Man Whitney. GPx : Glutathion peroxydase ; SOD : Superoxyde dismutase ; CAT : Catalase ; U_{GPx} : µmoles de GSH oxydé/min ; $U_{catalase}$: µmoles de H_2O_2/min ; Hb : Hémoglobine.

2.2. Evaluation des marqueurs de la peroxydation lipidique et des protéines carbonylées plasmatiques et/ou érythrocytaires

Un déficit de la réponse antioxydante induit des dommages aux biomolécules (lipides, protéines). Un dosage des produits de l'oxydation lipidique et protéique a été réalisé aux niveaux du plasma et/ou des érythrocytes des patients âgés sarcopéniques ainsi que chez les sujets âgés non sarcopéniques. Les résultats sont résumés dans le **Tableau 9**.

Le dosage d'un biomarqueur de la peroxydation lipidique, les diènes conjugués (DC), montre une augmentation significative de son taux érythrocytaire et plasmatique chez le groupe des patients sarcopéniques comparativement au groupe des non sarcopéniques. Au niveau érythrocytaire, le taux des diènes conjugués des patients sarcopéniques est relativement augmenté de 0,16 [0,12 - 0,21] nmoles/mg d'Hb à 0,19 [0,15 - 0,29] nmoles/mg d'Hb vis-à-vis au groupe des sujets non sarcopéniques. Au niveau plasmatique, le taux moyen des diènes conjugués qui était de 0,19 ± 0,04 nmoles/mg de protéine, chez le groupe des non sarcopéniques passe à 0,22 ± 0,06 nmoles/mg de protéine, chez le groupe des seniors sarcopéniques.

La mesure d'un autre marqueur de peroxydation lipidique, malondialdéhyde (MDA), révèle une augmentation significative de son taux plasmatique chez le groupe des patients sarcopéniques (15,10 x 10^{-3}[10,48 x 10^{-3} - 17,96 x 10^{-3}] nmoles/mg de protéine) comparé au groupe des non sarcopéniques (9,90 x 10^{-3}[8,32 x 10^{-3} - 14,45 x 10^{-3}] nmoles/mg de protéine).

Par ailleurs, le taux des protéines carbonylées a été mesuré au niveau plasmatique chez les personnes âgées sarcopéniques et non sarcopéniques. Une augmentation significative de la carbonylation des protéines est observée en comparant le groupe des non sarcopéniques aux groupes des sarcopéniques.

Tableau 9 : Taux des marqueurs de peroxydation lipidique et de protéines carbonylées plasmatiques et/ou érythrocytaires dans la population étudiée.

Groupe	Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
DC érythrocytaire (nmoles/ mg Hb)	0,16 [0,12 - 0,21]	0,19 [0,15 - 0,29]	0,011
DC plasmatique (nmoles/ mg de protéine)	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,06	0,013
MDA plasmatique (nmoles/ mg de protéine)	9,90 x 10-3 [8,32 x 10^{-3} - 14,45 x 10^{-3}]	15,10 x 10-3 [10,48 x 10^{-3} - 17,96 x 10^{-3}]	<0,001
Pc plasmatique (nmoles/ mg de protéine)	2,85 [1,58 - 3,41]	2,97 [2,07 - 3,59]	0,045

Les données sont présentées soit sous forme de moyenne ± écart-type, soit sous forme de médiane [25-75ème percentiles]. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test t de student ou le test de Man Whitney. DC : Dienes conjugués ; MDA : Malondialdéhyde ; PC : Protéines carbonylées, Hb : Hémoglobine.

3. Evaluation des marqueurs inflammatoires sériques

Les résultats du dosage des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-8, IL-6) et de CRP sériques sont présentés dans le **Tableau 10**.

Le taux de TNF-α est significativement plus élevé dans le groupe des patients sarcopéniques (28,22 [25,78 - 30,50] pg/mL) que dans le groupe des sujets non sarcopéniques (25,54 [24,23 - 29,59] pg/mL) (p= 0,032). De même, le niveau d'IL-8 est significativement plus élevé dans le groupe des patients sarcopéniques (21,50 [12,08 - 31,24]) par rapport aux non sarcopéniques (11,52 [7,90 - 20,90]) (p = 0,003). Le groupe des patients sarcopéniques présente

également un taux de CRP significativement plus élevé que les sujets non sarcopéniques. En revanche, aucune différence significative n'a été observée pour l'IL-6 entre le groupe des sarcopéniques et celui des non sarcopéniques.

Tableau 10 : Taux de marqueurs inflammatoires sériques dans la population étudiée.

Groupe	Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
TNF-α (pg/mL)	25,54 [24,23 - 29,59]	28,22 [25,78 - 30,50]	0,032
IL-8 (pg/mL)	11,52 [7,90 - 20,90]	21,50 [12,08 - 31,24]	0,003
IL-6 (pg/mL)	9,91 [7,90 - 13,42]	10,62 [8,12 - 18,39]	NS
CRP (mg/L)	16,40 [6,87 - 50,00]	40,00 [9,00 - 89,00]	0,019

Les données sont présentées sous forme de médiane [25-75ème percentiles]. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Man Whitney. TNF-α : *Facteur de nécrose tumorale ; IL-8 : Interleukine-8 ; IL-6 : Interleukine-6 ; CRP : Protéine C-réactive ; NS : Non significatif.*

La leucotriène B4 (LTB-4) est un médiateur lipidique pro-inflammatoire généré à partir de l'acide arachidonique via la voie de la 5-lipoxigénase. La LTB-4 exerce des actions biologiques bien caractérisées, en particulier la promotion du chémotactisme des leucocytes et la régulation des cytokines pro-inflammatoires **(DiMeo et al., 2008)**. De ce fait, un dosage du taux de LTB-4 a été réalisée aux niveaux du sérum des patients âgés sarcopéniques ainsi que chez les sujets âgés non sarcopéniques. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 32**.

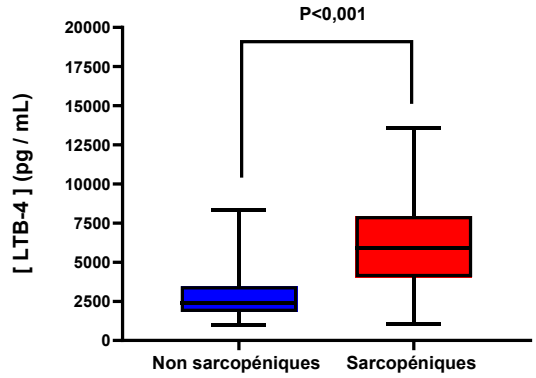


Figure 32 : Taux de leucotriène B 4 sérique dans la population étudiée. *Les résultats sont présentés sous forme de médiane [25-75ème percentiles]. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Man Whitney. LTB-4 : Leucotriène B 4.*

Les résultats montrent une augmentation hautement significative des taux sériques de LTB-4 chez les patients sarcopéniques comparativement aux sujets non sarcopéniques. En effet, le taux médian de LTB-4 qui était de 2721,20 [1723,92 - 3765,99] pg/mL passe à 6181,34 [3964,30 - 7947,13] pg/mL, respectivement chez les sujets non sarcopéniques et les patients sarcopéniques.

4. Evaluation d'apeline (myokine) plasmatique

L'apeline est une myokine sécrétée dans les muscles lors de l'exercice physique. Elle est produite lors de la contraction musculaire et semble capable de maintenir et de préserver les capacités musculaires. Avec l'âge, la régulation d'apeline est altérée entraînant une diminution des fonctions musculo-squelettiques (sarcopénie). L'apeline empêche la sarcopénie en stimulant les cellules satellites, en régénérant les fibres musculaires (myofibres) et en stimulant le métabolisme cellulaire. Les résultats du dosage d'apeline plasmatique sont présentés dans la **Figure 33** .

Le dosage de myokine, l'apeline, montre une augmentation significative chez le groupe des patients sarcopéniques alors qu'une diminution est observée chez le groupe des sujets non sarcopéniques (519,94 ± 207,61 pg/mL versus 372,10 ± 181,77 pg/mL chez les sarcopéniques et les non sarcopéniques, respectivement).

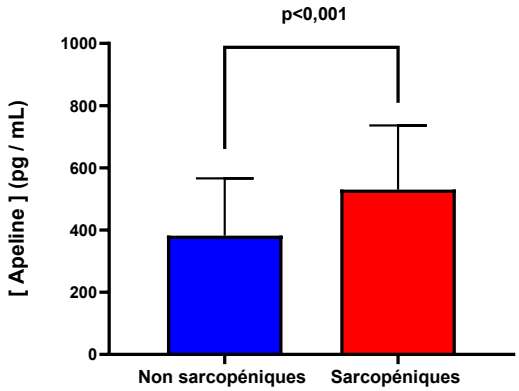


Figure 33 : Taux d'apeline plasmatique dans la population étudiée. *Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test t de student.*

5. Analyse des marqueurs lipidiques

5.1. Evaluation du profil des acides gras érythrocytaires

L'évaluation du profil des acides gras érythrocytaires a été réalisé par chromatographie en phase gazeuse sur les érythrocytes des sujets non sarcopéniques et les patients sarcopéniques. Les résultats exprimés en µg/mL sont consignés dans les **Tableaux 11 et 12.**

L'analyse des acides gras saturés étudiés (de C12:0 à C25:0) a montré que les taux des acides gras à très long chaîne (C22:0, C24:0, et C25:0) sont significativement augmentés chez les patients sarcopéniques par rapport aux sujets non sarcopéniques. Des taux de C12:0, C14:0, C16:0 plus faibles sont remarqués chez le groupe des sarcopéniques comparé au non sarcopéniques.

Pour les acides gras monoinsaturés (AGMI) érythrocytaires, une augmentation significative a été mise en évidence chez le groupe des personnes âgées sarcopéniques comparativement au groupe des non sarcopéniques. Cette augmentation est associée à l'élévation significative de C17:1 n-7, C22:1 n-9, et C24:1 n-9.

Concernant les acides gras polyinsaturés (AGPI), une augmentation significative a été notée chez le groupe des aînés sarcopéniques, en comparaison au groupe des aînés non sarcopéniques. Cette augmentation résulte surtout l'augmentation significative de la somme des AGPI oméga-6. Un niveau très élevé de C20:2 n-6, de C20:4 n-6, et de C22:2 n-6 a été détecté dans les érythrocytes des patients sarcopéniques par rapports aux sujets témoins. Pour les AGPI de la famille oméga-3, une augmentation significative de C18:3 n-3 a été observé chez les patients sarcopéniques alors que les autres oméga 3 aucune variation n'a été observée.

Parlons des acides gras Trans (**Tableau 12**), une augmentation significative de la concentration totale en acides gras trans érythrocytaires a été mise en évidence chez le groupe des patients sarcopéniques comparativement aux sujets non sarcopéniques. Cette augmentation se traduit par une augmentation hautement significative de C18:1 trans 11, et C18:2 cis 9 trans 12 ($p<0,001$), et par une augmentation significative de C18:1 trans 9, C18:2 trans 9 cis 12, C18:3 cis 9 cis12 trans 15, C18:2 cis 9 trans 11, et C18:2 trans 10 cis 12 dans le groupe des patients sarcopéniques comparativement au groupe témoins.

Tableau 11 : Profil érythrocytaire des acides gras chez les patients sarcopéniques et les sujets non sarcopéniques étudiés.

Groupe	Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
∑AGS	59,53 [51,70 - 87,06]	65,92 [43,25 - 90,23]	NS
C12:0	0,33 [0,27 - 0,49]	0,25 [0,14 - 0,40]	NS
C14:0	0,68 [0,47 - 0,91]	0,62 [0,46 - 0,94]	NS
C16:0	49,79 [32,46 - 61,44]	47,49 [26,94 - 59,20]	NS
C18:0	29,83 [23,68 - 35,96]	25,34 [15,75 - 35,71]	NS
C20:0	0,09 [0,06 - 0,23]	0,18 [0,09 - 0,30]	0,017
C21:0	0,17 [0,12 - 0,30]	0,20 [0,15 - 0,29]	NS
C22:0	0,49 [0,26 - 0,96]	0,56 [0,28 - 0,89]	0,027
C24:0	0,36 [0,25 - 0,57]	0,46 [0,29 - 0,80]	0,001
C25:0	0,08 [0,02 - 0,19]	0,09 [0,04 - 0,20]	0,043
∑AGMI	20,41 [16,31 - 34,93]	26,78 [16,25 - 43,84]	0,007
C14:1 n-5	0,87 [0,5 - 1,06]	0,81 [0,40 - 1,27]	NS
C16:1 n-7	0,54 [0,32 - 0,73]	0,52 [0,36 - 0,86]	NS
C17:1 n-7	0,11 [0,04 - 0,74]	0,34 [0,16 - 1,00]	0,027
C18:1 9 n-9	16,87 [13,40 - 30,18]	22,43 [12,36 - 37,99]	NS
C18:1 n-7	1,88 [1,50 - 2,67]	2,35 [1,42 - 3,87]	NS
C20:1 n-9	0,08 [0,03 - 0,21]	0,13 [0,06 - 0,31]	NS
C22:1 n-9	0,07 [0,03 - 0,16]	0,13 [0,05 - 0,25]	0,049
C24:1 n-9	0,06 [0,04 - 0,12]	0,09 [0,05 - 0,17]	0,030
∑AGPI	14,61 [8,49 - 23,27]	18,31 [14,51 - 45,64]	0,021
∑AGPI n-3	1,28 [0,83 - 3,45]	1,30 [0,73 - 4,11]	NS
C18:3 n-3	0,04 [0,02 - 0,09]	0,12 [0,05 - 0,25]	0,001
C20:3 n-3	0,79 [0,34 - 2,46]	0,59 [0,22 - 2,71]	NS
C20:5 n-3	0,12 [0,04 - 0,25]	0,09 [0,04 - 0,28]	NS
C22:5 n-3	0,07 [0,05 - 0,18]	0,07 [0,03 - 0,17]	NS
C22:6 n-3	0,25 [0,07 - 0,42]	0,12 [0,06 - 0,41]	NS
∑AGPI n-6	13,78 [7,95 - 20,70]	17,56 [13,36 - 40,05]	0,007
C18:2 n-6	7,81 [3,98 - 13,26]	8,38 [3,39 - 22,36]	NS
C18:3 n-6	0,33 [0,16 - 0,73]	0,49 [0,29 - 0,83]	NS
C20:2 n-6	0,12 [0,08 - 0,18]	0,18 [0,10 - 0,36]	0,019
C20:3 n-6	0,37 [0,1 - 0,88]	0,35 [0,06 - 0,85]	NS
C20:4 n-6	3,55 [1,49 - 7,33]	10,30 [3,75 - 15,45]	<0,001
C22:2 n-6	0,9 [0,04 - 0,21]	0,14 [0,08 - 0,27]	0,027
C22:4 n-6	0,05 [0,02 - 0,17]	0,09 [0,03 - 0,39]	NS

Les concentrations en acides gras sont exprimées en µg/mL. Les données sont présentées sous forme de médiane [25-75ème percentiles]. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Man Whitney.

Tableau 12 : Profil érythrocytaire des acides gras Trans chez les patients sarcopéniques et les sujets non sarcopéniques étudiés.

Groupe	Non sarcopéniques n = 63	Sarcopéniques n = 97	p-value
∑AG Trans	3,64 [2,32 - 5,61]	4,12 [3,20 – 4,94]	0,048
C16:1 trans 11	0,21 [0,07 - 0,42]	0,14 [0,09 - 0,29]	NS
C18:1 trans 9	0,17 [0,04 - 0,61]	0,37 [0,19 - 0,55]	0,018
C18:1 trans 11	0,20 [0,10 - 0,34]	0,69 [0,38 - 0,96]	<0,001
C18:2 trans 9 cis 12	0,06 [0,02 - 0,16]	0,15 [0,07 - 0,24]	0,012
C18:2 trans 9 trans 12	0,21 [0,11 - 0,31]	0,14 [0,83 - 0,29]	NS
C18:2 cis 9 trans 12	0,54 [0,32 - 0,67]	0,20 [0,13 - 0,32]	<0,001
C18:3 trans 9,12,15	0,15 [0,05 - 0,25]	0,20 [0,12 - 0,35]	NS
C18:3 trans 9,12 cis 15	0,18 [0,11 - 0,30]	0,23 [0,11 - 0,36]	NS
C18:3 trans 9 cis 12 trans 15	0,18 [0,10 - 0,31]	0,17 [0,11 - 0,41]	NS
C18:3 cis 9 trans 12 trans 15	0,23 [0,11 - 0,37]	0,22 [0,14 - 0,39]	NS
C18:3 trans 9 cis12 cis 15	0,18 [0,10 - 0,31]	0,22 [0,14 - 0,39]	NS
C18:3 cis 9 trans 2 cis 15	0,11 [0,04 - 0,20]	0,16 [0,07 - 0,27]	NS
C18:3 cis 9 cis12 trans 15	0,08 [0,04 - 0,15]	0,17 [0,05 - 0,26]	0,019
C18:2 cis 9 trans 11	0,16 [0,09 - 0,33]	0,12 [0,06 - 0,16]	0,012
C18:2 trans 10 cis 12	0,14 [0,08 - 0,25]	0,28 [0,11 - 0,55]	0,048

Les concentrations en acides gras sont exprimées en µg/mL. Les données sont présentées sous forme de médiane [25-75ème percentiles]. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Man Whitney.

5.2. Evaluation du taux du cholestérol et de certains de ses dérivés oxydés (oxystérols) au niveau plasmatique

L'évaluation du taux du cholestérol et de certains de ses dérivés oxydés (oxystérols) au niveau plasmatique a été réalisé par CPG-MS sur 45 participants (22 patients sarcopéniques et 23 sujets non sarcopéniques) parmi les 160 participants inclus dans notre étude. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 34**.

Chez les patients sarcopéniques, le taux plasmatique du 7β-OHC, et du 24S-OHC sont significativement plus élevés comparativement aux sujets non sarcopéniques alors qu'aucune différence significative n'a été observée pour le taux de cholestérol, le 7α-OHC, le 7KC, et le 25-OHC. En revanche, une diminution non significative du taux du 27-OHC a été remarquée dans le plasma des patients sarcopéniques par rapport aux sujets témoins.

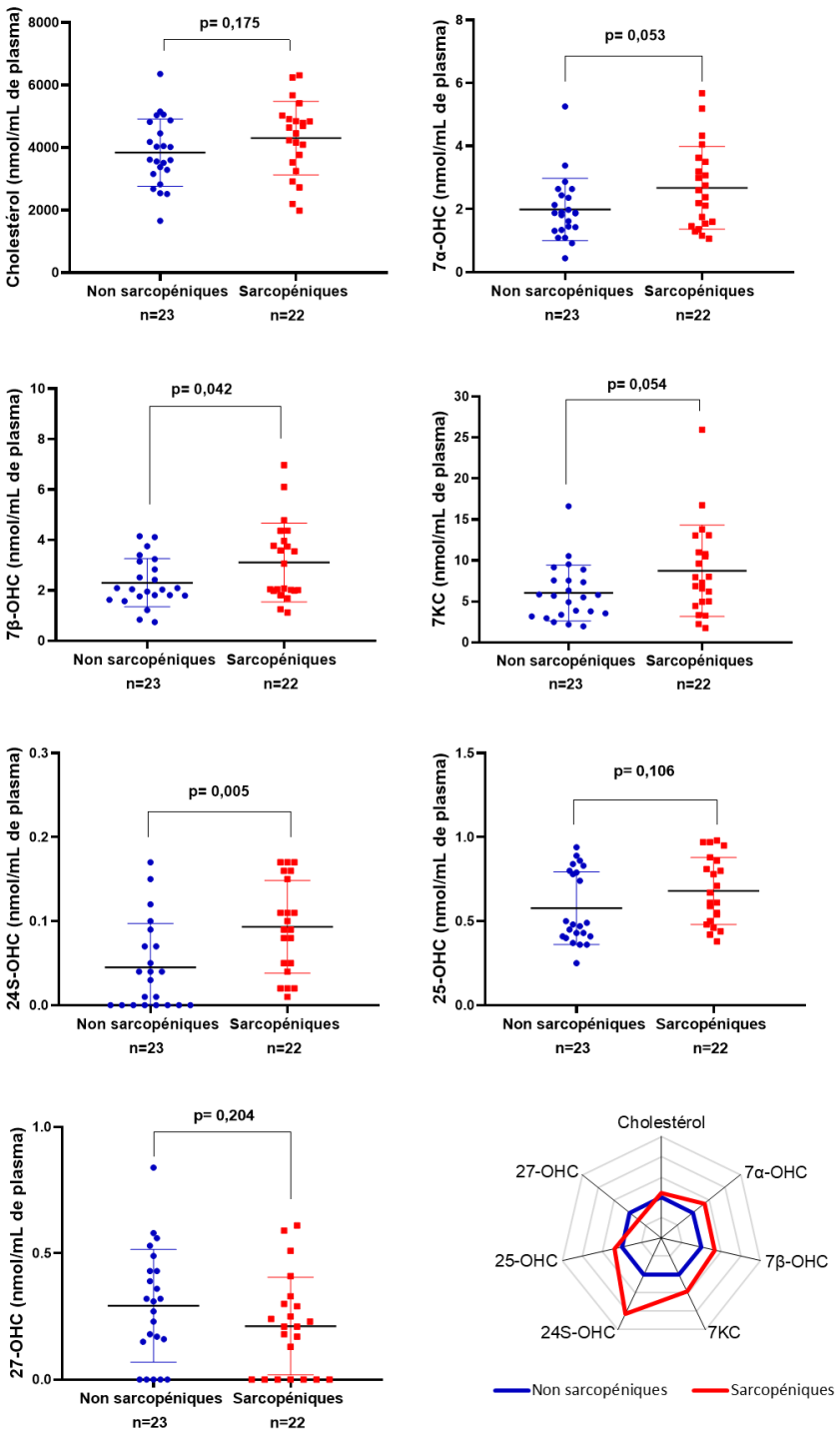


Figure 34 : Taux de cholestérol et de ses dérivés oxydés (oxystérols) dans le plasma de patients sarcopéniques et de sujets non sarcopéniques. *Les concentrations sont exprimées en nmol/mL. Les données sont présentées sous forme de médiane [25-75ème percentiles]. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test de Man Whitney. 7α-OHC : 7α-hydroxycholestérol ; 7β-OHC : 7β-hydroxycholestérol ; 7KC : 7-cétocholestérol ; 24S-OHC : 24S-hydroxycholestérol ; 25-OHC : 25-hydroxycholestérol ; 27-OHC : 27-hydroxycholestérol.*

6. Evaluation de la corrélation entre score SARC-F, stress oxydant, inflammation, myokine, acides gras, cholestérol et dérivés oxydés (oxystérols)

Afin d'évaluer la liaison entre les différents paramètres étudiés dans le groupe des patients sarcopéniques ayant un score SARC-F $\geqslant 4$, une analyse statistique a été réalisée avec le test de corrélation de Spearman. L'étude de corrélation est illustrée par la matrice de corrélation de Spearman ci-dessous :

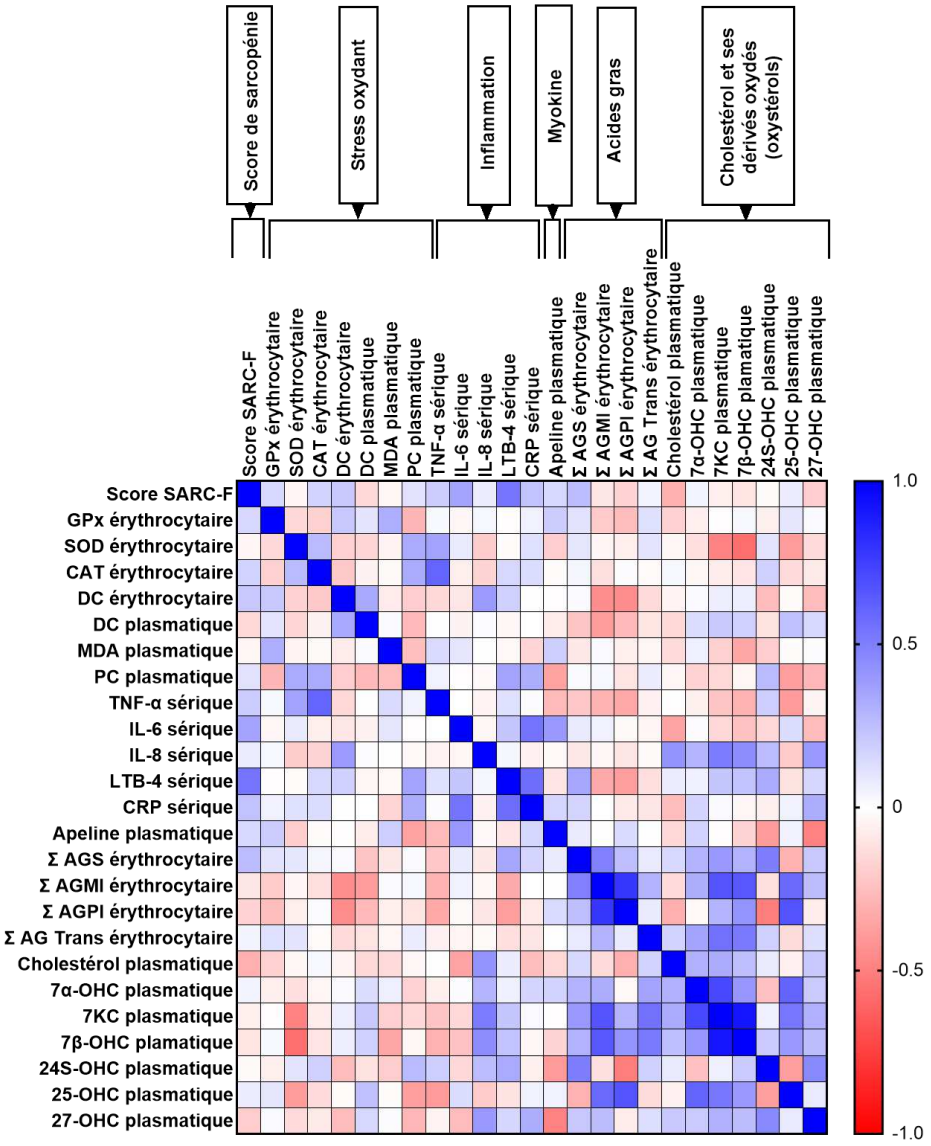


Figure 35 : Matrice de corrélation entre les différents paramètres dans le groupe des patients sarcopéniques.

La corrélation a été réalisée par le test du coefficient de Spearman. Le coefficient de Spearman mesure les relations entre les variables quantitatives prises deux à deux. Sa valeur est comprise entre -1 et 1. La matrice de corrélation est graduée du rouge (la valeur proche de -1 indique une forte corrélation négative) au bleu (la valeur proche de 1, implique une forte corrélation positive). GPx : Glutathion peroxydase ; SOD : Superoxyde dismutase ; CAT : Catalase ; *DC :* Diènes conjugués *; MDA :* Malondialdéhyde ; PC : Protéines carbonylées ; TNF-α : *Facteur de nécrose tumorale ; IL-8 : Interleukine-8 ; IL-6 : Interleukine-6 ; CRP : Protéine C-réactive ; AGS : Acides gras saturés ; AGMI : Acides gras monoinsaturés ; AGPI : Acides gras polyinsaturés ; AG Trans ; Acides gras Trans ; 7α-OHC : 7α-hydroxycholestérol ; 7β-OHC : 7β-hydroxycholestérol ; 7KC : 7-cétocholestérol ; 24S-OHC : 24S-hydroxycholestérol ; 25-OHC : 25-hydroxycholestérol ; 27-OHC : 27-hydroxycholestérol.*

Dans le groupe des patients sarcopéniques, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre le score SARC-F, et les activités des enzymes antioxydantes (GPx, SOD, et CAT) érythrocytaires. Toutefois, des corrélations positives significatives ont été observée entre le score SARC-F et les marqueurs d'inflammation IL-6, LTB-4, et CRP avec des valeurs respectives du coefficient de corrélation r de 0,354, 0,541, et 0,238. Au niveau érythrocytaire, l'activité de SOD et de catalase sont corrélées positivement avec le taux sérique de TNF-α (avec respectivement r= 0,363, et r=0,601). L'activité de SOD est corrélée négativement avec les taux plasmatiques de 7KC (r= -0,483, p=0,011) et de 7β-OHC (r= -0,563, p=0,002). Au niveau plasmatique, une corrélation négative a été révélée entre MDA et le taux du 7β-OHC (r= -0,350, p=0,058). Des corrélations positives entre le taux des protéines carbonylées (PC) et les marqueurs d'inflammation LTB-4 et CRP, avec des coefficients de corrélations respectifs r de 0,354, et 0,314, tandis que des corrélations négatives entre le taux des PC, le taux d'apeline, et le taux du 25-OHC ont été observées (avec respectivement r= -0,362, et r= -0,377).

En outre, différentes corrélations ont été obtenues entre les différents marqueurs de l'inflammation, l'apeline et les marqueurs lipidiques chez les patients âgées sarcopéniques. En effet, taux de TNF-α est corrélé négativement avec le taux d'AGPI, le taux du 7β-OHC et le taux du 25-0HC avec des coefficients de corrélations respectifs r de -0,339, -0,305, et -0,393. Une corrélation positive significative a été dévoilée entre le taux d'IL-6 et les taux d'apeline plasmatique (r= 0,398; p= 0,004). De même, des corrélations positives ont été révélées entre le taux d'IL-8 et les taux du cholestérol, du 7KC, et du 7β-OHC (avec respectivement r= 0,416, r= 0,0512, et r=0,444). De surcroît, une corrélation positive a été constatée entre le taux de

LTB-4 et le taux du 24S-OHC (r=0,332), tandis que des corrélations négatives entre le taux d'apeline, le taux du 24S-OHC, et le taux du 27-OHC ont été observées (avec respectivement r= -0,392, et r= -0,489). Concernant les acides gras, des corrélations positives ont été révélées entre le niveau des AGs, des AGMI et des AG Trans, et le taux plasmatique du 7KC ainsi que du 7β-OHC.

7. Régression logistique

Après ajustement pour les facteurs de risque adaptés aux traits cliniques (l'âge, le sexe, l'IMC, l'hypertension artérielle, le diabète, la glycémie) entre le groupe des sujets non sarcopéniques et le groupe des patients sarcopéniques, notre étude indique que le taux de C24:0 érythrocytaire est le facteur le plus associé au risque de sarcopénie [OR = 8,61 ; IC à 95% (1,46 - 50,78) ; p = 0,017], suivi par le taux de protéines carbonylées plasmatiques [OR = 2,38 ; IC à 95% (1,06 - 3,57) ; p = 0,035], le taux de LTB-4 sérique [OR = 1,00 ; IC à 95% (1,00 -1,01) ; p <0,001], et l'assistance [OR = 0,64 ; IC à 95% (0,02 - 0,28) ; p <0,001] (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Régression logistique.

	Odd ratio (OR)	IC 95%	p-value
C24:0 érythrocytaire (µg/mL)	8,61	1,46 - 50,78	0,017
PC plasmatique (nmoles/ mg de protéine)	2,38	1,06 - 3,57	0,035
LTB-4 sérique (pg/mL)	1,00	1,00 -1,01	<0,001
Assistance (n)	0,64	0,02 - 0,28	p <0,001

OR : Odd ratio ; IC : intervalle de confiance ; PC : Protéines carbonylées ; LTB-4 : Leucotriène B4.

II. Etude *in vitro*

À la lumière des résultats cliniques montrant une augmentation plasmatique de dérives oxydés du cholestérol (oxystérols), en particulier de ceux oxydés en C7 (7β-OHC, 7KC), chez les patients sarcopéniques âgés de plus de 65 ans, notre étude *in vitro* a consisté :

i) à étudier les caractéristiques biochimiques de deux huiles Méditerranéennes (lentisque et chardon-marie) en termes de polyphénols, flavonoïdes, caroténoïdes, acides gras, phytostérols et tocophérols et à évaluer leurs potentiels antioxydants,

ii) à caractériser les activités cytotoxiques du 7β-OHC et du 7KC sur des cellules musculaires squelettiques C2C12, en abordant les paramètres associés au développement de la sarcopénie, le stress oxydant, les dysfonctions des organites, et la mort cellulaire,

iii) à évaluer la capacité de ces deux huiles Méditerranéennes (lentisque et chardon-marie) et de l'α-tocophérol (constituant majeur de la vitamine E présent en grande quantité dans ces huiles) à s'opposer aux effets toxiques induits par le 7β-OHC et le 7KC sur les myoblastes C2C12.

iiii) à évaluer la toxicité du 7β-OHC et du 7KC associés ou non à PLSO ou α-tocophérol sur des cellules C2C12 différenciées en myotubes en utilisant du sérum de cheval comme agent différenciateur.

1. Caractéristiques des huiles Méditerranéennes : huile de lentisque et huile de chardon-marie

1.1. Composition biochimique des huiles de graines de lentisque et de chardon-marie

1.1.1. Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en caroténoïdes

La détermination de la teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en caroténoïdes a été effectuée par la méthode spectrophotométrique en utilisant respectivement le réactif de Folin–Ciocalteu, le trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), et l'éther de pétrole. Les résultats obtenus sont consignés dans le **Tableau 14**.

Nos résultats montrent que les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des deux huiles (PLSO, MTSO) sont relativement similaires, sauf que la teneur en caroténoïdes est variable dans les deux huiles ; le taux le plus élevé est observé dans l'huile PLSO avec une valeur de 2083,59 ± 55,00 mg / kg.

Tableau 14 : Teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en caroténoïdes des extraits de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO).

	Polyphénols totaux (mg EAG / g d'extrait)	Flavonoïdes (mg EC / g d'extrait)	Caroténoïdes (mg / kg)
PLSO	28,50 ± 0,77	51,36 ± 2,30	2083,59 ± 55,00
MTSO	23,98 ± 0,65	55,06 ± 5,91	366,79 ± 3,66

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type ; PLSO : Pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : Milk thistle seed oil ; EGA : Équivalent acide gallique ; EC : Équivalent catéchine.

1.1.2. Identification et quantification des polyphénols par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

L'identification et la quantification du profil phénolique a été réalisées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). La liste des polyphénols présents dans les deux huiles est présentée dans le **Tableau 15**.

Les huiles de graines de lentisque et de chardon-marie ne sont pas riches en composés phénoliques. L'acide protocatechuique, qui est un acide dihydroxybenzoïque et un type d'acide phénolique, et la coumarine, qui appartient à une sous-classe de polyphénols (hydroxycoumarines), sont identifiée dans l'huile de graine de lentisque (PLSO). Dans le MTSO, seule la vanilline est détectée.

Tableau 15 : Composition en polyphénols des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO).

Polyphénols (mg équivalent de quercétine / 100 g d'huile)	PLSO	MTSO
Acide protocatechuique	0,140 ± 0,001	-
Coumarine	0,650 ± 0,003	-
Vanilline	-	0,330 ± 0,001

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type ; PLSO : Pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : Milk thistle seed oil.

1.1.3. Composition en acides gras

Le profil en acides gras de PLSO et de MTSO, exprimé en pourcentage d'acides gras totaux, a été déterminé à l'aide de chromatographie en phase gazeuse et les résultats sont présentés dans le **Tableau 16**.

D'après les chromatogrammes, les acides gras majoritaires détectés dans les deux huiles sont : les acides palmitique (C16:0), oléique (C18:1 n-9), et linoléique (C18:2 n-6). La composition en acides gras est qualitativement similaire entre PLSO et MTSO, sauf pour l'acide palmitique (C16:0) et l'acide oléique (C18:1 n-9) où ils sont plus élevés dans le PLSO que dans le MTSO ; l'acide linoléique (C18:2 n-6) est aussi plus élevé dans MTSO que PLSO. Dans les deux huiles, les acides gras insaturés (AGI) sont les plus abondants.

Tableau 16 : Composition en acide gras des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO).

Teneurs en acides gras (%)	PLSO	MTSO
ΣAGS	28,77 ± 0,24	19,24 ± 0,17
Acide myristique (C14:0)	0,05 ± 0,01	0,08 ± 0,00
Acide palmitique (C16:0)	27,20 ± 0,22	13,06 ± 0,07
Acide heptadécanoïque (C17:0)	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,00
Acide stérique (C18:0)	1,26 ± 0,01	3,35 ± 0,11
Acide arachidonique (C20:0)	0,12 ± 0,00	1,48 ± 0,06
Acide béhénique (C22:0)	0,04 ± 0,00	0,76 ± 0,00
Acide lignocérique (C24:0)	0,05 ± 0,00	0,19 ± 0,00
ΣAGI	71,25 ± 0,28	79,93 ± 0,61
ΣAGMI	53,67 ± 0,17	22,67 ± 0,03
Acide palmitoléique (C16:1 n-7)	2,25 ± 0,01	0,18 ± 0,00
Acide oléique (C18:1 n-9)	49,77 ± 0,12	21,39 ± 0,02
Acide vaccénique (C18:1 n-7)	1,51 ± 0,03	0,79 ± 0,01
Acide gadoléique (C20:1 n-9)	0,14 ± 0,01	0,31 ± 0,00
ΣAGPI	17,58 ± 0,11	57,26 ± 0,58
Acide linoléique (C18:2 n-6)	17,19 ± 0,10	56,77 ± 0,57
Acide α-linolénique (C18:3 n-3)	0,39 ± 0,01	0,49 ± 0,01
ΣAGS /ΣAGI	0,41± 0,86	0,24 ± 0,28

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type ; PLSO : Pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : Milk thistle seed oil.

1.1.4. Composition en phytostérols

La composition en phytostérols de PLSO et MTSO, exprimé en (mg / 100 g d'huile), a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse et les résultats sont consignés dans le **Tableau 17**.

Les résultats montrent que le β-sitostérol est le phytostérol majeur de PLSO et de MTSO. L'α-epoxysitostanol et le cycloarténol de 24-méthylène cycloarténol sont les composés majoritaires de PLSO et ils sont présents en quantités importante (33,36 ± 1,65 mg/100 g d'huile et 16,10 ± 2,72 mg/100 g d'huile, respectivement) ; le MTSO est riche en campestérol, stigmasterol, et Δ^5-Avenastérol (64,15 ± 0,35 mg/100 g d'huile, 28,75 ± 0,12 mg/100 g d'huile, 27,04 ± 0,24 mg/100 g d'huile, respectivement). A noter que MTSO contient du cholesterol **(Zarrouk et al., 2019)** alors que PLSO n'en contient pas.

Tableau 17 : Composition en phytostérols des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO).

Phytostérols (mg / 100 g d'huile)	PLSO	MTSO
Cholestérol	-	56,14 ± 0,35
Campestérol	4,48 ± 0,85	64,15 ± 0,35
Stigmastérol	2,69 ± 0,23	28,75 ± 0,12
β-Sitostérol	67,25 ± 3,24	249,36 ± 0,12
Δ^5-Avenastérol	3,10 ± 0,90	27,04 ± 0,24
β-Amyrine	1,81 ± 0,19	18,14 ± 0,12
Cycloarténol	9,35 ± 1,49	8,90 ± 0,71
24-Méthylène cycloarténol	16,10 ± 2,72	14,85 ± 0,12
α-Epoxysitostanol	33,36 ± 1,65	-
Autres phytostérols	16,76 ± 2,83	121,77 ± 1,89
Total	154,89 ± 5,40	589,10 ± 4,06

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type ; PLSO : Pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : Milk thistle seed oil.

1.1.5. Identification et quantification d'α-tocophérol

L'identification et la quantification d'α-tocophérol a été réalisées par HPLC. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 18**.

D'après les résultats, les deux huiles Méditerranéennes (PLSO , MTSO) sont riches en α-tocophérol. La richesse de ces deux huiles en α-tocophérol, nous a incité d'utiliser ce composé comme contrôle positif pour la cytoprotection dans le traitement des cellules C2C12.

Tableau 18 : Teneur en α-tocophérol des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon -marie (MTSO).

	PLSO	**MTSO**
α-tocophérol (mg/ 100 g d'huile)	34,05 ± 0,34	27,85 ± 2,46

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type ; PLSO : Pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : Milk thistle seed oil.

2. Evaluation des activités antioxydantes des huiles de graines de lentisque et de chardon-marie

L'activité antioxydante du PLSO et du MTSO a été évaluées par différentes méthodes complémentaires: le test DPPH, le test de la réduction du fer (FRAP), le test de chélation des ions ferreux, et le test KRL. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 19**.

À partir des valeurs d'IC50 du test DPPH, nous constatons que le PLSO et le MTSO possèdent des activités radicalaires comparables (5,01 ± 0,10 mg/mL, 4,30 ± 0,16 mg/mL ; respectivement). Cependant, leurs capacités antiradicalaires sont moins importante que le standard (acide ascorbique (Vitamine C)).

Pour le test FRAP, le PLSO représente l'huile la plus active avec une IC50 de 1,15 ± 0,23 mg/mL par rapport au MTSO. En comparaison avec l'acide ascorbique, les deux huiles s'avèrent moins actives. L'étude de l'activité chélatrice par le test de chélation des ions ferreux a révélé que le PLSO et le MTSO possèdent des activités chélatrices similaires (5,61 ± 0,14 mg/mL, 5,75 ± 0,24 mg/mL ; respectivement). En revanche, leurs activités chélatrices est moins importantes que l'EDTA.

Pour le test KRL, nous avons utilisé l'α-tocophérol comme molécule de référence. Nos résultats montrent que le PLSO possède le statut antioxydant KRL le plus élevé (4440 ± 493,60 équivalent Trolox), suivi par le MTSO (160,17 ± 0,33 équivalent Trolox) et l' α-tocophérol (0,94 ± 0,01 équivalent Trolox).

Tableau 19 : Mesure de l'activité antioxydante des huiles de graines de lentisque (PLSO) et de chardon-marie (MTSO).

	IC50 (mg / mL)			(Equivalent Trolox)
	Test DPPH	**Test FRAP**	**Test de chélation des ions ferreux**	**Test KRL**
PLSO	5,01 ± 0,10	1,15 ± 0,23	5,61 ± 0,14	4440,00 ± 493,60
MTSO	4,30 ± 0,16	4,53 ± 0,23	5,75 ± 0,24	160,17 ± 0,33
EDTA (standard)	–	–	0,60 ± 0,09	–
Acide ascorbique (standard)	0,81 ± 0,27	0,41 ± 0,16	–	–
α-tocophérol	–	–	–	0,94 ± 0,01

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type ; PLSO : Pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : Milk thistle seed oil ; IC50 : concentration inhibitrice à 50% ; EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid, ; DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl; FRAP : Ferric reducing-antioxidant power.

3. Effet cytoprotecteurs des huiles de lentisque et de chardon-marie sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 non différenciées

3.1. Choix des concentrations optimales des différents traitements

Afin de préciser les effets cytoprotecteurs et antioxydants des huiles Méditerranéennes (PLSO et MTSO) et d'α-tocophérol sur les myoblastes C2C12 en culture, la première partie de notre travail a consisté à mettre au point les conditions expérimentales permettant d'induire un environnement pro-oxydant et cytotoxique mimé par le 7β-OHC et le 7KC présents en concentration augmentée dans le plasma des patients sarcopéniques.

L'effet du 7β-OHC et du 7KC sur la viabilité cellulaire a été évalué en utilisant le test FDA. Après 12 h de culture, les cellules C2C12 sont traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de 7β-OHC et 7KC (12,5 à 200 µM). Les résultats sont présentés dans la **Figure 36** .

Nos résultats montrent une diminution concentration-dépendante de la viabilité cellulaire en présence de 7β-OHC et de 7KC avec une IC 50 (concentration inhibitrice à 50%) d'ordre de 50 µM. Cette concentration a été utilisée dans toutes les expériences ultérieures afin

d'évaluer la capacité préventive et cytoprotectrice de PLSO, de MTSO et d'α-tocophérol à s'opposer aux effets toxiques induits par le 7β-OHC et le 7KC.

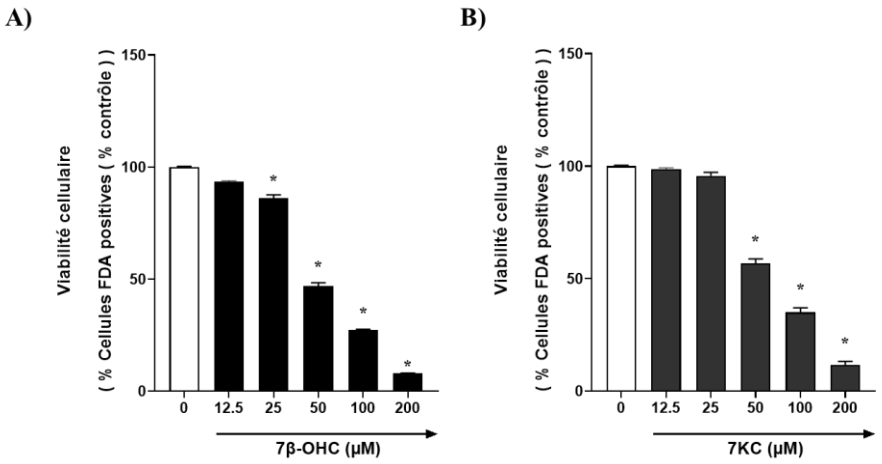


Figure 36 : Evaluation des effets de différentes concentrations de 7β-OHC et 7KC sur les cellules C2C12 après 24 h de traitement. La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test FDA. ***A)*** *Les cellules cultivées pendant 12 h sont traitées avec différentes concentrations de 7β-OHC (12,5 à 200 µM) pendant 24 h,* ***B)*** *Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h sont traitées avec différentes concentrations de 7KC (12,5 à 200 µM) pendant 24 h. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test-t de student. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type, * indique la différence significative (p <0,05) entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées.*

L'effet des huiles Méditerranéennes (PLSO et MTSO) et d'α-tocophérol sur la viabilité cellulaire a été évalué en utilisant le test MTT. Les cellules C2C12 après 12 h de culture sont traitées pendant 24 h avec différentes concentrations de PLSO (5 à 3 200 µg/mL) et de MTSO (5 à 3 200 µg/mL), et d' α-tocophérol (23,125 à 7 400 µM). Les résultats sont illustrés dans la **Figure 37**.

Nos résultats ne montrent aucun effet toxique du PLSO (5 à 800 µg/mL), du MTSO (5 à 200 µg/mL) et d'α-tocophérol (23,125 à 462,5 µM). Une diminution de la viabilité cellulaire a été observée à partir de la concentration 1 600 µg/mL pour PLSO, 400 µg/mL pour MTSO, et 925 µM pour α-tocophérol. Sur la base de ces résultats, le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM) ont été sélectionnés pour évaluer leur effets cytoprotecteurs dans les expériences ultérieures.

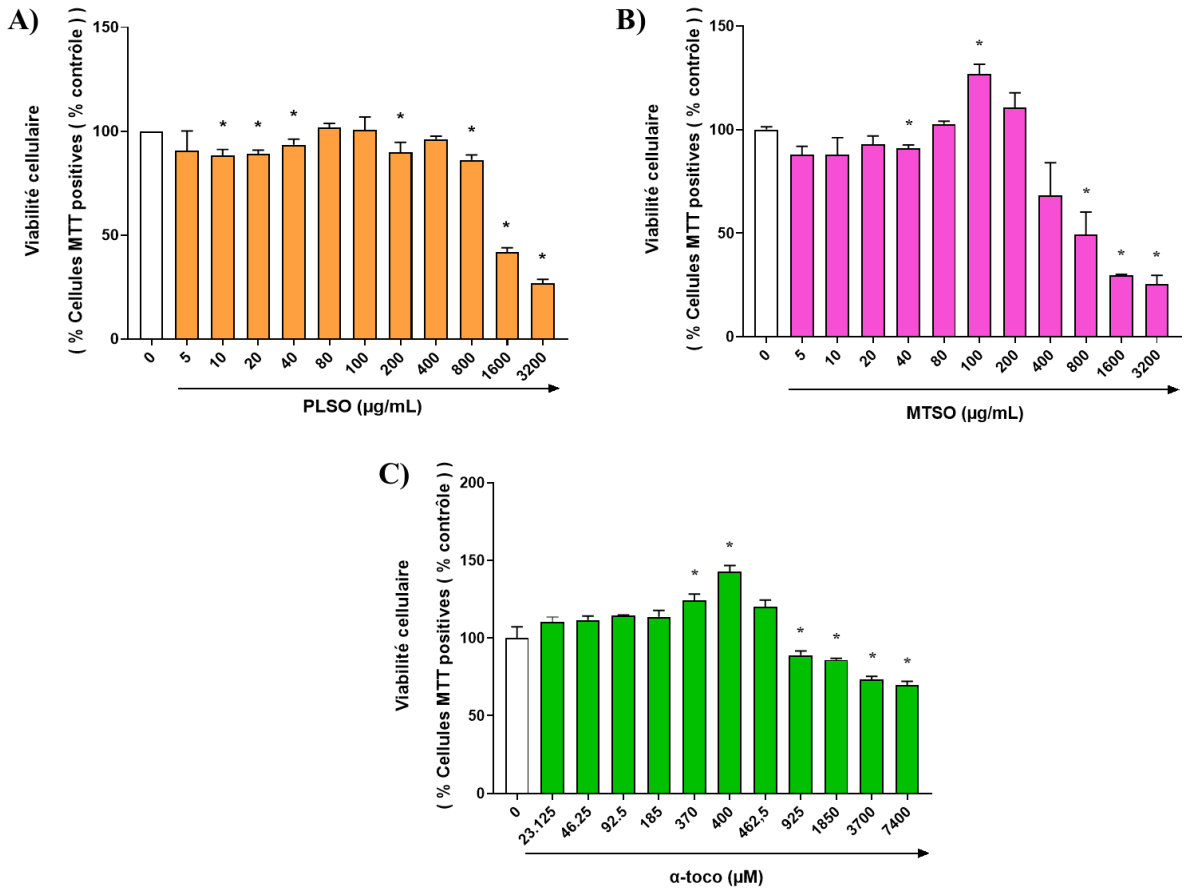


Figure 37 : Evaluation des effets de différentes concentrations des huiles Méditerranéennes (PLSO : pistacia lentiscus seed oil ; MTSO : milk thistle seed oil) et d'α-tocophérol sur la viabilité des cellules C2C12 après 24 h de traitement.

La viabilité cellulaire a été mesurée avec le test MTT. ***A)*** *Les cellules cultivées pendant 12 h sont traitées avec différentes concentrations de PLSO* (5 à 3 200 µg/mL) *pendant 24 h,* ***B)*** *Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h sont traitées avec différentes concentrations de MTSO* (5 à 3 200 µg/mL) *pendant 24 h,* ***C)*** *Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h sont traitées avec différentes concentrations* d'α-tocophérol (23,125 à 7 400 µM) *pendant 24 h. L'analyse statistique des données a été réalisée par le test-t de student. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type, * indique la différence significative ($p<0,05$) entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées.*

3.2. Evaluation des effets cytoprotecteurs de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la viabilité et l'adhésion cellulaire

3.2.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité estérase par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA)

Afin d'évaluer les effets cytoprotecteurs de PLSO, de MTSO, et de l'α-tocophérol associés ou non au 7β-OHC et au 7KC sur l'activité estérase utilisée comme indicateur de viabilité cellulaire, une coloration à la FDA a été réalisée sur les myoblastes C2C12 cultivés pendant 12 h et traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), ou α-tocophérol (400 µM) (utilisé comme contrôle positif de cytoprotection). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 38**.

Dans ces conditions de traitement des myoblastes C2C12, une diminution significative de pourcentage de cellules FDA-positives, reflétant les cellules vivantes, a été observée en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle), au véhicule (EtOH 0,1%). En revanche, lorsque le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) sont associés au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM), une cytoprotection est observée : dans ces conditions, une augmentation significative du pourcentage de cellules FDA-positives a été détectée. Cela démontre que le PLSO, le MTSO, et l'α-tocophérol atténuent la mort cellulaire induite par le 7β-OHC et le 7KC. Aucune différence n'a été observée entre contrôle, véhicules et cellules traitées avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM).

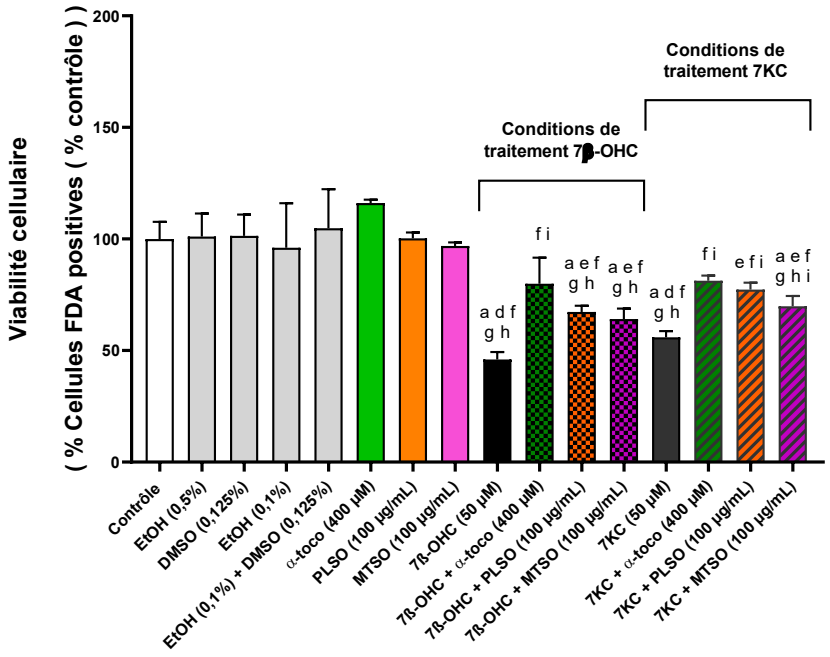


Figure 38 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA). Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.2.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'adhésion cellulaire

Les effets cytoprotecteurs de PLSO, de MTSO, et d'α-tocophérol associés ou non au 7β-OHC et au 7KC sur l'adhésion cellulaire ont été quantifiés par le test de coloration à la sulforhodamine 101 (SR101). Les résultats sont présentés dans la **Figure 39**.

L'adhésion cellulaire diminue significativement en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle), et au véhicule (EtOH 0,1%). Cette diminution est fortement atténuée en co-traitement avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM). Ainsi, le PLSO, le MTSO, et l'α-tocophérol corrigent en partie la perte d'adhésion cellulaire induite par le 7β-OHC et le 7KC. Aucune différence n'a été observée entre contrôle, véhicules, et cellules traitées avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM).

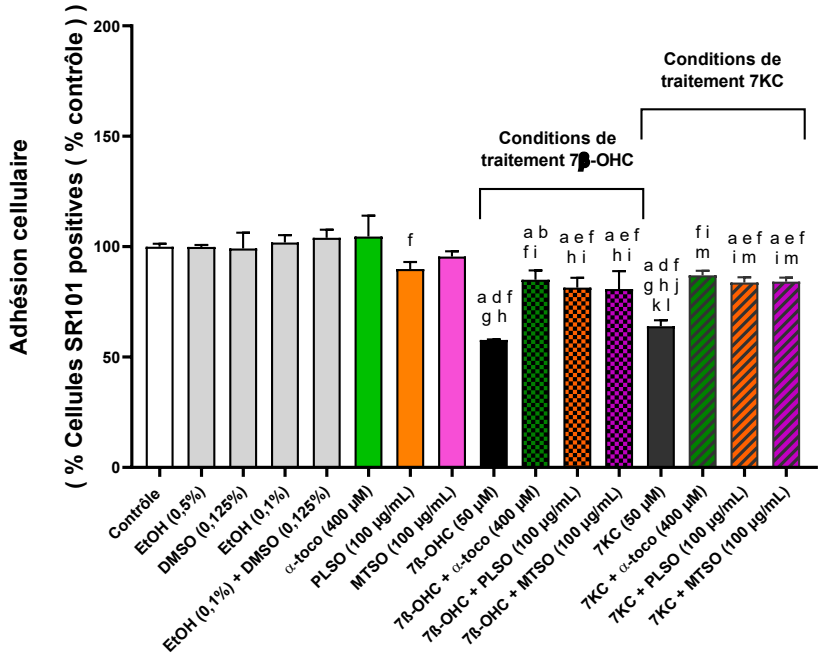


Figure 39 : Mesure de l'adhésion cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Test de coloration à la suforhodamine 101 (SR101). Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences

statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.2.3. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la morphologie cellulaire

Les effets cytoprotecteurs de PLSO, de MTSO, et d'α-tocophérol associés ou non au 7β-OHC et au 7KC sur la morphologie des myoblastes C2C12 cultivés pendant 12 h ont été analysés après 24 h par microscopie à contraste de phase sur un microscope inversé équipé d'une caméra (Axiovert 40 CFL, Zeiss). Les images obtenues sont présentées dans la **Figure 40**.

En microscopie à contraste de phase, les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h et traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM), comparativement au contrôle et aux véhicules montrent une augmentation du nombres des cellules rondes flottantes (cellules mortes), et une diminution du nombre de cellules adhérentes. Ces effets ont été remarquablement corrigés lorsque les cellules ont été simultanément incubées avec du PLSO (100 µg/mL), du MTSO (100 µg/mL) ou de l'α-tocophérol (400 µM). Aucun effet sur la croissance cellulaire et l'adhésion cellulaire des cellules non traitées (contrôle), des différents véhicules, et les cellules traitées avec PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et α-tocophérol (400 µM) n'a été observé.

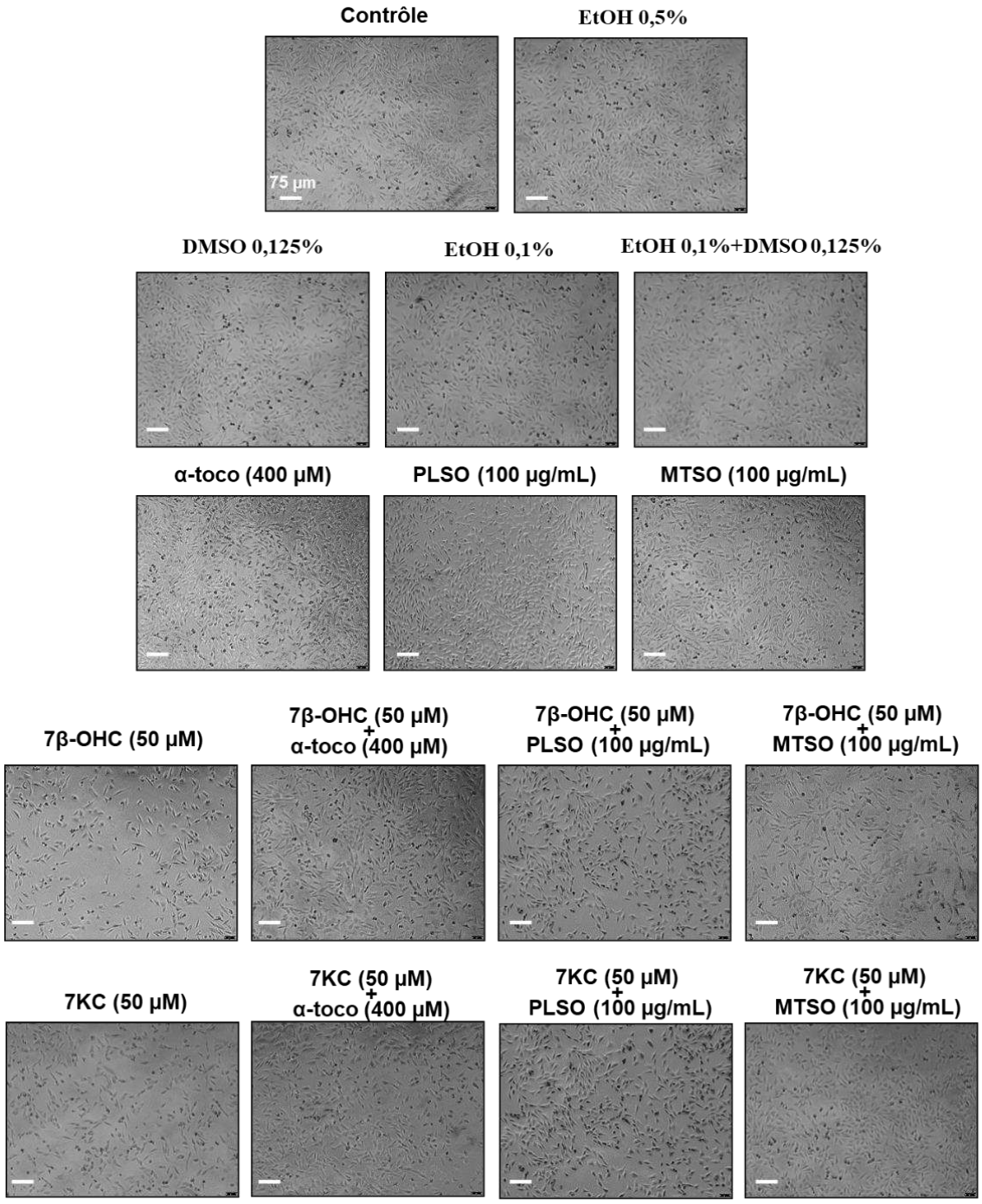


Figure 40 : Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des myoblastes C2C12.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM) et de 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et α-tocophérol (400 µM), et observées en microscopie à contraste de phase. Nous observons moins de cellules adhérentes avec le 7β-OHC et le 7KC. Cette diminution est fortement atténuée lorsque ces oxystérols sont associés à PLSO, MTSO et α-tocophérol.

3.2.4. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la perméabilité la membrane plasmique

L'augmentation de perméabilité de la membrane plasmique est un critère de mort cellulaire ; la perméabilité a été mesurée avec l'iodure de propidium (PI), un fluorochrome qui ne pénètre que dans les cellules avec des membranes plasmiques altérées correspondant à des cellules mortes.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 41**.

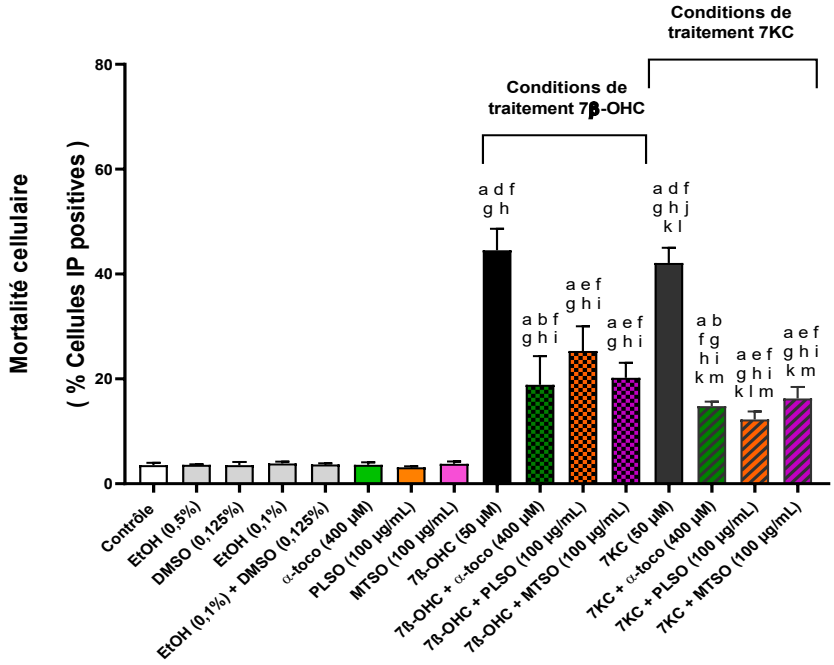


Figure 41 : Mesure de la mortalité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Test de coloration à l'iodure de propidium (IP). Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e

: comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

L'analyse de la fluorescence émise par l'IP a été analysée par cytométrie en flux. Cela a montré que le traitement par 7β-OHC (50 µM) et 7KC (50 µM) augmente significativement le pourcentage des cellules IP positives, cellules ayant une membrane plasmique lésée considérées comme des cellules mortes. À la suite des co-traitements avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), ou l'α-tocophérol (400 µM), une nette réduction du pourcentage des cellules IP positives est observée confirmant les effets cytoprotecteurs de ces composés. Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle), les différents véhicules et les cellules traitées avec PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et α-tocophérol (400 µM).

3.3. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et 7-cétocholestérol sur le stress oxydant

3.3.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO)

La production des espèces réactives de l'oxygène, en particulier d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) sur cellules C2C12 a été évaluée par coloration au DHE. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 42**.

L'analyse par cytométrie en flux a révélé une augmentation significative du pourcentage des cellules DHE positives reflétant une surproduction d'ERO en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM). Ainsi, la surproduction d'ERO est significativement plus élevée en présence du 7β-OHC (50 µM) qu'en présence du 7KC (50 µM). Cette augmentation est significativement atténuée lorsque le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) sont associés au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM). Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules.

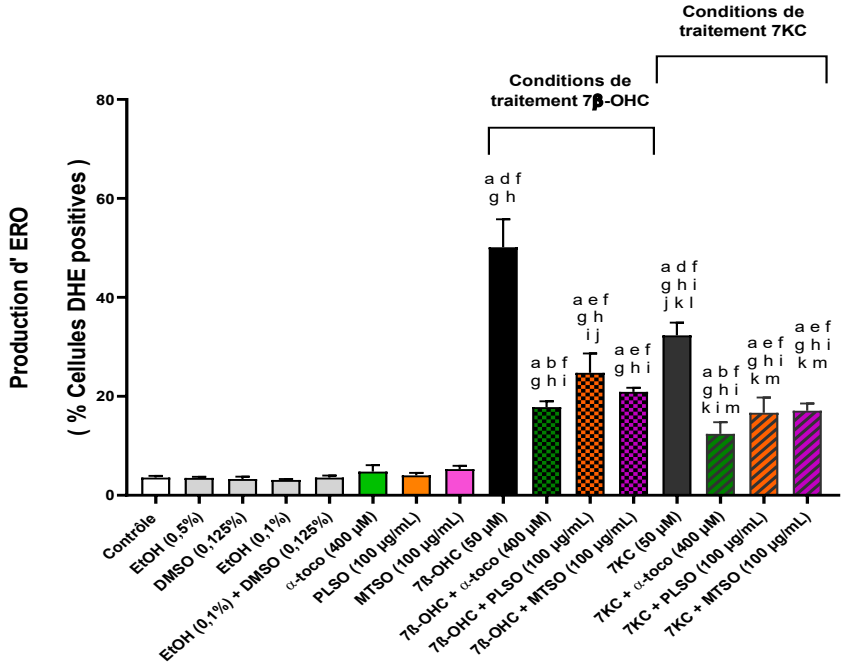


Figure 42 : Mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Test de coloration au dihydroéthidium (DHE). Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.3.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le système de défense antioxydant

La première ligne de défense des cellules face au stress oxydant fait intervenir des enzymes antioxydantes comme la SOD qui dégrade les $O_2^{\bullet -}$ produits par les cellules, la GPx qui assure la détoxification cellulaire en dégradant H_2O_2, et la catalase qui permet la dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2. Les activités des enzymes antioxydantes SOD et GPx ainsi que l'expression des gènes antioxydants *SOD1* (*Cu/Zn-SOD, cytoplasmique*), *SOD2* (*Mn-SOD, mitochondrial*), *GPx* et *catalase (CAT)* ont été respectivement évaluées par dosage spectrophotométrique et par RT-qPCR. Les résultats de ces deux analyses sont présentés dans le **Tableau 20** et la **Figure 43**.

Les résultats du dosage spectrophotométrique montrent une diminution significative de l'activité de SOD et GPx suite au traitement avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM), comparativement aux cellules non traitées et au véhicule (EtOH 0,1%). En revanche, les cellules co-traitées avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM) montrent une augmentation significative de l'activité de SOD et GPx par rapport aux cellules traitées avec le 7β-OHC (50 µM) ou le 7KC (50 µM). Aucune différence n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules. Ces résultats soulignent une diminution des activités enzymatiques SOD et GPx en présence de 7β-OHC et de 7KC. Cette diminution est significativement atténuée en présence des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

La quantification par RT-qPCR de l'expression de gènes antioxydants montre une diminution d'expression d'ARNm de *SOD1*, *SOD2* et *GPx*, et une augmentation du niveau d'expression d'ARNm de *catalase* dans les cellules traitées au 7β-OHC (50 µM) comparativement aux cellules non traitées, et au véhicule (EtOH 0,1%). En présence de PLSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), une augmentation du niveau d'expression d'ARNm de *SOD1*, *SOD2* et *GPx* et une diminution du niveau d'expression d'ARNm de *catalase* sont révélées. En revanche, en présence du 7KC, une augmentation du niveau d'expression d'ARNm de *SOD1 et SOD2 a* été observée. Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

Tableau 20 : Mesure des activités des enzymes antioxydantes, SOD et GPx, en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

	SOD (% par rapport au contrôle)	GPx (% par rapport au contrôle)
Contrôle	97,79 ± 1,47	98,02 ± 1,32
EtOH 0,5%	94,66 ± 0,45	102,78 ± 1,32
DMSO 0,125%	93,59 ± 4,75	100,40 ± 4,06
EtOH 0,1%	93,15 ± 4,62	102,59 ± 1,05
EtOH 0,1% + DMSO 0,125%	93,83 ± 1,91	104,03 ± 2,17
α-toco (400 µM)	91,17 ± 1,02	96,78 ± 1,32
PLSO (100 µg/mL)	92,04 ± 3,54	104,70 ± 2,71
MTSO (100 µg/mL)	97,33 ± 2,22	90,33 ± 3,11 ^{g}
7β-OHC (50 µM)	58,00 ± 1,87 ^{adfgh}	22,59 ± 2,49 ^{adfgh}
7β-OHC + α-toco (400 µM)	88,16 ± 0,76 ^{i}	60,72 ± 2,90 ^{abfghi}
7β-OHC + PLSO (100 µg/mL)	75,70 ± 1,54 ^{aefghij}	47,33 ± 2,96 ^{aefghij}
7β-OHC + MTSO (100 µg/mL)	78,00 ± 1,33 ^{aefghi}	43,33 ± 3,11 ^{aefghij}
7KC (50 µM)	64,00 ± 2,00 ^{adfghjkl}	25,33 ± 2,44 $^{adfgh jkl}$
7KC + α-toco (400 µM)	85,67 ± 1,56 ^{ahim}	46,33 ± 2,44 ^{abfghijm}
7KC+ PLSO (100 µg/mL)	83,00 ± 3,33 ^{ahim}	40,33 ± 1,11 ^{aefghijm}
7KC+ MTSO (100 µg/mL)	83,00 ± 2,00 ^{ahim}	37,67 ± 1,78 ^{aefghijm}

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %)+ DMSO (0,125%)); f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100

µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

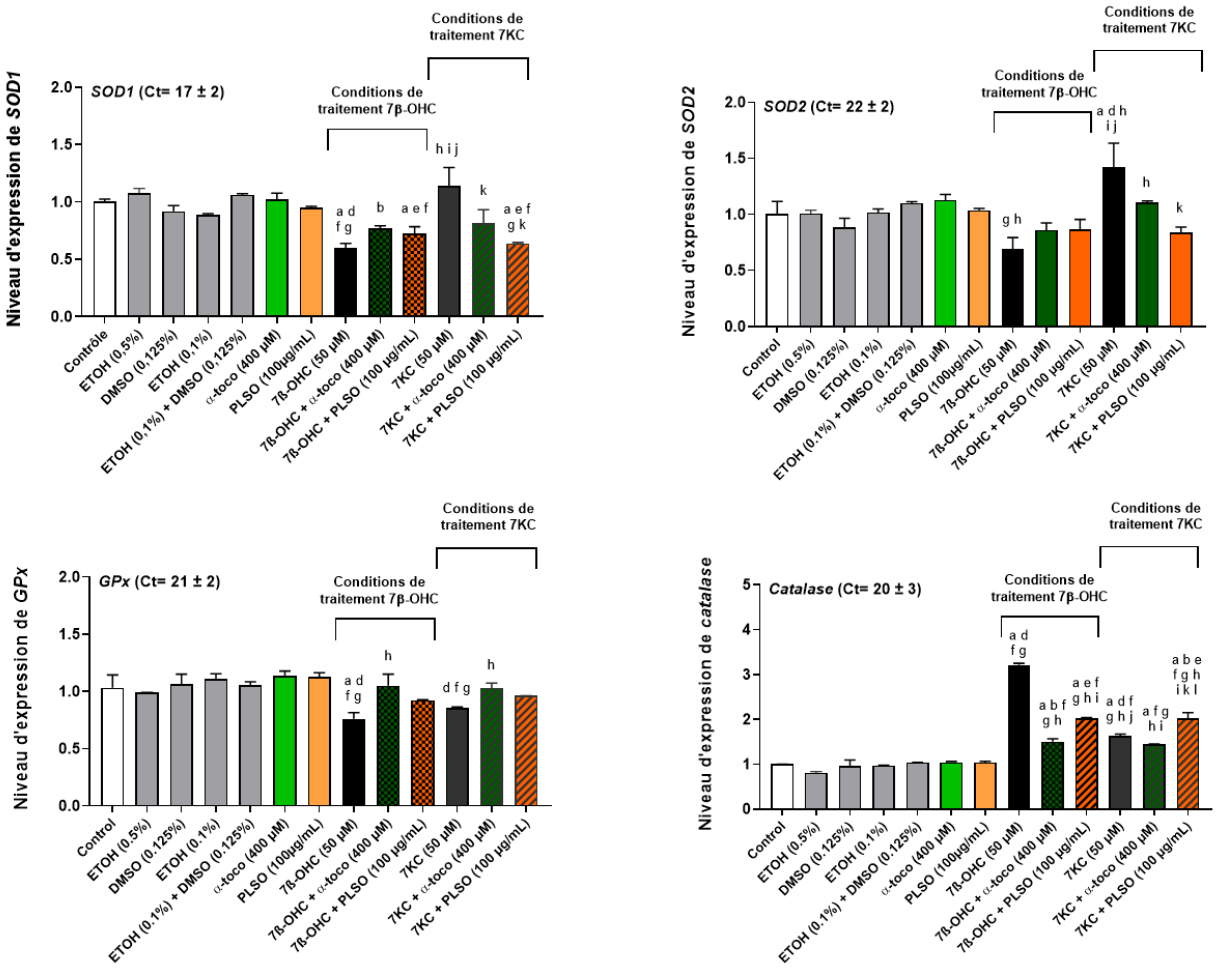


Figure 43 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associé ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur le niveau d'expression des gènes antioxydants (SOD1, SOD2, *Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus*

contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM), j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL), K : comparaison versus 7KC (50 µM) , l : comparaison versus 7KC (50 µM) + α-toco (400 µM).

3.3.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la peroxydation lipidique

Un déficit de la réponse antioxydante induit divers dommages, dont la peroxydation lipidique, qui contribue à la destruction cellulaire. Un dosage des produits de la peroxydation lipidique (MDA (malondialdéhyde), DC (dienes conjugués)) a été réalisé sur les myoblastes C2C12 cultivés pendant 12 h puis traitées en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM). Les résultats obtenus sont illustrés dans le **Tableau 21**.

Les résultats montrent une nette augmentation du taux de MDA et de DC en présence des oxystérols (50 µM) et une diminution significative dans le cas de co-traitement du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), ou l'α-tocophérol (400 µM). Ceci montre que la rupture de l'équilibre RedOx conduit à une peroxydation lipidique en présence des deux oxystérols et que PLSO, MTSO et α-tocophérol inhibent cette peroxydation lipidique.

3.3.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la production de protéines carbonylées

Des dommages aux protéines sont aussi induits par le stress oxydant. Un dosage des protéines carbonylées au niveau cellulaire a été évalué. Les protéines carbonylées sont la conséquence de la peroxydation lipidique : les aldéhydes formés réagissent avec les amines libres des protéines. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 22**.

Les résultats montrent une nette augmentation du taux des protéines carbonylées dans les cellules traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM). Cette augmentation est significativement diminuée en présence du PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et α-tocophérol (400 µM) associées au 7β-OHC (50 µM) ou au 7KC (50 µM).

Tableau 21 : Mesure des produits de peroxydation lipidique (MDA, DC) en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

	MDA (nmol / mg de protéine)	DC (nmol / mg de protéine)
Contrôle	4,10 ± 0,07	520,02 ± 22,21
EtOH 0,5%	4,20 ± 0,13	489,92 ± 6,72
DMSO 0,125%	3,70 ± 0,13	504,40 ± 40,13
EtOH 0,1%	4,00 ± 0,07	585,88 ± 17,58
EtOH 0,1% + DMSO 0,125%	4,15 ± 0,03	496,29 ± 34,99
α-toco (400 µM)	3,50 ± 0,27	545,38 ± 12,17
PLSO (100 µg/mL)	4,10 ± 0,07	601,45 ± 13,81
MTSO (100 µg/mL)	4,00 ± 0,27	613,44 ± 15,96
7β-OHC (50 µM)	7,85 ± 0,17 ^{adfgh}	1173,12 ± 40,56 ^{adfgh}
7β-OHC + α-toco (400 µM)	4,55 ± 0,30 ^{fi}	695,69 ± 1,41 ^{abfi}
7β-OHC + PLSO (100 µg/mL)	5,05 ± 0,10 ^{aefghi}	666,57 ± 11,26 ^{aei}
7β-OHC + MTSO (100 µg/mL)	5,17 ± 0,29 ^{aefghi}	802,34 ± 13,42 ^{aefghik}
7KC (50 µM)	6,83 ± 0,24 ^{adfghijkl}	1135,27 ± 72,45 ^{adfghjkl}
7KC + α-toco (400 µM)	4,87 ± 0,24 ^{fhim}	696,89 ± 28,16 ^{abfim}
7KC+ PLSO (100 µg/mL)	5,33 ± 0,22 ^{aefghim}	751,94 ± 15,10 ^{aefghim}
7KC+ MTSO (100 µg/mL)	5,40 ± 0,27 ^{aefghim}	783,33 ± 13,98 ^{aefghim}

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %)+ DMSO (0,125 %)); f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h

: comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

Tableau 22 : Mesure de protéines carbonylées en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

	PC (nmol / mg de protéine)
Contrôle	133,29 ± 22,21
EtOH 0,5%	146,87 ± 5,99
DMSO 0,125%	134,11 ± 0,20
EtOH 0,1%	123,44 ± 2,20
EtOH 0,1% + DMSO 0,125%	147,11 ± 14,10
α-toco (400 µM)	139,49 ± 10,30
PLSO (100 µg/mL)	137,69 ± 10,34
MTSO (100 µg/mL)	138,43 ± 11,42
7β-OHC (50 µM)	380,37 ± 10,58 ^{adfgh}
7β-OHC + α-toco (400 µM)	176,63 ± 4,38 ^{afghi}
7β-OHC + PLSO (100 µg/mL)	158,08 ± 6,01 ^{i}
7β-OHC + MTSO (100 µg/mL)	188,89 ± 2,31 ^{aefghi}
7KC (50 µM)	339,85 ± 6,87 ^{adfghijkl}
7KC + α-toco (400 µM)	172,45 ± 4,81 ^{afghim}
7KC+ PLSO (100 µg/mL)	181,68 ± 1,92 ^{aefghim}
7KC+ MTSO (100 µg/mL)	183,82 ± 5,65 ^{aefghim}

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme

statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %)+ DMSO (0,125 %)); f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.3.1. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'expression de protéine Nrf2

La protéine Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related factor 2) est un facteur de transcription, ayant une région basique leucine zipper (bZIP) au niveau de son domaine C terminal. Nrf2 est impliquée dans la défense cellulaire contre le stress oxydant. Nrf2 joue un rôle clé dans la régulation de nombreux gènes parmi lesquels se trouvent les gènes antioxydants et les enzymes de détoxication de phase II à savoir les enzymes de conjugaison telles que les glutathion-S-transférases (GST) et les uridine diphospho (UDP)-glucuronosyltransférase (UGT), et les enzymes impliquées dans la réduction des métabolites réactifs telles que la NAD(P)H quinone oxydoréductase (NQO1). Il est donc important d'évaluer l'incidence du 7β-OHC et du 7KC sur l'expression de Nrf2 ainsi que l'effet du PLSO et de l'α-tocophérol sur cette protéine. L'expression de la protéine Nrf2 totale et phosphorylée a été évaluée par Western blot sur les cellules C2C12. Les résultats sont présentés dans la **Figure 44**.

Les résultats montrent une diminution significative de l'expression de la protéine Nrf2 totale en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle), et au véhicule (EtOH 0,1%). Lorsque les cellules sont cultivées en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées au PLSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM), l'expression de Nrf2 totale a été fortement augmentée. Par ailleurs, une légère diminution de l'expression de la protéine Nrf2 phosphorylée a été observée dans les cellules traitées avec le 7β-OHC comparativement au véhicule (EtOH 0,1%). Cette diminution est plus marquée en présence du 7KC qu'en présence du 7β-OHC. Nos résultats montrent aussi une augmentation

significative de rapport [Nrf2 phosphorylée / Nrf2 totale] en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM). Cette augmentation est fortement atténuée en co-traitement avec le PLSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol 400 µM).

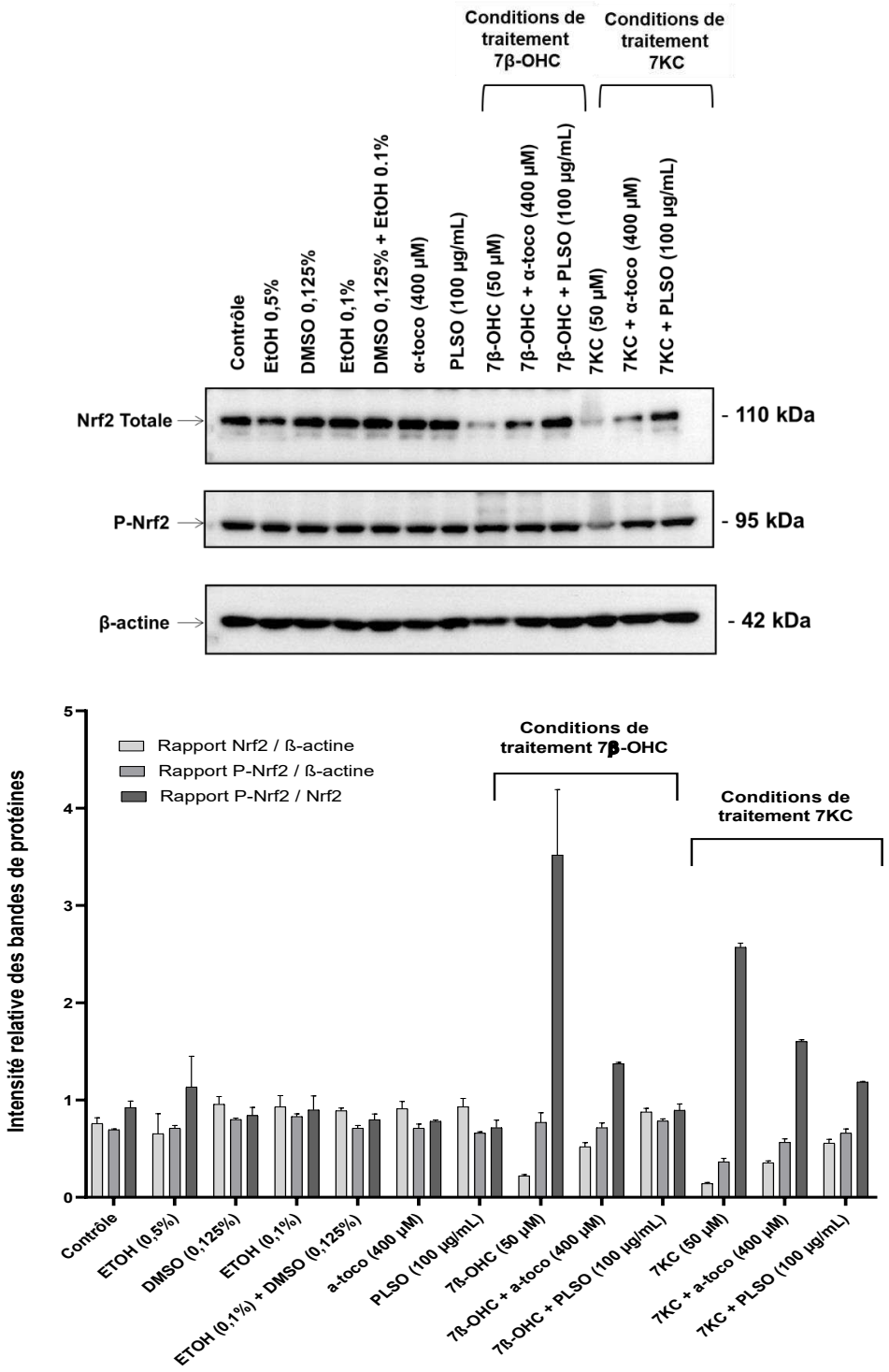


Figure 44 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associé ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de protéine Nrf2 totale et phosphorylée.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM), et de 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). La protéine Nrf2 totale et la protéine Nrf2 phosphorylée ainsi que la β-actine (utilisé comme une protéine de référence) ont été caractérisées par Western blot avec des anticorps appropriés.

3.4. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité mitochondriale

3.4.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le potentiel transmembranaire mitochondrial

Dans la mitochondrie, le gradient des protons (H^+) résulte du flux d'électrons généré par la chaîne respiratoire mitochondriale ce qui conduit à la distribution asymétrique des H^+ de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale créant ainsi un gradient chimique (ΔpH) et un gradient électrochimique négatif (ΔΨm) élevé au niveau de la matrice mitochondriale. Cette différence de potentiel (ΔΨm) est essentielle pour maintenir la fonction physiologique de la chaîne respiratoire (production d'ATP) et le contrôle de la perméabilité membranaire mitochondriale.

La variation de ΔΨm a été mesurée par cytométrie en flux après coloration au $DiOC_6(3)$. L'accumulation de ce fluorochrome dans la mitochondrie dépond de la valeur du ΔΨm. La chute du ΔΨm s'accompagne donc d'une diminution de la fluorescence associée à $DiOC_6(3)$ du fait que l'accumulation de ce dernier dépend du ΔΨm : si ΔΨm est élevé l'accumulation de $DiOC_6(3)$ est forte, si ΔΨm est faible l'accumulation de $DiOC_6(3)$ est faible.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 45**.

Suite au traitement des myoblastes C2C12 avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM), une diminution marquée de ΔΨm, révélée par une augmentation du pourcentage de cellules avec des mitochondries dépolarisées ($DiOC_6(3)$-cellules négatives), est observée comparativement aux cellules non traitées (contrôle) et au véhicule (EtOH 0,1%). Lorsque le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) sont associés au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM), nous observons une diminution significative du pourcentage de cellules $DiOC_6(3)$, cellules négatives avec des mitochondries dépolarisées. Ceci

montre des activités mito-protectrices du PLSO, du MTSO et de l'α-tocophérol. Aucune différence significative du pourcentage des cellules avec des mitochondries dépolarisées n'a été révélée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

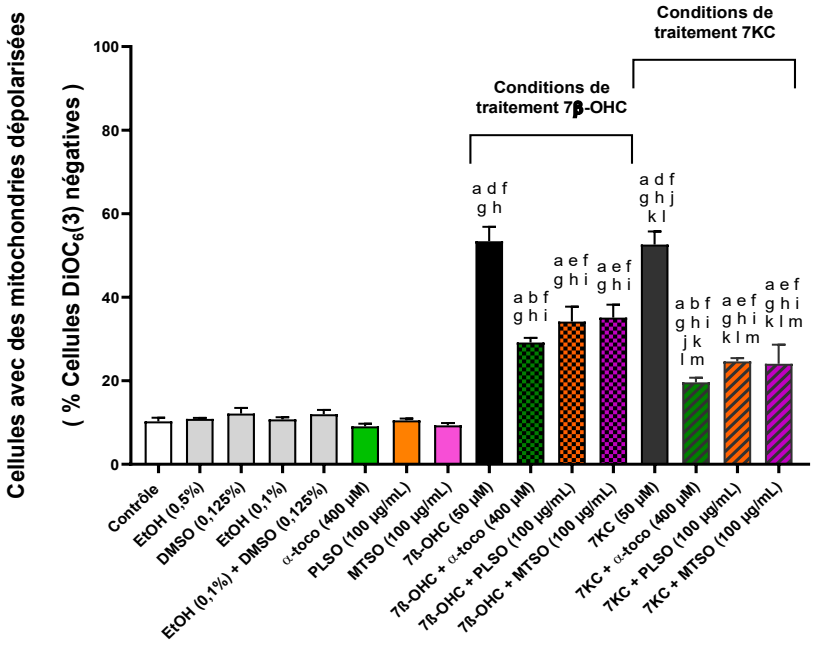


Figure 45 : Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial (ΔΨm) permettant la détermination du pourcentage de cellules C2C12 avec des mitochondries dépolarisées en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes et d'α-tocophérol.

Utilisation du test de coloration au $DiOC_6(3)$. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.4.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le taux d'ATP mitochondrial

La chaîne respiratoire mitochondriale, localisée au niveau des crêtes de la membrane interne des mitochondries, a pour fonction de produire de l'ATP. L'ATP est la clef du métabolisme énergétique des cellules.

L'étude de la production de l'ATP mitochondriale a été réalisée grâce à une technique de bioluminescence. Ainsi, les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM). Les résultats du dosage d'ATP sont présentés dans la **Figure 46**. Le traitement des myoblastes C2C12 avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) montre une nette réduction du taux d'ATP par rapport au contrôle et au véhicule (EtOH 0,1%). En revanche, le co-traitement des oxystérols avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), ou l'α-tocophérol (400 µM) induit une augmentation significative du taux d'ATP. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

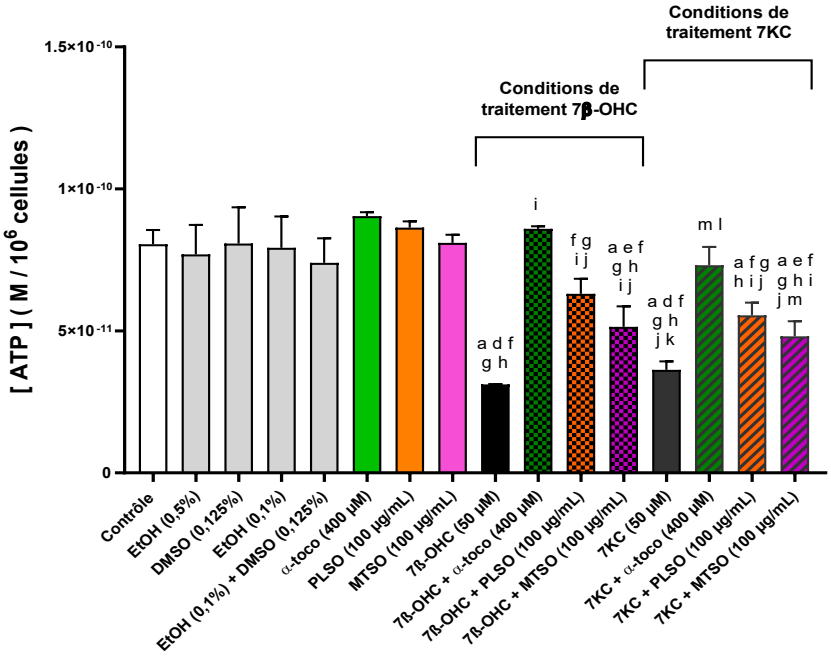


Figure 46 : Mesure de la concentration cellulaire d'ATP en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide

d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.4.3. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la masse mitochondriale

La masse mitochondriale a été évaluée par cytométrie en flux après coloration avec le MitoTracker Red. Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Après 24 h de traitement, une coloration au MitoTracker Red a été effectuée sur les cellules mise en suspension. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 47**.

Dans ces conditions de traitement des myoblastes C2C12, une augmentation significative de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF), pouvant correspondre à une augmentation de la masse mitochondriale pour palier à la déficience de la production d'ATP, a été observée en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle), et au véhicule (EtOH 0,1%). Cette augmentation est fortement atténuée en co-traitement avec le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM). Le co-traitement avec le PLSO (100 µg/mL) montre une légère diminution, mais non statistiquement significative, d'IMF comparativement aux cellules traitées avec du 7β-OHC (50 µM) seul. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules.

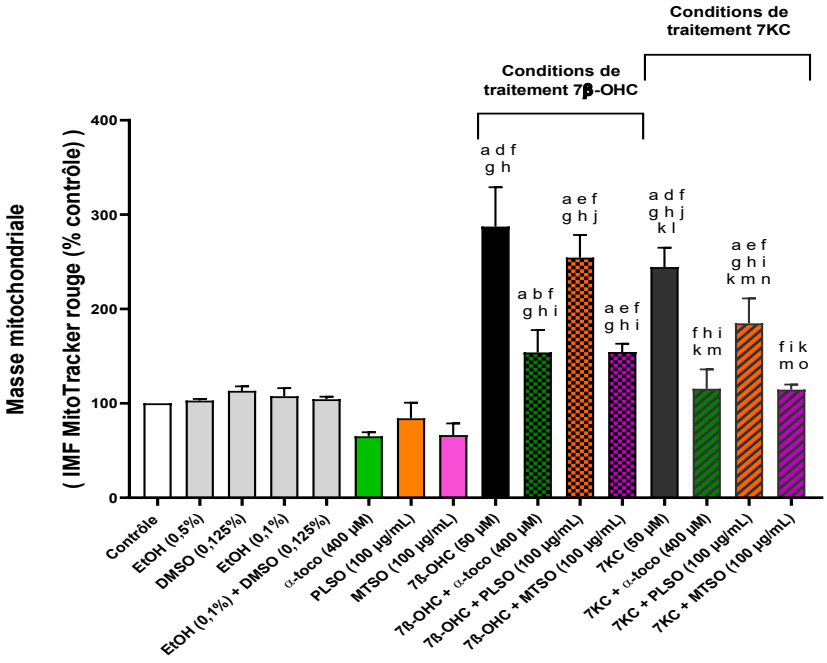


Figure 47 : Mesure de la masse mitochondriale en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Utilisation du test de coloration au MitoTracker Red. *Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).*

3.4.4. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la production d'anion superoxyde au niveau mitochondrial

La production d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) au niveau mitochondrial sur cellules C2C12 a été évaluée par la coloration au MitoSOX Red. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 48**.

L'analyse par cytométrie en flux a révélé une augmentation significative du pourcentage de cellules MitoSOX positives reflétant une surproduction d'$O_2^{\bullet -}$ mitochondriaux en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM). Cette augmentation est fortement atténuée lorsque le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) sont associés au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM) ce qui confirme l'activité mito-protectrice de ces composés. Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules.

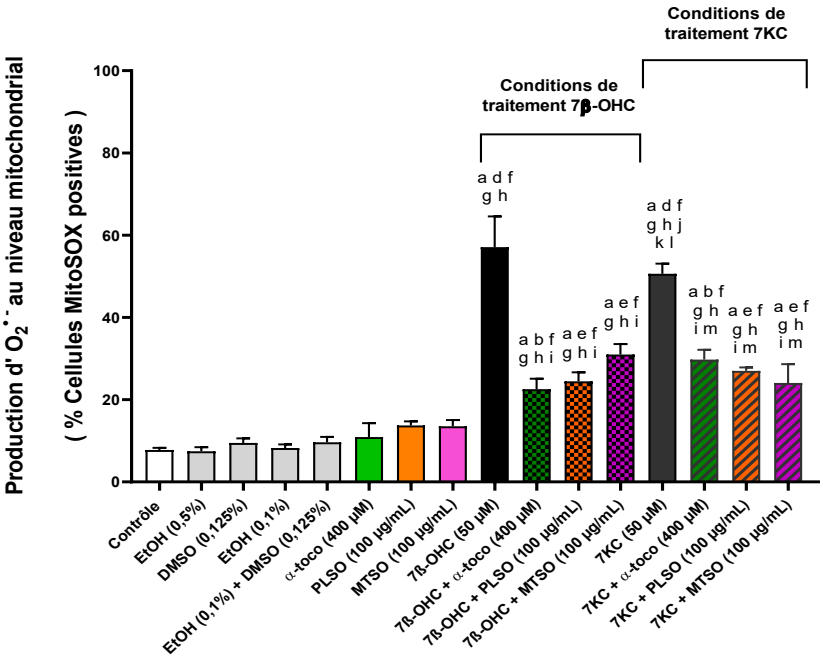


Figure 48 : Mesure de la production d'anion superoxyde au niveau mitochondrial permettant la détermination du pourcentage de cellules surproduisant l'anion superoxyde en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol

Utilisation du test de coloration au MitoSOX Red. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse

comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

3.4.5. Effet de MitoQ et de MitoTempol associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité estérase par coloration à la fluorescéine diacétate (FDA)

Les mitochondries produisent normalement des ERO. Une surproduction d'ERO peut survenir sous l'effet d'agents physiques, chimiques ou biologiques et dans certaines maladies. Pour prévenir cette surproduction d'ERO mitochondriaux, il existe un antioxydant mitochondrial (MitoTempol) et un analogue de coenzyme Q10 (MitoQ) . Dans ce contexte, les effets antioxydants de MitoQ et de MitoTempol associés ou non au 7β-OHC et au 7KC ont été évalués sur les cellules C2C12 cultivés pendant 12 h et traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), α-tocophérol (400 µM), MitoQ (1 µM), ou mitoTempol (5 µM). Un test FDA est réalisé pour évaluer l'impact de MitoQ et de MitoTempol sur l'activité estérase et/ou la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 49**.

À la suite de co-traitement des oxystérols avec le MitoQ (1 µM), une faible cytoprotection est observée avec le test FDA. En revanche une cytoprotection significative et marquée est trouvée avec le MitoTempol (5 µM) comparativement aux cellules traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) seuls. Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules.

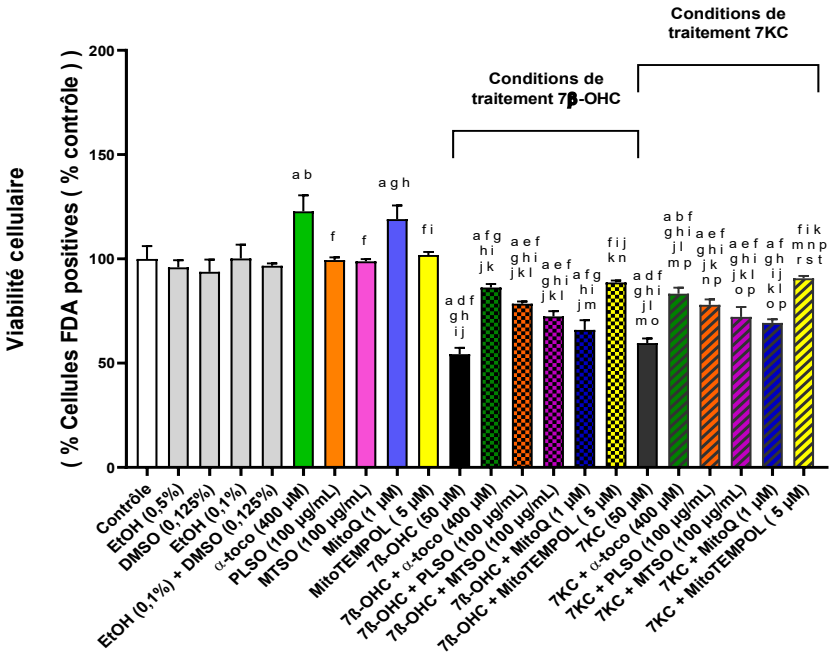


Figure 49 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs de mitoQ et de mitoTempol.

Test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA). Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus MitoQ (1 µM) ; j : comparaison versus MitoTempol (5 µM); k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; m : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; n : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MitoQ (1 µM) ; o : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MitoTempol (5 µM) ; p : comparaison versus 7KC (50 µM) ; q : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; r : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL) ; s : comparaison versus 7KC (50 µM) + MitoQ (1 µM) ; t : comparaison versus 7KC (50 µM) + MitoTempol (5 µM) . Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

3.4.6. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la glycolyse et le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs, également appelé cycle de l'acide citrique ou cycle de l'acide tricarboxylique (cycle TCA), correspond à une série de réactions chimiques qui fait suite à la glycolyse. Le cycle de Krebs représente la principale source d'énergie de la cellule. En effet, au cours de ce cycle le pyruvate, le produit final de la glycolyse, est transportée du cytosol, lieu de la glycolyse, vers la mitochondrie où il est ensuite converti par la pyruvate-déshydrogénase en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) qui est le substrat de départ du cycle de Krebs. Il est donc intéressant d'étudier l'effet de PLSO et de MTSO associes ou non au 7β-hydroxycholestérol et 7-cétocholestérol sur le taux de différents acides organiques impliqués dans la glycolyse (acide lactique, acide pyruvique) et dans le cycle de Krebs (acide citrique, acide 2-cétoglutarique, acide succinique, acide fumarique, acide malique, acide oxaloacétique).

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). L'analyse des acides organiques a été étudiée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS). Les résultats obtenus exprimés en ng / million de cellules sont consignés dans le **Tableau 23**.

En présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM), une augmentation significative de la quantité d'acide lactique est observée comparativement aux cellules non traitées (contrôle) et au véhicule (EtOH 0,1%). En revanche, les cellules co-traitées avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM) montrent une diminution significative du taux d'acide lactique par rapport aux cellules traitées avec le 7β-OHC (50 µM) ou le 7KC (50 µM). Par ailleurs, une diminution significative de la quantité d'acide lactique est révélée dans les cellules traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle) et au véhicule (EtOH 0,1%). Cette diminution est fortement atténuée lorsque le 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM). La mesure des taux de différents acides organiques du cycle du Krebs, révèle une diminution marquée de la quantité d'acide citrique, d'acide 2-cétoglutarique, d'acide succinique, d'acide fumarique, d'acide malique, et d'acide oxaloacétique dans les cellules traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) par rapport aux cellules non traitées (contrôle) et au véhicule (EtOH 0,1%). Cette diminution est atténuée en co-traitement avec le PLSO , le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM). Cela montre la capacité de PLSO, de MTSO, et de α-tocophérol de réguler le cycle du Krebs.

Tableau 23 : Mesure des acides organiques en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7 cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

	Glycolyse		Cycle de Krebs					
	Acide lactique	**Acide pyruvique**	**Acide citrique**	**Acide 2-cétoglutarique**	**Acide succinique**	**Acide fumarique**	**Acide malique**	**Acide oxaloacétique**
Contrôle	370,32 ± 2,28	38,58 ± 1,06	32,21 ± 1,05	5,09 ± 0,33	34,76 ± 0,11	8,07 ± 0,20	4,51 ± 0,17	6,30 ± 0,18
EtOH 0,5%	354,57 ± 4,38	40,99 ± 1,08	29,04 ± 1,95	5,53 ± 0,18	34,12 ± 0,21	9,38 ± 0,20	4,48 ± 0,13	6,41± 0,79
DMSO 0,125%	353,36 ± 6,02	39,52 ± 0,30	31,44 ± 0,26	5,45 ± 0,07	35,53 ± 0,44	8,33 ± 0,14	6,02 ± 0,25	5,10 ± 0,26
EtOH 0,1%	351,45 ± 0,16	35,91± 0,66	27,90 ± 0,66	4,18 ± 0,11	33,32 ± 0,83	7,65 ± 0,23	4,58 ± 0,11	6,25 ± 0,12
EtOH 0,1% + DMSO 0,125%	373,73 ± 3,29	40,72 ± 1,24	28,13 ± 1,28	6,84 ± 0,12	33,55 ± 1,12	8,06 ± 0,11	5,06 ± 0,47	6,95 ± 0,28
α-toco (400 µM)	243,43 ± 3,92 a b	77,18 ± 0,84 a b	48,94 ± 1,91 a b	23,65 ± 1,11 a b	47,60 ± 0,46 a b	10,62 ± 0,06 a	10,43 ± 0,60 a b	12,06 ± 0,09 a b
PLSO (100 µg/mL)	453,07 ± 1,61 a c f	62,42 ± 2,81 a c f	32,28 ± 1,45 f	11,49 ± 0,47 a c f	33,10 ± 0,08 f	8,45 ± 0,27 f	10,41 ± 0,55 a c	17,19 ± 0,95 a c f
MTSO (100 µg/mL)	513,69 ± 4,56 a c f g	66,85 ± 1,73 a c f	24,66 ± 0,45 a c f g	12,80 ± 0,52 a c f	54,32 ± 1,58 a c f g	12,16 ± 0,17 a g	13,32 ± 0,59 a c f g	41,75 ± 1,27 a c f g
7β-OHC (50 µM)	545,63 ± 4,05 a d f g h	25,64 ± 0,06 a d f g h	11,80 ± 0,73 a d f g h	2,32 ± 0,07 a d f g h	6,57 ± 0,23 a d f g h	4,89 ± 0,03 a d f g h	2,62 ± 0,12 d f g h	4,66 ± 0,08 f g h
7β-OHC + α-toco (400 µM)	306,19 ± 4,05 a b f g h i	79,27 ± 1,39 a b g h i	31,43 ± 0,51 f h i	16,56 ± 0,17 a b f g h i	14,21 ± 0,07 a b f g h i	11,57 ± 0,11 a b g i	5,02 ± 0,23 f g h i	16,10 ± 0,46 a b f h i
7β-OHC + PLSO (100 µg/mL)	312,47 ± 2,68 a e f g h i	30,05 ± 0,94 e f g h j	12,24 ± 0,25 a e f g h j	2,54 ± 0,15 a e f g h j	12,13 ± 0,02 a e f g h i	6,71 ± 0,06 f g h j	2,41 ± 0,35 a f g h j	4,25 ± 0,14 f g h j
7β-OHC + MTSO (100 µg/mL)	293,92 ± 2,25 a e f g h i l	34,77 ± 0,45 f g h j	13,89 ± 0,74 a e f g h j	1,96 ± 0,09 a e f g h j	8,68 ± 0,30 a e f g h j	6,56 ± 0,05 f h j	3,65 ± 0,11 f g h	7,85 ± 0,26 f g h i j k
7KC (50 µM)	544,88 ± 0,34 a d f g h i j c k l	27,99 ± 0,84 a f g h j	19,21 ± 0,33 a d f g i j k	2,16 ± 0,04 a d f g h j	15,41 ± 0,59 a d f g h i l	4,66 ± 0,13 a f g h j	2,46 ± 0,21 d f g h j	4,92 ± 0,17 f g h j
7KC + α-toco (400 µM)	229,16 ± 4,30 a b g h i j k l m	128,96 ± 4,52 a b f g h i j k l m	36,94 ± 0,70 b f h i k l m	19,67 ± 0,65 a b f g h i j k l m	49,79 ± 0,77 a b g h i j l m	14,84 ± 1,38 a b f g h i j k l m	8,51 ± 0,28 a b h i j k l m	18,09 ± 0,44 a b f h i k l m
7KC+ PLSO (100 µg/mL)	273,94 ± 3,04 a e f g h i j k l m n	81,82 ± 2,14 a e g h i k l m n	33,20 ± 0,08 f h i k l m	5,07 ± 0,42 e f g h i j k l m n	12,85 ± 0,25 a e f g h i k l n	7,77 ± 0,07 f h i j m n	5,60 ± 0,60 e f g h i k m n	20,77 ± 0,46 a e f g h i j k l m
7KC+ MTSO (100 µg/mL)	342,03 ± 3,14 a e f g h i j k l m n o	66,68 ± 1,44 a e f g i j k l m n o	27,16 ± 2,01 f h i k l m n o	4,25 ± 0,12 f g h j l n	13,41 ± 0,23 a e f g h i l n	10,92 ± 0,20 [a] e g i k l m n o	4,24 ± 0,23 f g h n	13,42 ± 0,46 a e g h i k l m n o

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey.

3.4.7. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur les niveaux d'expression de gènes codants pour les protéines de la dynamique mitochondriale

Les mitochondries se divisent, fusionnent et modifient constamment leur taille et leur forme, formant un réseau dynamique pour maintenir leur intégrité et leur quantité. Les cellules normales maintiennent un équilibre entre la fusion et la fission. Les protéines Mitofusine 1 et 2 (Mfn1/2) sont impliquées dans la fusion de la membrane mitochondriale externe, et la protéine d'atrophie optique 1 (OPA1) assure la fusion des membranes mitochondriales internes. La fission mitochondriale 1 (Fis1) et la protéine 1 liée à la dynamine (Drp1) sont associées à la fission mitochondriale. Fis1 se localise principalement sur la membrane mitochondriale externe. Drp1 est une protéine cytoplasmique qui se transloque dans les mitochondries et interagit avec Fis1 pour améliorer la fission **(Y. Wang et al., 2019)** (**Figure 50**). Il est donc important de déterminer l'effet de PLSO associé ou non au 7β-OHC ou au 7KC sur les niveaux de l'expression des gènes impliqués dans la fusion/fission mitochondriale.

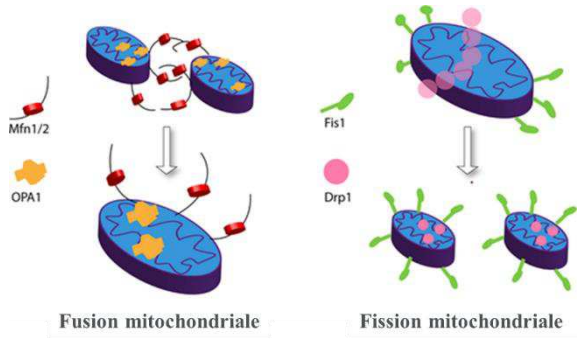


Figure 50 : Représentation schématique de la dynamique mitochondriale.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM), et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Ensuite, une RT-qPCR a été réalisée pour étudier l'expression de gènes impliqués dans la fusion/fission mitochondriale. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 51**.

Les résultats montrent une augmentation de l'expression de gènes de fusion mitochondriale (*Mfn1, Mfn2, et Opa1)* dans les cellules traitées au 7β-OHC (50 µM) comparativement aux cellules non traitées. En présence de PLSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), une diminution d'expression de *Mfn1, Mfn2, et Opa1* est révélée bien que

non significative. En présence du 7β-OHC, une diminution d'expression des gènes de fission mitochondriale *(Drp1 et Fis1)* a été observée. Le 7 KC affecte l'expression des gènes de ces protéines de façon différente.

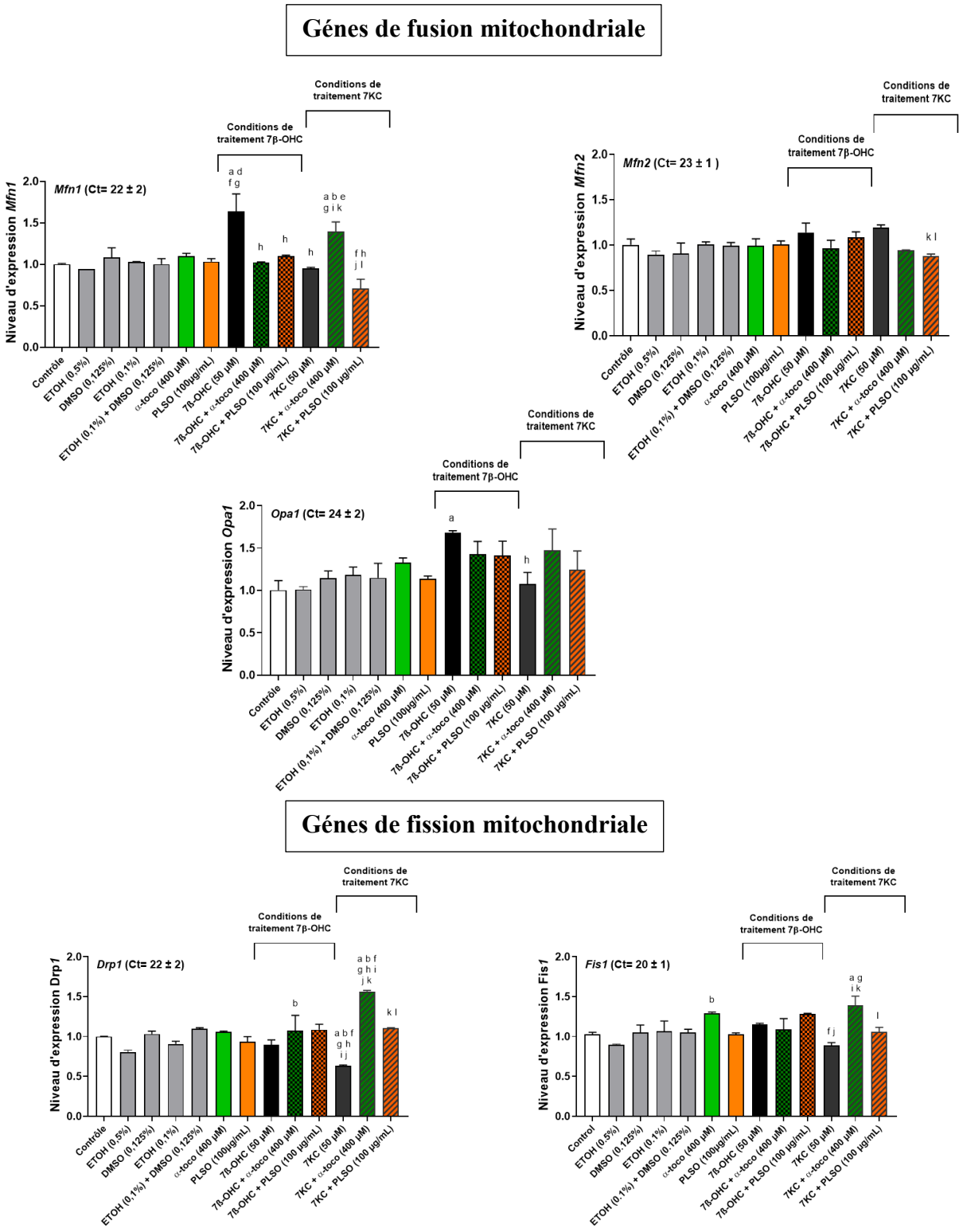


Figure 51: Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de gènes impliqués dans la fusion (Mfn1, Mfn2, Opa1) et la fission (Drp1, Fis1) mitochondriale.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM), j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL), K : comparaison versus 7KC (50 µM) , l : comparaison versus 7KC (50 µM) + α-toco (400 µM).

3.4.8. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur la biogenèse mitochondriale

Le facteur mitochondrial TFAM (mitochondrial transcription factor A) et le facteur NRF1 (nuclear respiratory factor 1) sont requis pour la régulation de la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt). NRF1 a été signalé comme étant lié aux promoteurs du gène TFAM et travaillant ensemble dans la fonction et la biogenèse mitochondriales. L'impact du 7β-OHC (50 µM) et 7KC associés ou non au PLSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM) sur l'expression de *Tfam1* et de *Nrf1* a été évalué sur les cellules C2C12. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 52**.

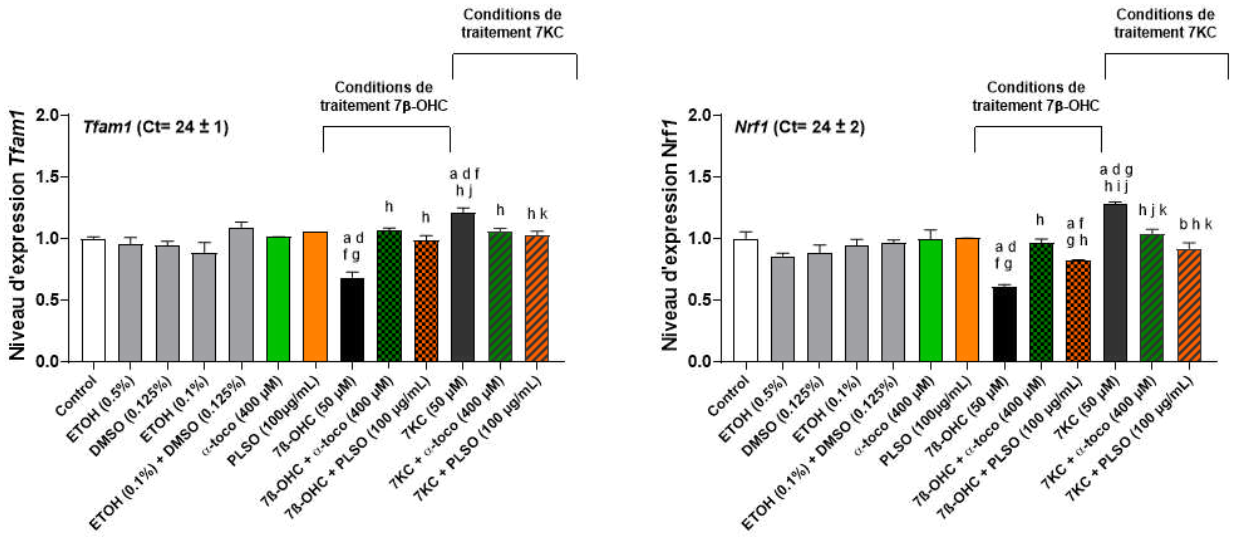


Figure 52 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de Tfam1 et de Nrf1.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM), j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL), K : comparaison versus 7KC (50 µM) , l : comparaison versus 7KC (50 µM) + α-toco (400 µM).

Les résultats montrent que sous l'effet du 7β-OHC (50 µM), le niveau d'expression de *Tfam1* et de *Nrf1* est significativement diminué comparativement aux cellules non traitées (contrôle) ou au véhicule (EtOH (0,1 %)). Cette diminution est atténuée en présence de PLSO (100 µg/mL), et d'α-tocophérol (400 µM). En revanche, sous l'effet du 7KC (50 µM), le niveau d'expression de *Tfam1* et de *Nrf1* est significativement augmenté par rapport au contrôle. Les deux oxystérols (7β-OHC et 7KC) ont donc des effets différents sur le niveau d'expression de *Tfam1* et de *Nrf1*.

L'AMPK et les sirtuines jouent également des rôles importants dans la biogenèse mitochondriales. L'expression de gènes *Sirt3 et Ampk α1* ainsi que la quantité des protéines Sirt1 et AMPK α1 ont été respectivement évaluées par RT-qPCR et Western blot. Les résultats de ces deux analyses sont présentés dans les **Figures 53** et **54**.

La quantification par RT-qPCR de l'expression de gènes mitochondriaux montre une diminution significative d'expression d'ARNm de *Sirt3 et Ampk α1* dans les cellules traitées au 7β-OHC (50 µM) comparativement aux cellules non traitées, et au véhicule (EtOH 0,1%). En revanche, aucun effet sur le niveau d'expression de ces gènes (*Sirt3 et Ampk α1)* n'a été révélé en présence du 7KC (**Figure (53**).

Les résultats de l'analyse par Western blot ne montrent aucun changement de la quantité de la protéine AMPK α1 sur les cellules traitées avec 7β-OHC (50 µM) et 7KC (50 µM) comparativement aux cellules non traitées. Une légère diminution de la quantité de Sirt1 est révélée avec les cellules traitées avec 7β-OHC (50 µM) (**Figure 64)**.

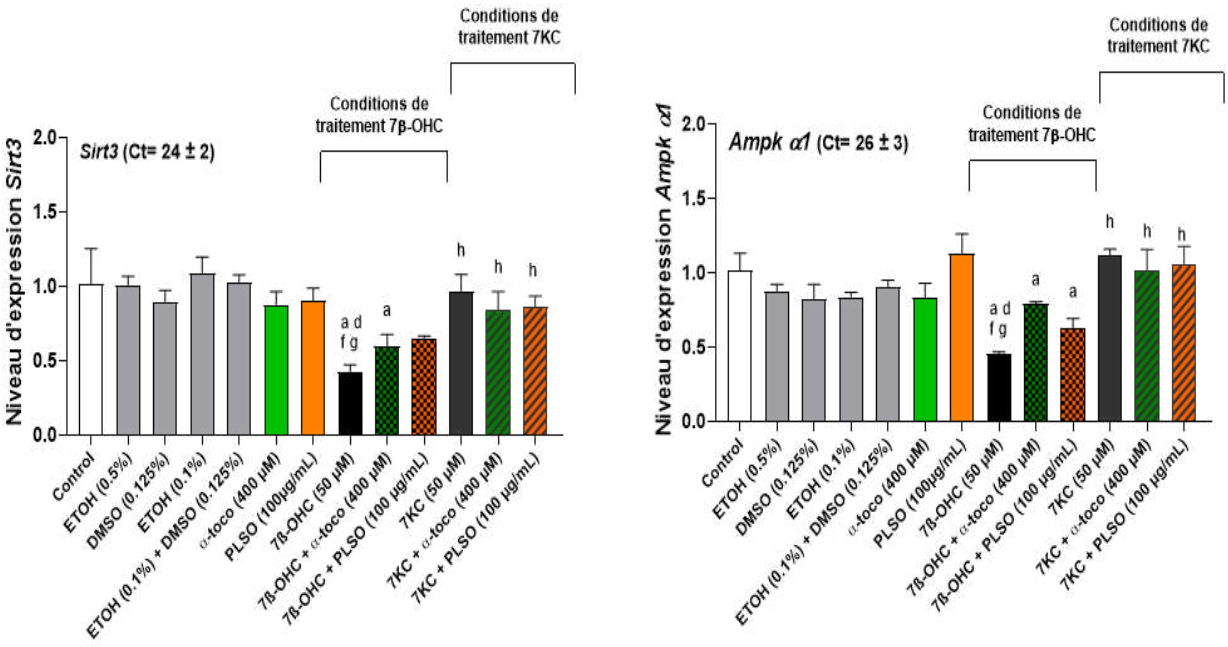


Figure 53 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de Sirt3 et de Ampk α1.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM), j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL), K : comparaison versus 7KC (50 µM) , l : comparaison versus 7KC (50 µM) + α-toco (400 µM).

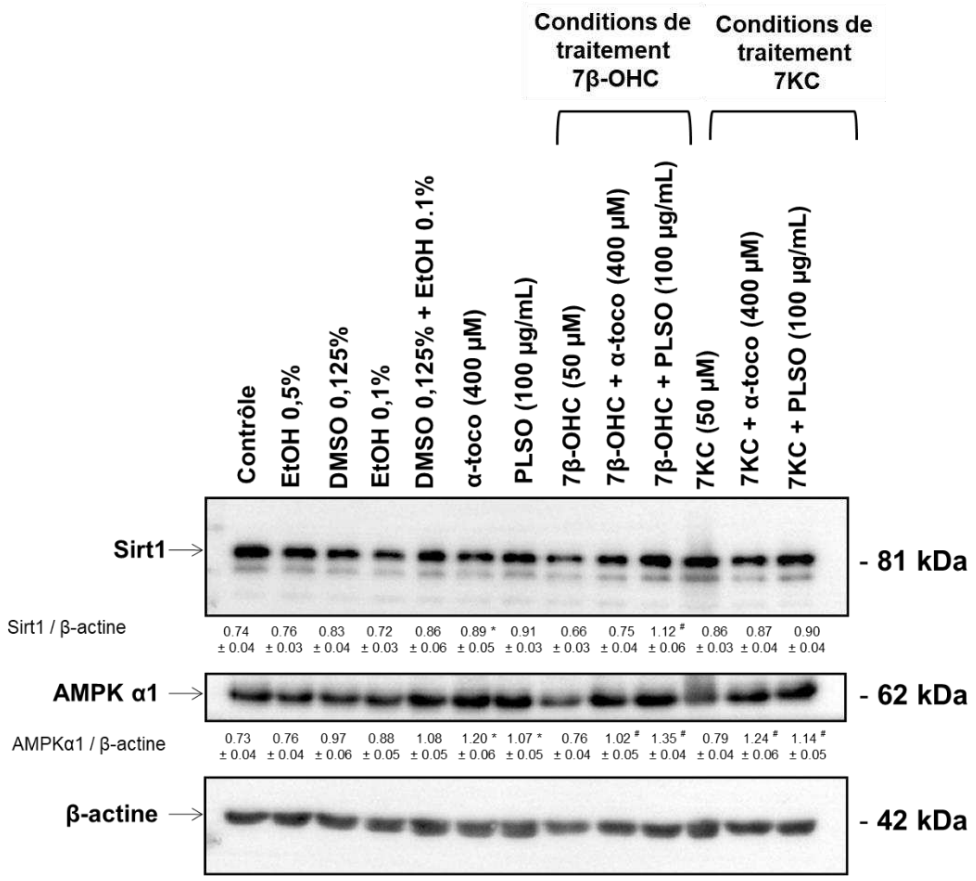


Figure 54 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur la quantité de protéines mitochondriales (Sirt1 et AMPK α1).

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Les protéines mitochondriales (Sirt1 et AMPK α1) *ainsi que la β-actine (utilisé comme une protéine de référence) ont été caractérisées par Western blot avec des anticorps appropriés. Les données sont présentées sous forme de sous forme de moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes et comparées par le test-t de student. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives sont indiquées par différents symboles : * comparaison entre PLSO, α-tocophérol, 7β-OHC, et (7β-OHC + PLSO) versus le véhicule correspondant ; # comparaison entre 7β-OHC, (7β-OHC + PLSO) et (7β-OHC + α-toco).*

Le 7β-OHC et le 7KC ont des effets différents sur la dynamique et la biogenèse mitochondriale. Ces effets sont plus ou moins norlalisés en fonction de PLSO et d'α-tocophérol. Sur la base de ces resultats une carte thermique « heatmap » a été réalisée (**Figure 55**).

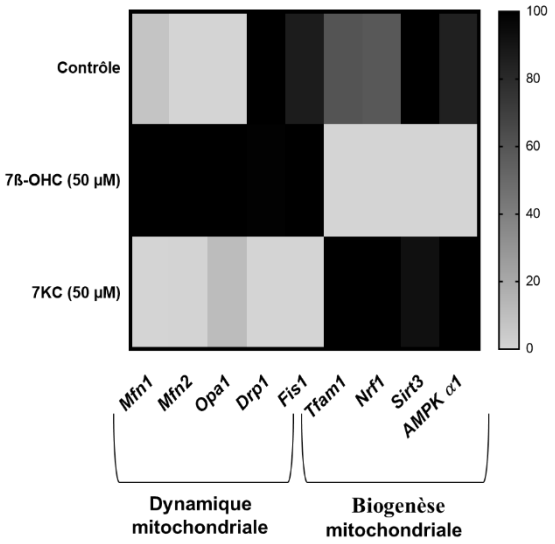


Figure 55 : Heatmap réalisée sur cellules C2C12 comparant la differences entre les deux oxystérols étudiés (7β-OHC et 7KC).

La carte thermique (heatmap) est un système de classification par couleurs comparant les effets du 7β-OHC et du 7KC. La couleur passe du gris (peu ou pas d'effet) au noir (effet maximal) en fonction de l'intensité des effets sur les niveaux l'expression de génes impliqués dans la dynamique et la biogenèse mitochondriale.

3.5. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité peroxysomale

Les peroxysomes sont des organites qui participent au contrôle de l' homéostasie RedOx et au métabolisme des lipides. Ils sont fonctionnellement connectés aux mitochondries et au réticulum endoplasmique, et sont souvent situés au voisinage des mitochondries. Une évaluation des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'activité peroxysomale a été réalisée. Ainsi, plusieurs paramètres peroxysomaux ont été étudiés avec l'utilisation de différentes méthodes complémentaires : microscopie à illumination structurée (Apotome), cytométrie en flux, Western blot , RT-qPCR et chromatographie en phase gazeuse couplée à spectrométrie de masse (CPG-MS).

3.5.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'expression et la topographie du transporteur membranaire peroxysomal ABCD3

Le transporteur ABCD3 est un composant majeur de la membrane peroxysomale. Ce transporteur peroxysomal est fréquemment utilisé pour évaluer la masse peroxysomale, fournissant ainsi des informations sur la biogenèse des peroxysomes. La topographie et la quantité d'ABCD3 ont été respectivement évaluées par microscopie à fluorescence par illumination structurée avec le module Apotome, et par cytométrie en flux après un immunomarquage indirecte, en utilisant un anticorps primaire polyclonal anti-ABCD3 et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les résultats de ces deux analyses sont présentés dans les **Figures 56** et **57**.

L'observation microscopique des cellules C2C12 par apotome a révélé une répartition homogène des peroxysomes dans le cytoplasme des cellules non traitées, et des cellules traitées au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM). Sous traitement au 7β-OHC (50 µM) et au 7KC (50 µM), une diminution importante de la densité des peroxysomes et des agrégats de peroxysomes (qui pourraient correspondre à des vésicules de perxophagie) sont observés. Lorsque les cellules sont cultivées en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM), l'aspect des peroxysomes et leur topographie évoquent ceux des cellules non traitées (contrôle) **(Figure 56)**.

En accord avec les observations microscopiques, l'analyse par cytométrie en flux a révélé une augmentation significative du pourcentage des cellules avec un niveau réduit d'ABCD3, indiquant une diminution de la masse peroxysomale, sous traitement avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM). Cette diminution de la masse peroxysomale induite par le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) est fortement contrecarrée en présence des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol **(Figure 57)**.

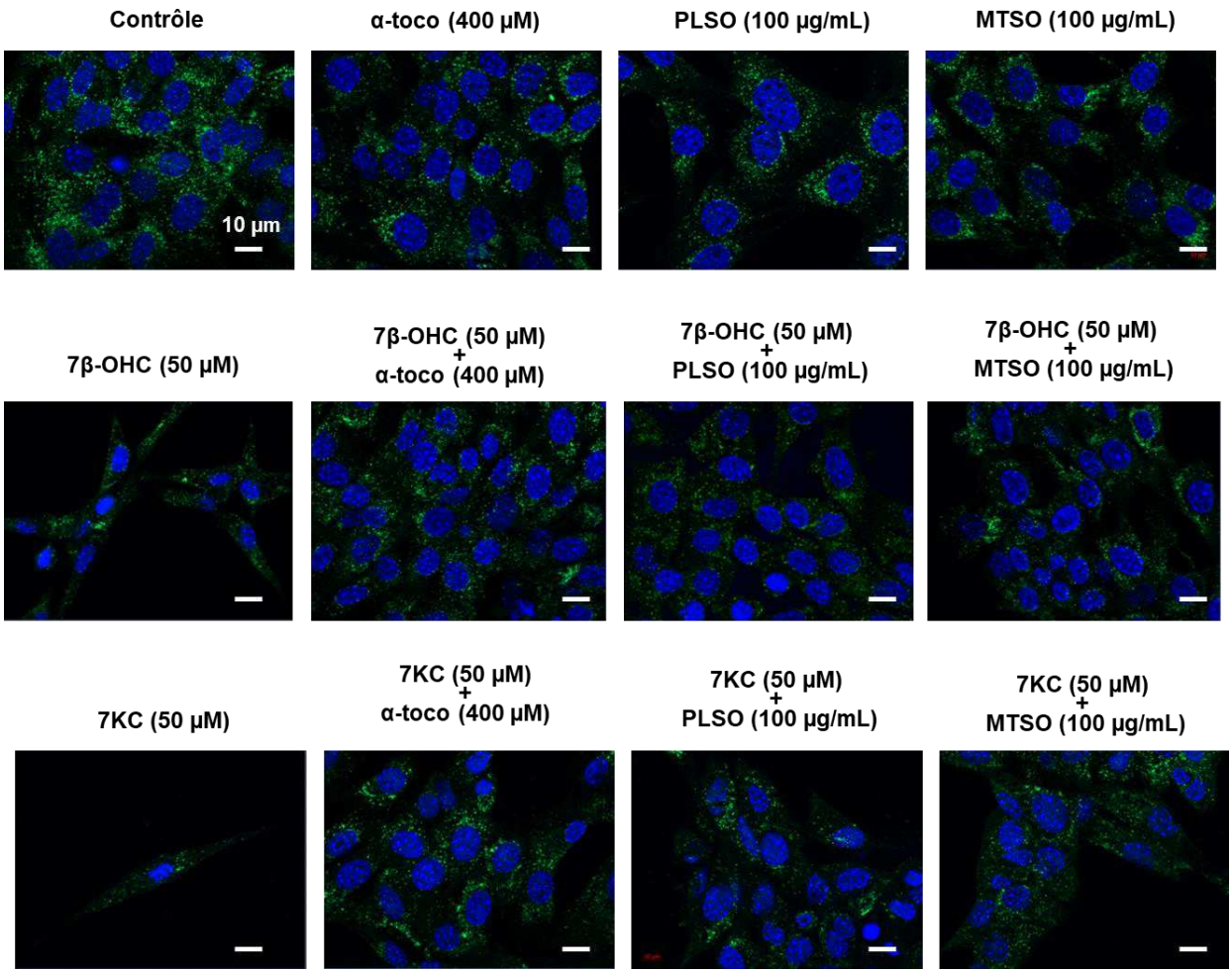


Figure 56 : Analyse par microscopie à fluorescence (Apotome) de la quantité et de la topographie de la protéine peroxysomale ABCD3.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM) et de 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et α-tocophérol (400 µM), et observées en microscopie à fluorescence par illumination structurée avec le module Apotome après immunomarquage en utilisant un anticorps polyclonal anti-ABCD3. Nous observons une diminution importante de la densité des peroxysomes et des agrégats de peroxysomes. Cette diminution est atténuée lorsque ces oxystérols sont associés à PLSO, MTSO et α-tocophérol. Une contre coloration des noyaux au Hoechst 33342 (1 µg/mL) a été réalisée.

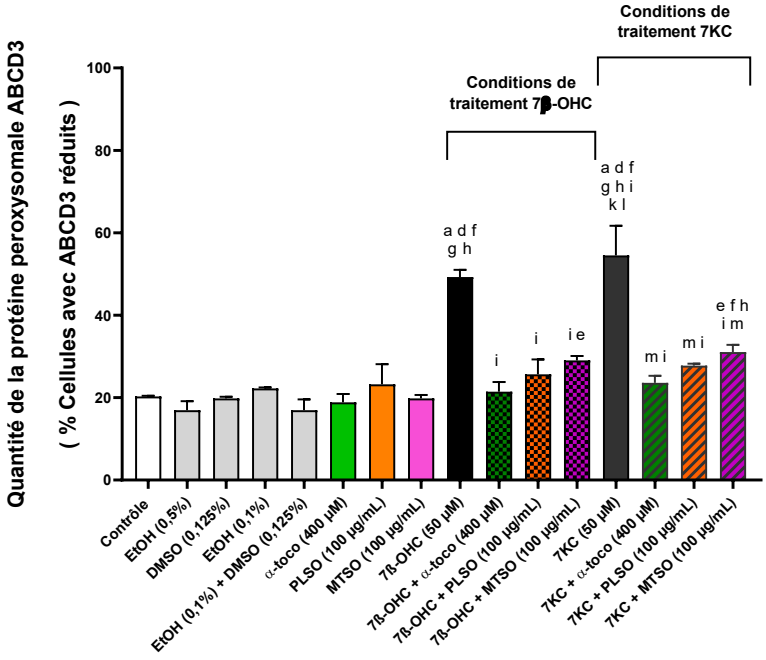


Figure 57 : Mesure de la quantité de la protéine peroxysomale ABCD3 en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL) ; l : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + MTSO (100 µg/mL) ; m : comparaison versus 7KC (50 µM) ; n : comparaison versus 7KC (50 µM)+ α-toco (400 µM) ; o : comparaison versus 7KC (50 µM)+ PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.5.2. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le niveau d'expression d'ARNm du gène Abcd3

La quantification de l'expression d'ARNm du gène *Abcd3* a été réalisée par RT-qPCR sur les cellules C2C12 cultivés pendant 12 h et traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tcophérol (400 µM). Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 58**.

En présence de PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), aucun changement du niveau d'expression de l'ARNm d'*Abcd3* n'a été observée par rapport aux cellules non traitées, et aux cellules traitées avec les véhicules (EtOH 0,5%, DMSO 0,125%). Cependant, en présence du 7β-OHC, le niveau d'expression de l'ARNm d'*Abcd3* a été significativement diminué. Le co-traitement du 7β-OHC avec le PLSO (100 µg/mL), le MTSO (100 µg/mL), ou l'α-tocophérol (400 µM) induit une augmentation significative du niveau d'expression d'*Abcd3*. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

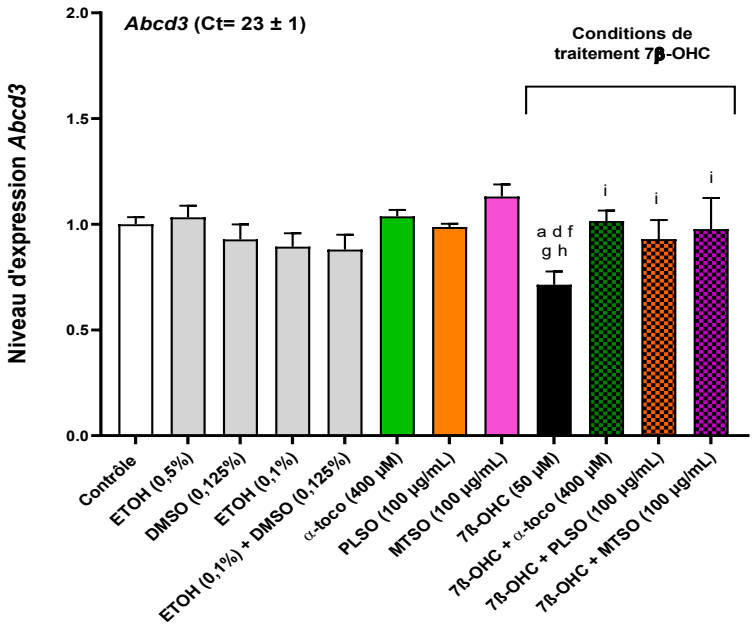


Figure 58 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol associé ou non aux huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et à l'α-tocophérol sur le niveau d'expression d'Abcd3.

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes,

indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM) ; k : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

3.5.3. Effet de MTSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol sur le niveau d'expression des peroxines

Afin de préciser l'impact du 7β-OHC sur la biogenèse des peroxysomes, l'expression des peroxines (quantité d'ARNm), notamment Pex5, Pex13 et Pex14, a été étudiés. Pex5 transporte les protéines nouvellement synthétisées du cytosol vers la matrice peroxysomale **(W. Wang & Subramani, 2017)**. Pex13 et Pex14 sont des composants clés du complexe d'amarrage peroxysomal localisé au niveau de la membrane peroxysomale et sont nécessaires à la formation des peroxysomes **(J.-Y. Wang et al., 2019)**.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) associées ou non au MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Ensuite, RT-qPCR a été réalisé pour étudier l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse peroxysomale, en particulier la *Pex5, la Pex13, et la Pex14*. Les résultats sont présentés dans la **Figure 59**.

Les résultats montrent une diminution significative de l'ARNm de *Pex5* dans les cellules traitées au 7β-OHC (50 µM) comparativement aux cellules non traitées, et au véhicule (EtOH 0,1%). En présence de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM), une augmentation d'expressionde Pex5 est révélée bien que non significative. En présence du 7β-OHC, une augmentation d'expression d'ARNm de *Pex13* et *Pex14* a été observée.

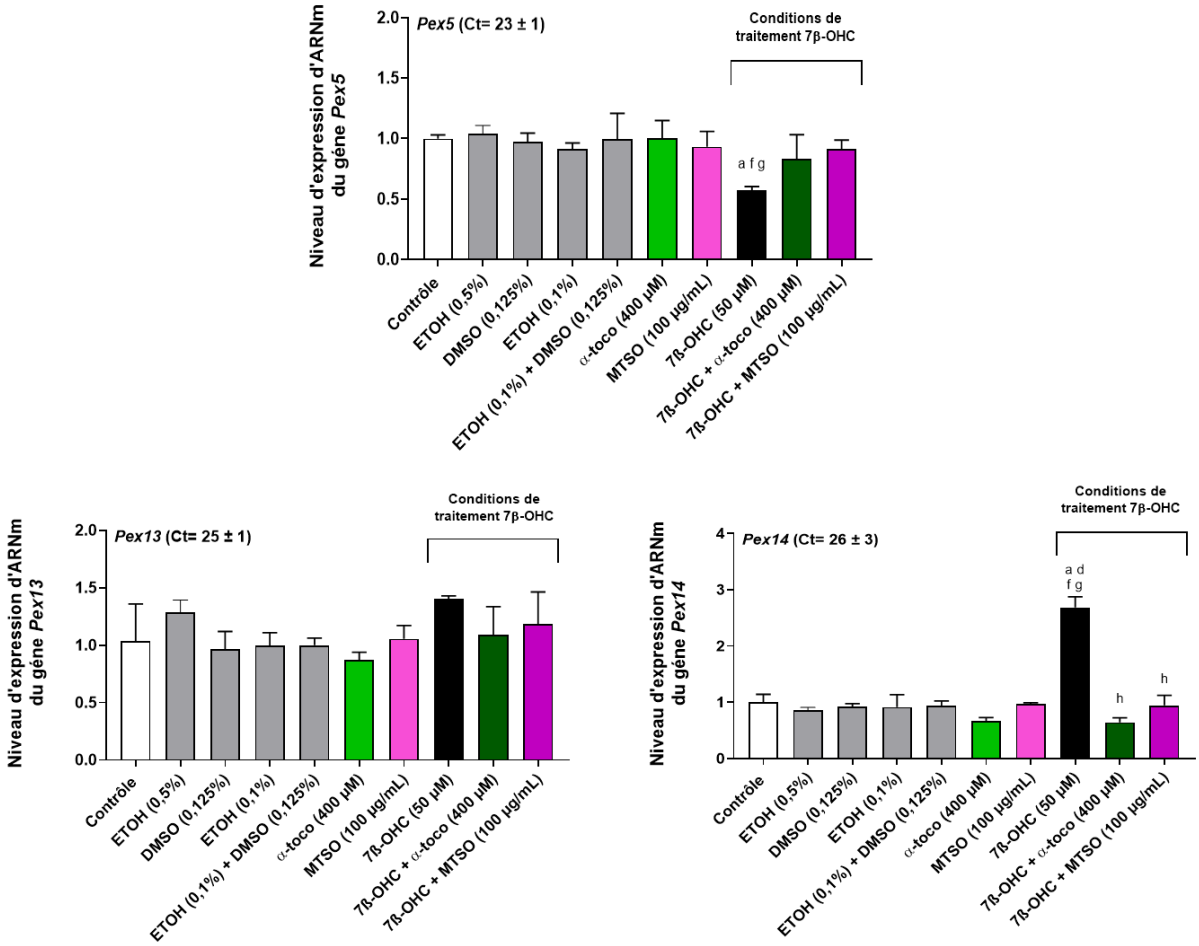


Figure 59 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol associé ou non au MTSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse peroxysomale (Pex5, Pex13, Pex14).

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus MTSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM).

3.5.4. Effet de MTSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol sur la quantité de protéine ABCD3 et d'enzymes impliquées dans la β-oxydation des acides gras à très long chaine (ACOX1, MFP2)

La β-oxydation peroxysomale permet la dégradation des acides gras à très longue chaîne (C ≥ 22). Elle fait appel aux oxydases centrales à savoir l'acyl-CoA oxydase-1 (ACOX1) et l'enzyme multifonctionnelle (MFP2). L'effet de MTSO associé ou non au 7β-OHC sur la quantité de protéine ABCD3 et d'enzymes peroxysomales (ACOX1, MFP2) a été quantifiée sur les cellules C2C12 par Western blot. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 60**.

Les résultats de l'analyse par Western blot des myoblastes C2C12 montrent une diminution significative de quantité de la protéine ABCD3 après traitement des cellules avec le 7β-OHC (50 µM), comparativement aux cellules non traitées, et au véhicule (EtOH 0,1%). En revanche, les cellules co-traitées avec le MTSO (100 µg/mL), et l'α-tocophérol (400 µM) montrent une augmentation significative de quantité de la protéine ABCD3 par rapport aux cellules traitées avec le 7β-OHC (50 µM) seul. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par RT-qPCR.

De même, des diminutions marquées de quantité de protéines ACOX1 (isoformes 75, 50 et 25 kDa) et MFP2 ont été observés suite au traitement avec du 7β-OHC (50 µM) comparativement aux cellules non traitées (contrôle), et au véhicule (EtOH 0,1%). Ces diminutions ont été réduites lorsque le 7β-OHC (50 µM) est associé au MTSO ou à l'α-tocophérol.

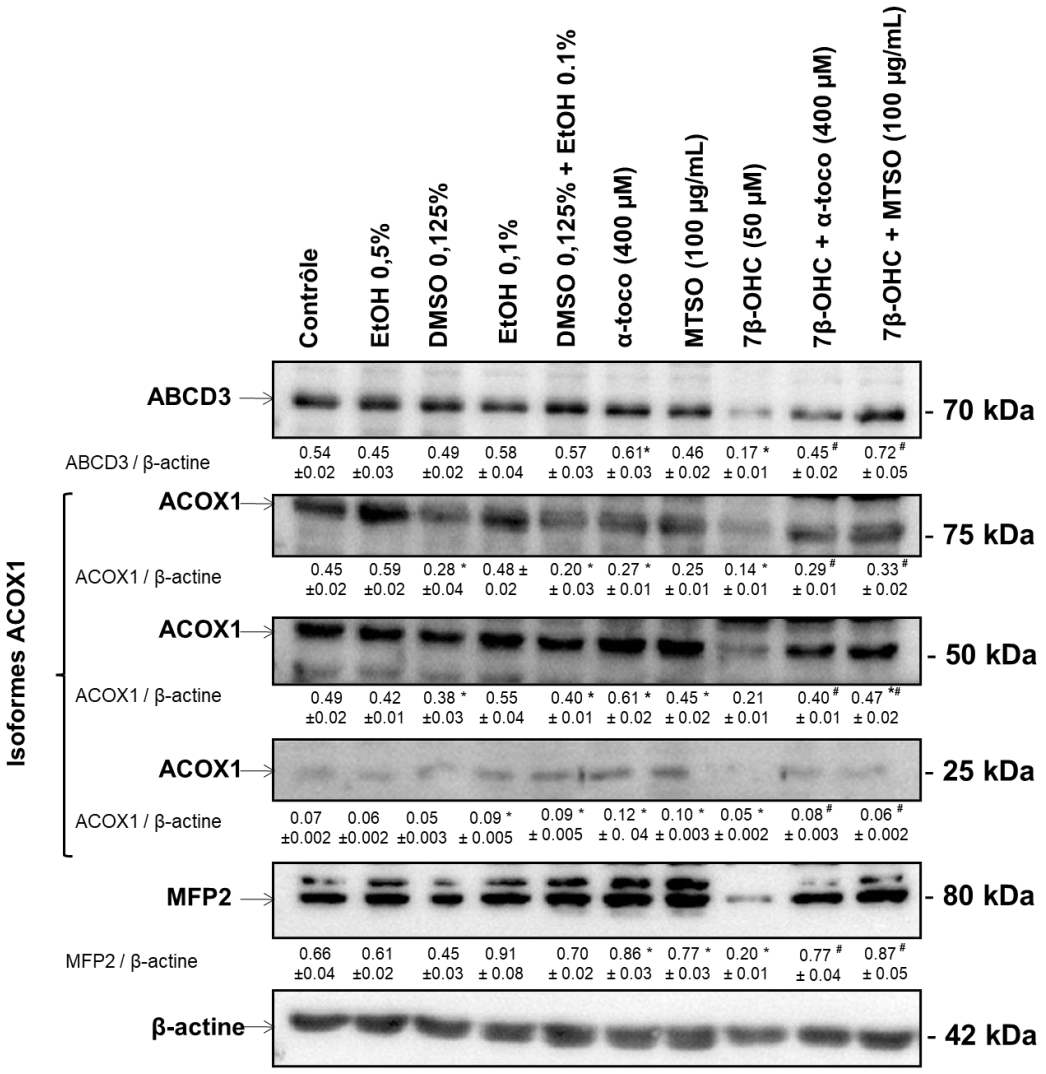


Figure 60 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol associé ou non au MTSO et à l'α-tocophérol sur la quantité de protéines peroxysomales (ABCD3, ACOX1, MFP2).

*Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM) associées ou non au MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Les protéines peroxysomales (ABCD3, ACOX1, MFP2) ainsi que la β-actine (utilisé comme une protéine de référence) ont été caractérisées par Western blot avec des anticorps appropriés. Les données sont présentées sous forme de sous forme de moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes et comparées par le test-t de student. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives sont indiquées par différents symboles : * comparaison entre MTSO, α-tocophérol, 7β-OHC, et (7β-OHC + MTSO) versus le véhicule correspondant ; # comparaison entre 7β-OHC, (7β-OHC + MTSO) et (7β-OHC + α-toco). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules.*

3.5.5. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le profil des acides gras à très long chaîne (AGTLC)

Comme le 7β-OHC induit une diminution de la quantité de protéines ACOX1 et MFP2 impliquées dans la β-oxydation peroxysomale, cet effet pourrait favoriser l'accumulation des acides gras à très long chaîne (AGTLC), qui peuvent contribuer à des dysfonctionnements cellulaires en induisant du stress oxydant et en activant la mort cellulaire **(Baarine, Ragot, et al., 2012)**. Par conséquent, le niveau intracellulaire d'AGTLC a été déterminé par CPG-MS après traitement des cellules C2C12 en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM) pendant 24 h. Les résultats exprimés en ng / million de cellules sont consignés dans le **Tableau 24.**

L'analyse des AGTLC a révélé une augmentation significative des taux de l'acide béhénique (C22:0), de l'acide lignocérique (C24:0), de l'acide nervonique (C24:1 n-9), de l'acide cérotique (C26:0), et de l'acide hexacosénoïque (C26:1 n-9), après traitement des cellules avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM), par rapport aux cellules non traitées, et au véhicule (EtOH 0,1%). Cette augmentation a été normalisée lorsque les cellules C2C12 traitées au 7β-OHC ont été simultanément incubés avec du PLSO (100 µg/mL), du MTSO (100 µg/mL) ou de l'α-tocophérol (400 µM). Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle) et les différents véhicules.

L'activité accrue d'ELOVL1 (Elongation of Very-Long-Chain Fatty Acid 1) pourrait également être impliquée dans le niveau accru d'AGTLC. Actuellement, sept enzymes appelées ELOVL 1–7, localisées dans le réticulum endoplasmique, ont été identifiées. ELOVL1 est suggéré pour contrôler la synthèse des AGTLC jusqu'à C26:0. Il s'agit de l'élongase la plus puissante pour C24:0 et C26:0, alors que, selon le type cellulaire considéré, une activité d'élongase similaire a été rapportée avec ELOVL3 et ELOVL6 **((Jakobsson et al., 2006) (Kihara, 2012))**. Nos résultats montrent une augmentation de l'indice d'activité de l'élongase (qui pourrait correspondre à l'activité ELOVL1, 3 et 6 ; rapport [C24:0 / C22:0] et rapport [C26:0 / C22:0] sous traitement avec le 7β-OHC; ces différents indices d'activité élongase ont été fortement atténués lorsque le 7β-OHC et le 7KC sont associés au PLSO, au MTSO ou à l'α-tocophérol.

Tableau 24 : Mesure des acides gras à très long chaîne en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

	C22:0	C22:1 (n-9)	C24:0	C24:1 (n-9)	C26:0	C26:1 (n-9)	C24:0 / C22:0	C26:0 / C22:0
Contrôle	11,57 ± 0,02	11,07 ± 0,02	15,71 ± 0,09	8,51 ± 0,07	2,06 ± 0,03	2,79 ± 0,00	1,36 ± 0,01	0,18 ± 0,00
EtOH 0,5%	11,12 ± 0,12	10,65 ± 0,15	16,05 ± 0,09	8,84 ± 0,05	2,06 ± 0,04	2,74 ± 0,01	1,44 ± 0,01	0,19 ± 0,00
DMSO 0,125%	12,04 ± 0,02	11,41 ± 0,09	15,88 ± 0,04	8,61 ± 0,00	2,21 ± 0,01	2,84 ± 0,00	1,32 ± 0,01	0,18 ± 0,00
EtOH 0,1%	11,39 ± 0,12	10,95 ±0,07	15,30 ± 0,16	8,51 ± 0,05	1,99 ± 0,01	2,75 ± 0,02	1,34 ± 0,03	0,18 ± 0,00
EtOH 0,1% + DMSO 0,125%	11,54 ± 0,06	10,55 ± 0,15	15,70 ± 0,02	8,50 ± 0,03	2,14 ± 0,07	2,87 ± 0,01	1,36 ± 0,01	0,19 ± 0,01
α-toco (400 µM)	9,08 ± 0,03 ab	7,64 ± 0,26 ab	13,20 ± 0,01 ab	6,42 ± 0,07 ab	1,81 ± 0,01	2,02 ± 0,02 ab	1,45 ± 0,00	0,20 ± 0,00
PLSO (100 µg/mL)	8,60 ± 0,15 ac	7,28 ± 0,04 ac	10,85 ± 0,07 acf	6,68 ± 0,07 ac	1,28 ± 0,03 acf	2,14 ± 0,01 ac	1,26 ± 0,01 f	0,15 ± 0,00 f
MTSO (100 µg/mL)	10,06 ± 0,25 acfg	7,53 ± 0,17 ac	10,91 ± 0,18 acfg	7,85 ± 0,10 acfg	1,86 ± 0,08	2,36 ± 0,05 ac	1,09 ± 0,05 abfg	0,19 ± 0,00
7β-OHC (50 µM)	13,49 ± 0,09 adfgh	8,89 ± 0,06 adfgh	23,61 ± 0,12 adfgh	11,39 ± 0,12 adfgh	5,57 ± 0,01 adfh	4,72 ± 0,02 adfgh	1,75 ± 0,00 adfgh	0,41 ± 0,00 adfgh
7β-OHC + α-toco (400 µM)	11,24 ± 0,16 ghi	9,64 ± 0,26 abfgh	17,00 ± 0,18 abfghi	10,96 ± 0,09 abfghi	4,20 ± 0,01 abfhi	3,60 ± 0,01 abfghi	1,51 ± 0,01 aghi	0,37 ± 0,01 abfghi
7β-OHC + PLSO (100 µg/mL)	9,24 ± 0,06 aefghij	8,79 ± 0,31 aefghj	14,38 ± 0,29 aefghij	7,32 ± 0,16 aefghij	3,77 ± 0,02 aefhij	2,70 ± 0,04 fghij	1,56 ± 0,02 aeghi	0,41 ± 0,00 aefgh
7β-OHC + MTSO (100 µg/mL)	11,87 ± 0,19 fghijk	10,83 ± 0,27 fghijk	15,42 ± 0,07 fghijk	9,61 ± 0,04 aefghijk	1,81 ± 0,01 gijk	3,07 ± 0,04 aefghijk	1,30 ± 0,03 fhijk	0,15 ± 0,00 fijk
7KC (50 µM)	11,70 ± 0,10 fghik	8,79 ± 0,31 adfghjl	23,05 ± 0,24 adfghjkl	16,36 ± 0,12 adfghijkl	11,38 ± 0,18 adfghijkl	11,02 ± 0,03 adfghijkl	1,97 ± 0,04 adfghijkl	0,97 ± 0,01 adfghijkl
7KC + α-toco (400 µM)	13,81 ± 0,09 abfghjklm	11,74 ± 0,17 fghijklm	19,28 ± 0,44 abfghijklm	15,70 ± 0,11 abfghijklm	8,19 ± 0,12 abfghijklm	7,06 ± 0,06 abfghijklm	1,40 ± 0,04 ghijkm	0,59 ± 0,01 abfghijklm
7KC+ PLSO (100 µg/mL)	10,79 ± 0,03 aeghiklmn	10,70 ± 0,06 fghijkmn	21,23 ± 0,26 aefghijklmn	15,92 ± 0,05 aefghijklm	8,62 ± 0,22 aefghijklm	8,69 ± 0,05 aefghijklmn	1,97 ± 0,03 aefghijkln	0,80 ± 0,02 aefghijklmn
7KC+ MTSO (100 µg/mL)	12,60 ± 0,09 aefghijklmno	10,94 ± 0,07 fghijkm	20,47 ± 0,29 aefghijklmn	15,78 ± 0,19 aefghijklm	8,47 ± 0,14 aefghijklm	7,97 ± 0,01 aefghijklmno	1,63 ± 0,03 aefghijlmno	0,67 ± 0,02 aefghijklmno

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey.

3.6. Visualisation en microscopie à transmission électronique des modifications ultrastructurales des myoblastes murins C2C12

Les modifications morphologiques des myoblastes C2C12 cultivées pendant 12 h et traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC et du 7KC associées ou non au PLSO, MTSO, et à l'α-tocophérol ont été évalués par microscopie électronique à transmission (MET). Les images obtenues sont présentées dans la **Figure 61**. Les cellules non traitées, et les cellules traitées au PLSO, au MTSO, et à l'α-tocophérol ont une morphologie cellulaire fusiforme avec un noyau rond central contenant quelques nucléoles, de petites vacuoles cytoplasmiques vides, et des mitochondries et des peroxysomes morphologiquement normaux. En revanche, des modifications majeures de l'aspect des myoblastes C2C12 ont été observés en présence du 7β-OHC. Ainsi, des cellules rondes avec des noyaux irréguliers, plusieurs vacuoles cytoplasmiques contenant de nombreux débris cellulaires, et des mitochondries et des peroxysomes de forme et de taille irrégulières ont été observées. Ces modifications ont été atténuées par le co-traitement au PLSO, au MTSO, et à l'α-tocophérol. Aucune différence morphologique n'a été observée entre les cellules non traitées et les différents véhicules.

De plus, l'observation en MET des myoblastes C2C12 nous a permis de mettre en évidence les organites cellulaires essentiels, à savoir les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique. Les images sont présentées dans la **Figure 62**. Les cellules non traitées, les cellules traitées au PLSO, au MTSO, et à l'α-tocophérol présentent des mitochondries morphologiquement normales avec de nombreuses crêtes, des peroxysomes ronds de taille homogène (de l'ordre de 0,4 ± 0,1 μm) et un réticulum endoplasmique riche en ribosomes et facilement identifiable. Cependant, des changements majeurs dans la taille et la forme de ces organites ont été observés lorsque les cellules C2C12 ont été traitées avec du 7β-OHC (50 μM). Ainsi, plusieurs mitochondries présentant des tailles et des formes anormales ont été observées : taille plus importante, densité matricielle réduite et crêtes mitochondriales déstructurées. De plus, plusieurs peroxysomes ont été détectés dans de nombreuses vacuoles cytoplasmiques, évoquant un processus de pexophagie. Il est à noter que ces modifications de la topographie et/ou de la morphologie mitochondriale et peroxysomale ont été atténuées lorsque le 7β-OHC a été associé au PLSO, au MTSO, ou à l'α-tocophérol. En effet, les mitochondries et les peroxysomes ont retrouvé leurs formes et des peroxysomes présents dans les vacuoles sont rarement détectés. Globalement, nos observations par MET confirment que le 7β-OHC induit plusieurs modifications mitochondriales et peroxysomales, et que le PLSO, le MTSO, et l'α-tocophérol ont de puissants effets cytoprotecteurs sur ces organites.

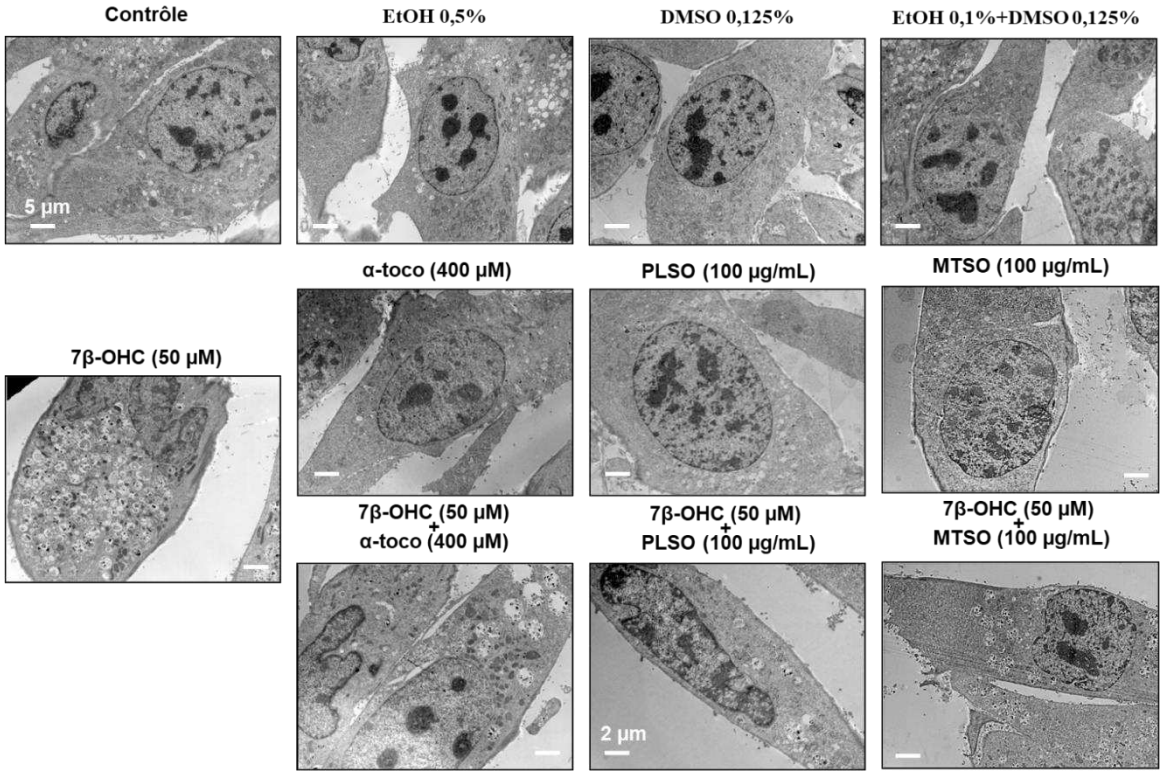


Figure 61 : Analyse par microscopie électronique à transmission de la morphologie des myoblastes C2C12.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), au MTSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM), et observées en microscopie électronique à transmission (MET). Dans les cellules non traitées (contrôle), les cellules traitées à l'α-tocophérol (400 µM), et les cellules traitées au PLSO et MTSO (100 µg/mL), les cellules ont une forme fusiforme, avec de gros noyaux ronds contenant plusieurs nucléoles ; elles présentent plusieurs petites vacuoles vides et des mitochondries et des peroxysomes morphologiquement normaux. Dans les cellules traitées par le 7β-OHC (50 µM), les cellules ont une morphologie anormale : elles ont une forme ronde, des noyaux irréguliers, et plusieurs vacuoles cytoplasmiques contenant des débris cellulaires, ainsi que des mitochondries et des peroxysomes altérés. Dans les cellules traitées par (7β-OHC + α-tocophérol, 7β-OHC+ PLSO et 7β-OHC+ MTSO), nous observons principalement des cellules morphologiquement normales ; elles sont fusiformes, contiennent des vacuoles vides et possèdent principalement des mitochondries et des peroxysomes ressemblant à ceux présents dans les cellules contrôle. Aucune différence n'a été observée entre les cellules contrôle et les différents véhicules (EtOH (0,5 %), DMSO (0,125 %), EtOH (0,1 %) et EtOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)).

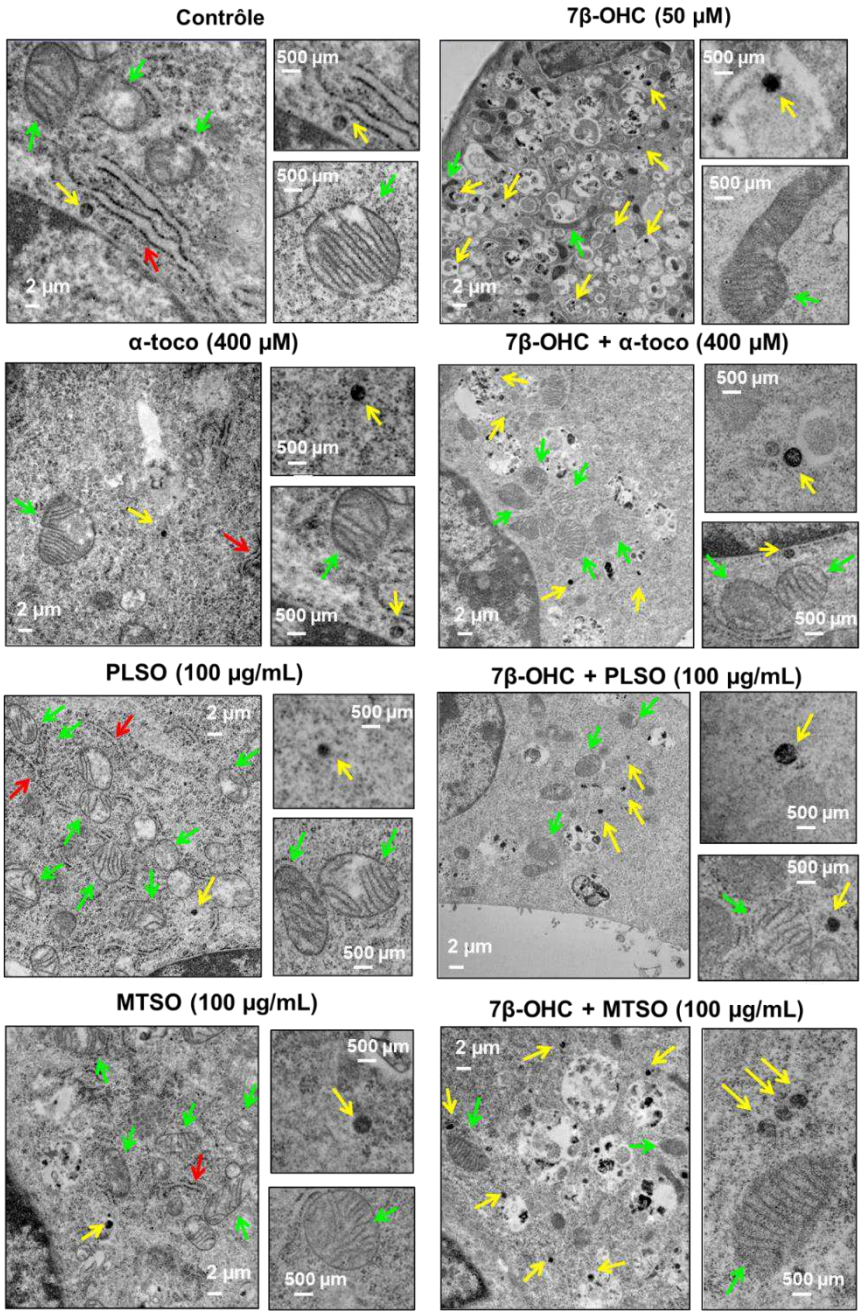


Figure 62 : Visualisation par microscopie électronique à transmission des mitochondries, des peroxysomes et du réticulum endoplasmique dans les myoblastes C2C12 .

Les cellules C2C12 ont été incubées pendant 24 h avec ou sans 7β-OHC (50 µM) en présence ou en absence de PLSO (100 µg/mL), de MTSO (100 µg/mL) ou d'α-tocophérol (400 µM). Dans les cellules non traitées (contrôle), les cellules traitées à l'α-tocophérol (400 mM) et les cellules traitées au PLSO ou au MTSO (100 µg/mL), des mitochondries avec des crêtes claires ainsi que des peroxysomes ronds de taille homogène ont été détectés. Dans les cellules traitées par le 7β-OHC (50 µM), des mitochondries irrégulières avec une taille plus importante, une densité matricielle réduite et des crêtes déstructurées, ainsi que des peroxysomes de taille et de forme anormales ont été visualisés. Dans les cellules traitées au (7β-OHC + α-tocophérol), au (7β-OHC+ PLSO) et au (7β-OHC+ MTSO), nous avons observé des mitochondries et des peroxysomes morphologiquement similaires à ceux présents dans les cellules contrôle. Les mitochondries, les peroxysomes, et le réticulum endoplasmique sont respectivement indiqués par des flèches vertes, jaunes, et rouges.

3.7. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol des cellules C2C12 a été évalué via la détermination des taux de cholestérol, de ses précurseurs (lathostérol, desmostérol, lanostérol) et de ses dérivés oxydés (7α-OHC, 7β-OHC, 7KC, 25-OHC, 27-OHC) par CPG-MS. Les résultats exprimés en ng/million de cellules sont présentés dans le **Tableau 25**.

Les résultats montrent une diminution significative du taux du cholestérol dans les cellules traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) comparativement aux cellules non-traitées et au véhicule (EtOH 0,1%). Cette diminution est significativement atténuée lorsque le 7β-OHC (50 µM) est associé au MTSO (100 µg/mL), et à l''α-tocophérol (400 µM), et lorsque le 7KC (50 µM) est associé au PLSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM).

Par ailleurs, une nette diminution des taux des précurseurs du cholestérol (lathostérol, desmostérol, lanostérol) a été observée en présence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM). Cette diminution est plus marquée en présence du 7KC qu'en présence du 7β-OHC. La réduction des taux des précurseurs du cholestérol est augmentée lorsque les cellules C2C12 sont traitées par du 7β-OHC associé au PLSO (100 µg/mL), et au MTSO. En revanche, lorsque le 7β-OHC (50 µM) est associé à l'α-tocophérol (400 µM), la diminution des précurseurs du cholestérol (lathostérol, desmostérol, lanostérol) est atténuée. Aucune différence significative n'a été révélée entre les cellules non traitées (contrôle), et les différents véhicules.

Par ailleurs, les résultats de dosage des oxystérols montrent respectivement des taux élevés en 7β-OHC et en 7KC dans les cellules traitées avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) comparativement aux cellules non traitées et au véhicule (EtOH 0,1%), ce qui démontrent que ces oxystérols s'accumulent bien dans les cellules. L'accumulation des oxystérols dans les cellules est très fortement réduite en présence des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

Tableau 25 : Mesure des taux de cholestérol, de ses précurseurs et de ses dérivés oxydés en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 et évaluation des effets cytoprotecteurs des huiles Méditerranéennes (PLSO, MTSO) et d'α-tocophérol.

	Cholestérol	Précurseurs du cholestérol			Oxystérols				
		Lathostérol	Desmostérol	Lanostérol	7α-OHC	7β-OHC	7KC	25-OHC	27-OHC
Contrôle	4,43 ± 0,10	31,92 ± 0,39	19,63 ± 0,20	6,19 ± 0,09	0,42 ± 0,01	1,24 ± 0,02	10,20 ± 0,11	0,67 ± 0,01	0,48 ± 0,02
EtOH 0,5%	4,20 ± 0,02	32,12 ± 0,11	19,03 ± 0,46	6,68 ± 0,04	0,46 ± 0,00	1,73 ± 0,03	13,03 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,45 ± 0,02
DMSO 0,125%	4,19 ± 0,07	32,10 ± 1,19	18,53 ± 0,16	6,47 ± 0,06	0,42 ± 0,01	2,28 ± 0,03	17,14 ± 0,48	0,63 ± 0,03	0,48 ± 0,01
EtOH 0,1%	4,26 ± 0,04	31,81 ± 0,42	19,23 ± 0,21	6,30 ± 0,05	0,42 ± 0,01	1,45 ± 0,02	11,12 ± 0,26	0,61 ± 0,02	0,34 ± 0,01
EtOH 0,1%+ DMSO 0,125%	4,27 ± 0,05	31,82 ± 0,22	19,02 ± 0,36	6,61 ± 0,01	0,44 ± 0,01	1,42 ± 0,01	10,48 ± 0,54	0,63 ± 0,01	0,47 ± 0,02
α-toco (400 µM)	5,06 ± 0,10 ab	112,99 ± 0,72 ab	29,82 ± 0,34 ab	12,27 ± 0,19 ab	0,26 ± 0,00	0,60 ± 0,01	3,94 ± 0,09	0,56 ± 0,00 a	0,44 ± 0,01
PLSO (100 µg/mL)	3,24 ± 0,13 acf	57,61 ± 2,29 acf	24,04 ± 0,18 acf	9,45 ± 0,20 acf	0,36 ± 0,02	1,36 ± 0,03	9,82 ± 0,35	0,80 ± 0,02 acf	1,09 ± 0,01 acf
MTSO (100 µg/mL)	4,59 ± 0,10 g	88,40 ± 0,42 acfg	30,14 ± 1,09 acg	15,46 ± 0,14 acfg	0,76 ± 0,00 acfg	2,70 ± 0,04	25,97 ± 0,85	1,00 ± 0,03 acfg	0,79 ± 0,01 acfg
7β-OHC (50 µM)	3,44 ± 0,07 adfh	28,62 ± 2,52 fgh	4,15 ± 0,10 adfgh	3,43 ± 0,13 adfgh	7,53 ± 0,05 adfgh	3972,84 ± 84,59 adfgh	219,95 ± 0,25	0,27 ± 0,00 adfgh	0,10 ± 0,01 adfgh
7β-OHC + α-toco (400 µM)	4,36 ± 0,13 fgi	37,27 ± 0,45 fghi	5,16 ± 0,02 abfgh	4,47 ± 0,01 abfghi	3,80 ± 0,04 abfghi	1699,09 ± 6,90 abfgh	153,90 ± 5,21	0,71 ± 0,04 fhi	0,18 ± 0,00 abfghi
7β-OHC+PLSO (100 µg/mL)	2,24 ± 0,07 aefghij	21,78 ± 0,12 aefghij	2,73 ± 0,23 aefghj	3,29 ± 0,18 aefghj	3,46 ± 0,07 aefghij	1880,13 ± 68,91 aefghi	100,09 ± 7,07	0,40 ± 0,01 aefghij	0,10 ± 0,00 aefghj
7β-OHC+MTSO (100 µg/mL)	4,26 ± 0,24 fik	27,82 ± 0,74 fghjk	4,88 ± 0,15 aefghk	5,88 ± 0,08 efghijk	7,52 ± 0,11 aef ghjk	3196,43 ± 96,05 aefghijk	200,40 ± 0,63	0,25 ± 0,00 aefghjk	0,11 ± 0,01 aefghj
7KC (50 µM)	3,11 ± 0,03 adfhjkl	13,28 ± 0,08 adfghijkl	3,72 ± 0,07 adfg	3,34 ± 0,09 adfghjl	0,63 ± 0,01 fgijkl	64,48 ± 1,10 ijkl	3546,18 ± 80,06 adfghijkl	0,24 ± 0,00 adfghjk	0,09 ± 0,01 adfghj
7KC + α-toco (400 µM)	5,62 ± 0,08 abfghijklm	20,09 ± 0,70 abfghijlm	3,20 ± 0,08 abfghj	4,14 ± 0,04 abfghiklm	0,44 ± 0,01 fhijkl	20,08 ± 0,74 ijkl	1336,47 ± 27,77 abfgijklm	0,48 ± 0,00 abghijlm	0,20 ± 0,00 abfghiklm
7KC+ PLSO (100 µg/mL)	4,66 ± 0,01 gikmn	20,05 ± 0,47 aefghijlm	5,50 ± 0,03 aefghkn	4,49 ± 0,10 aefghiklm	0,55 ± 0,02 fijkl	21,41 ± 0,42 ijkl	2369,69 ± 41,13 aefghijklmn	0,31 ± 0,01 aefghjn	0,16 ± 0,01 aefghm
7KC+ MTSO (100 µg/mL)	2,60 ± 0,06 aefghijlno	20,34 ± 0,75 aefghijlm	4,79 ± 0,03 aefghk	4,69 ± 0,24 aefghiklm	0,66 ± 0,02 fgijkl	26,31 ± 0,98 ijkl	2968,89 ± 35,99 aefghijklmno	0,27 ± 0,01 aefghjkn	0,18 ± 0,00 aefghikm

Les concentrations sont exprimées en ng / million de cellules. Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey.

3.8. Détermination des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO sur la mort cellulaire induite par le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol

3.8.1. Effet de PLSO et de MTSO associés ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur le pourcentage de cellules en Sub-G1

La répartition des cellules C2C12 dans les différentes phases du cycle cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux après coloration à l'IP en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), MTSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Notre étude s'est focalisée sur l'analyse du pic Sub-G1 du cycle cellulaire, localisé juste avant le pic G0/G1. Ce pic contient des cellules caractérisées par une condensation et/ou une fragmentation nucléaire (caractéristiques des cellules apoptotiques) associée à une fragmentation internucléosomale de l'ADN. Cette analyse est souvent utilisée pour quantifier la proportion de cellules en apoptose. Les résultats obtenus sont présentés par la **Figure 63**.

Suite au traitement des myoblastes C2C12 avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM), une très faible augmentation du pourcentage de cellules en sub-G1 (7β-OHC: 4,63 % et 7KC: 3,13 %), a été observée comparativement aux cellules non traitées (contrôle; 1,50 %). Le très faible pourcentage de cellules apoptotiques induit par le 7β-OHC et le 7KC a été atténué par le PLSO, le MTSO, et l'α-tocophérol. Par ailleurs, le 7β-OHC et le 7KC induisent des modifications mineures de la répartition des cellules C2C12 dans les différentes phases du cycle cellulaire. Ces modifications sont en faveur d'une diminution du pourcentage des cellules en phase S (cellules en prolifération).

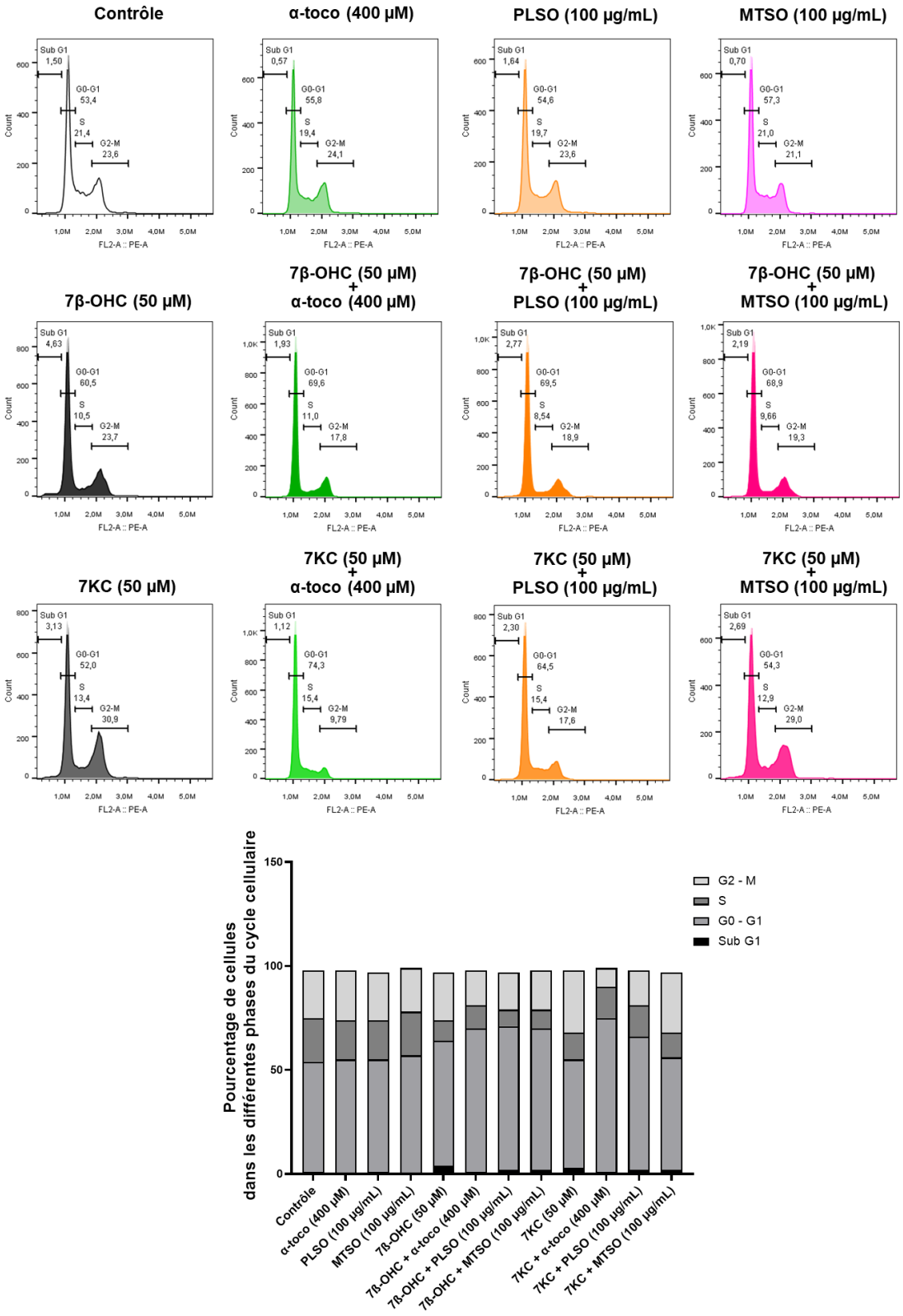


Figure 63 : Evaluation de l'effet du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associé ou non au PLSO, au MTSO, ou à l'α-tocophérol sur la répartition des cellules C2C12 dans les différentes phases du cycle cellulaire.

3.8.2. Effet de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur l'apoptose et l'autophagie

Le Western blot a été utilisé pour étudier deux types de mort cellulaire : l'apoptose et l'autophagie. Les analyses des protéines apoptotiques (Caspase-3 et PARP), et des protéines autophagiques (LC3-II et LC3-I) ont été réalisées pour définir le type de mort cellulaire induit par le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol sur les myoblastes C2C12 cultivés pendant 12 h et traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), ou à l'α-tocophérol (400 µM). Les résultats sont présentés dans la **Figure 64**.

Les résultats des Western blots montrent l'absence d'apoptose des cellules C2C12 traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) : absence de caspase-3 clivée et de PARP clivée. En outre, aucun effet pro-apoptotique de PLSO et d'α-tocophérol n'a été observé. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par la coloration de Giemsa qui n'a pas montré de cellules avec des noyaux condensés et / ou fragmentés, caractéristiques des cellules apoptotiques, lorsque les cellules C2C12 sont traitées par du 7β-OHC ou du 7KC (**Figure 65 A)**. Les résultats de la coloration Hoechst 33342 sont identiques à ceux obtenus par la coloration de Giemsa.

Lorsque les cellules C2C12 sont traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM), une augmentation du rapport LC3-II / LC3-I, qui constitue un critère autophagique, a été révélée comparativement au véhicule (EtOH 0,1%). Cette augmentation est fortement atténuée en présence de PLSO (100 µg/mL), et d'α-tocophérol (400 µM). Ainsi, le PLSO et l'α-tocophérol atténuent l'autophagie induite par le 7β-OHC et le 7KC. En accord avec les résultats des Western blots, les observations par 'Apotome', après coloration avec le réactif de détection vert (Kit Abcam ; réf : ab139484), ont révélés la présence de plusieurs vacuoles de grandes tailles considérées comme des vacuoles autophagiques dans presque toutes les cellules traitées avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) alors que ces vacuoles ne sont pas présentes dans le contrôle **(Figure 65 B)**.

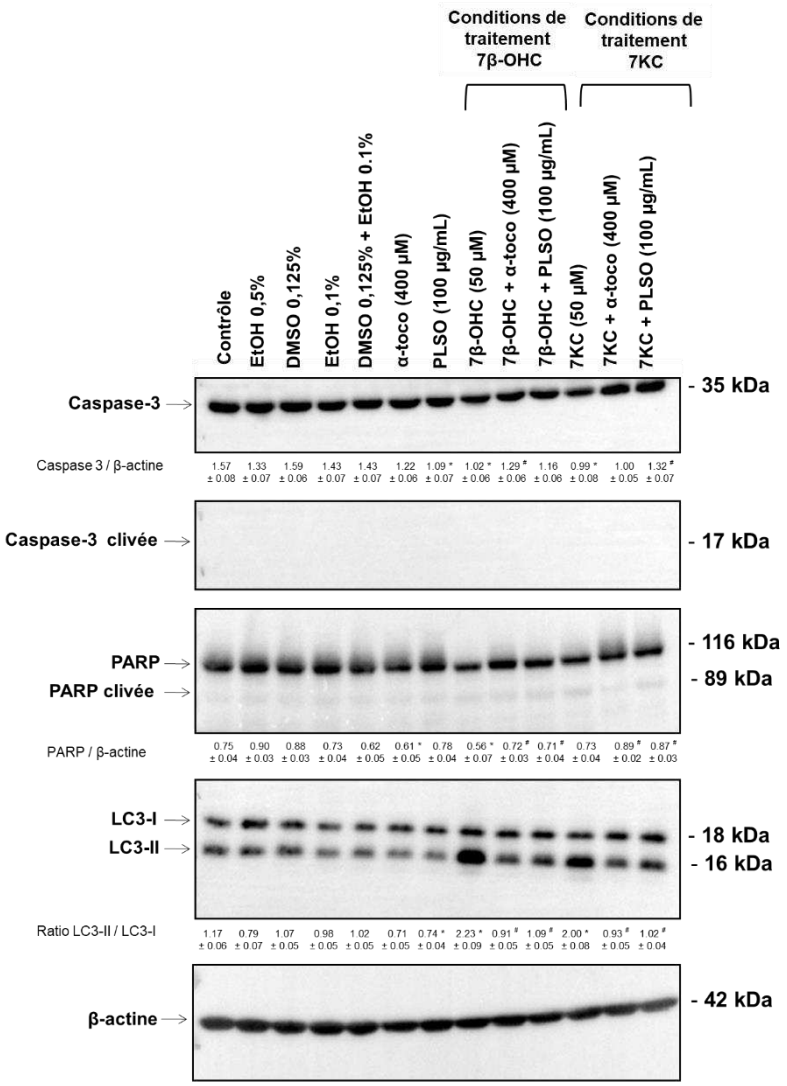


Figure 64 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur la quantité de protéines apoptotiques (Caspase-3 et PARP), et de protéines autophagiques (LC3-II et LC3-I).

*Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), et à l'α-tocophérol (400 µM). Les protéines apoptotiques (Caspase-3 et PARP), et des protéines autophagiques (LC3-II et LC3-I) ainsi que la β-actine (utilisé comme une protéine de référence) ont été caractérisées par Western blot avec des anticorps appropriés. Les données sont présentées sous forme de sous forme de moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes et comparées par le test-t de student. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives sont indiquées par différents symboles : * comparaison entre PLSO, α-tocophérol, 7β-OHC, et (7β-OHC + PLSO) versus le véhicule correspondant ; # comparaison entre 7β-OHC, (7β-OHC + PLSO) et (7β-OHC + α-toco).*

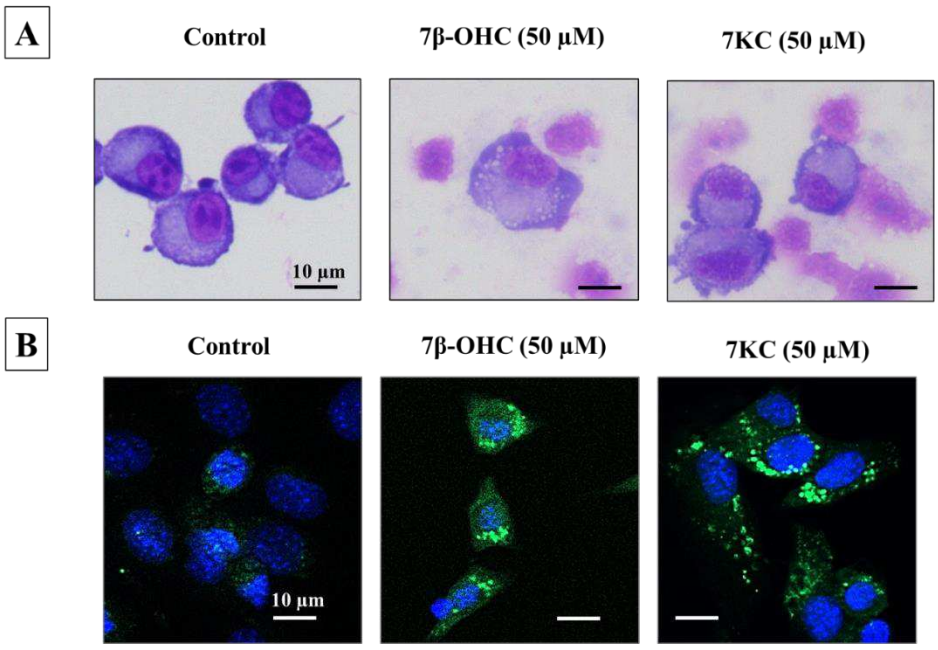


Figure 65 : Caractérisation de la mort cellulaire induite par le 7β-hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol.

A) coloration au Giemsa, aucune cellule à noyaux condensés et / ou fragmentés caractéristiques des cellules apoptotiques n'est observée ; **B)** coloration avec un fluorochrome vert s'accumulant dans les vacuoles d'autophagie (Kit Abcam ; réf : ab139484) et contre coloration au Hoechst 33342 (1 µg/mL) ; des vacuoles de grandes tailles pratiquement absentes dans le cytoplasme des cellules contrôle sont présentes dans les cellules traitées par les oxystérols.

D'autres marqueurs de l'autophagie ont été étudiés comme Atg13 et P62. Atg13 semble intervenir précocement au niveau de l'initiation de l'autophagie en agissant sur la protéine ULK (Unc-51-like kinase). Après 24 h de traitement, nous n'avons pas observé de différence de quantité de protéine Atg13. De même, nous n'avons pas observé de différence de quantités de protéine P62 **(Figure 66)**, qui dans les phases précoces de l'autophagie permet de fixer la phosphatidyléthanolamine à LC3-I pour donner LC3-II et contribuer à la formation de l'autophagosome **(Popelka & Klionsky, 2017)**. Ces résultats suggèrent qu'à 24 h, l'autophagie observée est à un stade tardif (P62 non différent entre contrôle et traités; rapport LC-3II/LC3-I augmenté dans les cellules traitées).

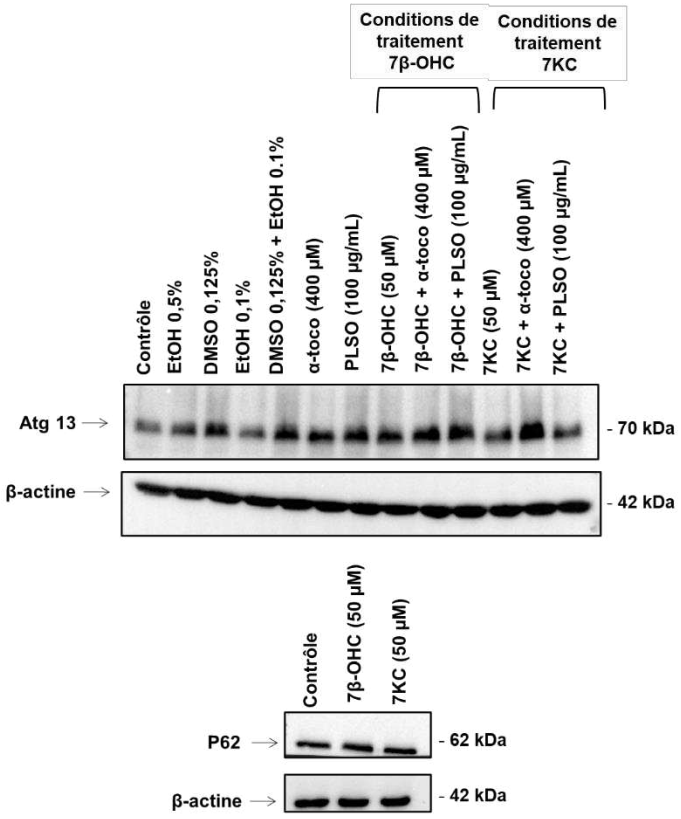


Figure 66 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol sur la quantité de protéines autophagiques : Atg 13 et P62.

De plus, le test Annexine V - Iodure de propidium (AV-IP) permet de distinguer 4 cadrans dans le cytogramme biparamétrique (abscisse : Annexine V, ordonnée IP) : Q1 cellules viables (cadran en bas à gauche (AV-/IP-); Q2 apoptose primaire (cadran en bas à droite AV+/IP-) et Q3 apoptose secondaire ou nécrose primaire (ou autres types de mort cellulaire) (cadran en haut à droite AV+/IP+) **(Figure 67)**. Le cadran en haut à gauche Q4 (AV-/IP+) correspond à des cellules très dégradées avec une membrane plasmique très altérée. Dans notre cas, les cellules C2C12 non traitées (contrôle) et traitées par le 7β-OHC ont été analysées par cytométrie en flux spectrale. Avec le contrôle, des cellules ne sont observées qu'en Q1 (cellules vivantes); avec le 7β-OHC des cellules n'ont été observées qu'en Q1 en Q3, mais pas en Q2 ce qui est en faveur d'une induction de mort non-apoptotique. Par ailleurs, lorsque le 7β-OHC est associé avec l'α-tocophérol le pourcentage de cellules en Q3 est diminuée montant que l'α-tocophérol atténue la mort induite par le 7β-OHC.

Les résultats montrent que la cytométrie spectrale, de plus en plus utilisée pour étudier simultanément plusieurs marqueurs sur une même cellule dans des études biologiques complexes, est une excellente alternative à la cytométrie conventionnelle pour aboder la caractérisation de la mort cellulaire en utilisant entre autre l'analyse biparamétrique Annexine V-Iodure de propidium.

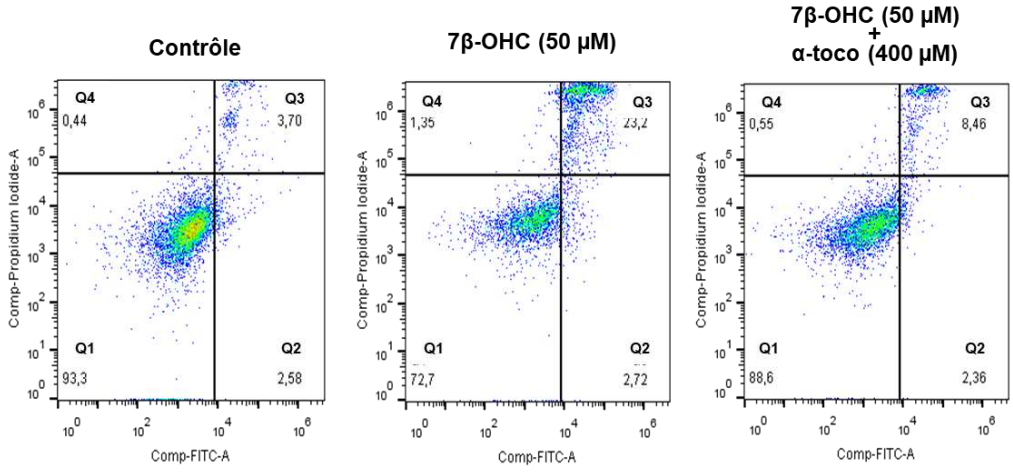


Figure 67 : Résultats du test Annexine V-Iodure de propidium.

Les cytogrammes de cytométrie en flux spectrale fournissent une répartition des cellules sur la base de la double coloration Annexine-V (FITC) en abscisse et Iodure de propidium en ordonnée.

Pour évaluer la capacité du 7β-OHC et du 7KC à induire une mort cellulaire indépendante des caspases ou dépendante des caspases, les deux oxystérols (7β-OHC, 7KC) ont été utilisés en association avec du z-VAD-fmk (un inhibiteur pan-caspases), par la réalisation d'un test FDA. Lorsque le z-VAD-fmk est associée au 7β-OHC et au 7KC, comparativement au 7β-OHC et au 7KC seuls, aucune différence n'a été observée **(Figure 78)**. Nos résultats suggèrent donc qu'une mort cellulaire indépendante des caspases est impliquée dans la mort induite par les deux oxystérols dans les cellules C2C12.

De plus, pour évaluer la capacité du 7β-OHC et du 7KC à déclencher une autophagie de survie ou une autophagie léthale, la 3-méthyladénine (3 MA: 5 µM), qui est un inhibiteur de l'autophagie et la rapamycine (Rapa: 2 µM), qui est un activateur de l'autophagie, ont été utilisés.

En présence de 3 MA (5 µM) avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM), une diminution très significative de pourcentage de cellules FDA-positives, reflétant les cellules vivantes, a été observée. En présence de Rapa (2 µM) avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM), une augmentation significative du pourcentage de cellules FDA-positives a été détectée **(Figure 68)**. Ces résultats démontrent que le 7β-OHC ainsi que le 7KC induisent une autophagie de survie dans les cellules C2C12.

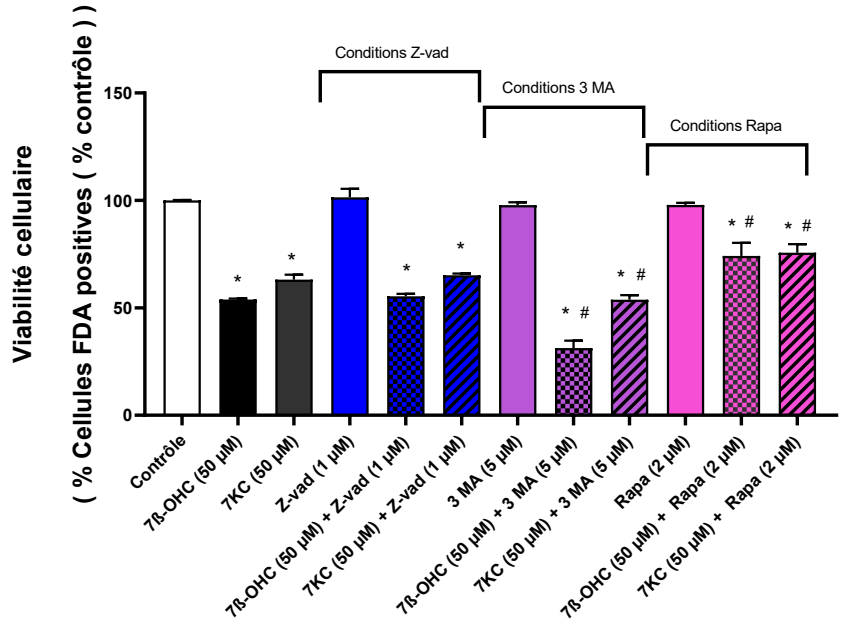


Figure 68 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation des effets du z-VAD-fmk, de la 3-méthyladénine, et de la rapamycine : test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA). *Les données sont présentées sous forme de sous forme de moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes et comparées par le test-t de student. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives sont indiquées par différents symboles : * comparaison entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées; # comparaison entre les cellules traitées avec du 7β-OHC ou du 7KC et les cellules traitées au (7β-OHC+3 MA), (7KC+3 MA), (7β-OHC+Rapa), (7KC+Rapa).*

Il ressort de ces résultats que le 7β-OHC et le 7KC induisent une augmentation du stress oxydant, de la peroxydation lipidique, et de la mort cellulaire indépendante des casapases associée à une autophagie de survie. Par ailleurs, le stress oxydant s'accompagnait d'une

diminution de l'activité des enzymes antioxydantes dont GPx. Les caractéristiques de cette mort évoquent une ferroptose **((C. Li et al., 2018) (T. Zhao et al., 2021))**.

Pour préciser l'induction de ferroptose, les études complémentaires ont été réalisées en particulier la mesure des niveaux d'expression des ARNm de *GPx 4 totale* et *GPx 4 mitochondriale* mesurés par RT-qPCR sur cellules C2C12 cultivés pendant 12 h et traitées pendant 24 h en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL), ou α-tocophérol (400 µM). Les résultats sont présentés dans la **Figure 69**.

Sous l'effet du 7β-OHC, le niveau d'expression de *GPx 4 totale* est significativement diminué par rapport aux cellules non traitées (contrôle) et au véhicule (EtOH (0,1%). Cette diminution est fortement contrecarrée en co-traitement avec le PLSO (100 µg/mL) et l'α–tocophérol (400 µM). En revanche, sous l'effet du 7KC, aucune différence significative n'*a* été observée par rapport aux cellules non traitées. Par ailleurs, une nette diminution du niveau d'expression de *GPx 4 mitochondriale* dans les cellules traitées avec du 7β-OHC (50 µM) et du 7KC (50 µM) a été remarquée, comparativement aux cellules non traitées et au véhicule (EtOH 0,1%). En présence de PLSO (100 µg/mL), ou de l'α-tocophérol (400 µM), la diminution du taux d'expression de *GPx 4 mitochondriale* est atténuée. Ces diminutions de l'expression de GPx4 suggèrent que le 7β-OHC et le 7KC déclenchent une forme de mort cellulaire par ferroptose.

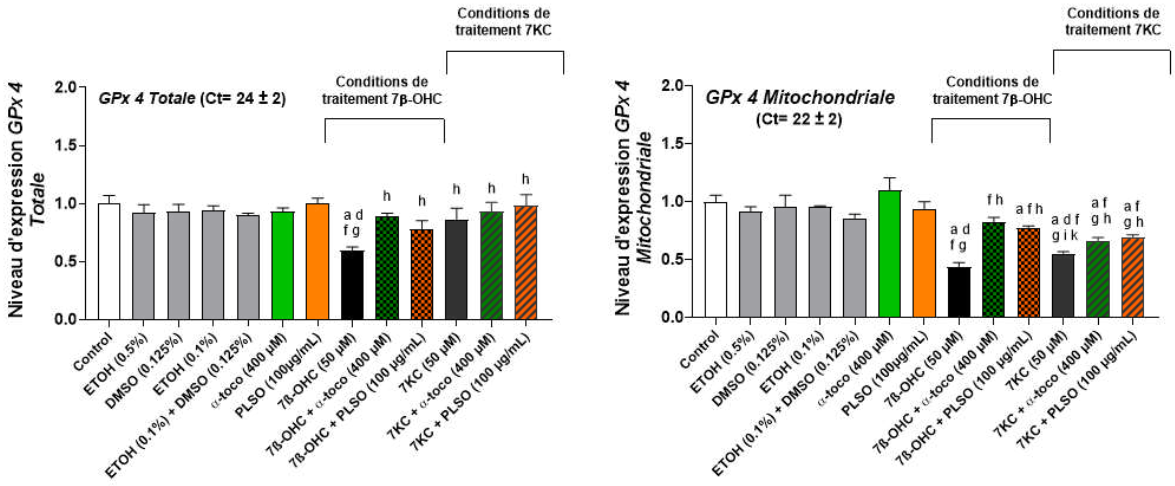


Figure 69 : Incidence du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol associés ou non au PLSO et à l'α-tocophérol sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la ferroptose (GPx 4 totale et GPx 4 mitochondriale).

Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes réalisées en tripliquate. Une analyse comparative multiple a été réalisée à l'aide

d'un test ANOVA suivi d'un test de Tukey. Une valeur p<0,05 est considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives entre les groupes, indiquées par des lettres différentes, tiennent compte du véhicule utilisé. a : comparaison versus contrôle ; b : comparaison versus ETOH (0,5 %) ; c : comparaison versus DMSO (0,125 %) ; d : comparaison versus ETOH (0,1 %) ; e : comparaison versus (ETOH (0,1 %) + DMSO (0,125 %)) ; f : comparaison versus α-toco (400 µM) ; g : comparaison versus PLSO (100 µg/mL) ; h : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) ; i : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM), j : comparaison versus 7β-OHC (50 µM) + PLSO (100 µg/mL), K : comparaison versus 7KC (50 µM) , l : comparaison versus 7KC (50 µM) + α-toco (400 µM).

Comme la ferroptose est inhibée par la déféroxamine, un chélateur de fer intracellulaire, nous avons testé l'effet de la déféroxamine sur la viabilité des cellules C2C12. La **Figure 70**, où la viabilité cellulaire est mesurée par le test FDA, montre clairement une augmentation significative du pourcentage de cellules FDA-positives (cellules vivantes) en présence du 7β-OHC+ déféroxamine (0,5 µM) et du 7KC (50 µM)+ déféroxamine (0,5 µM) par rapport aux cellules traitées avec le 7β-OHC (50 µM) et le 7KC (50 µM) seuls. Ces résultats montrent que la déféroxamine inhibe la mort cellulaire induite par le 7β-OHC et le 7KC.

Ces résultats sont en faveur d'une mort par ferroptose associée à une autophagie de survie sur cellules C2C12 cultivées en présence de 7β-OHC et 7KC.

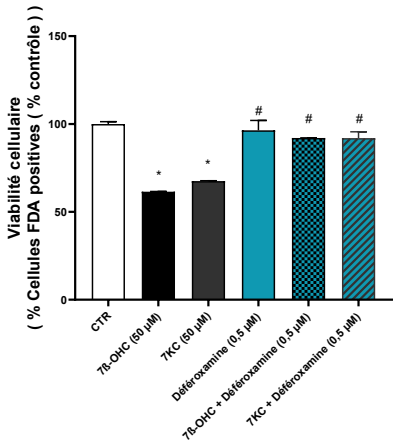


Figure 70 : Mesure de la viabilité cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol et de 7-cétocholestérol sur des cellules C2C12 et évaluation d'effet de la déféroxamine: test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA).

Les données sont présentées sous forme de sous forme de moyenne ± écart type de deux expériences indépendantes et comparées par le test-t de student. Une valeur p<0,05 est

*considérée comme statistiquement significative. Les différences statistiquement significatives sont indiquées par différents symboles : * comparaison entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées ; # comparaison entre les cellules traitées avec du 7β-OHC ou du 7KC et les cellules traitées au de la Déféroxamine, (7β-OHC+ Déféroxamine), (7KC+ Déféroxamine).*

3.9. Mécanisme de cytoprotection des huiles Méditerranéennes et d'α-tocophérol

Le PLSO et le MTSO contiennent des niveaux élevés d'acides gras, principalement d' acide oléique (C18:1 n-9), qui peuvent favoriser la formation de gouttelettes lipidiques avec des activités cytoprotectrices contre le stress oxydant induit par le 7β-OHC et le 7KC. La capacité de MTSO et d'α- tocophérol à déclencher la formation de gouttelettes lipidiques a été déterminée après coloration avec l'huile rouge (Oil Red O (ORO)) (**Figure 71**).

L'observation des cellules C2C12 par microscopie à contraste de phase ne révèle aucune gouttelette lipidique dans les cellules témoins, et les cellules traitées par l'α-tocophérol ainsi que dans les cellules MTSO-, (7β-OHC + MTSO) et (7β-OHC + α-tocophérol) alors qu'environ 10 % des cellules positives à l'ORO ont été détectées dans les cellules traitées au 7β-OHC.

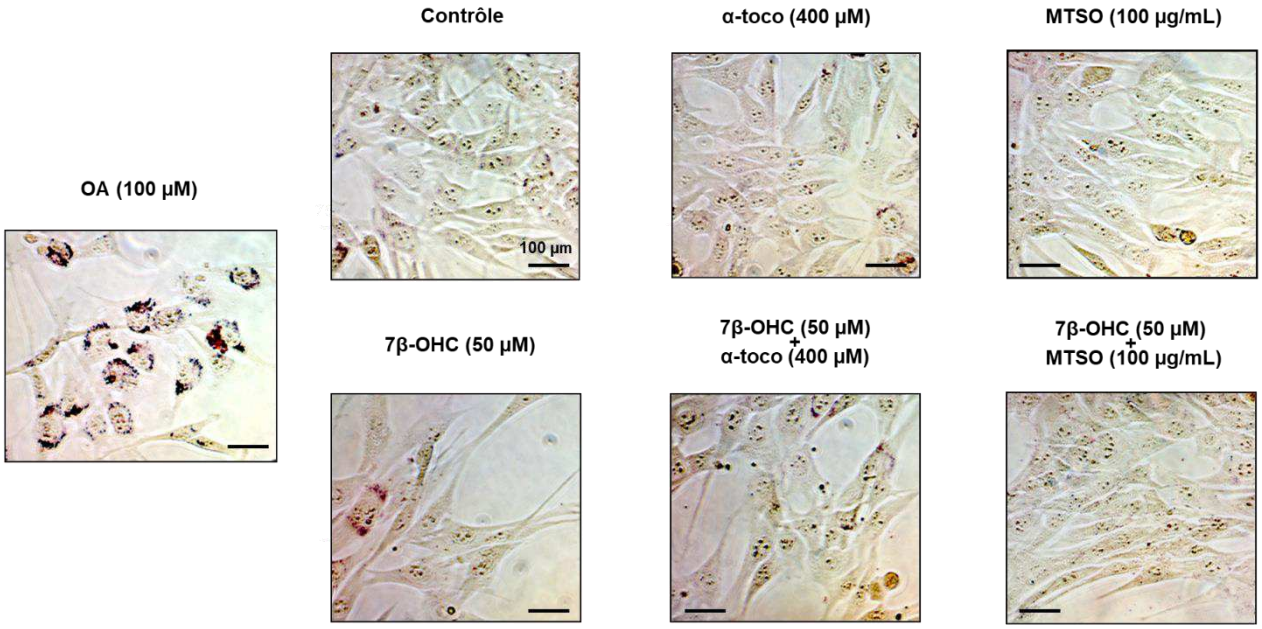


Figure 71 : Effet de MTSO et d'α-tocophérol sur la formation de gouttelettes lipidiques.

Les cellules C2C12 cultivées pendant 12 h ont été traitées pendant 24 h en présence ou en absence de 7β-OHC (50 µM) et de 7KC (50 µM) associées ou non au MTSO (100 µg/mL) ou à

l'α-tocophérol (400 µM). L'acide oléique (OA) a été utilisé comme contrôle positif pour induire la formation de gouttelettes lipidiques. Les observations ont été réalisées en microscopie à contraste de phase. Dans ces conditions d'observation, les gouttelettes lipidiques, localisées dans le cytoplasme, ont été observées uniquement dans toutes les cellules traitées par l'OA et dans environ 10% des cellules traitées par le 7β-OHC. Les points observés dans les noyaux correspondent aux nucléoles.

L'acide oléique est l'un des principaux acides gras de PLSO et MTSO. Il a été précédemment montré sur les cellules monocytaires humaines U937 que le 7KC-oléate n'a pas d'effet toxique sur ces cellules alors que le 7KC induit la mort cellulaire par apoptose **(Monier et al., 2003)**. L'estérification des oxystérols par l'oléate pourrait donc inhiber leurs toxicités. Cette hypothèse a été confirmée sur les myoblastes C2C12 (**Figure 72**). L'estérification probable des oxystérols par l'oléate présent en quantité importante dans PLSO (49,77 %) et MTSO (21,39 %) pourrait donc être un des facteurs contribuant à l'atténuation de la toxicité du 7KC et du 7β-OHC.

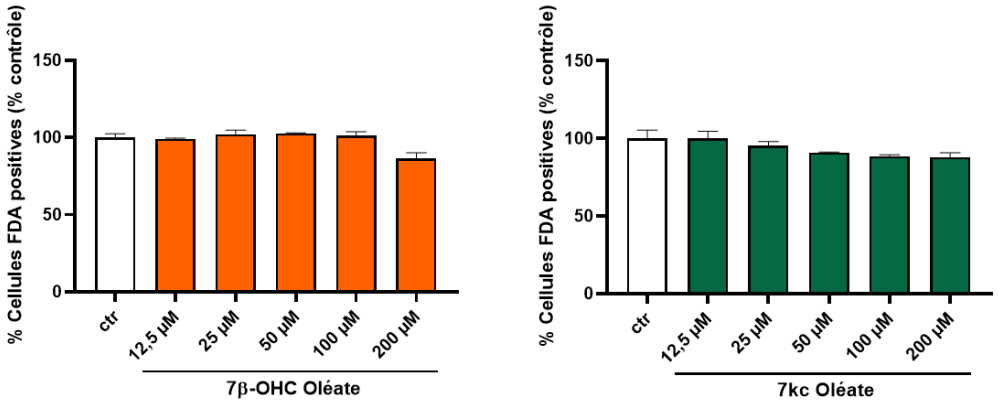


Figure 72 : Evaluation des effets de différentes concentrations de7β-OHC et 7KC sur les cellules C2C12 après 24 h de traitement. La viabilité cellulaire a été évaluée avec le test FDA.

Les cellules cultivées pendant 12 h sont traitées avec différentes concentrations de 7β-OHC oléate et 7KC oléate (12,5 à 200 µM) pendant 24 h.

4. Effet cytoprotecteur d'huile de lentisque sur les cellules musculaires C2C12 différenciées en myotubes

4.1. Différenciation des myoblastes en myotubes

Lorsque les cellules C2C12 sont à 80-90% de confluence, la différenciation des myoblastes en myotubes a été induite par le changement de milieu de prolifération par du milieu de différenciation où le sérum de veau fœtal a été remplacé par 2% de sérum de cheval. Ce changement de milieu correspond au jour 0 de différenciation **(Figure 73)**. La différenciation des myoblastes C2C12 a été étudiée sur une période de 7 jours et a été évaluée morphologiquement par microscopie à contraste de phase. Les images obtenues sont présentées dans la **Figure 74** .

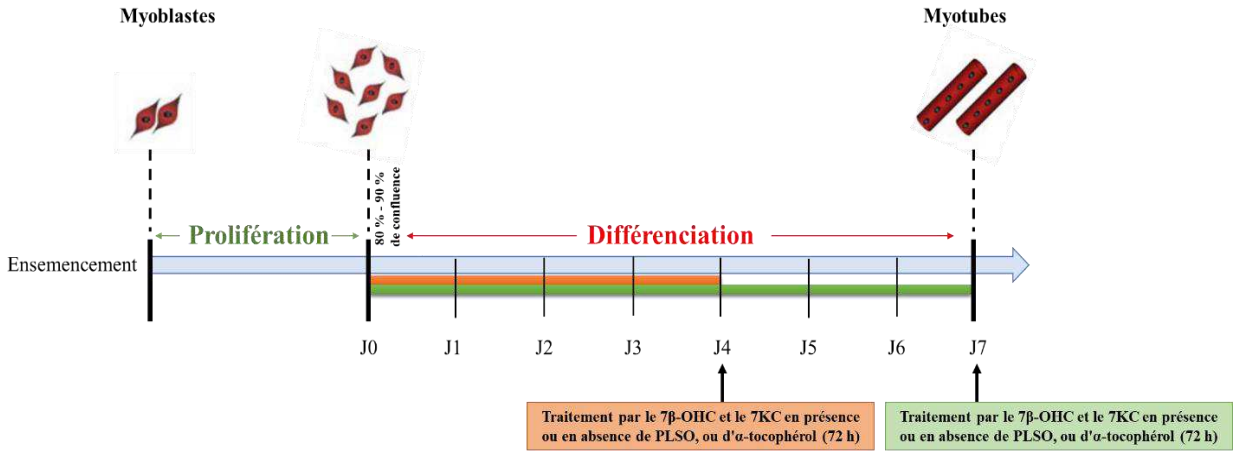


Figure 73 : Protocole expérimental pour évaluer l'effet cytoprotecteur de PLSO associé ou non au 7β-hydroxycholestérol et au 7-cétocholestérol sur les myoblastes en cours de différenciation (J4) et en fin de différenciation (J7).

Au jour 2 de différenciation, les cellules C2C12 commencent à s'aligner et à se différencier en myotubes. Aux 4ème jour et 6ème jour de différenciation, les cellules sont de plus en plus allongées avec des formes de myotubes caractéristiques. Au 7ème jour de différenciation, les cellules C2C12 sont toutes différenciées et forment des myotubes (**Figure 74**). Nous observons que les cellules sont toutes orientées dans une même direction et forment des stries. Ces stries évoquent la structure d'une fibre musculaire. À ce stade, les cellules possèdent plusieurs noyaux, ce sont des cellules plurinuclées.

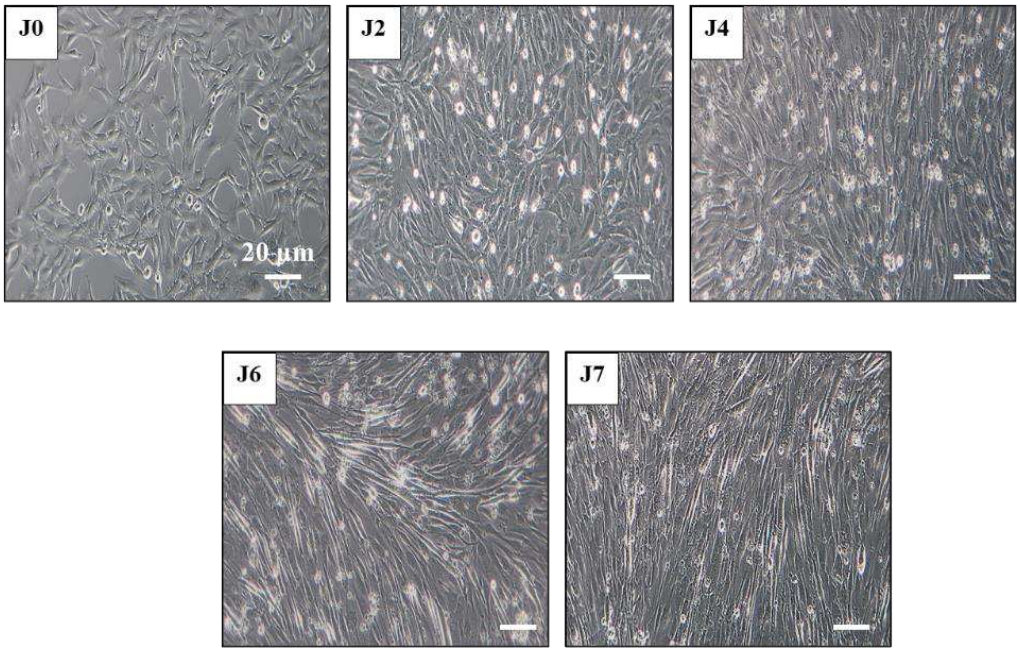


Figure 74 : Analyse par microscopie à contraste de phase de la morphologie des cellules C2C12 en cours de différenciation.

Lorsque les cellules C2C12 passent du milieu de prolifération au milieu de différenciation où le sérum de veau fœtal (10%) a été remplacé par 2% de sérum de cheval, les myoblastes C2C12, cellules fusiformes, cessent de proliférer et entrent dans un programme de différenciation (J0). Au cours de la différenciation (jour 2, jour 4, jour 6), les myoblastes se rassemblent, s'alignent et finissent par fusionner en myotubes matures multinucléés (c'est-à-dire au jour 7).

4.1. Effet sur la viabilité et l'adhésion cellulaire du 7β-hydroxycholestérol et du 7-cétocholestérol sur cellules C2C12 en cours de différenciation et en fin de différenciation

Pour évaluer l'effet du 7β-OHC et du 7KC sur les cellules C2C12 en cours de différenciation (J4) et en fin de différenciation (J7), les cellules C2C12 au jour 4 et au jour 7 ont été traitées au 7β-OHC et au 7KC à deux concentrations différentes (25 µM et 50 µM). Après 72 h de traitement, la viabilité et l'adhésion cellulaire ont été respectivement évaluées par le test de coloration FDA et le test de coloration Sulforhodamine 101 (SR101). Les résultats de ces deux tests sont présentés dans les **Figures 75** et **76**.

En cours de différenciation, au 4ème jour de différenciation, les résultats montrent une diminution significative des cellules FDA positives (considérées comme cellules vivantes) et une perte d'adhésion cellulaire, suite à un traitement avec le 7β-OHC (25 µM) et le 7β-OHC

(50 µM) pendant 72 h. Aucune variation significative n'a été observée entre les cellules contrôles et les cellules traitées avec le 7KC (25 µM) ou le 7KC (50 µM) (**Figure 75**).

En microscopie à contraste de phase (**Figure 76**), les cellules C2C12 en cours de différenciation, traitées pendant 72 avec du 7β-OHC (25 µM), et du 7β-OHC (50 µM) comparativement au contrôle, montrent une augmentation du nombre des cellules rondes flottantes (cellules mortes), et une diminution du nombre de cellules adhérentes. Ces effets ont été plus faibles en présence du 7KC (25 et 50 µM). Ces résultats montrent que le 7β-OHC est plus toxique que le 7KC, et que le 7β-OHC a un réel impact sur les cellules en cours de différenciation.

À la fin de différentiation, 7ème jour de différenciation, l'effet du 7β-OHC (25 et 50 µM) sur les cellules C2C12 différenciées (myotubes) n'est pas le même que sur les cellules en cours de différenciation. En effet, la figure montre que les effets toxiques du 7β-OHC sont moins marquées sur les cellules différenciées.

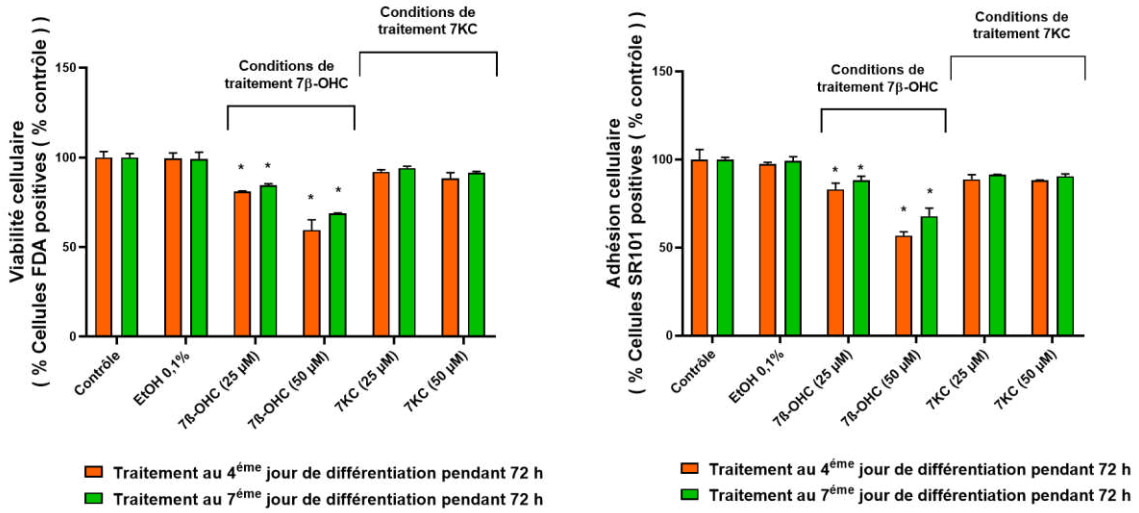


Figure 75 : Evaluation des effets de différentes concentrations de 7β-OHC et de 7KC sur les cellules C2C12 en cours de différenciation (J4) et en fin de différenciation (J7) après 72 h de traitement. La viabilité et l'adhésion cellulaire ont été respectivement évaluées avec le test FDA et le test sulforhodamine 101 (SR101).

*L'analyse statistique des données a été réalisée par le test-t de student. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type, * indique la différence significative (p <0,05) entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées.*

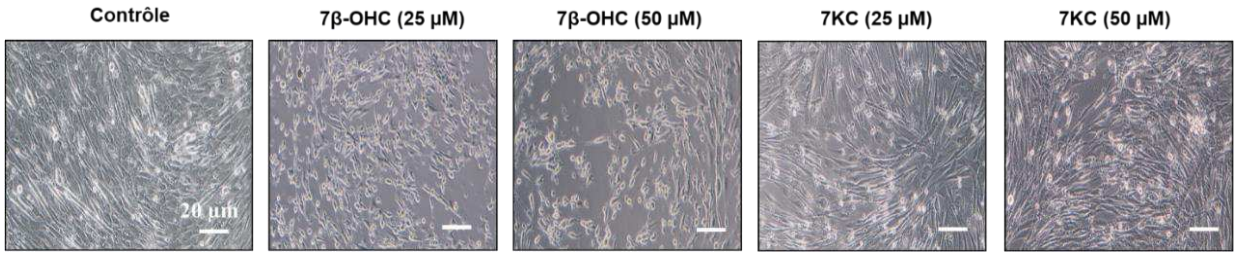


Figure 76 : Morphologie des cellules C2C12 en cours de différenciation (J4) et après 72 h de traitement avec le 7β-OHC et le 7KC.

Au 4 ème jour de différenciation, les cellules C2C12 ont été traitées pendant 72 h avec du 7β-OHC et du 7KC à deux concentrations différentes (25 µM et 50 µM), et observées en microscopie à contraste de phase. Nous observons moins des cellules adhérentes avec le 7β-OHC (25 µM et 50 µM) ainsi que la présence de cellules rondes flottantes, mais pas d'effet toxique avec le 7KC (25 µM et 50 µM). Ainsi, le 7β-OHC s'avère cytotoxique alors que le 7KC ne l'est pas.

4.2. Effet cytoprotecteur d'huile de lentisque sur la viabilité et l'adhésion cellulaire sur les cellules C2C12 en cours de différenciation et en fin de différenciation

Afin d'évaluer les effets cytoprotecteurs de PLSO, et de l'α-tocophérol associés ou non au 7β-OHC, une coloration FDA et une coloration suforhodamine 101 (SR101) ont été réalisées sur les cellules C2C12 en cours de différenciation et différenciées (myotubes) en présence ou en absence du 7β-OHC (50 µM) associées ou non au PLSO (100 µg/mL) ou à l'α-tocophérol (400 µM) (utilisé comme contrôle positif de cytoprotection). Nous avons seulement évalué l'effet du 7β-OHC (50 µM), car il s'agit de l'oxystérol ayant montré l'effet le plus toxique sur les cellules C2C12 en cours de différenciation et en fin de différenciation (**Figure 77**).

Aprés 72 h de traitement, des augmentations significatives du pourcentage de cellules FDA-positives et du pourcentage des cellules SR101 positives ont été détectées en co-traitement du 7β-OHC (50 µM) associé avec le PLSO (100 µg/mL), ou l'α-tocophérol (400 µM). Cela démontre que le PLSO et l'α-tocophérol atténuent la mort cellulaire induite par le 7β-OHC sur les myoblastes et les myotubes.

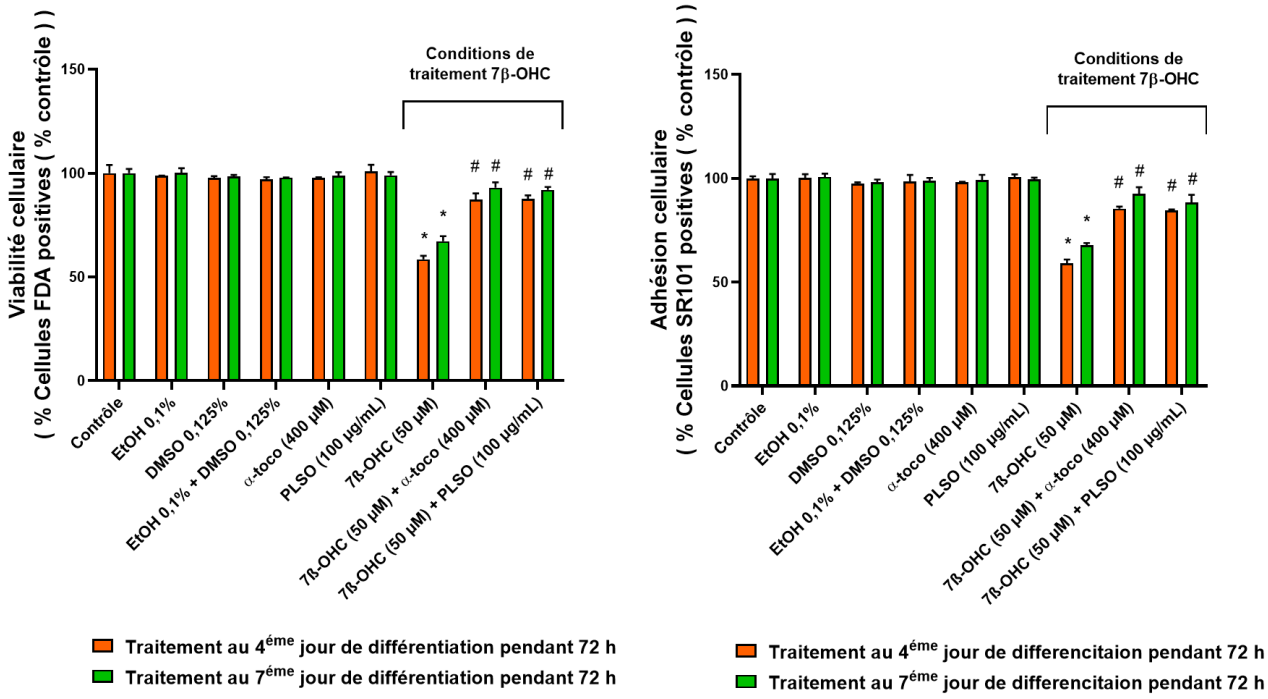


Figure 77 : Mesure de la viabilité et de l'adhésion cellulaire en présence de 7β-hydroxycholestérol sur des cellules C2C12 en cours de différenciation (J4) et à la fin de différenciation (J7) et après 72 h de traitement et évaluation des effets cytoprotecteurs de PLSO et d'α-tocophérol : test de coloration à la fluorescéine diacétate (FDA) et test de coloration à la suforhodamine 101 (SR101).

*L'analyse statistique des données a été réalisée par le test-t de student. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± écart type, * indique la différence significative (p <0,05) entre les cellules non traitées (contrôle) et les cellules traitées, # indique la différence significative entre les cellules traitées avec le 7β-OHC (50 µM) et les cellules traitées avec le (7β-OHC + PLSO), et le (7β-OHC +* α-toco*).*

DISCUSSION

I. Etude clinique

Le vieillissement en bonne santé est associé à un maintien des capacités fonctionnelles qui permettent le bien-être à un âge avancé ce qui permet une indépendance physique qui est un facteur crucial pour assurer la qualité de vie des personnes âgées. La perte de la masse, de la force et de la fonction musculaire constitue un facteur de risque important pour l'autonomie ; ce phénomène apparait progressivement avec la sénescence et le vieillissement, détériorant les performances physiques et caractérisant ainsi la sarcopénie. L'identification de la sarcopénie dans la pratique clinique est essentielle pour la mise en place précoce d'un traitement minimisant ses impacts et améliorant ainsi la qualité de vie des personnes âgées. La recherche des facteurs de risque et l'identification des biomarqueurs associés à la sarcopénie sont nécessaires pour le diagnostic de ce syndrome gériatrique. Dans ce contexte, une étude clinique (cas-témoin) a été effectuée en Tunisie sur 63 sujets non sarcopéniques (SARC-F < 4) et 97 patients sarcopéniques (SARC-F ≥ 4).

La première partie de l'étude clinique s'est orientée vers la recherche des facteurs de risque de la sarcopénie des personnes âgées. Il existe plusieurs preuves permettant d'affirmer l'implications de facteurs environnementaux et de facteurs liés au style de vie. L'âge est parmi les facteurs de risque les plus importants. Les résultats obtenus montrent que les personnes âgées sarcopéniques sont souvent les plus âgées. Ce résultat est en accord avec celui de Huang et al. **(C.-Y. Huang et al., 2016)**. Il faut noter que le risque de sarcopénie est plus important pour la tranche d'âge comprise entre 75 ans et 80 ans par rapport aux patients plus jeunes de plus de 40 ans **(Casati et al., 2019)**. La sarcopénie peut commencer à l'âge de 40 ans et s'accentue dès 75 ans. La masse musculaire maigre représente généralement jusqu'à environ 50 % du poids corporel total chez les jeunes adultes, mais elle diminue avec l'âge pour atteindre 25 % entre 75 et 80 ans **((Waters et al., 2000) (von Haehling et al., 2012))**. De ce fait, la sarcopénie est plus agressive chez les seniors de plus de 75 ans. De même, une prédominance féminine est constatée, ceci est concordant avec les données de la littérature. En effet, la plupart des études montrent que la sarcopénie concerne plus les femmes **(Ning et al., 2021)**. Ceci pourrait être relié aux différences hormonales entre les deux sexes.

Parmi les autres facteurs de risque les plus importants de la sarcopénie, le lieu de vie (avec la famille, lieu de vie collective « maison de retraite ») et la polypathologie sont aussi à prendre en considération. Dans notre série, le pourcentage des personnes âgées sarcopéniques

vivant en famille est très faible. Les liens familiaux dans notre communauté sont donc considérés comme l'un des facteurs les plus importants qui influent sur la relation entre l'auto-efficacité (self-efficacy) et les comportements d'autogestion et qui permettent de prédire la santé physique des personnes âgées **(Gallant, 2003)**. La polypathologie est un critère essentiel conditionnant la qualité de vie de la personne âgée. En effet, l'hypertension artérielle est la maladie la plus fréquente chez nos patients sarcopéniques. Ces données concordent avec ceux de la littérature où l'enquête algérienne sur la santé de la famille a suggéré que la principale maladie dont souffrent les personnes âgées est l'hypertension artérielle (HTA) avec un taux de prévalence de 43,3 %. D'autres études montrent que la prévalence de l'HTA augmente avec l'âge et que cette pathologie du sujet âgé est envisagée comme une conséquence normale de vieillissement **(Bénétos, 2015)**.

Il est important de noter que la sarcopénie est un concept polymorphe qui intègre plusieurs dimensions. Certains mettent un accent plus ou moins important sur l'aspect médical, d'autres intègrent plus les aspects médico-sociaux et d'autres accordent une place plus importante aux dimensions gériatriques.

Dans notre étude, l'autonomie pour les activités de base de la vie quotidienne (ADL) est préservée pour les sujets non sarcopéniques. Par contre, ces activités sont perturbées chez les patients âgés sarcopéniques. Le score médian d'ADL est 4 [3-5] pour un score normal de 6/6. Ces résultats sont compatibles avec les résultats obtenus par Hammami et al. **(Hammami et al., 2020)**. En effet, il a été rapporté que la sarcopénie accentue la baisse de mobilité et amplifie les risques de chute avec un impact sur la mortalité **(D. X. M. Wang et al., 2020)**. Le trouble dépressif chez les personnes âgées est aussi un critère prédominant chez les sarcopéniques. Le repérage des personnes ayant le risque de dépression a été fait par le test Mini-GDS. Un score positif de la Mini-GDS (≥1) a été remarqué chez les aînés sarcopéniques. Ceci a aussi été suggéré par Hammami et al. **(Hammami et al., 2020)** qui ont constaté une augmentation de la fréquence du symptôme dépressif dans la population tunisienne âgée diminuant de façon significative leur qualité de vie **(Hammami et al., 2020)**. L'altération des fonctions cognitives est aussi un autre critère important de la fragilité. Dans notre étude, l'évaluation globale des fonctions cognitives a été faite par le test Mini-cog. Ce test permet d'évaluer l'état cognitif des personnes enquêtées **(Carnero-Pardo et al., 2013)**. Le score médian du test Mini-cog est 2 [2-3] chez les patients sarcopéniques pour un score normal de 5/5. Ceci montre l'existence d'une association entre le syndrome de sarcopénie et une altération des fonctions cognitives **(C.-Y. Huang et al., 2016)**. Il est confirmé par diverses études que le vieillissement « cérébral » est

inclus dans la physiopathologie et représente un facteur principal de la cascade de la fragilité physique **(Buchman et al., 2012)**. Ainsi, les changements constatés au niveau cérébral (plaques amyloïdes, altérations de la microcirculation) sont liés à la progression de la sarcopénie **(Buchman et al., 2012)**. Par ailleurs, l'évaluation de l'état nutritionnel de notre population par le test MNA a montré que les personnes âgées sarcopéniques sont en situation de perte de poids ou de dénutrition. Ceci est en accord avec l'étude de Liguori et al. **(Liguori et al., 2018)**. Les résultats du test TUG ont révélé la diminution de la mobilité des patients sarcopéniques. Le test TUG est corrélé à de nombreuses tâches de performance physique présentes au cours de la vie quotidienne, telles que garder l'équilibre, s'asseoir et se tenir debout sur une chaise **(Benavent-Caballer et al., 2016)**.

De façon globale, la sarcopénie touche une large proportion des personnes âgées de 65 ans et plus. Leur statut physique est fragilisé par les modifications physiologiques liées au vieillissement, à la dépendance, à la dépression, aux troubles cognitifs et à la malnutrition. Ces différents facteurs accentuent la baisse de mobilité et amplifie les risques de chute des personnes âgées.

La deuxième partie de l'étude clinique a concerné l'identification de biomarqueurs associés à la sarcopénie. Le stress oxydant, l'inflammation, et le métabolisme lipidique (profil d'acides gras et d'oxystérols) pourraient jouer un rôle central non seulement dans le vieillissement, mais aussi dans le développement des maladies liées à l'âge comme la sarcopénie, mais aussi les maladies cérébrovasculaires et neurodégénératives, certaines maladies oculaires et osseuses, des maladies inflammatoires et certains cancers.

Le stress oxydant est un déséquilibre entre les niveaux des pro-oxydants et des antioxydants. Il a été démontré que le vieillissement prédispose le muscle squelettique à des niveaux accrus de stress oxydant ce qui suggère que ce phénomène joue un rôle dans la perte musculaire. L'état de stress oxydant semble être à la base de la pathogenèse des maladies chroniques et dans la sarcopénie il favorise une fonte musculaire **(S.-J. Meng & Yu, 2010)**.

Dans notre étude, les principales enzymes antioxydantes étudiées à la fois chez les personnes âgées sarcopéniques et non sarcopéniques sont la GPx, la SOD et la CAT érythrocytaires,. En effet, les érythrocytes sont exposés de manière permanente aux espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (ERO / ERN), mais leur métabolisme peut s'opposer aux dégâts oxydatifs. Il est bien connu que la variété de facteurs physiologiques et pathologiques peut augmenter les ERO incitant ainsi l'installation d'un stress oxydant. Les érythrocytes sont

nombreux, ont une durée de vie importante et sont faciles à obtenir et ils sont équipés d'enzymes antioxydantes leur permettant de neutraliser les radicaux libres, d'où le choix de ces cellules pour mesurer les activités des enzymes antioxydantes dans notre population. Les résultats de notre étude ont montré une augmentation de l'activité GPx, SOD et CAT érythrocytaires dans le groupe de patients sarcopéniques par rapport au groupe de sujets non sarcopéniques. Cette augmentation pourrait correspondre à une réaction de l'organisme pour lutter contre la surproduction des ERO. L'augmentation des activités antioxydantes et en accord avec des études suggérant des activités élevées de la SOD et la CAT érythrocytaires au cours du vieillissement **((Rizvi & Maurya, 2007) (Maurya et al., 2015))**. La plupart des études a révélée une diminution de l'activité de GPx en fonction de l'âge **((Maurya et al., 2015) (Sánchez-Castellano et al., 2020))**.

L'évaluation des dommages oxydatifs causées par le déséquilibre du statut oxydant, notamment la mesure de marqueurs de peroxydation lipidique (DC, MDA) et d'oxydation protéiquees (carbonylation protéique) a révélé une augmentation des teneurs plasmatiques et/ou érythrocytaires en DC, en MDA et en protéines carbonylées (PC), dans le groupe des patients sarcopéniques comparativement aux non sarcopéniques. Ces résultats sont en accord avec des études montrant une association de ces biomarqueurs du stress oxydant ainsi que d'autres (isoprostanes, 4-hydroxy-2,3-nonenal) avec le vieillissement **((Serviddio et al., 2009) (Saum et al., 2015) (Bellanti et al., 2018))**. Les différents biomarqueurs de la sarcopénie résultent pour l'essentiel de l'oxydation des protéines et acides gras polyinsaturés cellulaire qui sont sensibles aux radicaux libres **(Maurya et al., 2015)**.

Dans le muscle squelettique humain, le niveau de peroxydation lipidique dépend de la composition des fibres musculaires et de la fonction musculaire. La composition des fibres indique que les muscles contenant plus de 40 % de fibres de type II (fibres à contraction rapide) présentent des niveaux de peroxyde lipidique statistiquement plus faibles que les muscles contenant moins de 40 % de fibres de type II **(Marzani et al., 2003)**. Cela suggère qu'une peroxydation lipidique accrue prévaut dans les fibres de type I (fibres à contraction lente) **(Doria et al., 2012)**. Une augmentation du niveau de peroxydation lipidique au cours du vieillissement est évidente dans le muscle vaste latéral (situé à la partie antéro-externe de la cuisse) **(Barreiro et al., 2006)** et dans le muscle intercostal externe (situé entre les côtes)) **((Marzani et al., 2003) (Doria et al., 2012))**.

L'analyse des marqueurs inflammatoires a aussi montré des taux significativement élevés de TNF-α, IL-8, CRP et LTB-4, chez les patients sarcopéniques. De plus, des corrélations

positives entre IL-6, CRP et LTB-4 et le score de sarcopénie SARC-F ont été révélées. Plusieurs études ont noté que la sévérité de la sarcopénie est associée à l'inflammation, qui est considérée comme un facteur de risque favorisant la fragilité musculaire **((Bano et al., 2017) (Hammami et al., 2020))**. Le dysfonctionnement du tissu musculaire squelettique peut induire l'apparition d'une réponse inflammatoire chronique, qui à son tour réduit la fonction du muscle squelettique, constituant ainsi un cercle vicieux. À ce jour, de nombreuses preuves suggèrent que l'inflammation chronique de bas grade associée au vieillissement pourrait être un facteur clé de la sarcopénie **(Pan et al., 2021)**. Une telle inflammation est caractérisée par des quantités élevées de cytokines pro-inflammatoires et des quantités réduites de cytokines anti-inflammatoires. Des études antérieures ont montré que la perte de la masse et la force musculaire, ainsi que la réduction de la mobilité, de la fonction des membres inférieurs et de l'activité physique, sont exacerbées par l'augmentation des taux de marqueurs inflammatoires sanguins **((Visser et al., 2002) (Cesari et al., 2004))**. Des études transversales **((Haren et al., 2010) (Bautmans et al., 2011))** et longitudinales **(Alemán et al., 2011)** ont confirmé que la perte de masse musculaire squelettique, de force et de forme physique chez l'homme et chez la femme était associée à des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6, TNF-α, et CRP.

Le muscle squelettique peut également être un organe sécréteur **(Peake et al., 2015)**. Lorsque le muscle squelettique se contracte, il peut produire et libérer des cytokines. Ces cytokines, nommées myokines comme l'apeline, peuvent affecter la fonction musculaire squelettique. Nos résultats montrent l'augmentation du taux plasmatique d'apeline dans les patients sarcopéniques. Cependant, la plupart des études montrent plutôt qu'avec l'augmentation d'âge, les taux d'apeline diminuent chez la souris et chez l'Homme **((Fujie et al., 2014) (Rai et al., 2017))**. L'apeline s'est révélée utile pour lutter contre la fonte musculaire au cours du vieillissement, en facilitant la synthèse des protéines musculaires et la biogénèse mitochondriale. Une étude *in vivo* sur des souris âgées, recevant une injection quotidienne d'apeline ou surexprimant l'apeline via un transfert de gène médié par un adénovirus dans le muscle squelettique, a révélée des capacités musculaires améliorées et une hypertrophie des myofibres. L'amélioration musculaire induite par l'apeline est obtenue par la stimulation des voies métaboliques mitochondriales et et de l'axe (Forkhead box O3 (FOXO3)-MURF-1-atrogen) qui sont régénératives en ciblant les myofibres matures et/ou les cellules satellites **(Vinel et al., 2018)**.

Plusieurs altérations du métabolisme lipidique, en particulier celui des acides gras, ont été décrits en association avec les maladies liées à l'âge. Cependant, les mécanismes expliquant ces altérations restent à clarifier. Nos résultats montrent une augmentation des AGPI n-3 et AGPI n-6 chez les patients sarcopéniques. Nous constatons que le taux des acides gras oméga-6 est plus important par rapport aux acides gras oméga-3. Ces AGs oméga 6 peuvent induire des altérations de la micro-vascularisation, une inflammation chronique, une agrégation plaquettaire et des dysfonctionnements endothéliaux **(Innes & Calder, 2018)**. Iuliano et al (2013) ont montré une modification du profil des AGPI n-6 mais pas des AGPI n- 3 **(Iuliano et al., 2013)**. D'autres études ont rapporté des niveaux réduits des AGPI n-3 dans le sang des sujets âgées ayant une démence de type Alzheimer **((Morris et al., 2003) (Cunnane et al., 2009))** ainsi que chez des sujets sarcopéniques **(Y. Zhang et al., 2022)**. De même, il a été rapporté qu'une diminution du rapport [AGPI n-3/AGPI n-6] au niveau des érythrocytes est en relation avec le déficit cognitif lors du vieillissement étant donné que les besoins en AGPI oméga-3 sont essentiels à chaque étape de la vie : pendant le développement du cerveau chez le jeune, lors de l'apprentissage et au cours du vieillissement et sont aussi nécessaires pour stimuler la synthése des protéines musculaires **(Smith et al., 2011)**. Un niveau faible d'acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5 n-3), ainsi qu'un rapport [acide arachidonique (AA ; C20:4 n-6) / EPA] élevé, ont été associés à des troubles cardiovasculaires **(Domei et al., 2012)**. L'AA et l'EPA seraient des déterminants de la progression des maladies inflammatoires **(Tutino et al., 2019)**. En effet, l'AA est le précurseur majeur des éicosanoïdes pro-inflammatoires tels que les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes, connus par leur capacité à favoriser la sécrétion du peptide amyloïde **(Amtul et al., 2012)**.

Actuellement, alors que des études ont montré l'implication des acides gras Trans (AGT) dans la survenue des maladies cardiovasculaires, peu de choses sont connus sur l'impact de ces acides gras dans le développement d'autres maladies liées à l'âge. De ce fait, nous avons évalué la relation entre le profil des AGT et la sarcopénie. Une consommation importante en AGT aussi bien industriel que naturel pourrait causer un stress oxydant.

Les résultats d'analyse des acides gras érythrocytaires dans la population étudiées, ont montré une accumulation des AGT suivant chez les patients âgés sarcopéniques:C18:1 trans 9, C18:1 trans 11, C18:2 trans 9 cis 12, C18:2 cis 9 trans 12, C18:3 cis 9 cis 12 trans 15, C18:2 cis 9 trans 11, et C18:2 trans 10 cis 12. La présence importante des AGT dans les aliments transformés suggère un éventuel déséquilibre alimentaire chez les patients sarcopéniques. L'accumulation des AGT érythrocytaires pourrait aussi s'expliquer par les attaques radicalaires

intrinsèques (liées à l'augmentation du stress oxydant) qui pourraient favoriser l'isomérisation Cis/Trans des acides instaurés (AGI). L'isomérisation des acides gras induite par le stress oxydant serait importante dans le vieillissement car les chaînes des AGT pourraient affecter les propriétés et la fonction menbranaire **((Tsuzuki, 2010) (Zarrouk et al., 2015))**.

Le stress oxydant peut également favoriser la peroxydation lipidique conduisant à une augmentation de certains produits d'auto-oxydation du cholestérol (7KC et 7β OHC) qui sont associés à des maladies liées à l'âge fréquentes **(Zarrouk et al., 2014)**. Dans notre travail, l'analyse des oxystérols par GC-MS a révélé chez les patients sarcopéniques une augmentation plasmatique du 7β-OHC et du 7KC ainsi que d'autres produits issus de l'oxydation enzymatique du cholestérol comme le 24S-OHC, et le 25-OHC. Des corrélations négatives entre les concentrations du 7β-OHC et de 7KC plasmatique, et l'activité catalase érythrocytaire ont été révélées. Ces résultats sont compatibles avec ceux d'une étude réalisée sur des patients âgées souffrants d'une démence **(Zarrouk et al., 2020)**.

En raison de la double liaison en position 5,6 sur le noyau stérane du cholestérol, l'attaque des radicaux libres sur le carbone 7 est la plus probable et conduit à la formation de 7KC mais aussi de 7β-OHC, ces deux oxystérols étant interconvertibles via les enzymes 7β-hydroxycholestérol déshydrogénase-1 (7β-HSD1 : conversion de 7KC en 7β-OHC) et 7β-hydroxycholestérol déshydrogénase-2 (7β-HSD2 : conversion de 7β-OHC en 7KC) (**(Vejux et al., 2020) (Anderson et al., 2020))** . Dans les maladies cardiovasculaires, la maladie d'Alzheimer, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la cataracte et les formes sévères de SRAS-CoV2, des taux accrus de 7KC et de 7β-OHC ont aussi été identifiés dans le plasma et au niveau des sites lésionnels **((Zarrouk et al., 2014) (Testa et al., 2018) (Samadi et al., 2021))**. De plus, il a été montré que les niveaux de 7KC peuvent permettre de distinguer le vieillissement normal du pathologique **(Lin et al., 2018)**. Actuellement, dans certaines maladies liées à l'âge, l'implication du 7KC et/ou du 7β-OHC dans la physiopathologie est largement suspectée car ces oxystérols peuvent initier des voies de transduction du signal pertinentes pour le développement de ces maladies **((Leonarduzzi et al., 2014) (Vejux et al., 2020))**. Dans la sarcopénie, des augmentations plasmatiques du 7β-OHC et du 7KC ont également été observées, l'augmentation du 7β-OHC étant significative **(Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2021)**.

Compte tenu des résultats obtenus, ceci nous a conduit à évaluer *in vitro* l'effet de ces deux oxystérols (7β-OHC, 7KC) sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 non différenciées (myoblastes) et différenciées (myotubes) afin de comprendre comment ces deux

oxystérols, connus pour leur toxicité, peuvaient affecter les fonctions des cellules squeletiques musculaires .

II. Composition biochimique et activité antioxydante des huiles de graines de lentisque et de chardon-marie

En raison de l'implication du stress oxydant dans la sarcopénie, la thérapie antioxydante est une stratégie à envisager pour prévenir et soigner cette maladie **(Sorriento et al., 2018)**. Les plantes sont considérées comme une source de molécules bioactives à potentiel thérapeutique qui peuvent agir individuellement ou en synergie pour prévenir un grand nombre de maladies. Dans notre étude, l'intérêt s'est porté sur deux plantes Méditerranéennes largement utilisées en médecine traditionnelle ; le lentisque (*Pistacia lentiscus L.*) et le chardon-marie (*Silybum marianum*).

Plusieurs études ont décrites que l'huile des graines de lentisque (PLSO) a une valeur nutritive élevée et de grands avantages en médecine traditionnelle pour cicatriser les plaies, soulager les problèmes d'estomac et traiter ceratins cancers **(Mezni et al., 2016)**. De plus, l'huile de lentisque a des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antiprolifératifs et neuropotecteurs **((Mezni et al., 2016) (Saidi et al., 2017) (Ammari et al., 2018) (Milia et al., 2021))**. De même, l'huile des graines de chardon-marie (MTSO) a été utilisée dans le traitement de diverses maladies. Plusieurs études ont suggéré un rôle positif de l'huile de chardon-marie dans l'hépatoprotection et la régénération. Chez l'Homme, Lucena et al., 2002 **(Lucena et al., 2002)** ont mis en évidence une réduction significative de peroxydation lipidique chez des patients atteints de cirrhose alcoolique après administration de 450 mg/jour de silymarine extrait de graines de chardon-marie. Le chardon-marie est aussi utilisé dans le traitement de patients souffrant d'arthrite, de colite ulcéreuse, de rhinite allergique, de maladies de la peau, d'anémie, d'ostéoporose et de certains cancers **((J.-L. Kim et al., 2013) (Eita, 2022))**. En raison de leurs activités biologiques et de leurs spectres d'activités thérapeutiques, les huiles des graines de lentisque et de chardon-marie pourraient être bénéfiques pour prévenir et soigner la sarcopénie.

Nous rapportons que le PLSO de Tunisie (région de Tabarka) et le MTSO de Tunisie (région Sousse) ont des quantités de composés phénoliques totaux comparables à celles du PLSO et du MTSO d'Algérie **((Brahmi et al., 2020) (Rezzoug et al., 2020))**. Cette similitude peut être due au fait que ces deux régions se trouvent dans la même zone bioclimatique. Cependant, la teneur en flavonoïdes du PLSO et du MTSO de Tunisie est

supérieure à celle du PLSO du Maroc **(Bouyahya et al., 2018)** et du MTSO d'Algérie **(Rezzoug et al., 2020)**.

Par ailleurs, nos résultats indiquent que le PLSO étudié a une quantité plus élevée de caroténoïdes que le MTSO. Ainsi, nous pouvons considérer que le PLSO est une excellente source naturelle de ces pigments même par rapport à l'huile d'olive vierge (1,58 à 2,84 mg/kg d'huile) **(Gimeno et al., 2002)**. Ces pigments, principalement le β-carotène, sont des précurseurs de la vitamine A. Les caroténoïdes alimentaires sont des antioxydants censés avoir des effets bénéfiques sur la santé dans la prévention des maladies cardiovasculaires et du cancer **(Gammone et al., 2015)**. De plus, le β-carotène administré par voie orale à des souris mâles âgées de 8 semaines pendant 7 ou 14 jours a permis de maintenir et d'améliorer la masse musculaire squelettique en augmentant le niveau d'expression d'IGF-1 **(Kitakaze et al., 2015)**.

L'analyse du profil des acides gras de PLSO et de MTSO montre que ces deux huiles contiennent une quantité importante d'acide oléique (C18:1 n-9) et d'acide linoléique (C18:2 n-6). L'acide oléique est réputé pour son effet sur la stabilité oxydative des huiles et sa valeur nutritionnelle **(Aguilera et al., 2000)**. L'acide oléique a également de fortes activités antioxydantes contre la mort cellulaire induite par le 7KC sur les cellules BV-2 microgliales murines **((Debbabi et al., 2016) (Debbabi et al., 2017))**. L' acide linoléique est également un acide gras essentiel et un précurseur des acides gras polyinsaturés à chaîne plus longue, ce qui lui confère une valeur nutritionnelle **(Jandacek, 2017)**. Lee et al. ont indiqué que les acides gras insaturés, en particulier C18:1 n-9 et C18:2 n-6, augmentaient la prolifération des cellules musculaires squelettiques C2C12 **(J.-H. Lee et al., 2009)**.

Le profil des stérols montre que le β-sitostérol est le phytostérol majeur de PLSO et de MTSO. Le β-sitostérol est l'un des phytostérols alimentaires les plus abondants qui présentent des avantages potentiels pour la santé. Plusieurs études expérimentales ont démontré que le β-sitostérol pouvait réguler le métabolisme du glucose et des lipides **(Hwang et al., 2008)** et inhiber l'inflammation et le stress oxydant **((Gupta et al., 2011) (Liao et al., 2018))**. Une étude *in vitro* a montré que le traitement des cellules musculaires squelettiques C2C12 par le β-sitostérol améliore la biogenèse et la fonction mitochondriale par activation de la protéine kinase PGC-1 **(Wong et al., 2016)**; ces observations confèrent au PLSO et MTSO une grande valeur thérapeutique. De plus, l'analyse du profil en stérols de PLSO et MTSO montre la présence du cholestérol dans le MTSO. Ce qui rend nutritionnellement huile de lentisque (PLSO) plus attrayante.

Par ailleurs, les tocophérols sont également des ingrédients majeurs dans les huiles car ils ont une activité antioxydante élevée **(Y. Chen, 2014)**. Ils pourraient protéger les acides gras polyinsaturés (AGPI) de l'oxydation en piégeant les radicaux peroxyles lipidiques ($ROO^{\bullet -}$) **(Zingg & Meydani, 2019)**. Dans les deux huiles (PLSO et MTSO), l'α-tocophérol est présent en grande quantité contribuant à la conservation naturelle de ces huiles. Il est important de souligner que le PLSO et le MTSO sont des excellentes source de vitamine E, qui est constituée de quatre tocophérols et de quatre tocotriénols **(Rimbach et al., 2002)**.

Par ailleurs, le potentiel antioxydant de PLSO et de MTSO, évalué par quatres tests complémentaires à savoir : test de piégeage de radicaux libres (DPPH), test de réduction du fer (FRAP), test de chélation des ions ferreux (Fe^{2+}) et test KRL (Kit Radicaux Libres), a démontré un important potentiel antioxydant de ces huiles.

Les profils en nutriments et les propriétés antioxydantes de PLSO et MTSO ont conforté notre intérêt pour étudier les propriétés cytoprotectrices de ces deux huiles Méditeranniennes *in vitro* sur des cellules musculaires squelettiques. Par conséquent, dans le contexte de la sarcopénie, nous avons évalué les propriétés cytoprotectrices de PLSO et MTSO contre la cytotoxicité induite par le 7β-OHC et le 7KC (augmentés dans dans le plasma de patients sarcopénique), sur des cellules musculaires squelettiques C2C12 non différenciées (myoblastes) et différenciées (myotubes).

III. Etude *in vitro*

Plusieurs oxystérols, dont le 7β-OHC et le 7KC, sont en quantités élevées dans le plasma et les organes affectés chez les patients atteints de maladies liées à l'âge **((Zarrouk et al., 2014) (Testa et al., 2018))**. Les résultats de notre étude clinique, obtenus par GC-MS sur le plasma des personnes âgées de 65 ans et plus, ont révélé des taux plasmatiques élèves de 7β-OHC et de 7KC chez les patients sarcopéniques. Il a déjà été montré que le 7β-OHC et le 7KC sont des puissants inducteurs du stress oxydant en stimulant l'activité NAD(P)H **(Pedruzzi et al., 2004)** et en augmentant la production d'ERO mtochondriaux **(Nury et al., 2015)**. Le 7β-OHC et le 7KC sont parmi les oxystérols les plus cytotoxiques sur différents types de cellules de différentes espèces en induisant du stress oxydant, de l'inflammation, des dysfonctions des organites et en activant la mort cellulaire qui peut être dépendante ou non des caspases **(Lemaire-Ewing et al., 2005)**. Les dommages oxydatifs sont supposés être une des causes principales responsable du vieillissement cellulaire. Dans la sarcopénie, une altération oxydative des cellules satellites pourrait induire des problèmes de régénérescence musculaire

(Szentesi et al., 2019). Par conséquent, dans les maladies liées à l'âge, y compris la sarcopénie, il est important i) de mieux comprendre la toxicité du 7β-OHC et du 7KC et ii) d'identifier des molécules ou des mélange de molécules naturelles capables d'atténuer la mort cellulaire induite par le 7β-OHC et le 7KC.

Dans la présente étude, le 7β-OHC et le 7KC (50 µM) ont montré des effets cytotoxiques sur les cellules musculaires squelettiques C2C12. Ce effets sont caractérisés par une induction de la mort cellulaire associée à une surproduction d'ERO ainsi qu'à un dysfonctionnement mitochondrial et peroxysomal. Certains de ces effets ont été précédemment mis en évidence sur des cellules cardio-vasculaires, des cellules hématopoïétiques et immunitaires, des cellules rétiniennes et des cellules nerveuses exposées au 7β-OHC et/ou au 7KC **((Debbabi et al., 2016) (Sghaier, Nury, et al., 2019) (Yammine, Zarrouk, et al., 2020) (Vejux et al., 2020))**. Sur les myoblastes et myotubes C2C12, le 7β-OHC induit une perte d'adhésion cellulaire plus importante que le 7KC : elle se caractérise par une augmentation de cellules rondes flottant dans le mlieu de culture, suggérant une altération des constituants membranaires. Ces altérations pourraient être déclenchées par une rupture de l'équilibre RedOx, susceptible de modifier la structure et les propriétés physiques de la membrane plasmique favorisant la dégradation des molécules d'adhésion et des jonctions cellulaires par des mécanismes impliquant l'activation ERO-dépendante des métalloprotéinases matricielles **(Poli et al., 2013)**. De plus, les modifications de la membrane plasmique induites par le 7β-OHC et le 7KC, révélées dans la présente étude par une perméabilité accrue à l'IP, pourraient modifier l'homéostasie ionique (Ca^{2+}, N^{+}, K^{+}) avec des conséquences importantes sur de nombreuses voies de signalisation, notamment celles impliquées dans l'activation de l'apoptose **((Kunzelmann, 2016) (Vejux et al., 2020))** ou la transmission de l'influx nerveux **((Poli et al., 2013) (Bezine et al., 2018))**. En effet, chez les patients sarcopéniques, l'altération de l'influx nerveux pourrait amplifier le dysfonctionnement musculaire au niveau de la jonction neuro-musculaire. En faveur du rôle clé du stress oxydant dans la mort cellulaire induite par le 7β-OHC et le 7KC **(Nury, Zarrouk, et al., 2021)**, nos résultats obtenus sur des myoblastes C2C12 ont montré que le 7β-OHC et le 7KC induisent une surproduction d'ERO à la fois au niveau cellulaire total et au niveau mitochondrial. Ceci a pour conséquence une accumulation de produits d'oxydation des lipides et des protéines, tels que les diènes conjugués (DC), le malondialdéhyde (MDA), et les protéines carbonylées (PC), ainsi qu'une diminution de l'expression et de l'activité des principales enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx)). Ces résultats évoquent les effets pro-oxydants observés avec le 7β-OHC et le 7KC sur

différents types de cellules neuronales (oligodendrocytes murins 158 N, cellules microgliales murines BV-2, cellules neuronales murines N2a, et cellules de neuroblastome humaines SH-SY5Y) sur lesquelles l'activation du stress oxydant est à l'origine de la toxicité de ces oxystérols **((Hammouda et al., 2021) (Yammine, Zarrouk, et al., 2020) (Zarrouk et al., 2018))**.

Sur les cellules C2C12 ainsi que sur d'autres types cellulaires traitées par du 7β-OHC ou du 7KC, nous pouvons aussi penser que la surproduction d'ERO résulte de l'activation d'isoformes de NADPH oxydase **((Pedruzzi et al., 2004) (Nury et al., 2015))**. Comme la surproduction d'ERO et les dysfonctionnements mitochondriaux sont considérés comme des phénomènes majeurs impliqués dans la sénescence et le vieillissement **(Rufini et al., 2013)**, nos résultats soutiennent l'hypothèse que le 7β-OHC et le 7KC sont à même de contribuer au processus de vieillissement des cellules musculaires squelettiques. Le 7β-OHC ainsi que le 7KC via la surproduction d'ERO induiraient des altérations des structures mitochondriales et des protéines de la machinerie de fusion et de fission mitochondriale. Ceci pourrait favoriser non seulement une perte du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi m$) mais aussi une perturbation de la fonction de la chaîne respiratoire et une limitation de la production d'énergie, conduisant à la diminution de la production d'ATP observée dans notre étude. Par conséquent, dans les tissus à faible renouvellement cellulaire, comme le muscle squelettique, l'altération des mitochondries sous l'action du 7β-OHC et du 7KC pourrait avoir des effets néfastes importants sur la fonction musculaire.

Ces altérations fonctionnelles mitochondriales dans les cellules C2C12 sont associées à des modifications ultrastructurales révélées par la présence de mitochondries gonflées et de grande taille ; des altérations analogues ont également observées sur d'autres types cellulaires, comme les oligodendrocytes murins 158N, en présence d'oxystérols toxiques tels que le 7β-OHC et le 7KC **(Sghaier, Nury, et al., 2019)**. Il est suggéré que ces modifications contribuent à augmenter la surface des crêtes mitochondriales, qui sont le site de la phosphorylation oxydative pour la production d'ATP **(Quintana-Cabrera et al., 2018)**. Ces modifications ultrastructurales pourraient donc être considérées comme une réponse cellulaire visant à atténuer les dysfonctionnements énergétiques mitochondriaux et à prévenir la mort cellulaire et les principales activités peroxysomales nécessitant la production d'ATP, comme le transport via des transporteurs peroxysomaux ABCD spécifiques (ABCD1, ABCD2 et ABCD3) de divers types acides gras : acides gras à très longue chaîne (AGTLC ; nombre de carbone supérieur ou égal à 22), acide pristanique, acide di- et trihydroxy-cholestanoïque (DHCA et THCA) et acide dicarboxylique (DCA) **((Savary et al., 2012) (Kemp et al., 2011))**.

Comme les mitochondries, les peroxysomes, qui sont métaboliquement étroitement connectés aux mitochondries **(Lismont et al., 2015)**, sont une source d'ERO intracellulaires (principalement H_2O_2), et il est maintenant bien établi que les dysfonctionnements des peroxysomes augmentent la surproduction d'ERO et d'ERN et perturbent l'activité mitochondriale **((Pascual-Ahuir et al., 2017) (Nury et al., 2018))**. Sur des oligodendrocytes murins 158N, il a été montré que l'inactivation des transporteurs peroxysomaux ABCD1 et 2 associés à la β-oxydation peroxysomale, ainsi que d'ACOX1 et de MFP2, qui sont des enzymes centrales de la β-oxydation peroxysomale, favorise le stress oxydant et augmente la production d'ERO et d'ERN dans les cellules entières et/ou au niveau mitochondrial **(Baarine, Andréoletti, et al., 2012)**. Le peroxysome, en plus de son implication dans la régulation de l'homéostasie des ERO intervient dans le contrôle du métabolisme lipidique et de l'inflammation non cytokinique **(Baarine, Andréoletti, et al., 2012)**. Il a également été suggéré que le peroxysome pourrait jouer un rôle crucial dans le vieillissement cellulaire **(Titorenko & Terlecky, 2011)**. Cependant, nous savons encore très peu de choses sur le rôle des peroxysomes dans les cellules musculaires squelettiques dans des conditions normales et pathologiques.

La présente étude réalisée sur les myoblastes C2C12 montre clairement des altérations peroxysomales en présence du 7β-OHC et/ou du 7KC, qui se caractérisent par une densité peroxysomale réduite et un niveau faible du transporteur peroxysomal ABCD3 indiquant une diminution de la masse peroxysomale. Cette diminution de la masse peroxysomale est associée à une réduction de l'expression du gène codant pour la protéine Pex5, impliquée dans la biogenèse peroxysomale : Pex5 agit comme une navette pour l'import des protéines de la matrice peroxysomale **(W. Wang & Subramani, 2017)**. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que la diminution de la masse peroxysomale dans les myoblastes C2C12 traitées par le 7β-OHC et/ou le 7KC pourrait être la conséquence d'une induction de la pexophagie et d'une diminution de la biogenèse peroxysomale. Comme une diminution du niveau de Pex5 a été décrite au cours du vieillissement dans les neurones corticaux de cerveaux de souris mâles et femelles **(Uzor et al., 2020)**, nos données suggèrent que le 7β-OHC ou le 7KC pourrait également affecter le vieillissement dans les cellules musculaires squelettiques C2C12 non différenciées (myoblastes). De plus, en présence de 7β-OHC, nous avons également observé une augmentation des ARNm de deux peroxines, Pex13 et Pex14, qui sont également impliquées dans la biogenèse peroxysomale **(J.-Y. Wang et al., 2019)** et qui sont souvent déficientes dans la maladie de Zellweger, une peroxisomopathie rare et fatale **(Klouwer et al., 2015)**. Cependant, il a aussi été décrit que Pex14 peut contribuer à l'autophagie **(Jiang et al.,**

2015). Pex14 pourrait donc favoriser la pexophagie qui peut être induite par le 7β-OHC. De même, il a été montré que la peroxine Pex13 est impliquée dans la biogenèse des peroxysomes et associée à l'activation de l'autophagie sélective du virus Sindbis (virophagie) et à l'autophagie des mitochondries altérées (mitophagie) **(M. Y. Lee et al., 2017)**. Ainsi, sous l'effet du 7β-OHC, l'activation d'un processus de mitophagie impliquant Pex13 pourrait s'expliquer au moins en partie par le fait que cet oxystérol induit plusieurs dysfonctionnements mitochondriaux.

De plus, au niveau peroxysomal, des analyses par western blot ont montré une diminution de l'expression des enzymes peroxysomales ; ACOX1 et MFP2, impliquées dans la β-oxydation peroxysomale des AGTLC **(Wanders & Waterham, 2006)**. Ces résultats sont compatibles avec ceux des études réalisées sur les cellules nerveuses 158 N, BV-2 et N2a en présence de 7β-OHC et de 7KC **(Nury, Yammine, et al., 2021)**. Cette diminution de l'expression d'ACOX1 et MFP2 entraîne une diminution de la β-oxydation peroxysomale qui favorise une accumulation intracellulaire d'AGTLC pouvant contribuer à la lipotoxicité induite par le 7β-OHC : activation du stress oxydant et induction de la mort cellulaire **(Wanders et al., 2010)**.

Comme le 7β-OHC et le 7KC pourraient affecter et réduire le transport peroxysomal et la dégradation des AGTLC ($C \geq 22$), dont l'accumulation intracellulaire peut avoir des conséquences toxiques **((Unger & Orci, 2002) (Baarine, Andréoletti, et al., 2012))**, les niveaux d'AGTLC ont été mesurés par GC-MS et l'indice d'activité élongase de l'enzyme ELOVL1 associée au métabolisme des AGTLC, a été déterminé **(Amery et al., 2000)**. L'accumulation des AGTLC pourraient contribuer à la dystrophie musculaire liée à l'âge (sarcopénie) car certains acides gras se comportent comme des inhibiteurs métaboliques, des découpleurs de la phosphorylation oxydative et des inducteurs de la transition de perméabilité membranaire **(Cecatto et al., 2020)**.

D'un point de vue ultrastructural, les résultats sur les myoblastes C2C12 traités au 7β-OHC évoquent ceux obtenus sur les oligodendrocytes murins 158N, lorsque ces derniers ont été cultivés avec du 7β-OHC ou du 7KC **(Nury, Yammine, et al., 2021)** : les peroxysomes sont hétérogènes en morphologie et en taille et sont souvent présents dans des vacuoles dont le nombre est augmenté par rapport aux cellules non traitées. Dans les laboratoires de pathologie hospitaliers hautement spécialisés, ces modifications ultrastructurales peroxysomales pourraient servir de biomarqueurs de la toxicité des oxystérols dans les tissus de différents organes. La microscopie électronique pourrait exceptionnellement être un outil permettant de consolider une hypothèse physiopathologique pour aborder les altérations peroxysomales. La

présence de vacuoles contenant des peroxysomes altérés suggère un processus de pexophagie comme cela a été démontré dans les cellules 158 N traitées par le 7KC **(Nury et al., 2018)**.

Par ailleurs, sur les myoblastes C2C12, le 7β-OHC et le 7KC ont induit un type de mort cellulaire non-apoptotique indépendante des caspases. Des critères apoptotiques n'ont pas été observés : absence de noyaux condensés et / ou fragmentés, absence de caspase-3 clivée et de PARP clivée. L'utilisation de l'inhibiteur pan-caspase z-VAD-fmk n'augmente pas le pourcentage de cellules mortes. Par contre, des critères autophagiques ont été observés : présence de plusieurs vacuoles de grandes tailles considérées comme des vacuoles autophagiques dans presque toutes les cellules traitées avec le 7β-OHC et le 7KC (50 μM), et augmentation du rapport [LC3-II / LC3-I]. Ces résultats sont compatibles avec les résultats obtenus sur les cellules de glioblastome C6 traitées avec le 7β-OHC **(Sassi et al., 2019)**. De plus, la rapamycine, un inducteur autophagique, réduit l'autophagie induite par le 7β-OHC et le 7KC alors que la 3-méthyladénine, un inhibiteur autophagique, la stimule. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Yuan et al. montrant une autophagie de survie sur des cellules THP-1 traitées par un mélange de 7β-OHC et de 7KC soulignant l'importance de l'autophagie dans la lutte contre le stress cellulaire et la mort cellulaire dans l'athérosclérose **(Yuan et al., 2016)**. Sur cellules N2a traitées par du 7KC, une autophagie de survie a aussi été démontré **(Yammine, Zarrouk, et al., 2020)**. Actuellement, plusieurs études sont en faveur de l'activation d'une autophagie de survie sous l'effet des oxystérols (7β-OHC, 7KC) **(C. He et al., 2013)** qui induisent un type de mort particulier, connue sous le nom d'oxyapoptophagie incluant du stress oxydant, de l'apoptose et des critères d'autophagie sur certaines cellules **(Nury, Zarrouk, et al., 2021)**. En revanche, sur cellules C2C12, le 7β-OHC et le 7KC induisent une augmentation du stress oxydant, de la peroxydation lipidique, et une autophagie de survie sans apoptose (mort cellulaire indépendante des caspases). Le stress oxydant s'accompagnait d'une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes dont GPx4. Les caractéristiques de cette mort (stress oxydant, peroxydation lipidique, diminution des défenses antioxydantes (GPx, GPx4 total et mitochondrial), inhibtion par la déféroxamine) sont en faveur d'une mort cellulaire par ferroptose **((C. Li et al., 2018) (R.-P. Zhou et al., 2020) (T. Zhao et al., 2021))**.

Il a été rapporté que le fer régule certaines morts cellulaires programmées, telles que l'apoptose **(G. S. Wang et al., 1999)** et l'autophagie **(Lunova et al., 2014)**. Récemment, il a été décrit que la surcharge en fer était impliquée dans la ferroptose, une forme de mort cellulaire récemment décrite, qui conduit ensuite à plusieurs états pathologiques, dont l'hémochromatose **(H. Wang et al., 2017)** et la cardiomyopathie **(X et al., 2019)**. Par conséquent, il n'est pas

surprenant que la ferroptose puisse jouer un rôle dans l'altération de la fonction musculaire squelettique. Le muscle squelettique, qui contient 10 à 15 % de la quantité totale en fer de l'organisme, utilise principalement ce micronutriment pour les enzymes indispensables au métabolisme oxydatif, notamment la myoglobine, qui assure l'approvisionnement en oxygène de la cellule musculaire, ainsi que pour les enzymes impliquées dans le catabolisme mitochondrial **(Dziegala et al., 2018)**. Les évènements associés à la ferroptose, comme l'augmentation des produits de peroxydation lipidique **(Dixon et al., 2012)**, contribuent à la mort cellulaire. Dans la présente étude, la peroxydation lipidique a été mise en évidence par des taux élevés de MDA et de DC, qui sont tous deux considérés comme des produits de la peroxydation lipidique. De plus, la GPx4, en raison de son activité unique pour empêcher la peroxydation incontrôlée des phospholipides, est consiédé comme un biomarqueur de la ferroptose et cette enzyme est fortement altérée dans la mort ces cellules C2C12 traitées avec le 7β-OHC et le 7KC. L'ensemble des résultats obtenus concordent pour conclure que la mort induire par le 7β-OHC et le 7KC sur C2C12 est une mort par ferroptose.

Selon les résultats obtenus sur les myoblastes C2C12, prévenir la toxicité du 7β-OHC et du 7KC reste un enjeu majeur **(Nury, Yammine, et al., 2021)**. A cet effet, identifier de molécules ou mélanges de molécules naturelles ou synthétiques capables d'inhiber la toxicité induite par le 7β-OHC et le 7KC a un intérêt crucial. En effet, à l'heure actuelle, seules quelques molécules naturelles (α-tocophérol, acide docosahexaénoïque (DHA), biotine) ou synthétiques (fumarate de diméthyle (DMF), fumarate de monométhyle (MMF)) ainsi que certaines huiles (olive, nigelle, argan, chardon-marie, lentisque) inhibant la toxicité du 7β-OHC et du 7KC ont été identifiées **(Nury, Yammine, et al., 2021)**. Nos résultats montrent clairement que les deux huiles Méditerranéennes caractérisées par leur fort pouvoir antioxydant (MTSO, PLSO) réduisent la toxicité du 7β-OHC et du 7KC sur les cellules vasculaires, nerveuses et musculaires. D'un point de vue nutritionnel, ces huiles, riches en α-tocophérol **(Zarrouk et al., 2019)**, présentent un intérêt pour prévenir et/ou ralentir le développement de maladies fréquentes liées à l'âge : maladies cardiovasculaires, neurodégénératives et sarcopénie. D'après les résultats présentés dans notre étude, les concentrations en α-tocophérol apportées par le PLSO et le MTSO dans le milieu de culture sont respectivement de 15 et 44 nmoles/L. Il est donc peu probable que la cytoprotection puisse être due à l'α-tocophérol. Il est cependant important de noter que les effets cytoprotecteurs observés avec le PLSO ainsi que le MTSO sont similaires et sont comparables à l'α-tocophérol, utilisé à haute concentration (400 µM). Par conséquent, d'autres molécules ayant des activités cytoprotectrices potentielles doivent être

prises en considération et des activités synergiques entre ces molécules (acides gras, polyphénols, tocophérols) doivent être envisagées en raison de la capacité de ces composés à agir simultanément sur plusieurs voies de signalisation impliquées dans la toxicité du 7β-OHC et du 7KC **(Nury, Yammine, et al., 2021)**.

Comme les acides gras, en particulier l'acide oléique, sont les principaux composés de la PLSO mais aussi de la MTSO **((Zarrouk et al., 2019) (Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2021))**, l'évaluation de leur capacité à prévenir la mort cellulaire induite par les oxystérols est un point majeur. Comme il a été précédemment montré que l'acide oléique a une activité cytoprotectrice contre le 7KC **(Debbabi et al., 2017)**, cela pourrait être également le cas contre le 7β-OHC. L'hypothèse a donc été émise que la cytoprotection observée avec le MTSO ainsi que le PLSO pourrait être la conséquence d'une estérification du 7KC et du 7β-OHC par l'acide oléique sur le carbone 3 **(Monier et al., 2003)**. Cette hypothèse pourrait expliquer des activités cytoprotectrices similaires avec le MTSO et le PLSO. De plus, comme l'acide oléique induit la formation de gouttelettes lipidiques sur les cellules microgliales murines BV-2 **(Debbabi et al., 2017)** et que les gouttelettes lipidiques peuvent réduire le stress oxydant et la lipotoxicité **((Bailey et al., 2015) (Pressly et al., 2022))**, il était important de déterminer si le MTSO, qui est riche en acide oléique, était capable d'induire la formation de gouttelettes lipidiques. L'hypothèse d'un effet cytoprotecteur du MTSO, ainsi que de l'α-tocophérol, impliquant la formation de gouttelettes lipidiques est exclue puisqu'aucune gouttelette positive pour l'Oil Red O n'a été observée dans nos différentes conditions de culture sauf en présence d'acide oléique (utilisé comme contrôle positif) et de 7β-OHC. Avec les oxystérols cytotoxiques, le 24S-OHC, le 25-OHC **(Suzuki et al., 2021)**, et le 7KC **(Calle et al., 2019)**, qui modifie également le ratio (lipides polaires/lipides neutres) **((Kahn et al., 2005) (Vejux et al., 2005))**, la présence de gouttelettes lipidiques a été précédemment rapportée. Par conséquent, avec les oxystérols cytotoxiques, dont le 7β-OHC, la présence de gouttelettes lipidiques pourrait être considérée comme une réponse au stress oxydant. D'après nos résultats, l'absence de gouttelettes lipidiques avec le MTSO est un point d'importance majeures. En effet, une cytoprotection avec des composés lipidiques ne conduisant pas à la formation de gouttelettes lipidiques est peu susceptible de conduire *in vivo* à une stéatose indésirable dans différents types de cellules. De plus, alors que le MTSO et le PLSO ont plusieurs points communs en termes d'activités cytoprotectrices **(Ghzaiel, Zarrouk, et al., 2021)**, nous avons également observé que le PLSO diminue plus efficacement que le MTSO l'accumulation cellulaire de 7β-OHC et de 7KC. Nous pouvons donc supposer que dans les traitements à long terme nécessaires pour prévenir le

développement de maladies liées à l'âge associées à des niveaux accrus de 7β-OHC et/ou de 7KC, l'efficacité cytoprotectrice de PLSO pourrait être supérieure à celle de MTSO.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

La sarcopénie est considérée comme un problème de santé publique majeur en raison de la proportion de personnes âgées qui ne cesse d'augmenter dans le monde.

❖ **Au niveau de l'étude clinique, cette étude confirme que :**

- ✓ La sarcopénie est associée à un stress oxydant : augmentation significative de l'activité des enzymes antioxydantes (GPX, SOD, CAT) érythrocytaires, des marqueurs lipidiques et protéiques plasmatiques et/ou érythrocytaires (DC, MDA, PC). Par ailleurs, une augmentation significative des teneurs sériques et/ou plasmatiques en marqueurs d'inflammation non spécifique (TNF-α, IL-6, IL-8, LTB-4) et spécifique (apeline) a été observé.
- ✓ Les facteurs nutritionnels jouent un rôle important dans le développement de la sarcopénie. La population étudiée a montré une augmentation significative des teneurs érythrocytaires en AGPI n-6 et en AGT.

Cette étude clinique a aussi montré :

- ✓ Des augmentations plasmatique d'oxystérols, et en particulier de ceux oxydés en C7 (7KC et 7β-OHC), formés par auto-oxydation du cholestérol. Ceci est en accord avec la rupture de l'équilibre RedOx observée chez les malades sarcopéniques.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons résumer l'étude clinique comme suit :

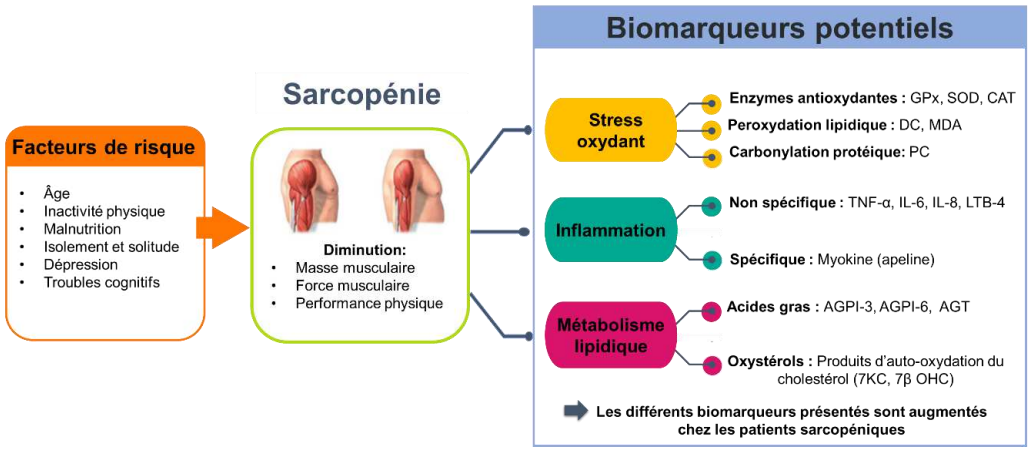


Figure 78 : Schéma récapitulatif des résultats de l'étude clinique.

Plusieurs perspectives sont envisagées pour l'étude clinique :

- Augmenter le nombre de cas étudiés,
- Mieux structurer l'étude : équilibrer les tranches d'âge entre sarcopéniques et non sarcopéniques, en sexe ratio, …
- Augmenter les paramètres pris en compte :
  - paramètres de défenses antioxydantes : paramètres non enzymatiques (vitamine C, vitamine E et GSH),
  - myokines : myostatin, myonectine, irisine, décorine,
  - paramètres lipidiques : prendre en compte plus d'oxystérols, en particulier ceux associés à l'inflammation.

❖ **Au niveau de l'étude *in vitro*, les résultats montrent que** :

✓ Le 7β-OHC et le 7KC sont toxiques sur les myoblastes et les myotubes : le 7β-OHC est plus toxique que le 7KC.

✓ Le 7β-OHC et le 7KC induisent un déséquilibre de l'équilibre RedOx caractérisé par une surproduction d'ERO, une diminution de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, GPx), une augmentation des produits de la péroxydation lipidique (MDA, DC) et de la carbonylation protéique (PC). Ces caractéristiques évoquent le stress oxydant observé dans la sarcopénie.

✓ Le 7β-OHC et le 7KC induisent des dysfonctionnements des organites (mitochondrie, peroxysome).

- La biogenèse peroxysomale est diminuée ainsi que la β-oxydation peroxysomale,
- La biogenèse et la dynamique mitochondriale sont perturbées ; le taux d'ATP est diminué, le cycle de Krebs est altéré et l'expression de certaines protéines (Tfam1, Nrf1, AMPK α1, Sirt3) est perturbé .

⇨ Ces altérations des mitochondries évoquent la perte de force musculaire observée dans la sarcopénie. Le peroxysome altéré pourrait être impliqué dans la rupture de l'équilibre RedOx.

✓ Le 7β-OHC et le 7KC diminuent la viabilité des myoblastes par une mort cellulaire présentant de nombreuses caractéristiques de ferroptose. Cette diminution de

viabilité pourrait contribuer à la diminution de la masse musculaire dans la sarcopénie.

- ✓ Le 7β-OHC et le 7KC activent aussi une autophagie de survie.
- ✓ Par ailleurs, l'étude montre des effets cytoprotecteurs de PLSO et MTSO.
  - Le co-traitement avec les huiles PLSO et MTSO réduit significativement les effets toxiques du 7β-OHC et du 7KC.
  - Différents nutriments pourraient être impliqués dans la cytoprotection associée à PLSO et MTSO: acides gras, phytostérols, polyphénols, et tocophérols. Il est donc suggéré qu'un régime associé à ces huiles Méditerranéennes ou incluant leurs nutriments pourrait prévenir et atténuer les symptômes de la sarcopénie.
  - PLSO et MTSO ont des effets mitoprotecteurs (mitothérapie) et pexoprotecteurs (pexothérapie).
  - Le MitoTempol, antioxydant mitochondrial (contrairement au MitoQ ; analogue de co-enzyme Q10) réduit fortement la toxicité du 7β-OHC et du 7KC.

⇨ Dans un contexte nutraceutique, la biodisponibilité et l'efficacité des composés présents dans le PLSO et le MTSO pourraient être améliorées à l'aide de plusieurs stratégies. Ces dernières pourraient inclure des stratégies de micro- et nano-encapsulation, des nanothérapies ciblant les organites (Targeted Organelle Nano Therapy (TORN)) / TORN thérapie **((Brahmi et al., 2019) (Badreddine et al., 2020))** et la conception d'aliments fonctionnels.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons résumer l'étude *in vito* par la **Figure 79**.

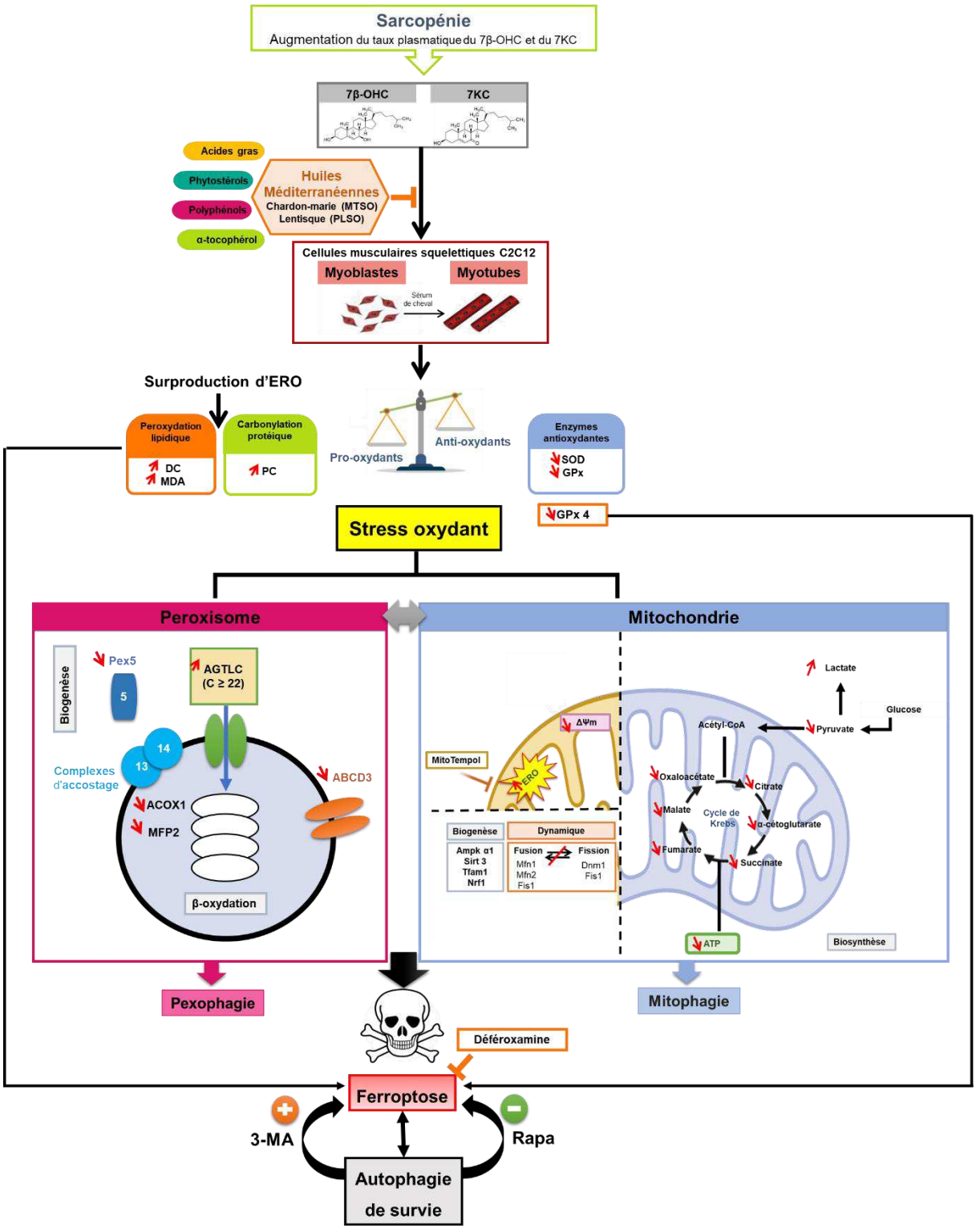


Figure 79: Schéma récapitulatif des résultats de l'étude *in vitro*. *Sur cellules C2C12, le 7β-OHC et le 7KC induisent une mort cellulaire indépendante des caspases avec des caractéristiques de ferroptose associée à l'autophagie de survie.*

Compte tenu des résultats obtenus *in vitro*, ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives.

- L'induction de mort par ferroptose observée sur cellules C2C12 en présence du 7β-OHC et du 7KC est un point fort de l'étude. Il est nécessaire de mieux caractériser ce type de mort étroitement liée au stress oxydant pour identifier les voies métaboliques impliquées et les cibles pharmacologiques.
- L'utilisation de biopsie de muscles de sujets sarcopéniques est envisagée pour appréhender le concept de mort des cellules musculaires squelettiques par ferroptose chez les sujets sarcopéniques ayant des taux élevés de 7β-OHC et de 7KC.
- En utilisant des cellules monocytaires humaines THP1 sur lesquelles le 7β-OHC et le 7KC induisent de l'apoptose, nous déterminerons si le PLSO et le MTSO ont encore des activités cytoprotectrices. Ceci permettra de définir si la cytoprotection de PLSO et MTSO est active à la fois sur une mort cellulaire indépendante et dépendante des caspases.
- Le mécanisme de cytoprotection des huiles pourrait être précisé. La part prise par l'estérification des oxystérols par les acides gras pourrait être évaluée en utilisant du tamoxifène qui est un inhibiteur d'ACAT (acyl-cholestérol acétyl transférase). L'implication des tocophérols pourrait être abordée en quantifiant la concentration intracellulaire de tocophérol et leur accumulation préférentielle dans la membrane plasmique (en particulier les radeaux lipidiques pour l'α-tocophérol). De la même façon, l'implication des polyphénols pourrait être évaluée en quantifiant leur concentration intracellulaire.
- Une étude *in vivo* pourrait être envisagée sur des souris recevant une nourriture supplémentée en PLSO et MTSO afin de déterminer si ces huiles :
    - préviennent la diminution de la force musculaire au cours du vieillissement (test d'aggrippement) ainsi que la diminution de la masse musculaire,
    - ont un impact sur le métabolisme des cellules musculaires squelettiques (activités des organites, synthèse protéique, autophagie).
- Une étude nutritionnelle contrôlée en milieu médicalisé est aussi envisageable pour montrer les bienfaits d'un régime associé aux huiles étudiées (PLSO et MTSO) chez les personnes âgées.
- Pour les études envisagées avec les huiles, la qualité de ces dernières (profil en nutriments devra être déterminée) et leur stabilité prise en compte.

Sur la base des résultats obtenus, il est aussi important de continuer à explorer :

- le rôle du peroxysome dans le vieillissement **(J. Kim & Bai, 2022)**,
- le rôle des oxystérols dans le vieillissement **((Zarrouk et al., 2014) (Shokr et al., 2021) (de Medina et al., 2022))**.

BIBLIOGRAPHIE

Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., & Capasso, F. (2010). Milk thistle in liver diseases : Past, present, future. *Phytotherapy Research*, *24*(10), 1423-1432. https://doi.org/10.1002/ptr.3207

Adhihetty, P. J., Ljubicic, V., & Hood, D. A. (2007). Effect of chronic contractile activity on SS and IMF mitochondrial apoptotic susceptibility in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *292*(3), E748-E755. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00311.2006

Aguilera, C. M., Ramírez-Tortosa, M. C., Mesa, M. D., & Gil, A. (2000). Do MUFA and PUFA have beneficial effects on the development of cardiovascular disease? *Recent Research Developments in Lipids*, *4*(2), 369-390.

Akimoto, T., Pohnert, S. C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P. B., Williams, R. S., & Yan, Z. (2005). Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(20), 19587-19593. https://doi.org/10.1074/jbc.M408862200

Akiyama, H. (2020). Aging well : An update. *Nutrition Reviews*, *78*(12 Suppl 2), 3-9. https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa084

Alemán, H., Esparza, J., Ramirez, F. A., Astiazaran, H., & Payette, H. (2011). Longitudinal evidence on the association between interleukin-6 and C-reactive protein with the loss of total appendicular skeletal muscle in free-living older men and women. *Age and Ageing*, *40*(4), 469-475. https://doi.org/10.1093/ageing/afr040

Altun, M., Besche, H. C., Overkleeft, H. S., Piccirillo, R., Edelmann, M. J., Kessler, B. M., Goldberg, A. L., & Ulfhake, B. (2010). Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(51), 39597-39608. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.129718

Altun, M., Edström, E., Spooner, E., Flores-Moralez, A., Bergman, E., Tollet-Egnell, P., Norstedt, G., Kessler, B. M., & Ulfhake, B. (2007). Iron load and redox stress in skeletal muscle of aged rats. *Muscle & Nerve*, *36*(2), 223-233. https://doi.org/10.1002/mus.20808

Amery, L., Fransen, M., Nys, K. D., Mannaerts, G. P., & Veldhoven, P. P. V. (2000). Mitochondrial and peroxisomal targeting of 2-methylacyl-CoA racemase in humans. *Journal of Lipid Research*, *41*(11), 1752-1759. https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31968-4

Ammari, M., Othman, H., Hajri, A., Sakly, M., & Abdelmelek, H. (2018). Pistacia lentiscus oil attenuates memory dysfunction and decreases levels of biomarkers of oxidative stress induced by lipopolysaccharide in rats. *Brain Research Bulletin*, *140*, 140-147. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.04.014

Amodio, G., Moltedo, O., Faraonio, R., & Remondelli, P. (2018). Targeting the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response to Counteract the Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2018*, 4946289. https://doi.org/10.1155/2018/4946289

Amtul, Z., Uhrig, M., Wang, L., Rozmahel, R. F., & Beyreuther, K. (2012). Detrimental effects of arachidonic acid and its metabolites in cellular and mouse models of Alzheimer's disease : Structural insight. *Neurobiology of Aging*, *33*(4), 831.e21-31. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.07.014

Anderson, A., Campo, A., Fulton, E., Corwin, A., Jerome, W. G., & O'Connor, M. S. (2020). 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox Biology*, *29*, 101380. https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101380

Andersson, D. C., Betzenhauser, M. J., Reiken, S., Meli, A. C., Umanskaya, A., Xie, W., Shiomi, T., Zalk, R., Lacampagne, A., & Marks, A. R. (2011). Ryanodine Receptor Oxidation Causes

Intracellular Calcium Leak and Muscle Weakness in Aging. *Cell metabolism*, *14*(2), 196-207. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.05.014

Argilés, J. M., & Stemmler, B. (2013). The potential of ghrelin in the treatment of cancer cachexia. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *13*(1), 67-76. https://doi.org/10.1517/14712598.2013.727390

Baarine, M., Andréoletti, P., Athias, A., Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Vejux, A., Riedinger, J.-M., Kattan, Z., Bessede, G., Trompier, D., Savary, S., Cherkaoui-Malki, M., & Lizard, G. (2012). Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid—Treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience*, *213*, 1-18. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.058

Baarine, M., Ragot, K., Athias, A., Nury, T., Kattan, Z., Genin, E. C., Andreoletti, P., Ménétrier, F., Riedinger, J.-M., Bardou, M., & Lizard, G. (2012). Incidence of Abcd1 level on the induction of cell death and organelle dysfunctions triggered by very long chain fatty acids and TNF-α on oligodendrocytes and astrocytes. *NeuroToxicology*, *33*(2), 212-228. https://doi.org/10.1016/j.neuro.2011.10.007

Bach-Faig, A., Berry, E. M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S., Medina, F. X., Battino, M., Belahsen, R., Miranda, G., Serra-Majem, L., & Mediterranean Diet Foundation Expert Group. (2011). Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutrition*, *14*(12A), 2274-2284. https://doi.org/10.1017/S1368980011002515

Badreddine, A., Zarrouk, A., Meddeb, W., Nury, T., Rezig, L., Debbabi, M., Bessam, F. Z., Brahmi, F., Vejux, A., Mejri, M., Nasser, B., & Lizard, G. (2020). Chapter 10 - Antioxidant and neuroprotective properties of Mediterranean oils : Argan oil, olive oil, and milk thistle seed oil. In C. R. Martin & V. R. Preedy (Éds.), *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases* (p. 143-154). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817780-8.00010-4

Bailey, A. P., Koster, G., Guillermier, C., Hirst, E. M. A., MacRae, J. I., Lechene, C. P., Postle, A. D., & Gould, A. P. (2015). Antioxidant Role for Lipid Droplets in a Stem Cell Niche of Drosophila. *Cell*, *163*(2), 340-353. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.020

Balagopal, P., Rooyackers, O. E., Adey, D. B., Ades, P. A., & Nair, K. S. (1997). Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *273*(4), E790-E800. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.4.E790

Ballabio, A., & Bonifacino, J. S. (2020). Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(2), 101-118. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0185-4

Bano, G., Trevisan, C., Carraro, S., Solmi, M., Luchini, C., Stubbs, B., Manzato, E., Sergi, G., & Veronese, N. (2017). Inflammation and sarcopenia : A systematic review and meta-analysis. *Maturitas*, *96*, 10-15. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.11.006

Barreiro, E. (2016). Role of Protein Carbonylation in Skeletal Muscle Mass Loss Associated with Chronic Conditions. *Proteomes*, *4*(2), 18. https://doi.org/10.3390/proteomes4020018

Barreiro, E., Coronell, C., Laviña, B., Ramírez-Sarmiento, A., Orozco-Levi, M., Gea, J., & PENAM Project. (2006). Aging, sex differences, and oxidative stress in human respiratory and limb muscles. *Free Radical Biology & Medicine*, *41*(5), 797-809. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.027

Barry, E., Galvin, R., Keogh, C., Horgan, F., & Fahey, T. (2014). Is the Timed Up and Go test a useful predictor of risk of falls in community dwelling older adults : A systematic review and meta-analysis. *BMC Geriatrics*, *14*, 14. https://doi.org/10.1186/1471-2318-14-14

Bassene, E. (2012). *Initiation a la recherche sur les substances naturelles : Extraction - analyse - essais biologiques*. Presses Universitaires de Dakar.

Bauer, J. M., Verlaan, S., Bautmans, I., Brandt, K., Donini, L. M., Maggio, M., McMurdo, M. E. T., Mets, T., Seal, C., Wijers, S. L., Ceda, G. P., De Vito, G., Donders, G., Drey, M., Greig, C., Holmbäck, U., Narici, M., McPhee, J., Poggiogalle, E., … Cederholm, T. (2015). Effects of a vitamin D and leucine-enriched whey protein nutritional supplement on measures of sarcopenia in older adults, the PROVIDE study : A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, *16*(9), 740-747. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2015.05.021

Baumgart, E., Vanhorebeek, I., Grabenbauer, M., Borgers, M., Declercq, P. E., Fahimi, H. D., & Baes, M. (2001). Mitochondrial Alterations Caused by Defective Peroxisomal Biogenesis in a Mouse Model for Zellweger Syndrome (PEX5 Knockout Mouse). *The American Journal of Pathology*, *159*(4), 1477-1494. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62534-5

Baumgartner, R. N., Koehler, K. M., Gallagher, D., Romero, L., Heymsfield, S. B., Ross, R. R., Garry, P. J., & Lindeman, R. D. (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American Journal of Epidemiology*, *147*(8), 755-763. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009520

Bautmans, I., Onyema, O., Van Puyvelde, K., Pleck, S., & Mets, T. (2011). Grip work estimation during sustained maximal contraction : Validity and relationship with dependency and inflammation in elderly persons. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *15*(8), 731-736. https://doi.org/10.1007/s12603-010-0317-1

Bazan, N. G. (2005). Neuroprotectin D1 (NPD1) : A DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *15*(2), 159-166. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2005.tb00513.x

Beal, M. F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radical Biology & Medicine*, *32*(9), 797-803. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00780-3

Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, *44*(1), 276-287. https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8

Beaudart, C., McCloskey, E., Bruyère, O., Cesari, M., Rolland, Y., Rizzoli, R., Araujo de Carvalho, I., Amuthavalli Thiyagarajan, J., Bautmans, I., Bertière, M.-C., Brandi, M. L., Al-Daghri, N. M., Burlet, N., Cavalier, E., Cerreta, F., Cherubini, A., Fielding, R., Gielen, E., Landi, F., … Cooper, C. (2016). Sarcopenia in daily practice : Assessment and management. *BMC Geriatrics*, *16*, 170. https://doi.org/10.1186/s12877-016-0349-4

Bechet, D., Tassa, A., Taillandier, D., Combaret, L., & Attaix, D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(10), 2098-2114. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.029

Beehler, B. C., Sleph, P. G., Benmassaoud, L., & Grover, G. J. (2006). Reduction of Skeletal Muscle Atrophy by a Proteasome Inhibitor in a Rat Model of Denervation. *Experimental Biology and Medicine*, *231*(3), 335-341. https://doi.org/10.1177/153537020623100315

Bellanti, F., Buglio, A. L., & Vendemiale, G. (2020). Chapter 9—Oxidative stress and sarcopenia. In V. R. Preedy & V. B. Patel (Éds.), *Aging (Second Edition)* (p. 95-103). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818698-5.00009-2

Bellanti, F., Lo Buglio, A., & Vendemiale, G. (2021). Mitochondrial Impairment in Sarcopenia. *Biology*, *10*(1), 31. https://doi.org/10.3390/biology10010031

Bellanti, F., Romano, A. D., Lo Buglio, A., Castriotta, V., Guglielmi, G., Greco, A., Serviddio, G., & Vendemiale, G. (2018). Oxidative stress is increased in sarcopenia and associated with

cardiovascular disease risk in sarcopenic obesity. *Maturitas*, *109*, 6-12. https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.12.002

Benavent-Caballer, V., Sendín-Magdalena, A., Lisón, J. F., Rosado-Calatayud, P., Amer-Cuenca, J. J., Salvador-Coloma, P., & Segura-Ortí, E. (2016). Physical factors underlying the Timed "Up and Go" test in older adults. *Geriatric Nursing*, *37*(2), 122-127. https://doi.org/10.1016/j.gerinurse.2015.11.002

Bénétos, A. (2015). Les hypertendus de plus de 80ans vivant en EHPAD : Sont-ils sur-traités ? *NPG Neurologie - Psychiatrie - Gériatrie*, *15*(86), 89-93. https://doi.org/10.1016/j.npg.2014.10.002

Beregi, E., Regius, O., Hüttl, T., & Göbl, Z. (1988). Age-related changes in the skeletal muscle cells. *Zeitschrift Fur Gerontologie*, *21*(2), 83-86.

Berthier, A., Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Monier, S., Athias, A., Bessède, G., Pais de Barros, J.-P., Laubriet, A., Gambert, P., Lizard, G., & Néel, D. (2004). Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, *11*(8), 897-905. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401434

Bevilacqua, L., Ramsey, J. J., Hagopian, K., Weindruch, R., & Harper, M.-E. (2004). Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *286*(5), E852-861. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00367.2003

Bezine, M., Namsi, A., Sghaier, R., Ben Khalifa, R., Hamdouni, H., Brahmi, F., Badreddine, I., Mihoubi, W., Nury, T., Vejux, A., Zarrouk, A., de Sèze, J., Moreau, T., Nasser, B., & Lizard, G. (2018). The effect of oxysterols on nerve impulses. *Biochimie*, *153*, 46-51. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.04.013

Bian, A.-L., Hu, H.-Y., Rong, Y.-D., Wang, J., Wang, J.-X., & Zhou, X.-Z. (2017). A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF-α. *European Journal of Medical Research*, *22*, 25. https://doi.org/10.1186/s40001-017-0266-9

Bijak, M. (2017). Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (Silybum marianum L. Gaernt.)—Chemistry, Bioavailability, and Metabolism. *Molecules*, *22*(11), 1942. https://doi.org/10.3390/molecules22111942

Bodine, S. C., Stitt, T. N., Gonzalez, M., Kline, W. O., Stover, G. L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J. C., Glass, D. J., & Yancopoulos, G. D. (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology*, *3*(11), 1014-1019. https://doi.org/10.1038/ncb1101-1014

Boffoli, D., Scacco, S. C., Vergari, R., Solarino, G., Santacroce, G., & Papa, S. (1994). Decline with age of the respiratory chain activity in human skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1226*(1), 73-82. https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90061-2

Bohnert, K. R., McMillan, J. D., & Kumar, A. (2018). Emerging roles of ER stress and unfolded protein response pathways in skeletal muscle health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(1), 67-78. https://doi.org/10.1002/jcp.25852

Bonaccio, M., Di Castelnuovo, A., Costanzo, S., Gialluisi, A., Persichillo, M., Cerletti, C., Donati, M. B., de Gaetano, G., & Iacoviello, L. (2018). Mediterranean diet and mortality in the elderly : A prospective cohort study and a meta-analysis. *The British Journal of Nutrition*, *120*(8), 841-854. https://doi.org/10.1017/S0007114518002179

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants : Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, *186*, 343-355. https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-i

Bouyahya, A., Dakka, N., Talbaoui, A., Naima, E., Abrini, J., & Bakri, Y. (2018). *Phenolic contents and antiradical capacity of vegetable oil from Pistacia lentiscus (L)*. *9*.

Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *The Biochemical Journal*, *134*(3), 707-716. https://doi.org/10.1042/bj1340707

Brahmi, F., Haddad, S., Bouamara, K., Yalaoui-Guellal, D., Prost-Camus, E., de Barros, J.-P. P., Prost, M., Atanasov, A. G., Madani, K., Boulekbache-Makhlouf, L., & Lizard, G. (2020). Comparison of chemical composition and biological activities of Algerian seed oils of Pistacia lentiscus L., Opuntia ficus indica (L.) mill. And Argania spinosa L. Skeels. *Industrial Crops and Products*, *151*, 112456. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112456

Brahmi, F., Vejux, A., Sghaier, R., Zarrouk, A., Nury, T., Meddeb, W., Rezig, L., Namsi, A., Sassi, K., Yammine, A., Badreddine, I., Vervandier-Fasseur, D., Madani, K., Boulekbache-Makhlouf, L., Nasser, B., & Lizard, G. (2019). Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59*(19), 3179-3198. https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1491828

Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1830*(5), 3289-3303. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020

Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S.-S. (2004). Calcium, ATP, and ROS : A mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *287*(4), C817-C833. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004

Brooks-Wilson, A. R. (2013). Genetics of healthy aging and longevity. *Human Genetics*, *132*(12), 1323-1338. https://doi.org/10.1007/s00439-013-1342-z

Brunk, U. T., & Terman, A. (2002). The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging : Accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *European Journal of Biochemistry*, *269*(8), 1996-2002. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02869.x

Buchman, A. S., Boyle, P. A., Yu, L., Shah, R. C., Wilson, R. S., & Bennett, D. A. (2012). Total daily physical activity and the risk of AD and cognitive decline in older adults. *Neurology*, *78*(17), 1323-1329. https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182535d35

Buckinx, F., Landi, F., Cesari, M., Fielding, R. A., Visser, M., Engelke, K., Maggi, S., Dennison, E., Al-Daghri, N. M., Allepaerts, S., Bauer, J., Bautmans, I., Brandi, M. L., Bruyère, O., Cederholm, T., Cerreta, F., Cherubini, A., Cooper, C., Cruz-Jentoft, A., … Kanis, J. A. (2018). Pitfalls in the measurement of muscle mass : A need for a reference standard. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *9*(2), 269-278. https://doi.org/10.1002/jcsm.12268

Buettner, D., & Skemp, S. (2016). Blue Zones. *American Journal of Lifestyle Medicine*, *10*(5), 318-321. https://doi.org/10.1177/1559827616637066

Bułdak, Ł., Łabuzek, K., Bułdak, R. J., Kozłowski, M., Machnik, G., Liber, S., Suchy, D., Duława-Bułdak, A., & Okopień, B. (2014). Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS-stimulated human monocytes/macrophages. *Pharmacological Reports*, *66*(3), 418-429.

Buttari, B., Segoni, L., Profumo, E., D'Arcangelo, D., Rossi, S., Facchiano, F., Businaro, R., Iuliano, L., & Riganò, R. (2013). 7-Oxo-cholesterol potentiates pro-inflammatory signaling in human M1 and M2 macrophages. *Biochemical Pharmacology*, *86*(1), 130-137. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.04.008

Cade, W. T., & Yarasheski, K. E. (2006). Metabolic and Molecular Aspects of Sarcopenia. In M. S. Runge & C. Patterson (Éds.), *Principles of Molecular Medicine* (p. 529-534). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-963-9_50

Calle, P., Muñoz, A., Sola, A., & Hotter, G. (2019). CPT1a gene expression reverses the inflammatory and anti-phagocytic effect of 7-ketocholesterol in RAW264.7 macrophages. *Lipids in Health and Disease*, *18*(1), 215. https://doi.org/10.1186/s12944-019-1156-7

Capel, F., Rimbert, V., Lioger, D., Diot, A., Rousset, P., Mirand, P. P., Boirie, Y., Morio, B., & Mosoni, L. (2005). Due to reverse electron transfer, mitochondrial H2O2 release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mechanisms of Ageing and Development*, *126*(4), 505-511. https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.11.001

Carlson, M. E., Suetta, C., Conboy, M. J., Aagaard, P., Mackey, A., Kjaer, M., & Conboy, I. (2009). Molecular aging and rejuvenation of human muscle stem cells. *EMBO Molecular Medicine*, *1*(8-9), 381-391. https://doi.org/10.1002/emmm.200900045

Carmeli, E. (2020). Sarcopenia in Older Adults. In *Background and Management of Muscular Atrophy*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.93418

Carnero-Pardo, C., Cruz-Orduña, I., Espejo-Martínez, B., Martos-Aparicio, C., López-Alcalde, S., & Olazarán, J. (2013). Utility of the Mini-Cog for Detection of Cognitive Impairment in Primary Care : Data from Two Spanish Studies. *International journal of Alzheimer's disease*, *2013*, 285462. https://doi.org/10.1155/2013/285462

Carnio, S., LoVerso, F., Baraibar, M. A., Longa, E., Khan, M. M., Maffei, M., Reischl, M., Canepari, M., Loefler, S., Kern, H., Blaauw, B., Friguet, B., Bottinelli, R., Rudolf, R., & Sandri, M. (2014). Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging. *Cell Reports*, *8*(5), 1509-1521. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.061

Caron, A. Z., Haroun, S., Leblanc, E., Trensz, F., Guindi, C., Amrani, A., & Grenier, G. (2011). The proteasome inhibitor MG132 reduces immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *12*, 185. https://doi.org/10.1186/1471-2474-12-185

Carter, H. N., Chen, C. C. W., & Hood, D. A. (2015). Mitochondria, Muscle Health, and Exercise with Advancing Age. *Physiology*, *30*(3), 208-223. https://doi.org/10.1152/physiol.00039.2014

Carter, H. N., Kim, Y., Erlich, A. T., Zarrin-khat, D., & Hood, D. A. (2018). Autophagy and mitophagy flux in young and aged skeletal muscle following chronic contractile activity. *The Journal of Physiology*, *596*(16), 3567-3584. https://doi.org/10.1113/JP275998

Casati, M., Costa, A. S., Capitanio, D., Ponzoni, L., Ferri, E., Agostini, S., & Lori, E. (2019). The Biological Foundations of Sarcopenia : Established and Promising Markers. *Frontiers in Medicine*, *6*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2019.00184

Cecatto, C., Amaral, A. U., Roginski, A. C., Castilho, R. F., & Wajner, M. (2020). Impairment of mitochondrial bioenergetics and permeability transition induction caused by major long-chain fatty acids accumulating in VLCAD deficiency in skeletal muscle as potential pathomechanisms of myopathy. *Toxicology in Vitro*, *62*, 104665. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104665

Cesari, M., Penninx, B. W. J. H., Pahor, M., Lauretani, F., Corsi, A. M., Rhys Williams, G., Guralnik, J. M., & Ferrucci, L. (2004). Inflammatory markers and physical performance in older persons : The InCHIANTI study. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *59*(3), 242-248. https://doi.org/10.1093/gerona/59.3.m242

Chabi, B., Ljubicic, V., Menzies, K. J., Huang, J. H., Saleem, A., & Hood, D. A. (2008). Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell*, *7*(1), 2-12. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x

Chang, N. C., & Rudnicki, M. A. (2014). Satellite cells : The architects of skeletal muscle. *Current Topics in Developmental Biology*, *107*, 161-181. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416022-4.00006-8

Chauveau, P., Aparicio, M., Bellizzi, V., Campbell, K., Hong, X., Johansson, L., Kolko, A., Molina, P., Sezer, S., Wanner, C., Ter Wee, P. M., Teta, D., Fouque, D., Carrero, J. J., & European Renal Nutrition (ERN) Working Group of the European Renal Association–European Dialysis

Transplant Association (ERA-EDTA). (2018). Mediterranean diet as the diet of choice for patients with chronic kidney disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, *33*(5), 725-735. https://doi.org/10.1093/ndt/gfx085

Chazaud, B., Sonnet, C., Lafuste, P., Bassez, G., Rimaniol, A.-C., Poron, F., Authier, F.-J., Dreyfus, P. A., & Gherardi, R. K. (2003). Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *Journal of Cell Biology*, *163*(5), 1133-1143. https://doi.org/10.1083/jcb.200212046

Cheema, N., Herbst, A., McKenzie, D., & Aiken, J. M. (2015). Apoptosis and necrosis mediate skeletal muscle fiber loss in age-induced mitochondrial enzymatic abnormalities. *Aging Cell*, *14*(6), 1085-1093. https://doi.org/10.1111/acel.12399

Chen, L. B. (1988). Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual Review of Cell Biology*, *4*, 155-181. https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001103

Chen, M.-M., Li, Y., Deng, S.-L., Zhao, Y., Lian, Z.-X., & Yu, K. (2022). Mitochondrial Function and Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Skeletal Muscle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 826981. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.826981

Chen, S.-Y., & Wang, H.-H. (2007). The Relationship Between Physical Function, Knowledge of Disease, Social Support and Self-Care Behavior in Patients With Rheumatoid Arthritis. *The journal of nursing research : JNR*, *15*, 183-192. https://doi.org/10.1097/01.JNR.0000387614.87683.5a

Chen, W., Chen, Y., Wu, R., Guo, G., Liu, Y., Zeng, B., Liao, X., Wang, Y., & Wang, X. (2022). DHA alleviates diet-induced skeletal muscle fiber remodeling via FTO/m6A/DDIT4/PGC1α signaling. *BMC Biology*, *20*, 39. https://doi.org/10.1186/s12915-022-01239-w

Chen, Y. (2014). *Endogenous Phenolics from Expeller-pressed Canola Oil Refining Byproducts : Evaluation of Antioxidant Activities in Cell Culture and Deep-fat Frying Models*. https://mspace.lib.umanitoba.ca/xmlui/handle/1993/30357

Chhetri, J. K., de Souto Barreto, P., Fougère, B., Rolland, Y., Vellas, B., & Cesari, M. (2018). Chronic inflammation and sarcopenia : A regenerative cell therapy perspective. *Experimental Gerontology*, *103*, 115-123. https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.12.023

Cho, S. J., & Stout-Delgado, H. W. (2020). Aging and Lung Disease. *Annual Review of Physiology*, *82*, 433-459. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034610

Chopard, A., Hillock, S., & Jasmin, B. J. (2009). Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *13*(9b), 3032-3050. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00864.x

Chung, H. Y., Sung, B., Jung, K. J., Zou, Y., & Yu, B. P. (2006). The molecular inflammatory process in aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(3-4), 572-581. https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.572

Claiborne, A. (1985). Catalase Activity. In *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press.

Clariana, M., & García-Regueiro, J. A. (2011). Effect of high pressure processing on cholesterol oxidation products in vacuum packaged sliced dry-cured ham. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *49*(6), 1468-1471. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.027

Clavel, S., Coldefy, A.-S., Kurkdjian, E., Salles, J., Margaritis, I., & Derijard, B. (2006). Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mechanisms of Ageing and Development*, *127*(10), 794-801. https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.07.005

Coletti, D., Moresi, V., Adamo, S., Molinaro, M., & Sassoon, D. (2005). Tumor necrosis factor-α gene transfer induces cachexia and inhibits muscle regeneration. *Genesis*, *43*(3), 120-128. https://doi.org/10.1002/gene.20160

Collins, J. (2017). Letter from the Editor : Musculoskeletal Facts. *Seminars in Roentgenology*, *52*(4), 189-190. https://doi.org/10.1053/j.ro.2017.03.001

Cornish, S. M., & Chilibeck, P. D. (2009). Alpha-linolenic acid supplementation and resistance training in older adults. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, *34*(1), 49-59. https://doi.org/10.1139/H08-136

Correia-Melo, C., Ichim, G., Tait, S. W. G., & Passos, J. F. (2017). Depletion of mitochondria in mammalian cells through enforced mitophagy. *Nature Protocols*, *12*(1), 183-194. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.159

Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F. C., Michel, J.-P., Rolland, Y., Schneider, S. M., Topinková, E., Vandewoude, M., Zamboni, M., & European Working Group on Sarcopenia in Older People. (2010). Sarcopenia : European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and Ageing*, *39*(4), 412-423. https://doi.org/10.1093/ageing/afq034

Cruz-Jentoft, A. J., Bahat, G., Bauer, J., Boirie, Y., Bruyère, O., Cederholm, T., Cooper, C., Landi, F., Rolland, Y., Sayer, A. A., Schneider, S. M., Sieber, C. C., Topinkova, E., Vandewoude, M., Visser, M., Zamboni, M., & Writing Group for the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2 (EWGSOP2), and the Extended Group for EWGSOP2. (2019). Sarcopenia : Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing*, *48*(1), 16-31. https://doi.org/10.1093/ageing/afy169

Cruz-Jentoft, A. J., Kiesswetter, E., Drey, M., & Sieber, C. C. (2017). Nutrition, frailty, and sarcopenia. *Aging Clinical and Experimental Research*, *29*(1), 43-48. https://doi.org/10.1007/s40520-016-0709-0

Cruz-Jentoft, A. J., Landi, F., Schneider, S. M., Zúñiga, C., Arai, H., Boirie, Y., Chen, L.-K., Fielding, R. A., Martin, F. C., Michel, J.-P., Sieber, C., Stout, J. R., Studenski, S. A., Vellas, B., Woo, J., Zamboni, M., & Cederholm, T. (2014). Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults : A systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age and Ageing*, *43*(6), 748-759. https://doi.org/10.1093/ageing/afu115

Cruz-Jentoft, A. J., Landi, F., Topinková, E., & Michel, J.-P. (2010). Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *13*(1), 1-7. https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328333c1c1

Cunnane, S. C., Plourde, M., Pifferi, F., Bégin, M., Féart, C., & Barberger-Gateau, P. (2009). Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease. *Progress in Lipid Research*, *48*(5), 239-256. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.04.001

Dalle, S., Rossmeislova, L., & Koppo, K. (2017). The Role of Inflammation in Age-Related Sarcopenia. *Frontiers in Physiology*, *8*, 1045. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01045

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., & Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*, *52*(4), 601-623. https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408

D'amico, A., & Bertini, E. (2013). Chapter 148—Metabolic neuropathies and myopathies. In O. Dulac, M. Lassonde, & H. B. Sarnat (Éds.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 113, p. 1437-1455). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00013-7

Daoued, K., Chouaibi, M., Gaout, N., & Haj, O. (2015). Chemical composition and antioxidant activities of cold pressed lentisc (Pistacia lentiscusL.) seed oil. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, *93*.

da Silva Alexandre, T., de Oliveira Duarte, Y. A., Ferreira Santos, J. L., Wong, R., & Lebrão, M. L. (2014). Prevalence and associated factors of sarcopenia among elderly in Brazil : Findings from the SABE study. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *18*(3), 284-290. https://doi.org/10.1007/s12603-013-0413-0

Dawson-Hughes, B., Harris, S. S., & Ceglia, L. (2008). Alkaline diets favor lean tissue mass in older adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *87*(3), 662-665. https://doi.org/10.1093/ajcn/87.3.662

Debbabi, M., Nury, T., Zarrouk, A., Mekahli, N., Bezine, M., Sghaier, R., Grégoire, S., Martine, L., Durand, P., Camus, E., Vejux, A., Jabrane, A., Bretillon, L., Prost, M., Moreau, T., Ammou, S. B., Hammami, M., & Lizard, G. (2016). Protective Effects of α-Tocopherol, γ-Tocopherol and Oleic Acid, Three Compounds of Olive Oils, and No Effect of Trolox, on 7-Ketocholesterol-Induced Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunction in Microglial BV-2 Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(12), 1973. https://doi.org/10.3390/ijms17121973

Debbabi, M., Zarrouk, A., Bezine, M., Meddeb, W., Nury, T., Badreddine, A., Karym, E. M., Sghaier, R., Bretillon, L., Guyot, S., Samadi, M., Cherkaoui-Malki, M., Nasser, B., Mejri, M., Ben-Hammou, S., Hammami, M., & Lizard, G. (2017). Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiapoptophagy in microglial BV-2 cells. *Chemistry and Physics of Lipids*, *207*, 151-170. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.04.002

Decade of Healthy Ageing (2021-2030). (s. d.). Consulté 3 avril 2022, à l'adresse https://www.who.int/initiatives/decade-of-healthy-ageing

de Freitas, F. A., Levy, D., Zarrouk, A., Lizard, G., & Bydlowski, S. P. (2021). Impact of Oxysterols on Cell Death, Proliferation, and Differentiation Induction : Current Status. *Cells*, *10*(9), 2301. https://doi.org/10.3390/cells10092301

DeJong, C. H. C., Busquets, S., Moses, A. G. W., Schrauwen, P., Ross, J. A., Argiles, J. M., & Fearon, K. C. H. (2005). Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. *Oncology Reports*, *14*(1), 257-263.

Deldicque, L. (2013). Endoplasmic reticulum stress in human skeletal muscle : Any contribution to sarcopenia? *Frontiers in Physiology*, *4*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2013.00236

de Medina, P., Silvente-Poirot, S., & Poirot, M. (2022). Oxysterols are potential physiological regulators of ageing. *Ageing Research Reviews*, *77*, 101615. https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101615

Deon, M., Marchetti, D. P., Donida, B., Wajner, M., & Vargas, C. (2016). Oxidative Stress in Patients with X-Linked Adrenoleukodystrophy. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *36*(4), 497-512. https://doi.org/10.1007/s10571-015-0234-2

de Palma, L., Marinelli, M., Pavan, M., & Orazi, A. (2008). Rôle des ubiquitine ligases MuRF1 et MAFbx dans l'atrophie musculaire chez l'homme. *Revue du Rhumatisme*, *75*(1), 56-60. https://doi.org/10.1016/j.rhum.2007.04.021

Derbré, F., Gomez-Cabrera, M. C., Nascimento, A. L., Sanchis-Gomar, F., Martinez-Bello, V. E., Tresguerres, J. A. F., Fuentes, T., Gratas-Delamarche, A., Monsalve, M., & Viña, J. (2012). Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1α to exercise training. *AGE*, *34*(3), 669-679. https://doi.org/10.1007/s11357-011-9264-y

Dhibi, M., Issaoui, M., Brahmi, F., Mechri, B., Mnari, A., Cheraif, I., Skhiri, F., Gazzah, N., & Hammami, M. (2014). Nutritional quality of fresh and heated Aleppo pine (Pinus halepensis Mill.) seed oil : Trans-fatty acid isomers profiles and antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(8), 1442-1452. https://doi.org/10.1007/s13197-012-0664-5

Dhillon, R. J. S., & Hasni, S. (2017). Pathogenesis and Management of Sarcopenia. *Clinics in Geriatric Medicine*, *33*(1), 17-26. https://doi.org/10.1016/j.cger.2016.08.002

Dias, I. H., Borah, K., Amin, B., Griffiths, H. R., Sassi, K., Lizard, G., Iriondo, A., & Martinez-Lage, P. (2019). Localisation of oxysterols at the sub-cellular level and in biological fluids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *193*, 105426. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105426

DiMeo, D., Tian, J., Zhang, J., Narushima, S., & Berg, D. J. (2008). Increased interleukin-10 production and Th2 skewing in the absence of 5-lipoxygenase. *Immunology*, *123*(2), 250-262. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02694.x

Ding, H., Chen, S., Pan, X., Dai, X., Pan, G., Li, Z., Mai, X., Tian, Y., Zhang, S., Liu, B., Cao, G., Yao, Z., Yao, X., Gao, L., Yang, L., Chen, X., Sun, J., Chen, H., Han, M., … Xie, L. (2021). Transferrin receptor 1 ablation in satellite cells impedes skeletal muscle regeneration through activation of ferroptosis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *12*(3), 746-768. https://doi.org/10.1002/jcsm.12700

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C., & Almeida, L. M. (1994). Action of Phenolic Derivatives (Acetaminophen, Salicylate, and 5-Aminosalicylate) as Inhibitors of Membrane Lipid Peroxidation and as Peroxyl Radical Scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *315*(1), 161-169. https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1485

Diolez, P., Bourdel-Marchasson, I., Calmettes, G., Pasdois, P., Detaille, D., Rouland, R., & Gouspillou, G. (2015). Hypothesis on Skeletal Muscle Aging : Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocator Decreases Reactive Oxygen Species Production While Preserving Coupling Efficiency. *Frontiers in Physiology*, *6*, 369. https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00369

Dirks, A. J., & Leeuwenburgh, C. (2004). Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*(1), 27-39. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.10.003

Dirks, A., & Leeuwenburgh, C. (2002). Apoptosis in skeletal muscle with aging. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *282*(2), R519-R527. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00458.2001

Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis : An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, *149*(5), 1060-1072. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042

Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology*, *10*(1), 9-17. https://doi.org/10.1038/nchembio.1416

Domei, T., Yokoi, H., Kuramitsu, S., Soga, Y., Arita, T., Ando, K., Shirai, S., Kondo, K., Sakai, K., Goya, M., Iwabuchi, M., Ueeda, M., & Nobuyoshi, M. (2012). Ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids and the incidence of major adverse cardiac events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, *76*(2), 423-429. https://doi.org/10.1253/circj.cj-11-0941

Domingues-Faria, C., Vasson, M.-P., Goncalves-Mendes, N., Boirie, Y., & Walrand, S. (2016). Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. *Ageing Research Reviews*, *26*, 22-36. https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.12.004

Doria, E., Buonocore, D., Focarelli, A., & Marzatico, F. (2012). Relationship between Human Aging Muscle and Oxidative System Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, e830257. https://doi.org/10.1155/2012/830257

Dreyer, H. C., Blanco, C. E., Sattler, F. R., Schroeder, E. T., & Wiswell, R. A. (2006). Satellite cell numbers in young and older men 24 hours after eccentric exercise. *Muscle & Nerve*, *33*(2), 242-253. https://doi.org/10.1002/mus.20461

Dugas, B., Charbonnier, S., Baarine, M., Ragot, K., Delmas, D., Ménétrier, F., Lherminier, J., Malvitte, L., Khalfaoui, T., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., Latruffe, N., & Lizard, G. (2010). Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells : Cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *European Journal of Nutrition*, *49*(7), 435-446. https://doi.org/10.1007/s00394-010-0102-2

Dziegala, M., Josiak, K., Kasztura, M., Kobak, K., von Haehling, S., Banasiak, W., Anker, S. D., Ponikowski, P., & Jankowska, E. (2018). Iron deficiency as energetic insult to skeletal muscle in chronic diseases. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *9*(5), 802-815. https://doi.org/10.1002/jcsm.12314

Ebisui, C., Tsujinaka, T., Morimoto, T., Kan, K., Iijima, S., Yano, M., Kominami, E., Tanaka, K., & Monden, M. (1995). Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clinical Science (London, England: 1979)*, *89*(4), 431-439. https://doi.org/10.1042/cs0890431

Elkina, Y., von Haehling, S., Anker, S. D., & Springer, J. (2011). The role of myostatin in muscle wasting : An overview. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *2*(3), 143-151. https://doi.org/10.1007/s13539-011-0035-5

Endo, K., Oyama, T., Saiki, A., Ban, N., Ohira, M., Koide, N., Murano, T., Watanabe, H., Nishii, M., Miura, M., Sekine, K., Miyashita, Y., & Shirai, K. (2008). Determination of serum 7-ketocholesterol concentrations and their relationships with coronary multiple risks in diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *80*(1), 63-68. https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.10.023

Erridge, C., Webb, D. J., & Spickett, C. M. (2007). 25-Hydroxycholesterol, 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol upregulate interleukin-8 expression independently of Toll-like receptor 1, 2, 4 or 6 signalling in human macrophages. *Free Radical Research*, *41*(3), 260-266. https://doi.org/10.1080/10715760601070091

Ershler, W. B., & Keller, E. T. (2000). Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annual Review of Medicine*, *51*, 245-270. https://doi.org/10.1146/annurev.med.51.1.245

Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., & Rotheneder, M. (1989). Continuous Monitoring of in Vztro Oxidation of Human Low Density Lipoprotein. *Free Radical Research Communications*, *6*(1), 67-75. https://doi.org/10.3109/10715768909073429

Fan, J., Kou, X., Yang, Y., & Chen, N. (2016). MicroRNA-Regulated Proinflammatory Cytokines in Sarcopenia. *Mediators of Inflammation*, *2016*, 1438686. https://doi.org/10.1155/2016/1438686

Fanò, G., Mecocci, P., Vecchiet, J., Belia, S., Fulle, S., Polidori, M. C., Felzani, G., Senin, U., Vecchiet, L., & Beal, M. F. (2001). Age and sex influence on oxidative damage and functional status in human skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *22*(4), 345-351. https://doi.org/10.1023/a:1013122805060

Favaro, G., Romanello, V., Varanita, T., Andrea Desbats, M., Morbidoni, V., Tezze, C., Albiero, M., Canato, M., Gherardi, G., De Stefani, D., Mammucari, C., Blaauw, B., Boncompagni, S., Protasi, F., Reggiani, C., Scorrano, L., Salviati, L., & Sandri, M. (2019). DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. *Nature Communications*, *10*(1), 2576. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10226-9

Feissner, R. F., Skalska, J., Gaum, W. E., & Sheu, S.-S. (2009). Crosstalk signaling between mitochondrial Ca2+ and ROS. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, *14*(4), 1197-1218. https://doi.org/10.2741/3303

Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., & Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(23), 8204-8209. https://doi.org/10.1073/pnas.0502857102

Fernando, R., Castro, J. P., Flore, T., Deubel, S., Grune, T., & Ott, C. (2020). Age-Related Maintenance of the Autophagy-Lysosomal System Is Dependent on Skeletal Muscle Type. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*, e4908162. https://doi.org/10.1155/2020/4908162

Ferri, E., Marzetti, E., Calvani, R., Picca, A., Cesari, M., & Arosio, B. (2020). Role of Age-Related Mitochondrial Dysfunction in Sarcopenia. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5236. https://doi.org/10.3390/ijms21155236

Flohé, L., & Günzler, W. A. (1984). [12] Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology* (Vol. 105, p. 114-120). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05015-1

Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, *226*(1), 497-509.

Fontana, L., Meyer, T. E., Klein, S., & Holloszy, J. O. (2004). Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(17), 6659-6663. https://doi.org/10.1073/pnas.0308291101

Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span—From yeast to humans. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5976), 321-326. https://doi.org/10.1126/science.1172539

Foreman, N. A., Hesse, A. S., & Ji, L. L. (2021). Redox Signaling and Sarcopenia : Searching for the Primary Suspect. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 9045. https://doi.org/10.3390/ijms22169045

Franckhauser, S., Elias, I., Rotter Sopasakis, V., Ferré, T., Nagaev, I., Andersson, C. X., Agudo, J., Ruberte, J., Bosch, F., & Smith, U. (2008). Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia*, *51*(7), 1306-1316. https://doi.org/10.1007/s00125-008-0998-8

François, J.-C., & Trojan, J. (2001). Thérapies antisens dirigées contre le récepteur de l'IGF-I. *médecine/sciences*, *17*(12), 1343-1348. https://doi.org/10.1051/medsci/200117121343

Fransen, M., Lismont, C., & Walton, P. (2017). The Peroxisome-Mitochondria Connection : How and Why? *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), E1126. https://doi.org/10.3390/ijms18061126

Fried, L. P., Tangen, C. M., Walston, J., Newman, A. B., Hirsch, C., Gottdiener, J., Seeman, T., Tracy, R., Kop, W. J., Burke, G., & McBurnie, M. A. (2001). Frailty in Older Adults : Evidence for a Phenotype. *The Journals of Gerontology: Series A*, *56*(3), M146-M157. https://doi.org/10.1093/gerona/56.3.M146

Friedmann Angeli, J. P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Hammond, V. J., Herbach, N., Aichler, M., Walch, A., Eggenhofer, E., Basavarajappa, D., Rådmark, O., Kobayashi, S., Seibt, T., Beck, H., Neff, F., Esposito, I., Wanke, R., Förster, H., … Conrad, M. (2014). Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature Cell Biology*, *16*(12), 1180-1191. https://doi.org/10.1038/ncb3064

Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle : A brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, *96*(3), 183-195. https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y

Frost, R. A., & Lang, C. H. (2007). Protein kinase B/Akt : A nexus of growth factor and cytokine signaling in determining muscle mass. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *103*(1), 378-387. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00089.2007

Fry, C. S., Drummond, M. J., Glynn, E. L., Dickinson, J. M., Gundermann, D. M., Timmerman, K. L., Walker, D. K., Volpi, E., & Rasmussen, B. B. (2013). Skeletal muscle autophagy and protein breakdown following resistance exercise are similar in younger and older adults. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *68*(5), 599-607. https://doi.org/10.1093/gerona/gls209

Fry, C. S., & Rasmussen, B. B. (2011). Skeletal muscle protein balance and metabolism in the elderly. *Current Aging Science*, *4*(3), 260-268. https://doi.org/10.2174/1874609811104030260

Fujie, S., Sato, K., Miyamoto-Mikami, E., Hasegawa, N., Fujita, S., Sanada, K., Hamaoka, T., & Iemitsu, M. (2014). Reduction of Arterial Stiffness by Exercise Training Is Associated with Increasing Plasma Apelin Level in Middle-Aged and Older Adults. *PLOS ONE*, *9*(4), e93545. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093545

Fulle, S., Di Donna, S., Puglielli, C., Pietrangelo, T., Beccafico, S., Bellomo, R., Protasi, F., & Fanò, G. (2005). Age-dependent imbalance of the antioxidative system in human satellite cells. *Experimental Gerontology*, *40*(3), 189-197. https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.11.006

Gallant, M. P. (2003). The influence of social support on chronic illness self-management : A review and directions for research. *Health Education & Behavior: The Official Publication of the Society for Public Health Education*, *30*(2), 170-195. https://doi.org/10.1177/1090198102251030

Gammone, M. A., Riccioni, G., & D'Orazio, N. (2015). Carotenoids : Potential allies of cardiovascular health? *Food & Nutrition Research*, *59*. https://doi.org/10.3402/fnr.v59.26762

Ge, Y., Wu, A.-L., Warnes, C., Liu, J., Zhang, C., Kawasome, H., Terada, N., Boppart, M. D., Schoenherr, C. J., & Chen, J. (2009). MTOR regulates skeletal muscle regeneration in vivo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *297*(6), C1434-1444. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00248.2009

Ghzaiel, I., Sassi, K., Zarrouk, A., Nury, T., Ksila, M., Leoni, V., Bouhaouala-Zahar, B., Hammami, S., Hammami, M., Mackrill, J. J., Samadi, M., Ghrairi, T., Vejux, A., & Lizard, G. (2021). 7-Ketocholesterol : Effects on viral infections and hypothetical contribution in COVID-19. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *212*, 105939. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105939

Ghzaiel, I., Zarrouk, A., Essadek, S., Martine, L., Hammouda, S., Yammine, A., Ksila, M., Nury, T., Meddeb, W., Tahri Joutey, M., Mihoubi, W., Caccia, C., Leoni, V., Samadi, M., Acar, N., Andreoletti, P., Hammami, S., Ghrairi, T., Vejux, A., … Lizard, G. (2022). Protective effects of milk thistle (Sylibum marianum) seed oil and α-tocopherol against 7β-hydroxycholesterol-induced peroxisomal alterations in murine C2C12 myoblasts : Nutritional insights associated with the concept of pexotherapy. *Steroids*, *183*, 109032. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109032

Ghzaiel, I., Zarrouk, A., Nury, T., Libergoli, M., Florio, F., Hammouda, S., Ménétrier, F., Avoscan, L., Yammine, A., Samadi, M., Latruffe, N., Biressi, S., Levy, D., Bydlowski, S. P., Hammami, S., Vejux, A., Hammami, M., & Lizard, G. (2021). Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of Pistacia lentiscus L. Seed Oil against 7β-Hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 Myoblasts : Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(11), 1772. https://doi.org/10.3390/antiox10111772

Gianoudis, J., Bailey, C. A., & Daly, R. M. (2015). Associations between sedentary behaviour and body composition, muscle function and sarcopenia in community-dwelling older adults. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, *26*(2), 571-579. https://doi.org/10.1007/s00198-014-2895-y

Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., & López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α-tocopherol, and β-carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, *78*(2), 207-211. https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00399-5

Girven, M., Dugdale, H. F., Owens, D. J., Hughes, D. C., Stewart, C. E., & Sharples, A. P. (2016). L-glutamine Improves Skeletal Muscle Cell Differentiation and Prevents Myotube Atrophy After Cytokine (TNF-α) Stress Via Reduced p38 MAPK Signal Transduction. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(12), 2720-2732. https://doi.org/10.1002/jcp.25380

Gomes, M. J., Martinez, P. F., Pagan, L. U., Damatto, R. L., Mariano Cezar, M. D., Ruiz Lima, A. R., Okoshi, K., & Okoshi, M. P. (2017). Skeletal muscle aging : Influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget*, *8*(12), 20428-20440. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14670

Gorassini, A., Verardo, G., Fregolent, S.-C., & Bortolomeazzi, R. (2017). Rapid determination of cholesterol oxidation products in milk powder based products by reversed phase SPE and HPLC-APCI-MS/MS. *Food Chemistry*, *230*, 604-610. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.080

Gouspillou, G., Sgarioto, N., Kapchinsky, S., Purves-Smith, F., Norris, B., Pion, C. H., Barbat-Artigas, S., Lemieux, F., Taivassalo, T., Morais, J. A., Aubertin-Leheudre, M., & Hepple, R. T. (2014). Increased sensitivity to mitochondrial permeability transition and myonuclear translocation of endonuclease G in atrophied muscle of physically active older humans. *The FASEB Journal*, *28*(4), 1621-1633. https://doi.org/10.1096/fj.13-242750

Grande, G., Qiu, C., & Fratiglioni, L. (2020). Prevention of dementia in an ageing world : Evidence and biological rationale. *Ageing Research Reviews*, *64*, 101045. https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101045

Grandjean, D. (2005). Comprendre le stress oxydatif chez le chien. *Nouveau praticien veterinaire*, *2005*, 95.

Granic, A., Sayer, A. A., & Robinson, S. M. (2019). Dietary Patterns, Skeletal Muscle Health, and Sarcopenia in Older Adults. *Nutrients*, *11*(4), E745. https://doi.org/10.3390/nu11040745

Gray, E., Rice, C., Hares, K., Redondo, J., Kemp, K., Williams, M., Brown, A., Scolding, N., & Wilkins, A. (2014). Reductions in neuronal peroxisomes in multiple sclerosis grey matter. *Multiple Sclerosis Journal*, *20*(6), 651-659. https://doi.org/10.1177/1352458513505691

Gray, S. R., & Mittendorfer, B. (2018). Fish oil-derived n-3 polyunsaturated fatty acids for the prevention and treatment of sarcopenia. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, *21*(2), 104-109. https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000441

Greiwe, J. S., Cheng, B., Rubin, D. C., Yarasheski, K. E., & Semenkovich, C. F. (2001). Resistance exercise decreases skeletal muscle tumor necrosis factor alpha in frail elderly humans. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(2), 475-482. https://doi.org/10.1096/fj.00-0274com

Griffiths, W. J., Abdel-Khalik, J., Crick, P. J., Ogundare, M., Shackleton, C. H., Tuschl, K., Kwok, M. K., Bigger, B. W., Morris, A. A., Honda, A., Xu, L., Porter, N. A., Björkhem, I., Clayton, P. T., & Wang, Y. (2017). Sterols and oxysterols in plasma from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *169*, 77-87. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.018

Grimsrud, P. A., Xie, H., Griffin, T. J., & Bernlohr, D. A. (2008). Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. *The Journal of Biological Chemistry*, *283*(32), 21837-21841. https://doi.org/10.1074/jbc.R700019200

Grosso, G., Marventano, S., Yang, J., Micek, A., Pajak, A., Scalfi, L., Galvano, F., & Kales, S. N. (2017). A comprehensive meta-analysis on evidence of Mediterranean diet and cardiovascular

disease : Are individual components equal? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(15), 3218-3232. https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1107021

Gryson, C., Ratel, S., Rance, M., Penando, S., Bonhomme, C., Le Ruyet, P., Duclos, M., Boirie, Y., & Walrand, S. (2014). Four-month course of soluble milk proteins interacts with exercise to improve muscle strength and delay fatigue in elderly participants. *Journal of the American Medical Directors Association*, *15*(12), 958.e1-9. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2014.09.011

Guasch-Ferré, M., Salas-Salvadó, J., Ros, E., Estruch, R., Corella, D., Fitó, M., Martínez-González, M. A., & PREDIMED Investigators. (2017). The PREDIMED trial, Mediterranean diet and health outcomes : How strong is the evidence? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *27*(7), 624-632. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.05.004

Guéye, P. M., Glasser, N., Férard, G., & Lessinger, J.-M. (2006). Influence of human haptoglobin polymorphism on oxidative stress induced by free hemoglobin on red blood cells. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *44*(5), 542-547. https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.095

Guillemot-Legris, O., Mutemberezi, V., Cani, P. D., & Muccioli, G. G. (2016). Obesity is associated with changes in oxysterol metabolism and levels in mice liver, hypothalamus, adipose tissue and plasma. *Scientific Reports*, *6*, 19694. https://doi.org/10.1038/srep19694

Guina, T., Deiana, M., Calfapietra, S., Cabboi, B., Maina, M., Tuberoso, C. I., Leonarduzzi, G., Gamba, P., Gargiulo, S., Testa, G., Poli, G., & Biasi, F. (2015). The role of p38 MAPK in the induction of intestinal inflammation by dietary oxysterols : Modulation by wine phenolics. *Food & Function*, *6*(4), 1218-1228. https://doi.org/10.1039/c4fo01116c

Gupta, R., Sharma, A. K., Dobhal, M. p., Sharma, M. c., & Gupta, R. s. (2011). Antidiabetic and antioxidant potential of β-sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *Journal of Diabetes*, *3*(1), 29-37. https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2010.00107.x

Haberecht-Müller, S., Krüger, E., & Fielitz, J. (2021). Out of Control : The Role of the Ubiquitin Proteasome System in Skeletal Muscle during Inflammation. *Biomolecules*, *11*(9), 1327. https://doi.org/10.3390/biom11091327

Haddad, F., & Adams, G. R. (2006). Aging-sensitive cellular and molecular mechanisms associated with skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, *100*(4), 1188-1203. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01227.2005

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). [Oxidative stress]. *Revue Medicale De Liege*, *62*(10), 628-638.

Hammami, S., Ghzaiel, I., Hammouda, S., Sakly, N., Hammami, M., & Zarrouk, A. (2020). Evaluation of pro-inflammatory cytokines in frail Tunisian older adults. *PloS One*, *15*(11), e0242152. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242152

Hammouda, S., Ghzaiel, I., Picón-Pagès, P., Meddeb, W., Khamlaoui, W., Hammami, S., Muñoz, F. J., Hammami, M., & Zarrouk, A. (2021). Nigella and Milk Thistle Seed Oils : Potential Cytoprotective Effects against 7β-Hydroxycholesterol-Induced Toxicity on SH-SY5Y Cells. *Biomolecules*, *11*(6), 797. https://doi.org/10.3390/biom11060797

Han, L., Wu, S., & Hu, P. (2018). The functions of sarcopenia related myokines. *Translational Medicine of Aging*, *2*, 38-41. https://doi.org/10.1016/j.tma.2018.08.001

Haren, M. T., Malmstrom, T. K., Miller, D. K., Patrick, P., Perry, H. M., III, Herning, M. M., Banks, W. A., & Morley, J. E. (2010). Higher C-Reactive Protein and Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor Levels Are Associated With Poor Physical Function and Disability : A Cross-Sectional Analysis of a Cohort of Late Middle-Aged African Americans. *The Journals of Gerontology: Series A*, *65A*(3), 274-281. https://doi.org/10.1093/gerona/glp148

Harman, D. (1956). Aging : A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, *11*(3), 298-300. https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298

He, C., Zhu, H., Zhang, W., Okon, I., Wang, Q., Li, H., Le, Y.-Z., & Xie, Z. (2013). 7-Ketocholesterol induces autophagy in vascular smooth muscle cells through Nox4 and Atg4B. *The American Journal of Pathology*, *183*(2), 626-637. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.028

He, W., Goodkind, D., & Kowal, P. (2016). *An Aging World : 2015.* https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1088.9362

He, Y., Phan, K., Bhatia, S., Pickford, R., Fu, Y., Yang, Y., Hodges, J. R., Piguet, O., Halliday, G. M., & Kim, W. S. (2021). Increased VLCFA-lipids and ELOVL4 underlie neurodegeneration in frontotemporal dementia. *Scientific Reports*, *11*, 21348. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00870-x

Hepple, R. T., Qin, M., Nakamoto, H., & Goto, S. (2008). Caloric restriction optimizes the proteasome pathway with aging in rat plantaris muscle : Implications for sarcopenia. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *295*(4), R1231-1237. https://doi.org/10.1152/ajpregu.90478.2008

Hoppeler, H., Lüthi, P., Claassen, H., Weibel, E. R., & Howald, H. (1973). The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *344*(3), 217-232. https://doi.org/10.1007/BF00588462

Houston, D. K., Ding, J., Nicklas, B. J., Harris, T. B., Lee, J. S., Nevitt, M. C., Rubin, S. M., Tylavsky, F. A., Kritchevsky, S. B., & for the Health ABC Study. (2009). Overweight and Obesity Over the Adult Life Course and Incident Mobility Limitation in Older Adults : The Health, Aging and Body Composition Study. *American Journal of Epidemiology*, *169*(8), 927-936. https://doi.org/10.1093/aje/kwp007

Howard, C., Ferrucci, L., Sun, K., Fried, L. P., Walston, J., Varadhan, R., Guralnik, J. M., & Semba, R. D. (2007). Oxidative protein damage is associated with poor grip strength among older women living in the community. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *103*(1), 17-20. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00133.2007

Huang, C.-Y., Hwang, A.-C., Liu, L.-K., Lee, W.-J., Chen, L.-Y., Peng, L.-N., Lin, M.-H., & Chen, L.-K. (2016). Association of Dynapenia, Sarcopenia, and Cognitive Impairment Among Community-Dwelling Older Taiwanese. *Rejuvenation Research*, *19*(1), 71-78. https://doi.org/10.1089/rej.2015.1710

Huang, J., & Manning, B. D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2, and the two mTOR complexes. *Biochemical Society transactions*, *37*(Pt 1), 217-222. https://doi.org/10.1042/BST0370217

Huang, J.-D., Amaral, J., Lee, J. W., & Rodriguez, I. R. (2014). 7-Ketocholesterol-induced inflammation signals mostly through the TLR4 receptor both in vitro and in vivo. *PloS One*, *9*(7), e100985. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100985

Huang, Y., Wu, B., Shen, D., Chen, J., Yu, Z., & Chen, C. (2021). Ferroptosis in a sarcopenia model of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8). *International Journal of Biological Sciences*, *17*(1), 151-162. https://doi.org/10.7150/ijbs.53126

Huang, Y.-H., Chiu, W.-C., Hsu, Y.-P., Lo, Y.-L., & Wang, Y.-H. (2020). Effects of Omega-3 Fatty Acids on Muscle Mass, Muscle Strength and Muscle Performance among the Elderly : A Meta-Analysis. *Nutrients*, *12*(12), 3739. https://doi.org/10.3390/nu12123739

Hughes, S. M. (2001). Muscle development : Reversal of the differentiated state. *Current Biology*, *11*(6), R237-R239. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00114-2

Hulbert, A. J. (2005). On the importance of fatty acid composition of membranes for aging. *Journal of Theoretical Biology*, *234*(2), 277-288. https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.11.024

Hussain, S. N. A., Mofarrahi, M., Sigala, I., Kim, H. C., Vassilakopoulos, T., Maltais, F., Bellenis, I., Chaturvedi, R., Gottfried, S. B., Metrakos, P., Danialou, G., Matecki, S., Jaber, S., Petrof, B. J.,

& Goldberg, P. (2010). Mechanical Ventilation-induced Diaphragm Disuse in Humans Triggers Autophagy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *182*(11), 1377-1386. https://doi.org/10.1164/rccm.201002-0234OC

Hütter, E., Skovbro, M., Lener, B., Prats, C., Rabøl, R., Dela, F., & Jansen-Dürr, P. (2007). Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell*, *6*(2), 245-256. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00282.x

Huynh, K. K., Eskelinen, E.-L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P., & Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO Journal*, *26*(2), 313-324. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601511

Hwang, S.-L., Kim, H.-N., Jung, H.-H., Kim, J.-E., Choi, D.-K., Hur, J.-M., Lee, J.-Y., Song, H., Song, K.-S., & Huh, T.-L. (2008). Beneficial effects of beta-sitosterol on glucose and lipid metabolism in L6 myotube cells are mediated by AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *377*(4), 1253-1258. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.136

Ibrahim, K., May, C., Patel, H. P., Baxter, M., Sayer, A. A., & Roberts, H. (2016). A feasibility study of implementing grip strength measurement into routine hospital practice (GRImP) : Study protocol. *Pilot and Feasibility Studies*, *2*, 27. https://doi.org/10.1186/s40814-016-0067-x

Innes, J. K., & Calder, P. C. (2018). Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, *132*, 41-48. https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.004

Inoue, M., Sato, E. F., Nishikawa, M., Park, A.-M., Kira, Y., Imada, I., & Utsumi, K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(23), 2495-2505. https://doi.org/10.2174/0929867033456477

Iqbal, S., Ostojic, O., Singh, K., Joseph, A.-M., & Hood, D. A. (2013). Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle & Nerve*, *48*(6), 963-970. https://doi.org/10.1002/mus.23838

Iuliano, L. (2011). Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids*, *164*(6), 457-468. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006

Iuliano, L., Pacelli, A., Ciacciarelli, M., Zerbinati, C., Fagioli, S., Piras, F., Orfei, M. D., Bossù, P., Pazzelli, F., Serviddio, G., Caltagirone, C., & Spalletta, G. (2013). Plasma Fatty Acid Lipidomics in Amnestic Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *36*(3), 545-553. https://doi.org/10.3233/JAD-122224

Izquierdo, M., Merchant, R. A., Morley, J. E., Anker, S. D., Aprahamian, I., Arai, H., Aubertin-Leheudre, M., Bernabei, R., Cadore, E. L., Cesari, M., Chen, L.-K., de Souto Barreto, P., Duque, G., Ferrucci, L., Fielding, R. A., García-Hermoso, A., Gutiérrez-Robledo, L. M., Harridge, S. D. R., Kirk, B., … Fiatarone Singh, M. (2021). International Exercise Recommendations in Older Adults (ICFSR) : Expert Consensus Guidelines. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *25*(7), 824-853. https://doi.org/10.1007/s12603-021-1665-8

Jackson, J. R., Ryan, M. J., Hao, Y., & Alway, S. E. (2010). Mediation of endogenous antioxidant enzymes and apoptotic signaling by resveratrol following muscle disuse in the gastrocnemius muscles of young and old rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *299*(6), R1572-1581. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00489.2010

Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071-1078. https://doi.org/10.1038/nature08467

Jakobsson, A., Westerberg, R., & Jacobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals : Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*, *45*(3), 237-249. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004

Jamart, C., Raymackers, J.-M., Li An, G., Deldicque, L., & Francaux, M. (2011). Prevention of muscle disuse atrophy by MG132 proteasome inhibitor. *Muscle & Nerve*, *43*(5), 708-716. https://doi.org/10.1002/mus.21949

Jandacek, R. J. (2017). Linoleic Acid : A Nutritional Quandary. *Healthcare*, *5*(2), 25. https://doi.org/10.3390/healthcare5020025

Jang, J., Park, S., Kim, Y., Jung, J., Lee, J., Chang, Y., Lee, S. P., Park, B.-C., Wolfe, R. R., Choi, C. S., & Kim, I.-Y. (2021). Myostatin Inhibition-Induced Increase in Muscle Mass and Strength Was Amplified by Resistance Exercise Training, and Dietary Essential Amino Acids Improved Muscle Quality in Mice. *Nutrients*, *13*(5), 1508. https://doi.org/10.3390/nu13051508

Javitt, N. B. (2008). Oxysterols : Novel biologic roles for the 21st century. *Steroids*, *73*(2), 149-157. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2007.10.004

Jheng, J.-R., Chen, Y.-S., Ao, U. I., Chan, D.-C., Huang, J.-W., Hung, K.-Y., Tarng, D.-C., & Chiang, C.-K. (2018). The double-edged sword of endoplasmic reticulum stress in uremic sarcopenia through myogenesis perturbation. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *9*(3), 570-584. https://doi.org/10.1002/jcsm.12288

Ji, L. L. (2001). Exercise at old age : Does it increase or alleviate oxidative stress? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *928*, 236-247. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb05653.x

Jiang, L., Hara-Kuge, S., Yamashita, S., & Fujiki, Y. (2015). Peroxin Pex14p is the key component for coordinated autophagic degradation of mammalian peroxisomes by direct binding to LC3-II. *Genes to Cells*, *20*(1), 36-49. https://doi.org/10.1111/gtc.12198

Jiao, J., & Demontis, F. (2017). Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Current Opinion in Pharmacology*, *34*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.03.009

Joerger, M., Fauchier, T., Le Duff, F., Ciabrini-Moretti, M.-C., Dahan, T., Hébuterne, X., & Schneider, S. (2016). Évaluation du questionnaire SARC-F dans le dépistage de la sarcopénie liée à l'âge. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, *30*(1), 46-47. https://doi.org/10.1016/j.nupar.2016.01.003

Johnson, M. L., Robinson, M. M., & Nair, K. S. (2013). Skeletal muscle aging and the mitochondrion. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *24*(5), 247-256. https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.12.003

Joseph, A.-M., Adhihetty, P. J., Buford, T. W., Wohlgemuth, S. E., Lees, H. A., Nguyen, L. M.-D., Aranda, J. M., Sandesara, B. D., Pahor, M., Manini, T. M., Marzetti, E., & Leeuwenburgh, C. (2012). The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. *Aging Cell*, *11*(5), 801-809. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00844.x

Joseph, A.-M., Adhihetty, P. J., Wawrzyniak, N. R., Wohlgemuth, S. E., Picca, A., Kujoth, G. C., Prolla, T. A., & Leeuwenburgh, C. (2013). Dysregulation of Mitochondrial Quality Control Processes Contribute to Sarcopenia in a Mouse Model of Premature Aging. *PLOS ONE*, *8*(7), e69327. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069327

Jubrias, S. A., Odderson, I. R., Esselman, P. C., & Conley, K. E. (1997). Decline in isokinetic force with age : Muscle cross-sectional area and specific force. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *434*(3), 246-253. https://doi.org/10.1007/s004240050392

Jung, C. H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D.-H. (2010). MTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, *584*(7), 1287-1295. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017

Jung, T., Catalgol, B., & Grune, T. (2009). The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(4), 191-296. https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.04.001

Kadi, F., Charifi, N., Denis, C., & Lexell, J. (2004). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle & Nerve*, *29*(1), 120-127. https://doi.org/10.1002/mus.10510

Kahn, E., Vejux, A., Dumas, D., Montange, T., Frouin, F., Robert, V., Riedinger, J.-M., Stoltz, J.-F., Gambert, P., Todd-Pokropek, A., & Lizard, G. (2005). FRET multiphoton spectral imaging

microscopy of 7-ketocholesterol and Nile Red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol. *Analytical and quantitative cytology and histology / the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*, *26*, 304-313.

Kamel, H. K. (2003). Sarcopenia and Aging. *Nutrition Reviews*, *61*(5), 157-167. https://doi.org/10.1301/nr.2003.may.157-167

Kang, P., Wang, Y., Li, X., Wan, Z., Wang, X., Zhu, H., Wang, C., Zhao, S., Chen, H., & Liu, Y. (2020). Effect of flaxseed oil on muscle protein loss and carbohydrate oxidation impairment in a pig model after lipopolysaccharide challenge. *British Journal of Nutrition*, *123*(8), 859-869. https://doi.org/10.1017/S0007114519002393

Kanner, J., & Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor : Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, *31*(11), 1388-1395. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00718-3

Kato, H., Suzuki, H., Mimura, M., Inoue, Y., Sugita, M., Suzuki, K., & Kobayashi, H. (2015). Leucine-enriched essential amino acids attenuate muscle soreness and improve muscle protein synthesis after eccentric contractions in rats. *Amino Acids*, *47*(6), 1193-1201. https://doi.org/10.1007/s00726-015-1946-9

Kelly, M., Gauthier, M.-S., Saha, A. K., & Ruderman, N. B. (2009). Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Interleukin-6 in Rat Skeletal Muscle. *Diabetes*, *58*(9), 1953-1960. https://doi.org/10.2337/db08-1293

Kemp, S., Theodoulou, F. L., & Wanders, R. J. (2011). Mammalian peroxisomal ABC transporters : From endogenous substrates to pathology and clinical significance. *British Journal of Pharmacology*, *164*(7), 1753-1766. https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01435.x

Kent-Braun, J. A., & Ng, A. V. (2000). Skeletal muscle oxidative capacity in young and older women and men. *Journal of Applied Physiology*, *89*(3), 1072-1078. https://doi.org/10.1152/jappl.2000.89.3.1072

Kent-Braun, J. A., Ng, A. V., & Young, K. (2000). Skeletal muscle contractile and noncontractile components in young and older women and men. *Journal of Applied Physiology*, *88*(2), 662-668. https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.2.662

Khedir, S. B., Bardaa, S., Chabchoub, N., Moalla, D., Sahnoun, Z., & Rebai, T. (2017). The healing effect of Pistacia lentiscus fruit oil on laser burn. *Pharmaceutical Biology*, *55*(1), 1407-1414. https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1233569

Kiefer, L. S., Fabian, J., Rospleszcz, S., Lorbeer, R., Machann, J., Kraus, M. S., Fischer, M., Roemer, F., Rathmann, W., Meisinger, C., Heier, M., Nikolaou, K., Peters, A., Storz, C., Schlett, C. L., & Bamberg, F. (2022). Population-based cohort imaging : Skeletal muscle mass by magnetic resonance imaging in correlation to bioelectrical-impedance analysis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *13*(2), 976-986. https://doi.org/10.1002/jcsm.12913

Kihara, A. (2012). Very long-chain fatty acids : Elongation, physiology and related disorders. *The Journal of Biochemistry*, *152*(5), 387-395. https://doi.org/10.1093/jb/mvs105

Kilvington, A., Barnaba, C., Rajasekaran, S., Laurens Leimanis, M. L., & Medina-Meza, I. G. (2021). Lipid profiling and dietary assessment of infant formulas reveal high intakes of major cholesterol oxidative product (7-ketocholesterol). *Food Chemistry*, *354*, 129529. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129529

Kim, C., & Hwang, J.-K. (2020). The 5,7-Dimethoxyflavone Suppresses Sarcopenia by Regulating Protein Turnover and Mitochondria Biogenesis-Related Pathways. *Nutrients*, *12*(4), 1079. https://doi.org/10.3390/nu12041079

Kim, D.-O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H.-Y., & Lee, C. Y. (2003). Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(22), 6509-6515. https://doi.org/10.1021/jf0343074

Kim, J., & Bai, H. (2022). Peroxisomal Stress Response and Inter-Organelle Communication in Cellular Homeostasis and Aging. *Antioxidants*, *11*(2), 192. https://doi.org/10.3390/antiox11020192

Kim, J.-H., Kwak, H.-B., Leeuwenburgh, C., & Lawler, J. M. (2008). Lifelong exercise and mild (8%) caloric restriction attenuate age-induced alterations in plantaris muscle morphology, oxidative stress and IGF-1 in the Fischer-344 rat. *Experimental Gerontology*, *43*(4), 317-329. https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.12.012

Kim, J.-L., Kim, Y.-H., Kang, M.-K., Gong, J.-H., Han, S.-J., & Kang, Y.-H. (2013). Antiosteoclastic Activity of Milk Thistle Extract after Ovariectomy to Suppress Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis. *BioMed Research International*, *2013*, e919374. https://doi.org/10.1155/2013/919374

Kim, Y. A., Kim, Y. S., Oh, S. L., Kim, H.-J., & Song, W. (2013). Autophagic response to exercise training in skeletal muscle with age. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *69*(4), 697-705. https://doi.org/10.1007/s13105-013-0246-7

Kitakaze, T., Harada, N., Imagita, H., & Yamaji, R. (2015). β-Carotene Increases Muscle Mass and Hypertrophy in the Soleus Muscle in Mice. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *61*(6), 481-487. https://doi.org/10.3177/jnsv.61.481

Klionsky, D. J., & Emr, S. D. (2000). Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science (New York, N.Y.)*, *290*(5497), 1717-1721.

Klouwer, F. C. C., Berendse, K., Ferdinandusse, S., Wanders, R. J. A., Engelen, M., & Poll-The, B. T. (2015). Zellweger spectrum disorders : Clinical overview and management approach. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *10*(1), 151. https://doi.org/10.1186/s13023-015-0368-9

Kovacheva, E. L., Hikim, A. P. S., Shen, R., Sinha, I., & Sinha-Hikim, I. (2010). Testosterone supplementation reverses sarcopenia in aging through regulation of myostatin, c-Jun NH2-terminal kinase, Notch, and Akt signaling pathways. *Endocrinology*, *151*(2), 628-638. https://doi.org/10.1210/en.2009-1177

Kulig, W., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Rog, T., & Vattulainen, I. (2016). Cholesterol oxidation products and their biological importance. *Chemistry and Physics of Lipids*, *199*, 144-160. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.03.001

Kumaran, S., Savitha, S., Anusuya Devi, M., & Panneerselvam, C. (2004). L-carnitine and DL-alpha-lipoic acid reverse the age-related deficit in glutathione redox state in skeletal muscle and heart tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*, *125*(7), 507-512. https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.05.004

Kundu, M., & Thompson, C. B. (2008). Autophagy : Basic principles and relevance to disease. *Annual Review of Pathology*, *3*, 427-455. https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.2.010506.091842

Kunzelmann, K. (2016). Ion channels in regulated cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(11), 2387-2403. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2208-z

Kurmaev, D. P., Bulgakova, S. V., Zakharova, N. O., Treneva, E. V., & Nikolaeva, A. V. (2021). [Relationship of kidney functions with geriatric syndromes in elderly and old women.]. *Advances in Gerontology = Uspekhi Gerontologii*, *34*(3), 367-374.

Lai, J., Tang, Y., Yang, F., Chen, J., Huang, F.-H., Yang, J., Wang, L., Qin, D., Law, B. Y.-K., Wu, A.-G., & Wu, J.-M. (2022). Targeting autophagy in ethnomedicine against human diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, *282*, 114516. https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114516

Lambert, A. J., & Merry, B. J. (2004). Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics : Reversal by insulin. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *286*(1), R71-79. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00341.2003

Lang, C. H., Frost, R. A., & Vary, T. C. (2007). Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *293*(2), E453-459. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00204.2007

Lapidot, T., Granit, R., & Kanner, J. (2005). Lipid hydroperoxidase activity of myoglobin and phenolic antioxidants in simulated gastric fluid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(9), 3391-3396. https://doi.org/10.1021/jf040400w

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2009). MTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 20), 3589-3594. https://doi.org/10.1242/jcs.051011

Lardiés-Sánchez, B., & París, A. (2017). *Sarcopenia and Malnutrition in the Elderly*. https://doi.org/10.5772/intechopen.68426

Larsson, H., Böttiger, Y., Iuliano, L., & Diczfalusy, U. (2007). In vivo interconversion of 7β-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol, potential surrogate markers for oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *43*(5), 695-701. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.033

Lauretani, F., Russo, C. R., Bandinelli, S., Bartali, B., Cavazzini, C., Di Iorio, A., Corsi, A. M., Rantanen, T., Guralnik, J. M., & Ferrucci, L. (2003). Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility : An operational diagnosis of sarcopenia. *Journal of Applied Physiology*, *95*(5), 1851-1860. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00246.2003

Lawrence, R. E., & Zoncu, R. (2019). The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nature Cell Biology*, *21*(2), 133-142. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0244-7

Leduc-Gaudet, J.-P., Picard, M., Pelletier, F. S.-J., Sgarioto, N., Auger, M.-J., Vallée, J., Robitaille, R., St-Pierre, D. H., & Gouspillou, G. (2015). Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget*, *6*(20), 17923-17937.

Lee, J. H., Jeon, J. H., & Lee, M. J. (2020). Docosahexaenoic Acid, a Potential Treatment for Sarcopenia, Modulates the Ubiquitin-Proteasome and the Autophagy-Lysosome Systems. *Nutrients*, *12*(9), E2597. https://doi.org/10.3390/nu12092597

Lee, J.-H., Tachibana, H., Morinaga, Y., Fujimura, Y., & Yamada, K. (2009). Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids. *Life Sciences*, *84*(13-14), 415-420. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.01.004

Lee, M. Y., Sumpter, R., Zou, Z., Sirasanagandla, S., Wei, Y., Mishra, P., Rosewich, H., Crane, D. I., & Levine, B. (2017). Peroxisomal protein PEX13 functions in selective autophagy. *EMBO Reports*, *18*(1), 48-60. https://doi.org/10.15252/embr.201642443

Léger, B., Derave, W., De Bock, K., Hespel, P., & Russell, A. P. (2008). Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. *Rejuvenation Research*, *11*(1), 163-175B. https://doi.org/10.1089/rej.2007.0588

Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Berthier, A., Bessède, G., Corcos, L., Gambert, P., Néel, D., & Lizard, G. (2005). Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biology and Toxicology*, *21*(2), 97-114. https://doi.org/10.1007/s10565-005-0141-2

Lemaitre, R. N., & King, I. B. (2022). Very long-chain saturated fatty acids and diabetes and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, *33*(1), 76-82. https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000806

Leonarduzzi, G., Gargiulo, S., Gamba, P., Testa, G., Sottero, B., Rossin, D., Staurenghi, E., & Poli, G. (2014). Modulation of cell signaling pathways by oxysterols in age-related human diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, *75 Suppl 1*, S5. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.837

Leong, D. P., Teo, K. K., Rangarajan, S., Lopez-Jaramillo, P., Avezum, A., Orlandini, A., Seron, P., Ahmed, S. H., Rosengren, A., Kelishadi, R., Rahman, O., Swaminathan, S., Iqbal, R., Gupta, R., Lear, S. A., Oguz, A., Yusoff, K., Zatonska, K., Chifamba, J., … Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) Study investigators. (2015). Prognostic value of grip strength : Findings from the Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study. *Lancet (London, England)*, *386*(9990), 266-273. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62000-6

Leoni, V., Nury, T., Vejux, A., Zarrouk, A., Caccia, C., Debbabi, M., Fromont, A., Sghaier, R., Moreau, T., & Lizard, G. (2017). Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α-tocopherol : Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *169*, 96-110. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.029

Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by Self-Digestion : Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Developmental Cell*, *6*(4), 463-477. https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00099-1

Lezza, A. M. S., Pesce, V., Cormio, A., Fracasso, F., Vecchiet, J., Felzani, G., Cantatore, P., & Gadaleta, M. N. (2001). Increased expression of mitochondrial transcription factor A and nuclear respiratory factor-1 in skeletal muscle from aged human subjects. *FEBS Letters*, *501*(1), 74-78. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02628-X

Li, C., Deng, X., Xie, X., Liu, Y., Friedmann Angeli, J. P., & Lai, L. (2018). Activation of Glutathione Peroxidase 4 as a Novel Anti-inflammatory Strategy. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.01120

Li, Y.-P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D. L., & Reid, M. B. (2005). TNF-α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(3), 362-370. https://doi.org/10.1096/fj.04-2364com

Li, Y.-P., Chen, Y., Li, A. S., & Reid, M. B. (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *285*(4), C806-812. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00129.2003

Liao, P.-C., Lai, M.-H., Hsu, K.-P., Kuo, Y.-H., Chen, J., Tsai, M.-C., Li, C.-X., Yin, X.-J., Jeyashoke, N., & Chao, L. K.-P. (2018). Identification of β-Sitosterol as in Vitro Anti-Inflammatory Constituent in Moringa oleifera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(41), 10748-10759. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04555

Lin, J. B., Sene, A., Santeford, A., Fujiwara, H., Sidhu, R., Ligon, M. M., Shankar, V. A., Ban, N., Mysorekar, I. U., Ory, D. S., & Apte, R. S. (2018). Oxysterol Signatures Distinguish Age-Related Macular Degeneration from Physiologic Aging. *EBioMedicine*, *32*, 9-20. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.05.035

Linkermann, A., Skouta, R., Himmerkus, N., Mulay, S. R., Dewitz, C., De Zen, F., Prokai, A., Zuchtriegel, G., Krombach, F., Welz, P.-S., Weinlich, R., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., Pasparakis, M., Bleich, M., Weinberg, J. M., Reichel, C. A., Bräsen, J. H., Kunzendorf, U., … Krautwald, S. (2014). Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(47), 16836-16841. https://doi.org/10.1073/pnas.1415518111

Lismont, C., Nordgren, M., Van Veldhoven, P. P., & Fransen, M. (2015). Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *3*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2015.00035

Lluís, F., Perdiguero, E., Nebreda, A. R., & Muñoz-Cánoves, P. (2006). Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends in Cell Biology*, *16*(1), 36-44. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.11.002

López-Lluch, G., Hunt, N., Jones, B., Zhu, M., Jamieson, H., Hilmer, S., Cascajo, M. V., Allard, J., Ingram, D. K., Navas, P., & de Cabo, R. (2006). Calorie restriction induces mitochondrial biogenesis and bioenergetic efficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(6), 1768-1773. https://doi.org/10.1073/pnas.0510452103

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, *153*(6), 1194-1217. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039

Losón, O. C., Song, Z., Chen, H., & Chan, D. C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell*, *24*(5), 659-667. https://doi.org/10.1091/mbc.e12-10-0721

Lund, E. G., Kerr, T. A., Sakai, J., Li, W. P., & Russell, D. W. (1998). CDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(51), 34316-34327. https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.34316

Lunova, M., Goehring, C., Kuscuoglu, D., Mueller, K., Chen, Y., Walther, P., Deschemin, J.-C., Vaulont, S., Haybaeck, J., Lackner, C., Trautwein, C., & Strnad, P. (2014). Hepcidin knockout mice fed with iron-rich diet develop chronic liver injury and liver fibrosis due to lysosomal iron overload. *Journal of Hepatology*, *61*(3), 633-641. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.034

Ma, L., & Nelson, E. R. (2019). Oxysterols and nuclear receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *484*, 42-51. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.016

Maier, C. S., Chavez, J., Wang, J., & Wu, J. (2010). Protein adducts of aldehydic lipid peroxidation products identification and characterization of protein adducts using an aldehyde/keto-reactive probe in combination with mass spectrometry. *Methods in Enzymology*, *473*, 305-330. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)73016-0

Mansouri, A., Muller, F. L., Liu, Y., Ng, R., Faulkner, J., Hamilton, M., Richardson, A., Huang, T.-T., Epstein, C. J., & Van Remmen, H. (2006). Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, *127*(3), 298-306. https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.11.004

Marcinek, D. J., Schenkman, K. A., Ciesielski, W. A., Lee, D., & Conley, K. E. (2005). Reduced mitochondrial coupling in vivo alters cellular energetics in aged mouse skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, *569*(2), 467-473. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.097782

Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P., & Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & Development*, *18*(24), 3066-3077. https://doi.org/10.1101/gad.1250704

Martínez-Arnau, F. M., Fonfría-Vivas, R., Buigues, C., Castillo, Y., Molina, P., Hoogland, A. J., van Doesburg, F., Pruimboom, L., Fernández-Garrido, J., & Cauli, O. (2020). Effects of Leucine Administration in Sarcopenia : A Randomized and Placebo-controlled Clinical Trial. *Nutrients*, *12*(4), E932. https://doi.org/10.3390/nu12040932

Marzani, B., Balage, M., Vénien, A., Astruc, T., Papet, I., Dardevet, D., & Mosoni, L. (2008). Antioxidant supplementation restores defective leucine stimulation of protein synthesis in skeletal muscle from old rats. *The Journal of Nutrition*, *138*(11), 2205-2211. https://doi.org/10.3945/jn.108.094029

Marzani, B., Pansarasa, O., & Marzatico, F. (2003). [PDF] « Oxidative stress » and muscle aging : Influence of age, sex, fiber composition and function | Semantic Scholar. *Undefined*.

https://www.semanticscholar.org/paper/%22Oxidative-stress%22-and-muscle-aging%3A-influence-of-Marzani-Pansarasa/295d006420c4cccda4a4f10b5e216bd53b358a29

Marzetti, E., Calvani, R., Bernabei, R., & Leeuwenburgh, C. (2012). Apoptosis in Skeletal Myocytes : A Potential Target for Interventions against Sarcopenia and Physical Frailty – A Mini-Review. *Gerontology*, *58*(2), 99-106. https://doi.org/10.1159/000330064

Marzetti, E., Calvani, R., Cesari, M., Buford, T. W., Lorenzi, M., Behnke, B. J., & Leeuwenburgh, C. (2013). Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging : From signaling pathways to clinical trials. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(10), 2288-2301. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.024

Marzetti, E., Lawler, J. M., Hiona, A., Manini, T., Seo, A. Y., & Leeuwenburgh, C. (2008). Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, *44*(2), 160-168. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.028

Marzetti, E., & Leeuwenburgh, C. (2006). Skeletal muscle apoptosis, sarcopenia and frailty at old age. *Experimental Gerontology*, *41*(12), 1234-1238. https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.08.011

Massaad, C., Iuliano, L., & Lizard, G. (2017). Oxysterols and phytosterols in human health. *Chemistry and Physics of Lipids*, *207*, 49-50. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.08.003

Masuyama, M., Iida, R., Takatsuka, H., Yasuda, T., & Matsuki, T. (2005). Quantitative change in mitochondrial DNA content in various mouse tissues during aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1723*(1), 302-308. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.03.001

Matés, J. M., Pérez-Gómez, C., & Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, *32*(8), 595-603. https://doi.org/10.1016/s0009-9120(99)00075-2

Matos, L. C., Pereira, J. A., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2007). Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry*, *102*(3), 976-983. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.026

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *9*, 493-495. https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493

Maurya, P., Kumar, P., & Chandra, Dr. P. (2015). Biomarkers of oxidative stress in erythrocytes as a function of human age. *World Journal of Methodology*, *5*, 216-222. https://doi.org/10.5662/wjm.v5.i4.216

McClung, J. M., Judge, A. R., Talbert, E. E., & Powers, S. K. (2009). Calpain-1 is required for hydrogen peroxide-induced myotube atrophy. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *296*(2), C363-371. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00497.2008

McKendry, J., Currier, B. S., Lim, C., Mcleod, J. C., Thomas, A. C. Q., & Phillips, S. M. (2020). Nutritional Supplements to Support Resistance Exercise in Countering the Sarcopenia of Aging. *Nutrients*, *12*(7), E2057. https://doi.org/10.3390/nu12072057

McMullen, C. A., Ferry, A. L., Gamboa, J. L., Andrade, F. H., & Dupont-Versteegden, E. E. (2009). Age-related changes of cell death pathways in rat extraocular muscle. *Experimental Gerontology*, *44*(6-7), 420-425. https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.03.006

Meaney, S., Bodin, K., Diczfalusy, U., & Björkhem, I. (2002). On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation : Critical importance of the position of the oxygen function. *Journal of Lipid Research*, *43*(12), 2130-2135. https://doi.org/10.1194/jlr.m200293-jlr200

Mecocci, P., Fanó, G., Fulle, S., MacGarvey, U., Shinobu, L., Polidori, M. C., Cherubini, A., Vecchiet, J., Senin, U., & Beal, M. F. (1999). Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*(3-4), 303-308. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00208-1

Meng, S.-J., & Yu, L.-J. (2010). Oxidative Stress, Molecular Inflammation and Sarcopenia. *International Journal of Molecular Sciences*, *11*(4), 1509-1526. https://doi.org/10.3390/ijms11041509

Meng, X., Zhu, K., Devine, A., Kerr, D. A., Binns, C. W., & Prince, R. L. (2009). A 5-Year Cohort Study of the Effects of High Protein Intake on Lean Mass and BMC in Elderly Postmenopausal Women. *Journal of Bone and Mineral Research*, *24*(11), 1827-1834. https://doi.org/10.1359/jbmr.090513

Meriggioli, M. N., & Roubenoff, R. (2015). Prospect for pharmacological therapies to treat skeletal muscle dysfunction. *Calcified Tissue International*, *96*(3), 234-242. https://doi.org/10.1007/s00223-014-9926-8

Mezni, F., Shili, S., Ben Ali, N., Larbi Khouja, M., Khaldi, A., & Maaroufi, A. (2016). Evaluation of Pistacia lentiscus seed oil and phenolic compounds for in vitro antiproliferative effects against BHK21 cells. *Pharmaceutical Biology*, *54*(5), 747-751. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1079222

Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J., & Thérond, P. (2009). Biomarkers of lipid peroxidation : Analytical aspects. *Annales de biologie clinique*, *66*, 605-620. https://doi.org/10.1684/abc.2008.0283

Milia, E., Bullitta, S. M., Mastandrea, G., Szotáková, B., Schoubben, A., Langhansová, L., Quartu, M., Bortone, A., & Eick, S. (2021). Leaves and Fruits Preparations of Pistacia lentiscus L. : A Review on the Ethnopharmacological Uses and Implications in Inflammation and Infection. *Antibiotics*, *10*(4), 425. https://doi.org/10.3390/antibiotics10040425

Miller, C. J., Gounder, S. S., Kannan, S., Goutam, K., Muthusamy, V. R., Firpo, M. A., Symons, J. D., Paine, R., Hoidal, J. R., & Rajasekaran, N. S. (2012). Disruption of Nrf2/ARE signaling impairs antioxidant mechanisms and promotes cell degradation pathways in aged skeletal muscle. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1822*(6), 1038-1050. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.02.007

Mishra, P., & Chan, D. C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *The Journal of Cell Biology*, *212*(4), 379-387. https://doi.org/10.1083/jcb.201511036

Moilanen, T., & Nikkari, T. (1981). The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clinica Chimica Acta*, *114*(1), 111-116. https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90235-7

Molinari, F., Pin, F., Gorini, S., Chiandotto, S., Pontecorvo, L., Penna, F., Rizzuto, E., Pisu, S., Musarò, A., Costelli, P., Rosano, G., & Ferraro, E. (2017). The mitochondrial metabolic reprogramming agent trimetazidine as an 'exercise mimetic' in cachectic C26-bearing mice. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *8*(6), 954-973. https://doi.org/10.1002/jcsm.12226

Molyneux, P. (2004). *The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. *26*(2), 9.

Monier, S., Samadi, M., Prunet, C., Denance, M., Laubriet, A., Athias, A., Berthier, A., Steinmetz, E., Jürgens, G., Nègre-Salvayre, A., Bessède, G., Lemaire-Ewing, S., Néel, D., Gambert, P., & Lizard, G. (2003). Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *303*(3), 814-824. https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00412-1

Morley, J. E. (2011). Should frailty be treated with testosterone? *The Aging Male: The Official Journal of the International Society for the Study of the Aging Male*, *14*(1), 1-3. https://doi.org/10.3109/13685538.2010.502271

Morley, J. E. (2012). Sarcopenia in the elderly. *Family Practice*, *29 Suppl 1*, i44-i48. https://doi.org/10.1093/fampra/cmr063

Morley, J. E. (2016). Pharmacologic Options for the Treatment of Sarcopenia. *Calcified Tissue International*, *98*(4), 319-333. https://doi.org/10.1007/s00223-015-0022-5

Morley, J. E., Anker, S. D., & von Haehling, S. (2014). Prevalence, incidence, and clinical impact of sarcopenia : Facts, numbers, and epidemiology—update 2014. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *5*(4), 253-259. https://doi.org/10.1007/s13539-014-0161-y

Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Aggarwal, N., Schneider, J., & Wilson, R. S. (2003). Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, *60*(2), 194-200. https://doi.org/10.1001/archneur.60.2.194

Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *Journal of Lipid Research*, *5*(4), 600-608. https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)40190-7

Muller, F. L., Song, W., Liu, Y., Chaudhuri, A., Pieke-Dahl, S., Strong, R., Huang, T.-T., Epstein, C. J., Roberts, L. J., Csete, M., Faulkner, J. A., & Van Remmen, H. (2006). Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology & Medicine*, *40*(11), 1993-2004. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.01.036

Murakami, H., Guillet, C., Tardif, N., Salles, J., Migné, C., Boirie, Y., & Walrand, S. (2012). Cumulative 3-nitrotyrosine in specific muscle proteins is associated with muscle loss during aging. *Experimental Gerontology*, *47*(2), 129-135. https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.11.007

Murdolo, G., Piroddi, M., Tortoioli, C., Bartolini, D., Schmelz, M., Luchetti, F., Canonico, B., Papa, S., Zerbinati, C., Iuliano, L., & Galli, F. (2016). Free Radical-derived Oxysterols : Novel Adipokines Modulating Adipogenic Differentiation of Adipose Precursor Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *101*(12), 4974-4983. https://doi.org/10.1210/jc.2016-2918

Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., & Muccioli, G. G. (2016). Oxysterols : From cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in Lipid Research*, *64*, 152-169. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.002

Mutemberezi, V., Masquelier, J., Guillemot-Legris, O., & Muccioli, G. G. (2016). Development and validation of an HPLC-MS method for the simultaneous quantification of key oxysterols, endocannabinoids, and ceramides : Variations in metabolic syndrome. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(3), 733-745. https://doi.org/10.1007/s00216-015-9150-z

Nakamura, A., Kawakami, K., Kametani, F., Nakamoto, H., & Goto, S. (2010). Biological significance of protein modifications in aging and calorie restriction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1197*, 33-39. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05374.x

Namsi, A., Nury, T., Khan, A. S., Leprince, J., Vaudry, D., Caccia, C., Leoni, V., Atanasov, A. G., Tonon, M.-C., Masmoudi-Kouki, O., & Lizard, G. (2019). Octadecaneuropeptide (ODN) Induces N2a Cells Differentiation through a PKA/PLC/PKC/MEK/ERK-Dependent Pathway : Incidence on Peroxisome, Mitochondria, and Lipid Profiles. *Molecules*, *24*(18), 3310. https://doi.org/10.3390/molecules24183310

Narici, M. V., & Maffulli, N. (2010). Sarcopenia : Characteristics, mechanisms and functional significance. *British Medical Bulletin*, *95*, 139-159. https://doi.org/10.1093/bmb/ldq008

Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Pappa, A., Panayiotidis, M. I., & Franco, R. (2014). Oxidative stress, redox signaling, and autophagy : Cell death versus survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, *21*(1), 66-85. https://doi.org/10.1089/ars.2014.5837

Niemelä, M. S., Kangas, M., Ahola, R. J., Auvinen, J. P., Leinonen, A.-M., Tammelin, T. H., Vaaramo, E. S., Keinänen-Kiukaanniemi, S. M., Korpelainen, R. I., & Jämsä, T. J. (2019). Dose-response relation of self-reported and accelerometer-measured physical activity to perceived health in

middle age-the Northern Finland Birth Cohort 1966 Study. *BMC Public Health*, *19*(1), 21. https://doi.org/10.1186/s12889-018-6359-8

Ning, H.-T., Du, Y., Zhao, L.-J., Tian, Q., Feng, H., & Deng, H.-W. (2021). Racial and gender differences in the relationship between sarcopenia and bone mineral density among older adults. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, *32*(5), 841-851. https://doi.org/10.1007/s00198-020-05744-y

Nixon, M., & Andrew, R. (2021). Oxysterols as therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*, *178*(16), 3085-3088. https://doi.org/10.1111/bph.15577

Nury, T., Sghaier, R., Zarrouk, A., Ménétrier, F., Uzun, T., Leoni, V., Caccia, C., Meddeb, W., Namsi, A., Sassi, K., Mihoubi, W., Riedinger, J.-M., Cherkaoui-Malki, M., Moreau, T., Vejux, A., & Lizard, G. (2018). Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol : Attenuation by α-tocopherol. *Biochimie*, *153*, 181-202. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.009

Nury, T., Yammine, A., Ghzaiel, I., Sassi, K., Zarrouk, A., Brahmi, F., Samadi, M., Rup-Jacques, S., Vervandier-Fasseur, D., Pais de Barros, J. P., Bergas, V., Ghosh, S., Majeed, M., Pande, A., Atanasov, A., Hammami, S., Hammami, M., Mackrill, J., Nasser, B., … Lizard, G. (2021). Attenuation of 7-ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced oxiapoptophagy by nutrients, synthetic molecules and oils : Potential for the prevention of age-related diseases. *Ageing Research Reviews*, *68*, 101324. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101324

Nury, T., Zarrouk, A., Mackrill, J. J., Samadi, M., Durand, P., Riedinger, J.-M., Doria, M., Vejux, A., Limagne, E., Delmas, D., Prost, M., Moreau, T., Hammami, M., Delage-Mourroux, R., O'Brien, N. M., & Lizard, G. (2015). Induction of oxiapoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7β-hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol : Protective effects of α-tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids*, *99*(Pt B), 194-203. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.003

Nury, T., Zarrouk, A., Ragot, K., Debbabi, M., Riedinger, J.-M., Vejux, A., Aubourg, P., & Lizard, G. (2017). 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells : Potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *169*, 123-136. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.037

Nury, T., Zarrouk, A., Yammine, A., Mackrill, J. J., Vejux, A., & Lizard, G. (2021). Oxiapoptophagy : A type of cell death induced by some oxysterols. *British Journal of Pharmacology*, *178*(16), 3115-3123. https://doi.org/10.1111/bph.15173

Ochi, E., & Tsuchiya, Y. (2018). Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA) in Muscle Damage and Function. *Nutrients*, *10*(5), E552. https://doi.org/10.3390/nu10050552

O'Leary, M. F., Vainshtein, A., Iqbal, S., Ostojic, O., & Hood, D. A. (2013). Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *304*(5), C422-430. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00240.2012

Olkkonen, V. M., & Hynynen, R. (2009). Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(3), 123-133. https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.004

O'Loghlen, A., Pérez-Morgado, M. I., Salinas, M., & Martín, M. E. (2006). N-acetyl-cysteine abolishes hydrogen peroxide-induced modification of eukaryotic initiation factor 4F activity via distinct signalling pathways. *Cellular Signalling*, *18*(1), 21-31. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.013

Otera, H., & Mihara, K. (2011). Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *Journal of Biochemistry*, *149*(3), 241-251. https://doi.org/10.1093/jb/mvr002

Otis, J. S., Niccoli, S., Hawdon, N., Sarvas, J. L., Frye, M. A., Chicco, A. J., & Lees, S. J. (2014). Pro-Inflammatory Mediation of Myoblast Proliferation. *PLOS ONE*, *9*(3), e92363. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092363

Owsley, C. (2016). Vision and Aging. *Annual Review of Vision Science*, *2*, 255-271. https://doi.org/10.1146/annurev-vision-111815-114550

Pajares, M., Jiménez-Moreno, N., Dias, I. H. K., Debelec, B., Vucetic, M., Fladmark, K. E., Basaga, H., Ribaric, S., Milisav, I., & Cuadrado, A. (2015). Redox control of protein degradation. *Redox Biology*, *6*, 409-420. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.003

Pal, R., Palmieri, M., Loehr, J. A., Li, S., Abo-Zahrah, R., Monroe, T. O., Thakur, P. B., Sardiello, M., & Rodney, G. G. (2014). Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications*, *5*, 4425. https://doi.org/10.1038/ncomms5425

Pamplona, R., Portero-Otín, M., Ruiz, C., Gredilla, R., Herrero, A., & Barja, G. (2000). Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mechanisms of Ageing and Development*, *112*(3), 169-183. https://doi.org/10.1016/s0047-6374(99)00045-7

Pan, L., Xie, W., Fu, X., Lu, W., Jin, H., Lai, J., Zhang, A., Yu, Y., Li, Y., & Xiao, W. (2021). Inflammation and sarcopenia : A focus on circulating inflammatory cytokines. *Experimental Gerontology*, *154*, 111544. https://doi.org/10.1016/j.exger.2021.111544

Park, S. W., & Addis, P. B. (1985). HPLC Determination of C-7 Oxidized Cholesterol Derivatives in Foods. *Journal of Food Science*, *50*(5), 1437-1441. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb10494.x

Pascual-Ahuir, A., Manzanares-Estreder, S., & Proft, M. (2017). Pro- and Antioxidant Functions of the Peroxisome-Mitochondria Connection and Its Impact on Aging and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2017*, e9860841. https://doi.org/10.1155/2017/9860841

Paturi, S., Gutta, A. K., Katta, A., Kakarla, S. K., Arvapalli, R. K., Gadde, M. K., Nalabotu, S. K., Rice, K. M., Wu, M., & Blough, E. (2010). Effects of aging and gender on muscle mass and regulation of Akt-mTOR-p70s6k related signaling in the F344BN rat model. *Mechanisms of Ageing and Development*, *131*(3), 202-209. https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.01.008

Payne, A. M., Dodd, S. L., & Leeuwenburgh, C. (2003). Life-long calorie restriction in Fischer 344 rats attenuates age-related loss in skeletal muscle-specific force and reduces extracellular space. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *95*(6), 2554-2562. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00758.2003

Peake, J. M., Della Gatta, P., Suzuki, K., & Nieman, D. C. (2015). Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells : Regulatory mechanisms and exercise effects. *Exercise Immunology Review*, *21*, 8-25.

Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., Marie, J.-C., Pouzet, C., Samadi, M., Elbim, C., O'Dowd, Y., Bens, M., Vandewalle, A., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Lizard, G., & Ogier-Denis, E. (2004). NAD(P)H Oxidase Nox-4 Mediates 7-Ketocholesterol-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(24), 10703-10717. https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10703-10717.2004

Peng, J., Jones, G. L., & Watson, K. (2000). Stress proteins as biomarkers of oxidative stress : Effects of antioxidant supplements. *Free Radical Biology & Medicine*, *28*(11), 1598-1606. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00276-8

Pesce, V., Cormio, A., Fracasso, F., Lezza, A. M. S., Cantatore, P., & Gadaleta, M. N. (2005). Age-Related Changes of Mitochondrial DNA Content and Mitochondrial Genotypic and Phenotypic

Alterations in Rat Hind-Limb Skeletal Muscles. *The Journals of Gerontology: Series A*, *60*(6), 715-723. https://doi.org/10.1093/gerona/60.6.715

Petrella, J. K., Kim, J.-S., Mayhew, D. L., Cross, J. M., & Bamman, M. M. (2008). Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition : A cluster analysis. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *104*(6), 1736-1742. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01215.2007

Petrovski, G., & Das, D. K. (2010). Does autophagy take a front seat in lifespan extension? *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(11), 2543-2551. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01196.x

Philippou, A., Halapas, A., Maridaki, M., & Koutsilieris, M. (2007). Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, *7*(3), 208-218.

Phillips, T., & Leeuwenburgh, C. (2005). Muscle fiber-specific apoptosis and TNF-α signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *The FASEB Journal*, *19*(6), 1-33. https://doi.org/10.1096/fj.04-2870fje

Picard, M., Ritchie, D., Thomas, M. M., Wright, K. J., & Hepple, R. T. (2011). Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell*, *10*(6), 1047-1055. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00745.x

Picard, M., White, K., & Turnbull, D. M. (2013). Mitochondrial morphology, topology, and membrane interactions in skeletal muscle : A quantitative three-dimensional electron microscopy study. *Journal of Applied Physiology*, *114*(2), 161-171. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01096.2012

Picca, A., Calvani, R., Lorenzi, M., Menghi, A., Galli, M., Vitiello, R., Randisi, F., Bernabei, R., Landi, F., & Marzetti, E. (2017). Mitochondrial dynamics signaling is shifted toward fusion in muscles of very old hip-fractured patients : Results from the Sarcopenia in HIp FracTure (SHIFT) exploratory study. *Experimental Gerontology*, *96*, 63-67. https://doi.org/10.1016/j.exger.2017.06.005

Pluijm, S. M., Visser, M., Puts, M. T. E., Dik, M. G., Schalk, B. W. M., van Schoor, N. M., Schaap, L. A., Bosscher, R. J., & Deeg, D. J. H. (2007). Unhealthy lifestyles during the life course : Association with physical decline in late life. *Aging Clinical and Experimental Research*, *19*(1), 75-83. https://doi.org/10.1007/BF03325214

Polero, P., Rebollo-Seco, C., Adsuar, J. C., Pérez-Gómez, J., Rojo-Ramos, J., Manzano-Redondo, F., Garcia-Gordillo, M. Á., & Carlos-Vivas, J. (2020). Physical Activity Recommendations during COVID-19 : Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(1), E65. https://doi.org/10.3390/ijerph18010065

Poli, G., Biasi, F., & Leonarduzzi, G. (2013). Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biology*, *1*, 125-130. https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.001

Popelka, H., & Klionsky, D. J. (2017). The molecular mechanism of Atg13 function in autophagy induction : What is hidden behind the data? *Autophagy*, *13*(3), 449-451. https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1277312

Powers, S. K., Morton, A. B., Ahn, B., & Smuder, A. J. (2016). Redox control of skeletal muscle atrophy. *Free Radical Biology & Medicine*, *98*, 208-217. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.021

Powers, S. K., Smuder, A. J., & Criswell, D. S. (2011). Mechanistic links between oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(9), 2519-2528. https://doi.org/10.1089/ars.2011.3973

Pressly, J. D., Gurumani, M. Z., Varona Santos, J. T., Fornoni, A., Merscher, S., & Al-Ali, H. (2022). Adaptive and maladaptive roles of lipid droplets in health and disease. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, *322*(3), C468-C481. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00239.2021

Prunet, C., Montange, T., Véjux, A., Laubriet, A., Rohmer, J.-F., Riedinger, J.-M., Athias, A., Lemaire-Ewing, S., Néel, D., Petit, J.-M., Steinmetz, E., Brenot, R., Gambert, P., & Lizard, G. (2006). Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *69*(5), 359-373. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20272

Puts, M. T. E., Lips, P., & Deeg, D. J. H. (2005). Static and dynamic measures of frailty predicted decline in performance-based and self-reported physical functioning. *Journal of Clinical Epidemiology*, *58*(11), 1188-1198. https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2005.03.008

Quintana-Cabrera, R., Mehrotra, A., Rigoni, G., & Soriano, M. E. (2018). Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *500*(1), 94-101. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.088

Rachim, R., Sudarso, A., Makagiansar, S. P., Bakri, S., Rasyid, H., Aman, A. M., Kasim, H., & Seweng, A. (2020). Expression Of Interleukin-6 Levels In Elderly Sarcopenia. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, *7*(3), 2837-2844.

Raffa, M., Bel Hadj Youssef, I., Ben Othman, L., Fendri, C., & Mechri, A. (2021). Concentrations plasmatiques des glutathions et leurs corrélations avec les caractéristiques cliniques et thérapeutiques des patients atteints de schizophrénie. *L'Encéphale*, *47*(1), 10-14. https://doi.org/10.1016/j.encep.2020.01.010

Ragot, K., Mackrill, J. J., Zarrouk, A., Nury, T., Aires, V., Jacquin, A., Athias, A., Barros, J.-P. P. de, Véjux, A., Riedinger, J.-M., Delmas, D., & Lizard, G. (2013). Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochemical Pharmacology*, *86*(1), 67-79. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.028

Rai, R., Ghosh, A. K., Eren, M., Mackie, A. R., Levine, D. C., Kim, S.-Y., Cedernaes, J., Ramirez, V., Procissi, D., Smith, L. H., Woodruff, T. K., Bass, J., & Vaughan, D. E. (2017). Downregulation of the Apelinergic Axis Accelerates Aging, whereas Its Systemic Restoration Improves the Mammalian Healthspan. *Cell Reports*, *21*(6), 1471. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.057

Rajasekaran, N. S., Shelar, S. B., Jones, D. P., & Hoidal, J. R. (2020). Reductive stress impairs myogenic differentiation. *Redox Biology*, *34*, 101492. https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101492

Razzazi-Fazeli, E., Kleineisen, S., & Luf, W. (2000). Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of Chromatography. A*, *896*(1-2), 321-334. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00719-6

Redman, L. M., & Ravussin, E. (2011). Caloric restriction in humans : Impact on physiological, psychological, and behavioral outcomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*(2), 275-287. https://doi.org/10.1089/ars.2010.3253

Reid, M. B., Khawli, F. A., & Moody, M. R. (1993). Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *75*(3), 1081-1087. https://doi.org/10.1152/jappl.1993.75.3.1081

Relaix, F., & Zammit, P. S. (2012). Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration : The cell on the edge returns centre stage. *Development (Cambridge, England)*, *139*(16), 2845-2856. https://doi.org/10.1242/dev.069088

Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., & Elasri, O. (2020). Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Different Organic Extracts of Three Algerian Plants. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *10*, 75-79. https://doi.org/10.22270/jddt.v10i2-s.4038

Rhee, D., Sanger, J. M., & Sanger, J. W. (1994). The premyofibril : Evidence for its role in myofibrillogenesis. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, *28*(1), 1-24. https://doi.org/10.1002/cm.970280102

Rimbach, G., Minihane, A. M., Majewicz, J., Fischer, A., Pallauf, J., Virgli, F., & Weinberg, P. D. (2002). Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society*, *61*(4), 415-425. https://doi.org/10.1079/PNS2002183

Risso, D., Leoni, V., Canzoneri, F., Arveda, M., Zivoli, R., Peraino, A., Poli, G., & Menta, R. (2022). Presence of cholesterol oxides in milk chocolates and their correlation with milk powder freshness. *PloS One*, *17*(3), e0264288. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264288

Risso, D., Leoni, V., Fania, C., Arveda, M., Falchero, L., Barattero, M., Civra, A., Lembo, D., Poli, G., & Menta, R. (2021). Effect of industrial processing and storage procedures on oxysterols in milk and milk products. *Food & Function*, *12*(2), 771-780. https://doi.org/10.1039/d0fo02462g

Rizvi, S. I., & Maurya, P. K. (2007). Alterations in antioxidant enzymes during aging in humans. *Molecular Biotechnology*, *37*(1), 58-61. https://doi.org/10.1007/s12033-007-0048-7

Robinson, S. M., Reginster, J. Y., Rizzoli, R., Shaw, S. C., Kanis, J. A., Bautmans, I., Bischoff-Ferrari, H., Bruyère, O., Cesari, M., Dawson-Hughes, B., Fielding, R. A., Kaufman, J. M., Landi, F., Malafarina, V., Rolland, Y., van Loon, L. J., Vellas, B., Visser, M., Cooper, C., & ESCEO working group. (2018). Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia? *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *37*(4), 1121-1132. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.08.016

Rodacki, C. L., Rodacki, A. L., Pereira, G., Naliwaiko, K., Coelho, I., Pequito, D., & Fernandes, L. C. (2012). Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *95*(2), 428-436. https://doi.org/10.3945/ajcn.111.021915

Roermund, C. W. T. van, IJlst, L., Majczak, W., Waterham, H. R., Folkerts, H., Wanders, R. J. A., & Hellingwerf, K. J. (2012). Peroxisomal Fatty Acid Uptake Mechanism in Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(24), 20144-20153. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332833

ROLLAND, (Y.), ROLLAND (Y.), BENETOS (A.), GENTRIC (A.), ANKRI (J.), BLANCHARD (F.), BONNEFOY (M.), DECKER (L.), D., FERRY (M.), HANON (O.), JEANDEL (C.), NOURHASHEMI (F.), GUILLAUME (C.), P., RETORNAZ (F.), BOUVIER (H.), RUAULT (G.), & BERRUT (G.). (2011). La fragilité de la personne âgée : Un consensus bref de la Société française de gériatrie et gérontologie. *La fragilité de la personne âgée : un consensus bref de la Société française de gériatrie et gérontologie.*

Rondanelli, M., Miccono, A., Peroni, G., Guerriero, F., Morazzoni, P., Riva, A., Guido, D., & Perna, S. (2016). A Systematic Review on the Effects of Botanicals on Skeletal Muscle Health in Order to Prevent Sarcopenia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, *2016*, 5970367. https://doi.org/10.1155/2016/5970367

Rooyackers, O. E., Gijsen, A. P., Saris, W. H. M., Soeters, P. B., & Wagenmakers, A. J. M. (1996). Derangement in aerobic and anaerobic energy metabolism in skeletal muscle of critically ill and recovering rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1315*(1), 55-60. https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00103-4

Rossi, R., Pastorelli, G., & Corino, C. (2013). Application of KRL test to assess total antioxidant activity in pigs : Sensitivity to dietary antioxidants. *Research in Veterinary Science*, *94*(2), 372-377. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.08.005

Rothe, G., & Valet, G. (1990). Flow Cytometric Analysis of Respiratory Burst Activity in Phagocytes With Hydroethidine and 2′,7′-Dichlorofluorescin. *Journal of Leukocyte Biology*, *47*(5), 440-448. https://doi.org/10.1002/jlb.47.5.440

Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I., & Melino, G. (2013). Senescence and aging : The critical roles of p53. *Oncogene*, *32*(43), 5129-5143. https://doi.org/10.1038/onc.2012.640

Russell, D. W. (2000). Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1529*(1-3), 126-135. https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00142-6

Ryan, M. J., Dudash, H. J., Docherty, M., Geronilla, K. B., Baker, B. A., Haff, G. G., Cutlip, R. G., & Alway, S. E. (2008). Aging-Dependent Regulation of Antioxidant Enzymes and Redox Status in Chronically Loaded Rat Dorsiflexor Muscles. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, *63*(10), 1015-1026.

Ryan, M. J., Jackson, J. R., Hao, Y., Leonard, S. S., & Alway, S. E. (2011). Inhibition of xanthine oxidase reduces oxidative stress and improves skeletal muscle function in response to electrically stimulated isometric contractions in aged mice. *Free Radical Biology & Medicine*, *51*(1), 38-52. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.002

Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2014). Cell Death and Repair in Lung Disease. In L. M. McManus & R. N. Mitchell (Éds.), *Pathobiology of Human Disease* (p. 2558-2574). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.05302-8

Sabolová, M., Pohořelá, B., Fišnar, J., Kouřimská, L., Chrpová, D., & Pánek, J. (2017). Formation of oxysterols during thermal processing and frozen storage of cooked minced meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(15), 5092-5099. https://doi.org/10.1002/jsfa.8386

Safdar, A., deBeer, J., & Tarnopolsky, M. A. (2010). Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old. *Free Radical Biology & Medicine*, *49*(10), 1487-1493. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.010

Saidi, S. A., Ncir, M., Chaaben, R., Jamoussi, K., van Pelt, J., & Elfeki, A. (2017). Liver injury following small intestinal ischemia reperfusion in rats is attenuated by Pistacia lentiscus oil : Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *123*(4), 199-205. https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1302961

Sajko, S., Kubínová, L., Cvetko, E., Kreft, M., Wernig, A., & Erzen, I. (2004). Frequency of M-cadherin-stained satellite cells declines in human muscles during aging. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *52*(2), 179-185. https://doi.org/10.1177/002215540405200205

Sakuma, K., & Yamaguchi, A. (2012). Sarcopenia and age-related endocrine function. *International Journal of Endocrinology*, *2012*, 127362. https://doi.org/10.1155/2012/127362

Salazar-Barajas, M. E., Salazar-González, B. C., & Gallegos-Cabriales, E. C. (2017). Middle-Range Theory : Coping and Adaptation with Active Aging. *Nursing Science Quarterly*, *30*(4), 330-335. https://doi.org/10.1177/0894318417724459

Salucci, S., Battistelli, M., Baldassarri, V., Burini, D., Falcieri, E., & Burattini, S. (2017). Melatonin prevents mitochondrial dysfunctions and death in differentiated skeletal muscle cells. *Microscopy Research and Technique*, *80*(11), 1174-1181. https://doi.org/10.1002/jemt.22914

Samadi, A., Gurlek, A., Sendur, S. N., Karahan, S., Akbiyik, F., & Lay, I. (2019). Oxysterol species : Reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Endocrinological Investigation*, *42*(1), 7-17. https://doi.org/10.1007/s40618-018-0873-5

Samadi, A., Sabuncuoglu, S., Samadi, M., Isikhan, S. Y., Chirumbolo, S., Peana, M., Lay, I., Yalcinkaya, A., & Bjørklund, G. (2021). A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, *28*(1), 110-136. https://doi.org/10.2174/0929867327666200316142659

Sánchez-Castellano, C., Martín-Aragón, S., Bermejo-Bescós, P., Vaquero-Pinto, N., Miret-Corchado, C., Merello de Miguel, A., & Cruz-Jentoft, A. J. (2020). Biomarkers of sarcopenia in very old patients with hip fracture. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *11*(2), 478-486. https://doi.org/10.1002/jcsm.12508

Sandalio, L. M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C., & del Río, L. A. (2013). Role of Peroxisomes as a Source of Reactive Oxygen Species (ROS) Signaling Molecules. In L. A. del Río (Éd.), *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism* (p. 231-255). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5_13

Sander, B. D., Addis, P. B., Park, S. W., & Smith, D. E. (1989). Quantification of Cholesterol Oxidation Products in a Variety of Foods. *Journal of Food Protection*, *52*(2), 109-114. https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.2.109

Sandri, M. (2010). Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Letters*, *584*(7), 1411-1416. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.056

Sanger, J. M., Mittal, B., Pochapin, M. B., & Sanger, J. W. (1986). Myofibrillogenesis in living cells microinjected with fluorescently labeled alpha-actinin. *Journal of Cell Biology*, *102*(6), 2053-2066. https://doi.org/10.1083/jcb.102.6.2053

Sanger, J. W., Wang, J., Fan, Y., White, J., & Sanger, J. M. (2010). Assembly and Dynamics of Myofibrils. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*, e858606. https://doi.org/10.1155/2010/858606

Santilli, V., Bernetti, A., Mangone, M., & Paoloni, M. (2014). Clinical definition of sarcopenia. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, *11*(3), 177-180.

Sassi, K., Nury, T., Zarrouk, A., Sghaier, R., Khalafi-Nezhad, A., Vejux, A., Samadi, M., Aissa-Fennira, F. B., & Lizard, G. (2019). Induction of a non-apoptotic mode of cell death associated with autophagic characteristics with steroidal maleic anhydrides and 7β-hydroxycholesterol on glioma cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *191*, 105371. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.020

Saum, K.-U., Dieffenbach, A., Jansen, E., Schöttker, B., Holleczek, B., Hauer, K., & Brenner, H. (2015). Association between Oxidative Stress and Frailty in an Elderly German Population : Results from the ESTHER Cohort Study. *Gerontology*, *61*. https://doi.org/10.1159/000380881

Savary, S., Trompier, D., Andréoletti, P., Le Borgne, F., Demarquoy, J., & Lizard, G. (2012). Fatty acids—Induced lipotoxicity and inflammation. *Current Drug Metabolism*, *13*(10), 1358-1370. https://doi.org/10.2174/138920012803762729

Sayed, R. K. A., Fernández-Ortiz, M., Diaz-Casado, M. E., Rusanova, I., Rahim, I., Escames, G., López, L. C., Mokhtar, D. M., & Acuña-Castroviejo, D. (2018). The Protective Effect of Melatonin Against Age-Associated, Sarcopenia-Dependent Tubular Aggregate Formation, Lactate Depletion, and Mitochondrial Changes. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, *73*(10), 1330-1338. https://doi.org/10.1093/gerona/gly059

Schaap, L. A., Pluijm, S. M. F., Deeg, D. J. H., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Newman, A. B., Colbert, L. H., Pahor, M., Rubin, S. M., Tylavsky, F. A., Visser, M., & for the Health ABC Study. (2009). Higher Inflammatory Marker Levels in Older Persons : Associations With 5-Year Change in Muscle Mass and Muscle Strength. *The Journals of Gerontology: Series A*, *64A*(11), 1183-1189. https://doi.org/10.1093/gerona/glp097

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2019). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, *38*(10), e101812. https://doi.org/10.15252/embj.2019101812

Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway : Insights from genetic models. *Skeletal Muscle*, *1*(1), 4. https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-4

Schrader, M., Burkhardt, J. K., Baumgart, E., Lüers, G., Völkl, A., & Fahimi, H. D. (1996). The importance of microtubules in determination of shape and intracellular distribution of peroxisomes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *804*, 669-671. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb18660.x

Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2006). Growth and division of peroxisomes. *International Review of Cytology*, *255*, 237-290. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)55005-3

Schrader, M., & Fahimi, H. D. (2008). The peroxisome : Still a mysterious organelle. *Histochemistry and Cell Biology*, *129*(4), 421-440. https://doi.org/10.1007/s00418-008-0396-9

Schwingshackl, L., & Hoffmann, G. (2014). Adherence to Mediterranean diet and risk of cancer : A systematic review and meta-analysis of observational studies. *International Journal of Cancer*, *135*(8), 1884-1897. https://doi.org/10.1002/ijc.28824

Semba, R. D., Ferrucci, L., Sun, K., Walston, J., Varadhan, R., Guralnik, J. M., & Fried, L. P. (2007). Oxidative stress and severe walking disability among older women. *The American Journal of Medicine*, *120*(12), 1084-1089. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.07.028

Senthil Kumaran, V., Arulmathi, K., Srividhya, R., & Kalaiselvi, P. (2008). Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats. *Experimental Gerontology*, *43*(3), 176-183. https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.10.017

Serviddio, G., Romano, A. D., Greco, A., Rollo, T., Bellanti, F., Altomare, E., & Vendemiale, G. (2009). Frailty Syndrome is Associated with Altered Circulating Redox Balance and Increased Markers of Oxidative Stress. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, *22*(3), 819-827. https://doi.org/10.1177/039463200902200328

Sesti, G., Antonelli Incalzi, R., Bonora, E., Consoli, A., Giaccari, A., Maggi, S., Paolisso, G., Purrello, F., Vendemiale, G., & Ferrara, N. (2018). Management of diabetes in older adults. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, *28*(3), 206-218. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.11.007

Sghaier, R., Nury, T., Leoni, V., Caccia, C., Pais De Barros, J.-P., Cherif, A., Vejux, A., Moreau, T., Limem, K., Samadi, M., Mackrill, J. J., Masmoudi, A. S., Lizard, G., & Zarrouk, A. (2019). Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiapoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7β-hydroxycholesterol. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *194*, 105432. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105432

Sghaier, R., Zarrouk, A., Nury, T., Badreddine, I., O'Brien, N., Mackrill, J. J., Vejux, A., Samadi, M., Nasser, B., Caccia, C., Leoni, V., Moreau, T., Cherkaoui-Malki, M., Salhedine Masmoudi, A., & Lizard, G. (2019). Biotin attenuation of oxidative stress, mitochondrial dysfunction, lipid metabolism alteration and 7β-hydroxycholesterol-induced cell death in 158N murine oligodendrocytes. *Free Radical Research*, *53*(5), 535-561. https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1612891

Shenton, D., Smirnova, J. B., Selley, J. N., Carroll, K., Hubbard, S. J., Pavitt, G. D., Ashe, M. P., & Grant, C. M. (2006). Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(39), 29011-29021. https://doi.org/10.1074/jbc.M601545200

Shimozawa, M., Naito, Y., Manabe, H., Uchiyama, K., Kuroda, M., Katada, K., Yoshida, N., & Yoshikawa, T. (2004). 7-Ketocholesterol enhances the expression of adhesion molecules on human aortic endothelial cells by increasing the production of reactive oxygen species. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, *9*(6), 370-375. https://doi.org/10.1179/135100004225006902

Shokr, H., Dias, I. H., & Gherghel, D. (2021). Oxysterols and Retinal Microvascular Dysfunction as Early Risk Markers for Cardiovascular Disease in Normal, Ageing Individuals. *Antioxidants*, *10*(11), 1756. https://doi.org/10.3390/antiox10111756

Short, K. R., Bigelow, M. L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S., & Nair, K. S. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(15), 5618-5623. https://doi.org/10.1073/pnas.0501559102

Short, K. R., Vittone, J. L., Bigelow, M. L., Proctor, D. N., Coenen-Schimke, J. M., Rys, P., & Nair, K. S. (2005). Changes in myosin heavy chain mRNA and protein expression in human skeletal muscle with age and endurance exercise training. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *99*(1), 95-102. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00129.2005

Silva, R., Pizato, N., da Mata, F., Figueiredo, A., Ito, M., & Pereira, M. G. (2018). Mediterranean Diet and Musculoskeletal-Functional Outcomes in Community-Dwelling Older People : A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *22*(6), 655-663. https://doi.org/10.1007/s12603-017-0993-1

Simoneau, J.-A., Colberg, S. R., Thaete, F. L., & Kelley, D. E. (1995). Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *The FASEB Journal*, *9*(2), 273-278. https://doi.org/10.1096/fasebj.9.2.7781930

Singh, R. P., Dhanalakshmi, S., Tyagi, A. K., Chan, D. C. F., Agarwal, C., & Agarwal, R. (2002). Dietary Feeding of Silibinin Inhibits Advance Human Prostate Carcinoma Growth in Athymic Nude Mice and Increases Plasma Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 Levels1. *Cancer Research*, *62*(11), 3063-3069.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Skouta, R., Dixon, S. J., Wang, J., Dunn, D. E., Orman, M., Shimada, K., Rosenberg, P. A., Lo, D. C., Weinberg, J. M., Linkermann, A., & Stockwell, B. R. (2014). Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *Journal of the American Chemical Society*, *136*(12), 4551-4556. https://doi.org/10.1021/ja411006a

Slawik, M., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Adipose tissue expandability and the metabolic syndrome. *Genes & Nutrition*, *2*(1), 41-45. https://doi.org/10.1007/s12263-007-0014-9

Smit, L. A., Katan, M. B., Wanders, A. J., Basu, S., & Brouwer, I. A. (2011). A high intake of trans fatty acids has little effect on markers of inflammation and oxidative stress in humans. *The Journal of Nutrition*, *141*(9), 1673-1678. https://doi.org/10.3945/jn.110.134668

Smith, G. I., Atherton, P., Reeds, D. N., Mohammed, B. S., Rankin, D., Rennie, M. J., & Mittendorfer, B. (2011). Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment the muscle protein anabolic response to hyperaminoacidemia-hyperinsulinemia in healthy young and middle aged men and women. *Clinical science (London, England : 1979)*, *121*(6), 267-278. https://doi.org/10.1042/CS20100597

Smuder, A. J., Kavazis, A. N., Hudson, M. B., Nelson, W. B., & Powers, S. K. (2010). Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free Radical Biology & Medicine*, *49*(7), 1152-1160. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.025

Snyder, P. J., Bhasin, S., Cunningham, G. R., Matsumoto, A. M., Stephens-Shields, A. J., Cauley, J. A., Gill, T. M., Barrett-Connor, E., Swerdloff, R. S., Wang, C., Ensrud, K. E., Lewis, C. E., Farrar, J. T., Cella, D., Rosen, R. C., Pahor, M., Crandall, J. P., Molitch, M. E., Resnick, S. M., … Ellenberg, S. S. (2018). Lessons From the Testosterone Trials. *Endocrine Reviews*, *39*(3), 369-386. https://doi.org/10.1210/er.2017-00234

Song, W., Kwak, H.-B., & Lawler, J. M. (2006). Exercise training attenuates age-induced changes in apoptotic signaling in rat skeletal muscle. *Antioxidants & Redox Signaling*, *8*(3-4), 517-528. https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.517

Sorriento, D., De Luca, N., Trimarco, B., & Iaccarino, G. (2018). The Antioxidant Therapy : New Insights in the Treatment of Hypertension. *Frontiers in Physiology*, *9*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00258

Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B., & Pedersen, B. K. (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *The Journal of Physiology*, *529*(Pt 1), 237-242. https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00237.x

Stewart Coats, A. J., Ho, G. F., Prabhash, K., von Haehling, S., Tilson, J., Brown, R., Beadle, J., Anker, S. D., & for and on behalf of the ACT-ONE study group. (2016). Espindolol for the treatment and prevention of cachexia in patients with stage III/IV non-small cell lung cancer or colorectal cancer : A randomized, double-blind, placebo-controlled, international multicentre phase II study (the ACT-ONE trial). *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *7*(3), 355-365. https://doi.org/10.1002/jcsm.12126

Suetta, C., Andersen, J. L., Dalgas, U., Berget, J., Koskinen, S., Aagaard, P., Magnusson, S. P., & Kjaer, M. (2008). Resistance training induces qualitative changes in muscle morphology, muscle architecture, and muscle function in elderly postoperative patients. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *105*(1), 180-186. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01354.2007

Sullivan-Gunn, M. J., & Lewandowski, P. A. (2013). Elevated hydrogen peroxide and decreased catalase and glutathione peroxidase protection are associated with aging sarcopenia. *BMC Geriatrics*, *13*(1), 104. https://doi.org/10.1186/1471-2318-13-104

Suzuki, A., Urano, Y., Ishida, T., & Noguchi, N. (2021). Different functions of vitamin E homologues in the various types of cell death induced by oxysterols. *Free Radical Biology and Medicine*, *176*, 356-365. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.10.008

Szentesi, P., Csernoch, L., Dux, L., & Keller-Pinter, A. (2019). Changes in Redox Signaling in the Skeletal Muscle with Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 1-12. https://doi.org/10.1155/2019/4617801

Talbert, E. E., Smuder, A. J., Min, K., Kwon, O. S., Szeto, H. H., & Powers, S. K. (2013). Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, *115*(4), 529-538. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00471.2013

Tamaki, M., Miyashita, K., Hagiwara, A., Wakino, S., Inoue, H., Fujii, K., Fujii, C., Endo, S., Uto, A., Mitsuishi, M., Sato, M., Doi, T., & Itoh, H. (2017). Ghrelin treatment improves physical decline in sarcopenia model mice through muscular enhancement and mitochondrial activation. *Endocrine Journal*, *64*(Suppl.), S47-S51. https://doi.org/10.1507/endocrj.64.S47

Tan, P. L., Shavlakadze, T., Grounds, M. D., & Arthur, P. G. (2015). Differential thiol oxidation of the signaling proteins Akt, PTEN or PP2A determines whether Akt phosphorylation is enhanced or inhibited by oxidative stress in C2C12 myotubes derived from skeletal muscle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *62*, 72-79. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.02.015

Tardif, N., Salles, J., Guillet, C., Tordjman, J., Reggio, S., Landrier, J.-F., Giraudet, C., Patrac, V., Bertrand-Michel, J., Migne, C., Collin, M.-L., Chardigny, J.-M., Boirie, Y., & Walrand, S. (2014). Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2α activation. *Aging Cell*, *13*(6), 1001-1011. https://doi.org/10.1111/acel.12263

Tawbeh, A., Gondcaille, C., Trompier, D., & Savary, S. (2021). Peroxisomal ABC Transporters : An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(11), 6093. https://doi.org/10.3390/ijms22116093

Tee, A. R., & Proud, C. G. (2000). DNA-damaging agents cause inactivation of translational regulators linked to mTOR signalling. *Oncogene*, *19*(26), 3021-3031. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203622

Terman, A., Kurz, T., Navratil, M., Arriaga, E. A., & Brunk, U. T. (2010). Mitochondrial Turnover and Aging of Long-Lived Postmitotic Cells : The Mitochondrial–Lysosomal Axis Theory of Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, *12*(4), 503-535. https://doi.org/10.1089/ars.2009.2598

Testa, G., Rossin, D., Poli, G., Biasi, F., & Leonarduzzi, G. (2018). Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie*, *153*, 220-231. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.006

Tidball, J. G., Dorshkind, K., & Wehling-Henricks, M. (2014). Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. *Development*, *141*(6), 1184-1196. https://doi.org/10.1242/dev.098285

Titorenko, V. I., & Terlecky, S. R. (2011). Peroxisome Metabolism and Cellular Aging. *Traffic*, *12*(3), 252-259. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01144.x

Trabelsi, H., Sakouhi, F., Renaud, J., Villeneuve, P., Khouja, M. L., Mayer, P., & Boukhchina, S. (2012). Fatty acids, 4-desmethylsterols, and triterpene alcohols from Tunisian lentisc (Pistacia lentiscus) fruits. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *114*(8), 968-973. https://doi.org/10.1002/ejlt.201100146

Trompier, D., Vejux, A., Zarrouk, A., Gondcaille, C., Geillon, F., Nury, T., Savary, S., & Lizard, G. (2014). Brain peroxisomes. *Biochimie*, *98*, 102-110. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009

Tsuzuki, W. (2010). Cis–trans isomerization of carbon double bonds in monounsaturated triacylglycerols via generation of free radicals. *Chemistry and Physics of Lipids*, *163*(7), 741-745. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2010.06.006

Tutino, V., De Nunzio, V., Caruso, M. G., Veronese, N., Lorusso, D., Di Masi, M., Benedetto, M. L., & Notarnicola, M. (2019). Elevated AA/EPA Ratio Represents an Inflammatory Biomarker in Tumor Tissue of Metastatic Colorectal Cancer Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8), 2050. https://doi.org/10.3390/ijms20082050

Unger, R. H., & Orci, L. (2002). Lipoapoptosis : Its mechanism and its diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1585*(2), 202-212. https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00342-6

Uzor, N.-E., Scheihing, D. M., Kim, G. S., Moruno-Manchon, J. F., Zhu, L., Reynolds, C. R., Stephenson, J. M., Holmes, A., McCullough, L. D., & Tsvetkov, A. S. (2020). Aging lowers PEX5 levels in cortical neurons in male and female mouse brains. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *107*, 103536. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103536

van de Bovenkamp, P., Kosmeijer-Schuil, T. G., & Katan, M. B. (1988). Quantification of oxysterols in Dutch foods : Egg products and mixed diets. *Lipids*, *23*(11), 1079-1085. https://doi.org/10.1007/BF02535656

Vasto, S., Scapagnini, G., Bulati, M., Candore, G., Castiglia, L., Colonna-Romano, G., Lio, D., Nuzzo, D., Pellicanó, M., Rizzo, C., Ferrara, N., & Caruso, C. (2010). Biomarkes of aging. *Frontiers in bioscience*. https://doi.org/10.2741/S72

Vejux, A., Abed-Vieillard, D., Hajji, K., Zarrouk, A., Mackrill, J. J., Ghosh, S., Nury, T., Yammine, A., Zaibi, M., Mihoubi, W., Bouchab, H., Nasser, B., Grosjean, Y., & Lizard, G. (2020). 7-Ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol : In vitro and animal models used to characterize

their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochemical Pharmacology*, *173*, 113648. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113648

Vejux, A., Kahn, E., Dumas, D., Bessède, G., Ménétrier, F., Athias, A., Riedinger, J.-M., Frouin, F., Stoltz, J.-F., Ogier-Denis, E., Todd-Pokropek, A., & Lizard, G. (2005). 7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol–induced apoptosis : Analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation. *Cytometry Part A*, *64A*(2), 87-100. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20124

Vejux, A., & Lizard, G. (2009). Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases : Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine*, *30*(3), 153-170. https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.006

Verdijk, L. B., Koopman, R., Schaart, G., Meijer, K., Savelberg, H. H. C. M., & van Loon, L. J. C. (2007). Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *292*(1), E151-E157. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00278.2006

Vergallo, C. (2020). Nutraceutical Vegetable Oil Nanoformulations for Prevention and Management of Diseases. *Nanomaterials*, *10*(6), 1232. https://doi.org/10.3390/nano10061232

Vinel, C., Lukjanenko, L., Batut, A., Deleruyelle, S., Pradère, J.-P., Le Gonidec, S., Dortignac, A., Geoffre, N., Pereira, O., Karaz, S., Lee, U., Camus, M., Chaoui, K., Mouisel, E., Bigot, A., Mouly, V., Vigneau, M., Pagano, A. F., Chopard, A., … Dray, C. (2018). The exerkine apelin reverses age-associated sarcopenia. *Nature Medicine*, *24*(9), 1360-1371. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0131-6

Visser, M., Pahor, M., Taaffe, D. R., Goodpaster, B. H., Simonsick, E. M., Newman, A. B., Nevitt, M., & Harris, T. B. (2002). Relationship of Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor-α With Muscle Mass and Muscle Strength in Elderly Men and Women : The Health ABC Study. *The Journals of Gerontology: Series A*, *57*(5), M326-M332. https://doi.org/10.1093/gerona/57.5.M326

von Haehling, S., Morley, J. E., & Anker, S. D. (2010). An overview of sarcopenia : Facts and numbers on prevalence and clinical impact. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *1*(2), 129-133. https://doi.org/10.1007/s13539-010-0014-2

von Haehling, S., Morley, J. E., & Anker, S. D. (2012). From muscle wasting to sarcopenia and myopenia : Update 2012. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *3*(4), 213-217. https://doi.org/10.1007/s13539-012-0089-z

Wallace, L. M. K., Theou, O., Pena, F., Rockwood, K., & Andrew, M. K. (2015). Social vulnerability as a predictor of mortality and disability : Cross-country differences in the survey of health, aging, and retirement in Europe (SHARE). *Aging Clinical and Experimental Research*, *27*(3), 365-372. https://doi.org/10.1007/s40520-014-0271-6

Walther, T. C., & Farese, R. V. (2012). Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, *81*, 687-714. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061009-102430

Wanders, R. J. A. (2014). Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie*, *98*, 36-44. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.08.022

Wanders, R. J. A., Ferdinandusse, S., Brites, P., & Kemp, S. (2010). Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1801*(3), 272-280. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.01.001

Wanders, R. J. A., Vaz, F. M., Waterham, H. R., & Ferdinandusse, S. (2020). Fatty Acid Oxidation in Peroxisomes : Enzymology, Metabolic Crosstalk with Other Organelles and Peroxisomal Disorders. In G. Lizard (Éd.), *Peroxisome Biology : Experimental Models, Peroxisomal*

Disorders and Neurological Diseases (p. 55-70). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8_5

Wanders, R. J. A., & Waterham, H. R. (2006). Biochemistry of Mammalian Peroxisomes Revisited. *Annual Review of Biochemistry*, *75*(1), 295-332. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133329

Wang, C.-C., Ding, L., Zhang, L.-Y., Shi, H.-H., Xue, C.-H., Chi, N.-Q., Yanagita, T., Zhang, T.-T., & Wang, Y.-M. (2020). A pilot study on the effects of DHA/EPA-enriched phospholipids on aerobic and anaerobic exercises in mice. *Food & Function*, *11*(2), 1441-1454. https://doi.org/10.1039/c9fo02489a

Wang, D. X. M., Yao, J., Zirek, Y., Reijnierse, E. M., & Maier, A. B. (2020). Muscle mass, strength, and physical performance predicting activities of daily living : A meta-analysis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, *11*(1), 3-25. https://doi.org/10.1002/jcsm.12502

Wang, D.-T., Yin, Y., Yang, Y.-J., Lv, P.-J., Shi, Y., Lu, L., & Wei, L.-B. (2014). Resveratrol prevents TNF-α-induced muscle atrophy via regulation of Akt/mTOR/FoxO1 signaling in C2C12 myotubes. *International Immunopharmacology*, *19*(2), 206-213. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.002

Wang, G. S., Eriksson, L. C., Xia, L., Olsson, J., & Stål, P. (1999). Dietary iron overload inhibits carbon tetrachloride-induced promotion in chemical hepatocarcinogenesis : Effects on cell proliferation, apoptosis, and antioxidation. *Journal of Hepatology*, *30*(4), 689-698. https://doi.org/10.1016/s0168-8278(99)80201-3

Wang, H., An, P., Xie, E., Wu, Q., Fang, X., Gao, H., Zhang, Z., Li, Y., Wang, X., Zhang, J., Li, G., Yang, L., Liu, W., Min, J., & Wang, F. (2017). Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *66*(2), 449-465. https://doi.org/10.1002/hep.29117

Wang, J.-Y., Li, L., Chai, R.-Y., Qiu, H.-P., Zhang, Z., Wang, Y.-L., Liu, X.-H., Lin, F.-C., & Sun, G.-C. (2019). Pex13 and Pex14, the key components of the peroxisomal docking complex, are required for peroxisome formation, host infection and pathogenicity-related morphogenesis in Magnaporthe oryzae. *Virulence*, *10*(1), 292-314. https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1598172

Wang, L., Jiao, X.-F., Wu, C., Li, X.-Q., Sun, H.-X., Shen, X.-Y., Zhang, K.-Z., Zhao, C., Liu, L., Wang, M., Bu, Y.-L., Li, J.-W., Xu, F., Chang, C.-L., Lu, X., & Gao, W. (2021). Trimetazidine attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy via inhibiting NLRP3/GSDMD pathway-mediated pyroptosis. *Cell Death Discovery*, *7*(1), 251. https://doi.org/10.1038/s41420-021-00648-0

Wang, W., & Subramani, S. (2017). Role of PEX5 ubiquitination in maintaining peroxisome dynamics and homeostasis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *16*(21), 2037-2045. https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1376149

Wang, Y., Xu, E., Musich, P. R., & Lin, F. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *25*(7), 816-824. https://doi.org/10.1111/cns.13116

Waters, D. L., Baumgartner, R. N., & Garry, P. J. (2000). Sarcopenia : Current perspectives. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *4*(3), 133-139.

Welch, A. A. (2014). Nutritional influences on age-related skeletal muscle loss. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *73*(1), 16-33. https://doi.org/10.1017/S0029665113003698

Welch, A. A., MacGregor, A. J., Skinner, J., Spector, T. D., Moayyeri, A., & Cassidy, A. (2013). A higher alkaline dietary load is associated with greater indexes of skeletal muscle mass in women. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the*

European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, *24*(6), 1899-1908. https://doi.org/10.1007/s00198-012-2203-7

Werner, N., & Zibek, S. (2017). Biotechnological production of bio-based long-chain dicarboxylic acids with oleogenious yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(11), 194. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2360-0

White, J. P., Puppa, M. J., Sato, S., Gao, S., Price, R. L., Baynes, J. W., Kostek, M. C., Matesic, L. E., & Carson, J. A. (2012). IL-6 regulation on skeletal muscle mitochondrial remodeling during cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. *Skeletal Muscle*, *2*, 14. https://doi.org/10.1186/2044-5040-2-14

Wichansawakun, S., & Buttar, H. S. (2019). Chapter 32—Antioxidant Diets and Functional Foods Promote Healthy Aging and Longevity Through Diverse Mechanisms of Action. In R. B. Singh, R. R. Watson, & T. Takahashi (Éds.), *The Role of Functional Food Security in Global Health* (p. 541-563). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00032-3

Wiedmer, P., Jung, T., Castro, J. P., Pomatto, L. C. D., Sun, P. Y., Davies, K. J. A., & Grune, T. (2021). Sarcopenia—Molecular mechanisms and open questions. *Ageing Research Reviews*, *65*, 101200. https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101200

Willcox, D. C., Scapagnini, G., & Willcox, B. J. (2014). Healthy aging diets other than the Mediterranean : A focus on the Okinawan diet. *Mechanisms of Ageing and Development*, *136-137*, 148-162. https://doi.org/10.1016/j.mad.2014.01.002

Willcox, D. C., Willcox, B. J., Todoriki, H., & Suzuki, M. (2009). The Okinawan diet : Health implications of a low-calorie, nutrient-dense, antioxidant-rich dietary pattern low in glycemic load. *Journal of the American College of Nutrition*, *28 Suppl*, 500S-516S. https://doi.org/10.1080/07315724.2009.10718117

Wohlgemuth, S. E., Seo, A. Y., Marzetti, E., Lees, H. A., & Leeuwenburgh, C. (2010). Skeletal muscle autophagy and apoptosis during aging : Effects of calorie restriction and life-long exercise. *Experimental Gerontology*, *45*(2), 138-148. https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.11.002

Wong, H. S., Leong, P. K., Chen, J., Leung, H. Y., Chan, W. M., & Ko, K. M. (2016). β-Sitosterol increases mitochondrial electron transport by fluidizing mitochondrial membranes and enhances mitochondrial responsiveness to increasing energy demand by the induction of uncoupling in C2C12 myotubes. *Journal of Functional Foods*, *23*, 253-260. https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.02.045

Woo, J., Leung, J., & Morley, J. E. (2014). Validating the SARC-F : A suitable community screening tool for sarcopenia? *Journal of the American Medical Directors Association*, *15*(9), 630-634. https://doi.org/10.1016/j.jamda.2014.04.021

X, F., H, W., D, H., E, X., X, Y., J, W., S, G., F, G., N, Z., X, Y., Q, C., P, Z., W, D., J, C., F, Y., Ht, Y., A, L., W, G., J, M., & F, W. (2019). Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(7). https://doi.org/10.1073/pnas.1821022116

Xia, Q., Huang, X., Huang, J., Zheng, Y., March, M. E., Li, J., & Wei, Y. (2021). The Role of Autophagy in Skeletal Muscle Diseases. *Frontiers in Physiology*, *12*, 638983. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.638983

Xie, W.-Q., Xiao, W.-F., Tang, K., Wu, Y.-X., Hu, P.-W., Li, Y.-S., Duan, Y., & Lv, S. (2020). Caloric restriction : Implications for sarcopenia and potential mechanisms. *Aging*, *12*(23), 24441-24452. https://doi.org/10.18632/aging.103987

Xie, Y., Hou, W., Song, X., Yu, Y., Huang, J., Sun, X., Kang, R., & Tang, D. (2016). Ferroptosis : Process and function. *Cell Death and Differentiation*, *23*(3), 369-379. https://doi.org/10.1038/cdd.2015.158

Xu, W., Ocak, U., Gao, L., Tu, S., Cameron, ·, Lenahan, J., Zhang, J., Shao, A., & Lenahan, C. (2021). Selective autophagy as a therapeutic target for neurological diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *78*, 3. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03667-9

Yaffe, D., & Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, *270*(5639), 725-727. https://doi.org/10.1038/270725a0

Yammine, A., Nury, T., Vejux, A., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, D., Samadi, M., Greige-Gerges, H., Auezova, L., & Lizard, G. (2020). Prevention of 7-Ketocholesterol-Induced Overproduction of Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death with Major Nutrients (Polyphenols, ω3 and ω9 Unsaturated Fatty Acids) of the Mediterranean Diet on N2a Neuronal Cells. *Molecules*, *25*(10), 2296. https://doi.org/10.3390/molecules25102296

Yammine, A., Zarrouk, A., Nury, T., Vejux, A., Latruffe, N., Vervandier-Fasseur, D., Samadi, M., Mackrill, J. J., Greige-Gerges, H., Auezova, L., & Lizard, G. (2020). Prevention by Dietary Polyphenols (Resveratrol, Quercetin, Apigenin) Against 7-Ketocholesterol-Induced Oxiapoptophagy in Neuronal N2a Cells : Potential Interest for the Treatment of Neurodegenerative and Age-Related Diseases. *Cells*, *9*(11), E2346. https://doi.org/10.3390/cells9112346

Yang, S.-T., Kreutzberger, A. J. B., Lee, J., Kiessling, V., & Tamm, L. K. (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chemistry and Physics of Lipids*, *199*, 136-143. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2016.05.003

Yang, W., & Hu, P. (2018a). Hierarchical signaling transduction of the immune and muscle cell crosstalk in muscle regeneration. *Cellular Immunology*, *326*, 2-7. https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.08.006

Yang, W., & Hu, P. (2018b). Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *Journal of Orthopaedic Translation*, *13*, 25-32. https://doi.org/10.1016/j.jot.2018.01.002

Yang, W. S., Kim, K. J., Gaschler, M. M., Patel, M., Shchepinov, M. S., & Stockwell, B. R. (2016). Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(34), E4966-4975. https://doi.org/10.1073/pnas.1603244113

Yang, W. S., SriRamaratnam, R., Welsch, M. E., Shimada, K., Skouta, R., Viswanathan, V. S., Cheah, J. H., Clemons, P. A., Shamji, A. F., Clish, C. B., Brown, L. M., Girotti, A. W., Cornish, V. W., Schreiber, S. L., & Stockwell, B. R. (2014). Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, *156*(1-2), 317-331. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.010

Yang, W. S., & Stockwell, B. R. (2016). Ferroptosis : Death by Lipid Peroxidation. *Trends in Cell Biology*, *26*(3), 165-176. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014

Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy : Core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(2), 124-131. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014

Yeh, C.-J. G., Hsi, B.-L., & Page Faulk, W. (1981). Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *Journal of Immunological Methods*, *43*(3), 269-275. https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90174-5

Yoo, J.-I., Chung, H. J., Kim, B. G., Jung, Y.-K., Baek, K.-W., Song, M.-G., & Cho, M.-C. (2021). Comparative analysis of the association between various serum vitamin D biomarkers and sarcopenia. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *35*(9), e23946. https://doi.org/10.1002/jcla.23946

Yoshimura, Y., Bise, T., Shimazu, S., Tanoue, M., Tomioka, Y., Araki, M., Nishino, T., Kuzuhara, A., & Takatsuki, F. (2019). Effects of a leucine-enriched amino acid supplement on muscle mass, muscle strength, and physical function in post-stroke patients with sarcopenia : A randomized controlled trial. *Nutrition*, *58*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.05.028

Yoshioka, T., Kawada, K., Shimada, T., & Mori, M. (1979). Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *135*(3), 372-376. https://doi.org/10.1016/0002-9378(79)90708-7

Yuan, X.-M., Sultana, N., Siraj, N., Ward, L. J., Ghafouri, B., & Li, W. (2016). Autophagy Induction Protects Against 7-Oxysterol-induced Cell Death via Lysosomal Pathway and Oxidative Stress. *Journal of Cell Death*, *9*, 1-7. https://doi.org/10.4137/JCD.S37841

Zahm, J.-M., Baconnais, S., Monier, S., Bonnet, N., Bessède, G., Gambert, P., Puchelle, E., & Lizard, G. (2003). Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells : Analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, *52*(2), 57-69. https://doi.org/10.1002/cyto.a.10027

Zakyrjanova, G. F., Tsentsevitsky, A. N., Kuznetsova, E. A., & Petrov, A. M. (2021). Immune-related oxysterol modulates neuromuscular transmission via non-genomic liver X receptor-dependent mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, *174*, 121-134. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.013

Zambonin, L., Ferreri, C., Cabrini, L., Prata, C., Chatgilialoglu, C., & Landi, L. (2006). Occurrence of trans fatty acids in rats fed a trans-free diet : A free radical-mediated formation? *Free Radical Biology & Medicine*, *40*(9), 1549-1556. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.12.021

Zarrouk, A., Ben Salem, Y., Hafsa, J., Sghaier, R., Charfeddine, B., Limem, K., Hammami, M., & Majdoub, H. (2018). 7β-hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil. *Biochimie*, *153*, 210-219. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.06.027

Zarrouk, A., Cheraif, I., Hadj-Ahmed, S., Chaabane, W., Hammami, S., Debbabi, M., Frih, M., Rouaud, O., Moreau, T., Lizard, G., & Hammami, M. (2015). Correlations between Peripheral Trans Fatty Acids, Lipid Peroxidation Markers and Cognition in Dementia. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, *4*(4), 1-6. https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000206

Zarrouk, A., Hammouda, S., Ghzaiel, I., Hammami, S., Khamlaoui, W., Ahmed, S. H., Lizard, G., & Hammami, M. (2020). Association Between Oxidative Stress and Altered Cholesterol Metabolism in Alzheimer's Disease Patients. *Current Alzheimer Research*, *17*(9), 823-834. https://doi.org/10.2174/1567205017666201203123046

Zarrouk, A., Martine, L., Grégoire, S., Nury, T., Meddeb, W., Camus, E., Badreddine, A., Durand, P., Namsi, A., Yammine, A., Nasser, B., Mejri, M., Bretillon, L., Mackrill, J. J., Cherkaoui-Malki, M., Hammami, M., & Lizard, G. (2019). Profile of Fatty Acids, Tocopherols, Phytosterols and Polyphenols in Mediterranean Oils (Argan Oils, Olive Oils, Milk Thistle Seed Oils and Nigella Seed Oil) and Evaluation of their Antioxidant and Cytoprotective Activities. *Current Pharmaceutical Design*, *25*(15), 1791-1805. https://doi.org/10.2174/1381612825666190705192902

Zarrouk, A., Vejux, A., Mackrill, J., O'Callaghan, Y., Hammami, M., O'Brien, N., & Lizard, G. (2014). Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Research Reviews*, *18*, 148-162. https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.09.006

Zarrouk, A., Vejux, A., Nury, T., El Hajj, H. I., Haddad, M., Cherkaoui-Malki, M., Riedinger, J.-M., Hammami, M., & Lizard, G. (2012). Induction of Mitochondrial Changes Associated with Oxidative Stress on Very Long Chain Fatty Acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-Treated Human Neuronal Cells (SK-NB-E). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2012*, 1-15. https://doi.org/10.1155/2012/623257

Zerbinati, C., & Iuliano, L. (2017). Cholesterol and related sterols autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine*, *111*, 151-155. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.013

Zghibeh, C. M., Raj Gopal, V., Poff, C. D., Falck, J. R., & Balazy, M. (2004). Determination of trans-arachidonic acid isomers in human blood plasma. *Analytical Biochemistry*, *332*(1), 137-144. https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.04.030

Zhang, H., & Forman, H. J. (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 722-728. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.017

Zhang, L., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., & Shenberger, J. S. (2009). Hydrogen peroxide impairs insulin-stimulated assembly of mTORC1. *Free Radical Biology & Medicine*, *46*(11), 1500-1509. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.001

Zhang, Y., Guo, H., Liang, J., Xiao, W., & Li, Y. (2022). Relationship Between Dietary Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids Level and Sarcopenia. A Meta-Analysis of Observational Studies. *Frontiers in Nutrition*, *8*. https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2021.738083

Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism*, *6*(6), 472-483. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.004

Zhao, Q., Yang, S. T., Wang, J. J., Zhou, J., Xing, S. S., Shen, C. C., Wang, X. X., Yue, Y. X., Song, J., Chen, M., Wei, Y. Y., Zhou, Q. P., Dai, T., & Song, Y. H. (2015). TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF-κB activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *458*(4), 790-795. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.026

Zhao, T., Guo, X., & Sun, Y. (2021). Iron Accumulation and Lipid Peroxidation in the Aging Retina : Implication of Ferroptosis in Age-Related Macular Degeneration. *Aging and Disease*, *12*(2), 529-551. https://doi.org/10.14336/AD.2020.0912

Zhou, J., Chong, S. Y., Lim, A., Singh, B. K., Sinha, R. A., Salmon, A. B., & Yen, P. M. (2017). Changes in macroautophagy, chaperone-mediated autophagy, and mitochondrial metabolism in murine skeletal and cardiac muscle during aging. *Aging*, *9*(2), 583-599. https://doi.org/10.18632/aging.101181

Zhou, R.-P., Chen, Y., Wei, X., Yu, B., Xiong, Z.-G., Lu, C., & Hu, W. (2020). Novel insights into ferroptosis : Implications for age-related diseases. *Theranostics*, *10*(26), 11976-11997. https://doi.org/10.7150/thno.50663

Zingg, J.-M., & Meydani, M. (2019). Interaction Between Vitamin E and Polyunsaturated Fatty Acids. In P. Weber, M. Birringer, J. B. Blumberg, M. Eggersdorfer, & J. Frank (Éds.), *Vitamin E in Human Health* (p. 141-159). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05315-4_11

Zou, T., & Lin, Z. (2021). The Involvement of Ubiquitination Machinery in Cell Cycle Regulation and Cancer Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, 5754. https://doi.org/10.3390/ijms22115754

ANNEXES

- **Annexe I :** Le questionnaire SARC-F.
- **Annexe II :** Recrutement de la population d'étude : questionnaire (Facteurs biologiques prédicateurs de la fragilité chez les sujets âgés)
- **Publication 1 :** Ghzaiel I, Zarrouk A, Nury T, Libergoli M, Florio F, Hammouda S, Ménétrier F, Avoscan L, Yammine A , Samadi M , Latruffe N , Biressi S , Levy D , Bydlowski S, Hammami S, Vejux A, Hammami M, Lizard G. Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of Pistacia Lentiscus L. Seed oil against 7β-hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 myoblasts: Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death. **Antioxidants**. 2021: 10(11), 1772. *10.3390/antiox10111772*.
- **Publication 2 :** Ghzaiel I, Zarrouk A , Essadek S , Martine L, Hammouda S , Yammine A, Ksila M , Nury T , Meddeb W , Tahri Joutey M, Mihoubi W , Caccia K , Leoni V, Samadi M, Acar N , Andreoletti P , Hammami S , Ghrairi T , Vejux A , Hammami M, Lizard G. Protective Effects of Milk Thistle (Sylibum marianum) Seed Oil and α-tocopherol against 7β-hydroxycholesterol-induced Peroxisomal Alterations in Murine C2C12 Myoblasts: Nutritional Insights Associated with the Concept of Pexotherapy. **Steroids**. *2022 : 183, 109032. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.10903.*
- **Publication 3 :** Ghzaiel I, Sassi K, Zarrouk A, Ghosh S, Dias I, Nury T, Ksila M, Essadek S,Tahri Joutey M, Brahmi F, Mihoubi W, Rup-Jacques S, Samadi M, Rezig L, Meziane S, Ghrair T, Masmoudi-Kouki O, Hammami S, Nasser B, Hammami M, Wang Y, Griffiths W , Vejux, Lizard G. Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies: food and biomedical. **Redox Experimental Medicine**. 2022. R40-R56. *https://doi.org/10.1530/REM-22-0005.*

Annexe I

Questionnaire SARC-F

Composante	Question	Score
Force	Avez- vous des difficultés pour lever et transporter 4,5 kg ?	Aucune = 0 Un peu =1 Beaucoup ou incapable = 2
Troubles de la marche	Avez-vous des difficultés pour traverser une pièce ?	Aucune = 0 Un peu =1 Beaucoup ou incapable = 2
Lever d'une chaise	Avez-vous des difficultés pour lever d'une chaise ?	Aucune = 0 Un peu =1 Beaucoup, avec aide ou incapable = 2
Montée des escaliers	Avez-vous des difficultés pour monter 10 marches ?	Aucune = 0 Un peu =1 Beaucoup, avec aide ou incapable = 2
Chutes	Combien de fois êtes-vous tombé dans les 12 dernières mois ?	Pas de chute = 0 1 à 3 chutes = 1 ≥ 4 chutes = 2

SARC-F: un score supérieur à 4 doit faire supposer une sarcopénie.

Annexe II

N° dossier :

Service :

Code patient :

Date de prélèvement :

Facteurs biologiques prédicateurs de la fragilité chez les sujets âgés

Recrutement de la population d'étude : questionnaire

I. Présentation générale

Nom : …… Prénom : ……

Sexe : 1. Masculin / _ / 2. Féminin / _ /

Age (ans) : / _ / _ / _ /

Poids (Kg) : / _ / _ / _ /

Taille (m) : / _ / _ / _ /

II. Paramètres clinique du patient

Antécédents : Diabète / _ /

HTA / _ /

Dyslipoproteinémie / _ /

Autres / _ / Précisez : ……

Hospitalisation : Oui / _ / Non / _ /

Si oui : - Diagnostic : …….

- Germe identifié : …….

- Antibiothérapie : ……..

- Evolution : ……

Médicaments

Prenez-vous des médicaments ? Oui / _ / Non / _ /

Si oui précisez le nombre : ……....

La famille

1. Antidiabétiques / _ /
2. Antihypertenseurs / _ /
3. Hypolipémiants / _ /
4. IPP ou antiacides / _ /
5. Anti thrombotiques / _ /
6. Antiangoreux / _ /
7. Autres / _ /

Les habitudes de vie

Profession antérieur

1. Journalier / _ /
2. Ouvriers / _ /
3. Cadre moyen / _ /
4. Cadre supérieur / _ /
5. Profession libre / _ /
6. Femme au foyer / _ /

Niveau institutionnel

1. Analphabète / _ /
2. " Cottabe" / _ /
3. Primaire / _ /
4. Secondaire / _ /
5. Supérieur / _ /

Résidence

1. Seule / _ /
2. Avec la famille / _ /
3. Avec ses enfants / _ /

Assistance

Oui / _ / Non / _ /

Précisez la personne

1. Membre de la famille / _ /
2. Autre (assistante) / _ /

L'humeur (Mini GDS)

1. Vous sentez- vous découragé(e) et triste ? Oui / _ / Non / _ /
2. Avez-vous le sentiment que votre vie est vide ? Oui / _ / Non / _ /
3. Etes-vous heureux (se) la plupart du temps ? Oui / _ / Non / _ /
4. Avez-vous l'impression que votre situation est désespérée ? Oui / _ / Non / _ /

Si réponse **soulignée** est cochée = **1 point**

SCORE TOTAL :_____/ 4

- **Score ⩾ 1** : très forte probabilité de dépression

- **Score = 0** : très forte probabilité d'absence de dépression

Perception de la santé

Par rapport aux sujets de même âge : la personne se sent que sa santé est :

1. Meilleure / _ /
2. Equivalente / _ /
3. Moins bonne / _ /

Chute dans les 6 derniers mois

La personne a-t-il fait une chute ?

1. Aucune chute / _ /
2. Chute sans gravité / _ /
3. Chute compliquée ou multiple / _ /

Le test « Get Up and Go »:

Le patient doit se lever d'un fauteuil avec accoudoirs, marcher sur une distance de 3 mètres, fais demi-tour, revenir vers le fauteuil, en faire le tour et s'asseoir.

1. Aucune instabilité / _ /
2. Lenteur à l'exécution de la consigne / _ /
3. Hésitation, mouvements compensateur des membres supérieurs et du tronc / _ /
4. Le patient trébuche / _ /
5. Risque permanent de chute / _ /

Timing (secondes) : ……

L'appui unipodal :

Etre capable de rester en appui sur un seul pied en position débout, le membre d'appui en extension, l'autre jambe en légère flexion du genou

1. Les muscles relâchés pendants 5 Secondes / _ /
2. Les muscles relâchés pendants plus que 5 secondes / _ /

Nutrition : (MNA de dépistage)

A- Le patient présente-t-il une perte d'appétit ? A-t-il mangé moins ces derniers mois par manque d'appétit, problèmes digestifs ?

0 = anorexie sévère **1 =** anorexie modérée **2 =** pas d'anorexie

B- Perte récente de poids (< 3 mois)

0 = perte de poids > 3 kg **1 =** ne sait pas

2 = perte de poids entre 1 et 3 kg

3 = pas de perte de poids

C- Motricité

0 = du lit au fauteuil

1 = autonome à l'intérieur

2 = sort du domicile

D- Maladie aigüe ou stress psychologique lors des 3 derniers mois ?

0 = oui

2 = non

E- Problèmes neuropsychologiques

0 = démence ou dépression sévère

1 = démence ou dépression modérée

2 = pas de problème psychologique

F- Indice de masse corporelle (IMC = poids/(taille)² en kg/m²)

0 = IMC < 19

1 = 19 ≤ IMC < 21

2 = 21 ≤ IMC < 23

3 = IMC ≥ 23

SCORE TOTAL :_____/ 14

- 12-14: état nutritionnel normal
- 8-11: à risque de dénutrition
- 0-7: dénutrition avérée

La mobilité : (KATZ (A.D.L))

A- Hygiène corporelle

1= autonomie

½= aide

0= dépendant(e)

B- Habillage

1= autonomie pour le choix des vêtements et l'habillage

½= autonomie pour le choix des vêtements, l'habillage mais a besoin d'aide pour se chausser

0= dépendant(e)

C- Aller aux toilettes

1= autonomie pour aller aux toilettes, se déshabiller et se rhabiller ensuite

½= doit être accompagné(e) ou a besoin d'aide pour se déshabiller ou se rhabiller

0= ne peut aller aux toilettes seul(e)

D- Locomotion

1= autonomie	**½=** a besoin d'aide	**0=** grabataire

E- Continence

1= continent(e)	**½=** incontinence occasionnelle	**0=** incontinent(e)

F- Repas

1= mange seul(e)	**½=** aide pour couper la viande ou peler les fruits	**0=** dépendant(e)

SCORE TOTAL :_____ / 6

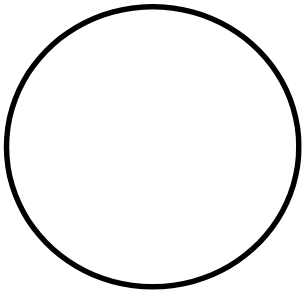
- **Score=6** : une autonomie complète
- **Score < 3** : dépendant

Fonction cognitives : (Mini-cog)

Demander au patient de retenir et répéter 3 mots :

1= Stylo	1= Cahier	1= Table

Demander au patient de dessiner une horloge après qu'il ait inscrit les chiffres, demandez-lui d'inscrire 11 h 10 ou 8 h 20



SCORE TOTAL :_____ / 5

Les paramètres biologiques

NFS :

GB (10^3/µL)	GR (10^6/µL)	Hb (g/dl)	VGM (fl)	CCMH (g/dl)	TCMH (%)	PLT (10^3/µL)

PNN	
PNE	
Lym	
Mono	
Baso	

Bilan lipidique

TG (mmol/l) =	CT (mmol/l) =	LDL (mmol/l) =	HDL (mmol/l) =

Bilan d'inflammation

CRP (mg/l) =	VS (mm) =

Bilan rénal

Créatinine (µmol/l) =	Urée (µmol/l) =

Bilan hépatique

ALAT (UI/L) =	ASAT (UI/L) =

Bilan glycémique

Glycémie (mmol/l) =	HbA1c (%) =

Ionogramme

Sodium (Na) (mmol/l)	Potassium (k) (mmol/l)	Calcium (Ca) (mmol/l)	Chlore (Cl) (mmol/l)

antioxidants

MDPI

Article

Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of *Pistacia lentiscus* L. Seed Oil against 7β-Hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 Myoblasts: Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death

Imen Ghzaiel [1,2,3], Amira Zarrouk [2,4,*], Thomas Nury [1], Michela Libergoli [5], Francesca Florio [5], Souha Hammouda [2], Franck Ménétrier [6], Laure Avoscan [7], Aline Yammine [1], Mohammad Samadi [8], Norbert Latruffe [1], Stefano Biressi [5], Débora Levy [9], Sérgio Paulo Bydlowski [9,10], Sonia Hammami [2], Anne Vejux [1], Mohamed Hammami [2] and Gérard Lizard [1,*]

check for updates

Citation: Ghzaiel, I.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Libergoli, M.; Florio, F.; Hammouda, S.; Ménétrier, F.; Avoscan, L.; Yammine, A.; Samadi, M.; et al. Antioxidant Properties and Cytoprotective Effect of *Pistacia lentiscus* L. Seed Oil against 7β-Hydroxycholesterol-Induced Toxicity in C2C12 Myoblasts: Reduction in Oxidative Stress, Mitochondrial and Peroxisomal Dysfunctions and Attenuation of Cell Death. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1772. https://doi.org/10.3390/antiox10111772

Academic Editors: Daniela-Saveta Popa, Laurian Vlase, Ionel Fizesan and Marius Emil Rusu

Received: 28 September 2021
Accepted: 3 November 2021
Published: 5 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1 Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA7270/Inserm, University Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; imenghzaiel93@gmail.com (I.G.); thomas.nury@u-bourgogne.fr (T.N.); alineyammine5@gmail.com (A.Y.); norbert.latruffe@u-bourgogne.fr (N.L.); anne.vejux@u-bourgogne.fr (A.V.)
2 Lab-NAFS 'Nutrition—Functional Food & Vascular Health', Faculty of Medicine, University of Monastir, LR12ES05, Monastir 5000, Tunisia; souhahammouda51@gmail.com (S.H.); sonia.hammami@fmm.rnu.tn (S.H.); mohamed.hammami@fmm.rnu.tn (M.H.)
3 Faculty of Sciences of Tunis, University Tunis-El Manar, Tunis 2092, Tunisia
4 Faculty of Medicine, University of Sousse, Sousse 4000, Tunisia
5 Department of Cellular, Computational and Integrative Biology (CIBio) and Dulbecco Telethon Institute, University of Trento, 38123 Trento, Italy; michela.libergoli@unitn.it (M.L.); francesca.florio@unitn.it (F.F.); stefano.biressi@unitn.it (S.B.)
6 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, 21065 Dijon, France; franck.menetrier@inrae.fr
7 Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, University Bourgogne Franche-Comté, Plateforme DimaCell, 21000 Dijon, France; laure.avoscan@inrae.fr
8 LCPMC-A2, ICPM, Department of Chemistry, University Lorraine, Metz Technopôle, 57070 Metz, France; mohammad.samadi@univ-lorraine.fr
9 Lipids, Oxidation and Cell Biology Team, Laboratory of Immunology (LIM19), Heart Institute (InCor), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-900, Brazil; d.levy@hc.fm.usp.br (D.L.); spbydlow@usp.br (S.P.B.)
10 National Institute of Science and Technology in Regenerative Medicine (INCT-Regenera), CNPq, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil
* Correspondence: zarroukamira@gmail.com (A.Z.); gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G.L.); Tel.: +216-94-837-999 or +1-212-241 9304 (A.Z.); +33-380-396-256 (G.L.)

Abstract: Aging is characterized by a progressive increase in oxidative stress, which favors lipid peroxidation and the formation of cholesterol oxide derivatives, including 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC). This oxysterol, which is known to trigger oxidative stress, inflammation, and cell death, could contribute to the aging process and age-related diseases, such as sarcopenia. Identifying molecules or mixtures of molecules preventing the toxicity of 7β-OHC is therefore an important issue. This study consists of determining the chemical composition of Tunisian *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) used in the Tunisian diet and evaluating its ability to counteract the cytotoxic effects induced by 7β-OHC in murine C2C12 myoblasts. The effects of 7β-OHC (50 μM; 24 h), associated or not with PLSO, were studied on cell viability, oxidative stress, and on mitochondrial and peroxisomal damages induction. α-Tocopherol (400 μM) was used as the positive control for cytoprotection. Our data show that PLSO is rich in bioactive compounds; it contains polyunsaturated fatty acids, and several nutrients with antioxidant properties: phytosterols, α-tocopherol, carotenoids, flavonoids, and phenolic compounds. When associated with PLSO (100 μg/mL), the 7β-OHC-induced cytotoxic effects were strongly attenuated. The cytoprotection was in the range of those observed with α-tocopherol. This cytoprotective effect was characterized by prevention of cell death and organelle

dysfunction (restoration of cell adhesion, cell viability, and plasma membrane integrity; prevention of mitochondrial and peroxisomal damage) and attenuation of oxidative stress (reduction in reactive oxygen species overproduction in whole cells and at the mitochondrial level; decrease in lipid and protein oxidation products formation; and normalization of antioxidant enzyme activities: glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD)). These results provide evidence that PLSO has similar antioxidant properties than α-tocopherol used at high concentration and contains a mixture of molecules capable to attenuate 7β-OHC-induced cytotoxic effects in C2C12 myoblasts. These data reinforce the interest in edible oils associated with the Mediterranean diet, such as PLSO, in the prevention of age-related diseases, such as sarcopenia.

Keywords: aging; 7β-hydroxycholesterol; mitochondria; C2C12 myoblasts; oxidative stress; peroxisome; *Pistacia lentiscus* L. seed oil; sarcopenia

1. Introduction

Aging is characterized by a progressive loss of physiological functions, coupled with a reduction in the ability to maintain homeostasis [1]. One of the hallmark effects of aging is sarcopenia, which is widely defined as an age-related progressive decline in skeletal muscle mass, strength, and function [2,3]. From the age of 30, humans lose approximately 3–8% of muscle mass per decade with an accelerated rate of decline after the age of 60 [4–6]. This decline leads to limited functional mobility in older adults [7], but it may also aggravate their vulnerability [8]. Indeed, skeletal muscle is the largest organ in the human body. It accounts for 30–40% of total body weight [9,10] and plays a primordial role in locomotion [11], respiration [12], thermogenesis [13], and regulation of lipids (fatty acids, cholesterol) [14,15] and glucose metabolism [16]. The aging skeletal muscle is marked by the development of an alteration of energy substrates use. In fact, in response to insulin stimulation, mitochondria of elderly subjects are unable to move from lipid oxidation to carbohydrate oxidation as do mitochondria of young subjects, showing a loss of metabolic flexibility during aging [17]. These data suggest an alteration in metabolic dynamism and highlight the inability of muscle cells to adapt to environmental variations. It is therefore important to better understand the underlying mechanisms leading to sarcopenia but also to identify the chemical epigenetic factors that may promote it. In addition, during aging, to allow the maintenance of muscle mass, strength and quality, and to act on these parameters, it is important to identify natural or synthetic molecules, as well as mixtures of molecules that can be provided in the form of food supplements, or functional foods [18]. An adapted diet, as well as foods acting on the muscle, must also be considered. Several aging mechanisms have been identified, including telomere shortening, genomic instability, epigenetic alterations, and organelle dysfunction (mainly mitochondrial changes), which can trigger cellular senescence [18]. In addition, among the parameters that can affect the aging of skeletal muscle, oxidative stress is one of the major contributors that can favor skeletal muscle damage [19,20]. Skeletal muscle consumes large quantities of oxygen compared to other tissues, resulting in higher amounts of reactive oxygen species (ROS) [21]. This increase in ROS levels could be due to two main factors: (i) altered functions of the mitochondrial respiratory chain; and (ii) impairment in cellular antioxidant defense mechanisms [22]. These ROS contribute to increased uptake of both glucose and cholesterol into the cells [23]. Cholesterol is a major component of cellular membranes, including the sarcolemma of skeletal muscle [24]. In the presence of oxidative stress, glucose and cholesterol can undergo auto-oxidation by a free-radical mechanism. The cholesterol oxide derivatives (oxysterols) formed by cholesterol auto-oxidation in oxidative stress conditions mainly correspond to those that are oxidized at position C7 (7-ketocholesterol (7KC) and 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC)) [25–28]. Interestingly, 7KC and 7β-OHC have similar cytotoxic effects (although the induction of cell death is faster with 7β-OHC) and these two oxysterols can be interconverted: the enzyme 11β-hydroxysteroid dehydrogenase-1

(11β-HSD1) converts 7KC into 7β-OHC, whereas 11β-hydroxysteroid dehydrogenase-2 (11β-HSD2) converts 7β-OHC into 7KC [29,30]. In addition, these oxysterols have been identified as key elements in the development of age-related diseases: cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases (Alzheimer's and Parkinson's), and ocular diseases (cataract, age-related macular degeneration) [28,31–33]. On various cell lines from different species, 7KC and 7β-OHC but also 24S-hydroxycholesterol trigger a mode of cell death by oxiapoptophagy, which includes oxidative stress and mitochondrial, lysosomal, and peroxisomal dysfunction, leading to an apoptotic mode of cell death associated with autophagic criteria [30,34–36]. Oxysterols are also involved in many physiologic processes: regulation of cholesterol metabolism [37] and RedOx homeostasis [38]; control of inflammation, including cytokine production [39]; albumin synthesis [40]; and cell differentiation [41]. Despite the considerable interest in oxysterols in the aging process, the impact of these molecules on skeletal muscle cells has not yet been studied. On human promonocytic U937 cells, 7KC, 7β-OHC and 5β,6β-epoxicholesterol showed high cytotoxicity, characterized by a high percentage of dead cells, overproduction of ROS, and secretion of pro-inflammatory cytokines [42]. It has been shown that the most toxic oxysterol on U937 cells, but also on other cells, was 7β-OHC [30,42].

Therefore, to mimic an age-related pro-oxidant environment, C2C12 murine myoblasts cultured in the presence of 7β-OHC were used as a cellular model. The effects of 7β-OHC were characterized on C2C12 and cytoprotective agents were investigated. The effect of α-tocopherol that protects many cells from the toxicity induced by 7β-OHC and 7KC was also analyzed [28] as well as that of *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO), widely used in the Tunisian diet. It is well known that vegetable oils are a valuable source of natural antioxidants, playing a crucial role in the improvement of human health [43] and in delaying muscle atrophy [44]. One of the most well-known powerful medicinal plants is *Pistacia lentiscus* L. (PL). PL is one of the Mediterranean's most valuable and important aromatic bushes. Its application in traditional medicine has increased over time and it is used as a therapeutic agent in the treatment of scabies, rheumatism, the manufacture of anti-diarrheal medicine, and in minor burns [45–47]. Extracts of different parts of the plant show various activities, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative, and neuroprotective effects [48–51]. The fruits of PL give an edible oil with high nutritional value due to its richness in unsaturated fatty acids, such as oleic acid (C18:1 n−9) and linoleic acid (C18:2 n−6) [52]. PLSO also has a comparable carotenoid and total polyphenols content than olive oil [53,54], and it has been demonstrated that it has antioxidant and protective effects against various diseases associated with oxidative stress [55,56].

In the present study, the first objective was to determine the biochemical composition of PLSO in polyphenols, flavonoids, β-carotene, fatty acids, phytosterols, and α-tocopherol, and its antioxidant properties. Furthermore, among the sarcopenic patients studied, as the level of 7β-OHC (mainly formed by cholesterol auto-oxidation, considered as a marker of oxidative stress, and known for its important pro-oxidant properties) was significantly higher than in non-sarcopenic subjects, the second objective of the study was to evaluate the ability of PLSO, compared to α-tocopherol, to attenuate the cytotoxic effects induced by 7β-OHC on murine C2C12 myoblasts; specifically, the effects on cell proliferation and viability, plasma membrane integrity, oxidative stress, and mitochondrial and peroxisomal status.

2. Material and Methods

2.1. Chemical Profile of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil*

2.1.1. Seed Material and Oil Extraction

The mature fruits of PL (lentisk-mastic tree) were collected in November 2019 from plants growing in the region of Tabarka (extreme north-west of Tunisia). After the harvest, fruits were ground using an ordinary grinder; the resulting paste was then manually mixed and let to stand overnight in a refrigerator. The next day, the paste was macerated in cold water. Subsequently, the mixture was placed in a water bath to prevent direct exposure of the ground material to the heat and thus degradation of the oil quality. After

filtration, the oil was separated from the water by a decantation process. The procedure of *Pistacia lentiscus* L. seed oil is summarized in Supplementary Figure S1. The oils obtained were stored and maintained at 4 °C for further analyses.

2.1.2. Colorimetric Determination of Total Phenolics, Flavonoids, and Carotenoids Contents of *Pistacia lentiscus* L. Seed Oil

The quantification of total phenolics and flavonoids was preceded by an extraction performed as follows: 4 g of PLSO was mixed thoroughly with 2 mL of n-hexane followed by the addition of 4 mL of methanol/water (60:40, *v/v*). The mixture was vortexed vigorously and centrifuged at 1490× *g* for 3 min to separate the two phases. The hydroalcoholic phase was collected, and the hexanic phase was re-extracted two more times with 4 mL of methanol/water (60:40, *v/v*) solution. Finally, the hydroalcoholic fraction obtained was combined, washed with 4 mL of n-hexane, and stored at −20 °C until analysis.

Phenolic compounds: Total phenolic compounds content was assayed by the Folin–Ciocalteau's method [57]. Briefly, 200 µL of the combined hydroalcoholic fraction or standard gallic acid solutions was mixed thoroughly with 1 mL of freshly prepared Folin–Ciocalteau reagent and 0.8 mL of 7.5% sodium carbonate (Na_2CO_3). After incubation for 30 min in the dark at room temperature, the absorbance was measured at 765 nm and the results were expressed as mg of gallic acid equivalent per g of sample.

Flavonoids: Quantification of total flavonoids was determined using an aluminum chloride ($AlCl_3$) colorimetric assay [58]. A volume of 100 µL of the combined hydroalcoholic fraction or standard catechin solutions was combined with 400 µL of distilled water and subsequently with 30 µL of 5% sodium nitrite ($NaNO_2$) solution. After 5 min, 20 µL of a 10% $AlCl_3$ solution and 200 µL of 1 M Na_2CO_3 solution were added. The final volume was adjusted with distilled water and mixed thoroughly. The absorbance was recorded at 510 nm, and the concentrations were expressed as mg of catechin equivalent per g of the sample.

Carotenoids: Total carotenoids content was measured by a colorimetric assay according to the method previously described by Dhibi et al. [59], and was expressed using the following formula:

$$\text{Carotenoids} = A\text{max} \times (10^5/2.65)$$

where *A*max is the maximum of absorption between 440 and 480 nm.

2.1.3. Polyphenols Analysis

In order to identify and quantify the polyphenolic compounds in PLSO, we analyzed them by high-performance liquid chromatography (HPLC). To this end, 1 g of oil was dissolved in 6 mL of petroleum ether and was then purified on a silica SPE cartridge (previously conditioned by 6 mL petroleum ether 40–60). The cartridge was then washed with 12 mL of petroleum ether and dried under nitrogen for 10 min. Polyphenolic compounds were eluted with 8 mL of a mixture of methanol/distilled water 80/20 (*v/v*), and then with 8 mL of acetonitrile. The eluate was evaporated to dryness under reduced pressure at 50 °C. The residue was taken up in 400 µL of methanol. The resulting extract was filtered through a 0.45 µm nylon membrane. Polyphenol analysis was performed by HPLC on a Perkin Elmer series 200 apparatus equipped with an automatic injector, a quaternary pump, a column oven to Peltier effect, and a DAD detector. HPLC analyses were carried out using RPHPLC with a licrospher 100 RP-18 column (150 × 4.6 mm internal diameter (i.d.), 5 µm particle size, Merck). A gradient elution was programmed using as a mobile phase A, distilled water with an adjusted pH of 2.2 using trifluoroacetic acid (TFA), and as a mobile phase B, acetonitrile. The samples were eluted according to the following gradient: 0 to 5 min with solvent A 100%, and 5 to 50 min with solvent A 100 to 45%. The flow rate was set at 1 mL/min throughout the gradient and the column temperature was maintained at 25 °C. The injection volume was 20 µL, and UV detection was carried out at a wavelength of 280 nm. The calibration curve was constructed using quercetin standard solution at different concentration levels (25 to 400 mg quercetin/L). Data were

expressed in mg equivalents quercetin/100 g of oil. Polyphenols analysis was realized by the Lara-Spiral laboratory (Couternon, France). The available polyphenol spectra present in the database of the Lara-Spiral company are listed in Supplementary Table S1.

2.1.4. Fatty Acids Analysis

Total lipids were extracted from PLSO according to the method described by Moilanen and Nikkari [60]. C19:0 was used as the internal standard in the experiments realized in LR12ES05, Lab-NAFS 'Nutrition—Functional Food & Vascular Health', Monastir, Tunisia. Lipids were trans-methylated with 14% boron trifluoride in methanol (BF_3-MeOH) using the method of Morrison and Smith [61]. Subsequently, fatty acid methyl esters were analyzed by gas chromatography (GC) under the same conditions described by Zarrouk et al. [62]. Fatty acids were identified by comparison with synthetic standards. This experiment was performed in triplicate and the data expressed either as g/100 g of oil (C19:0 used as internal standard) or as percentages of total fatty acids.

2.1.5. Phytosterols Analysis

The analysis of phytosterols was realized as described by Zarrouk et al. [62]. Briefly, the quantification of phytosterols was based on an isolation of the unsaponifiable fraction and a silylation of the unsaponifiable fraction before direct injection in gas chromatography (GC). Then, GC separations were performed with a Hewlett-Packard (HP 5890D, Palo Alto, CA, USA) using a capillary column (30 m length × 0.25 mm i.d. film thickness 0.25 µm). Working conditions were as follow: carrier gas, helium; flow through the column, 1 mL/min; injector temperature, 290 °C; detector temperature, 290 °C; oven temperature, 260 °C; injection volume 1 µL. The phytosterols were characterized and quantified by gas chromatography–flame ionization detection (GC-FID). The spectra were compared with those of the internal library INRAE (Dijon, France). Likewise, they were confirmed with the NIST Mass Spectral Library and with the literature. The concentration of each PLSO sterol was expressed in mg/100 g of oil and obtained by three independent analyses.

2.1.6. α-Tocopherol Analysis

PLSO was diluted 10 folds (*w/w*) with hexane. An amount of 5 mg diluted solution was mixed for 1 min with 200 µL of saline solution, 200 µL of ethanol/butylated hydroxy toluene (BHT) (Sigma-Aldrich; 50 mg/L) containing Tocol used as internal standard (1 ng/µL), and 500 µL of hexane. The extract was centrifuged at 10,000× *g* for 5 min at 4 °C. The upper layer (100 µL) was collected into a new tube and evaporated to dryness with a nitrogen stream. The dried extract was suspended with 50 µL of methanol/BHT (50 mg/L) and further centrifuged at 10,000× *g* for 5 min at 4 °C. The supernatant (40 µL) was finally transferred to an injection vial. Extract (2 µL) was injected with an 1100 autosampler into a Poroshell 120 EC-C18 (3 × 50 mm, 2.7 µm) maintained at 35 °C. Separation was achieved with a 1260 HPLC pump (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using a linear gradient of methanol (90% up to 100% in 5 min, and maintained at 100% for 3 min). Detection was realized with a Fluorescence Light Detector (Agilent Technologies, Craven Arms, England) at λ_{Exmax} = 292 nm and λ_{Emmax} = 325 nm. Authentic α-tocopherol standards (0, 50, 100, 200, 400, 600, and 800 ng) were extracted with the same protocol as the PLSO sample. Area ratios of α-tocopherol (room temperature (RT) = 5.4 min) to tocol (RT = 4.0 min) were calculated for PLSO and calibrations standards. A linear calibration curve was used for the calculations. The α-tocopherol analysis was realized by the lipidomic analytical platform (LAP, Dijon, France).

2.2. Antioxidant Activity of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil*

The hydroalcoholic fraction of PLSO was also used for the quantification of antioxidants activities with DPPH, FRAP, and FIC assays.

2.2.1. Free Radical Scavenging Activity with DPPH Assay

The free radical scavenging activity was determined by the 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) assay as described by Molyneux et al. [63], with some modifications. To this end, 50 µL of a hydroalcoholic fraction of PLSO (from 0.016 mg/mL to 2 mg/mL) was mixed with 950 µL of a methanolic DPPH solution (10^{-4} M). After incubation for 30 min in the dark, the absorbance was measured at 517 nm. The antioxidant activity related to the DPPH radical scavenging effect was expressed as a percent of inhibition (PI) using the following equation:

$$PI = [(A0 - A1)/A0] \times 100$$

where A0 is the absorbance of the DPPH solution and A1 is the absorbance of the DPPH solution after the addition of the sample. The antioxidant activity was expressed as IC50. A low IC50 value corresponds to a high antiradical activity. Ascorbic acid was used as the positive control and all tests were carried in triplicate.

2.2.2. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

The ferric reducing antioxidant power (FRAP) was determined according to the method of Bassene et al. [64]. Briefly, 400 µL of a hydroalcoholic fraction of PLSO (from 0.016 mg/mL to 2 mg/mL) was mixed with 1 mL of phosphate buffer (0.2 M; pH 6.6) and 1 mL of 1% potassium hexacyanoferrate ($K_3Fe(CN)_6$). After incubation in a water bath at 50 °C for 30 min in the dark, 1 mL of 10% trichloroacetic acid was added, and the mixture was then centrifuged at 1750× *g* for 10 min. Then, 1 mL of the obtained supernatant was incubated with 200 µL of 0.1% (*w/v*) ferric chloride ($FeCl_3$) solution and allowed to stand for 30 min in dark. The absorbance of the reaction mixture was measured spectrophotometrically at 700 nm. Higher value absorbance of the reaction mixture indicated greater reducing power. Ascorbic acid was used as a positive control. The test was carried out in triplicate. The FRAP value of the hydroalcoholic fraction of PLSO was calculated as follows:

$$FRAP\ [\%] = [(Absorbance_{sample}/Absorbance_{blank}) \times 100/Absorbance_{sample}\ ]$$

2.2.3. Ferrous-Ion Chelating (FIC) Assay

The ferrous ion chelating (FIC) activity of PLSO was determined according to the method of Dinis et al. [65], with minor modifications. In total, 100 µL of a hydroalcoholic fraction of PLSO (from 0.016 mg/mL to 2 mg/mL) was mixed with 50 µL of 2 mM $FeCl_2$, and 100 µL of 5 mM ferrozine. The mixture was allowed to stand for 10 min at room temperature. The ferrous iron–ferrozine complex formation was then monitored by measuring the absorbance at 562 nm against a blank. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used as positive control. The assays were performed in triplicate. The percentage of inhibition of ferrozine-Fe^{2+} complex formation was calculated as below:

$$FIC\ (\%) = [(Absorbance_{negative\ control} - Absorbance_{sample}) \times 100/Absorbance_{negative\ control}]$$

2.2.4. KRL Test

The overall antioxidant defense potential of the PLSO was measured with the KRL test (Kit Radicaux Libres) [62,66]. This test consists of submitting whole blood to free radical attack to mobilize the radical scavengers present in the blood and to neutralize the oxidation processes [66]. Diluted control blood samples in the presence or absence of PLSO, which was diluted in DMSO, were oxidized by molecular oxygen in an aqueous suspension using a 2.2′–azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) solution. Hemolysis was recorded using a 96-well microplate reader (KRL Reader, Kirial International, Lara-Spiral, Couternon, France) by measuring the turbidimetric optical density decay at 620 nm. The antioxidant efficiency of the oil was expressed in Trolox equivalent. The same analysis was conducted with α-tocopherol (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) used as control. The KRL test was realized by the Lara-Spiral laboratory (Couternon, France).

2.3. In Vitro Study

2.3.1. Cell Culture and Treatments

Murine C2C12 myoblasts were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (*v/v*) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% (*v/v*) of penicillin (100 U/mL)/streptomycin (100 mg/mL). The cells were maintained in a humidified atmosphere (5% CO_2, 95% air) at 37 °C. For subcultures, cells were trypsinized (0.05% trypsin − 0.02% EDTA solution) and passed twice a week. 7β-OHC was either from Sigma-Aldrich or provided by Mohammad Samadi (University of Lorraine, Metz, France); the purity was higher than 98%. The stock solutions of 7β-OHC was prepared at 800 µg/mL (2 mM), as previously described by Ragot et al. [67], and stored in the dark at 4 °C. A stock solution of PLSO was prepared at 80 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) and stored in the dark at 4 °C. An α-tocopherol (the major component of vitamin E; Sigma-Aldrich) solution was prepared to 80 mM in absolute ethanol, as previously described [60], and stored in the dark at 4 °C. For the different experiments, C2C12 myoblasts were used at 80% confluency; they were seeded either into Petri dishes of 10 cm in diameter (1.2×10^6 cells per Petri dish), in six-well plates (2×10^5 cells per well), or in 96-well plates (10×10^4 cells per well). After 12 h, the growth medium was removed and the C2C12 cells were incubated with 7β-OHC (20 µg/mL/50 µM) for 24 h with or without PLSO (100 µg/mL), or α-tocopherol (400 µM) (used as a positive control for cytoprotection) [28]. PLSO and α-tocopherol were introduced in the culture medium 2 h before 7β-OHC. The choice of the concentration of 7β-OHC (20 µg/mL/50 µM) and PLSO (100 µg/mL) was based on the dose-effect of 7β-OHC (5–80 µg/mL/12.5–200 µM) and PLSO (5–3200 µg/mL), which was realized with an MTT assay.

2.3.2. Evaluation of Cell Morphology by Phase-Contrast Microscopy

After 24 h of treatment with or without 7β-OHC (20 µg/mL/50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL), or of α-tocopherol (400 µM), the cell morphology and cell density of C2C12 myoblasts cells were observed and photographed using a phase-contrast microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera (Axiocam lCm1, Zeiss).

2.3.3. Evaluation of Cell Viability with the MTT Assay

Cell viability was measured using an MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay. MTT salt is reduced to formazan in metabolically active cells by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase [35]. C2C12 cells were seeded into 96-well flat-bottom culture plates. After 24 h of treatment as described above, an MTT solution (0.05 mg/mL, dissolved in culture medium) was added to each well and incubated for 3 h at 37 °C. The medium was removed and 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to dissolve the formed formazan crystals. The percentage of viable cells was calculated based on a reduction of the MTT dye into formazan crystals at 570 nm using a microplate reader (Tecan Sunrise, Tecan, Lyon, France).

2.3.4. Measurement of Cell Viability with the Fluorescein Diacetate Assay

The fluorescein diacetate (FDA) assay evaluates the ability of living cells to transform the FDA to fluorescein after cleavage by plasma membrane esterases [68]. After 24 h of treatment with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL), α-tocopherol (400 µM), or MitoQ (1 µM) [69,70], C2C12 cells were incubated for 5 min at 37 °C with 50 µM FDA (Sigma-Aldrich) and then lysed with 10 mM of a Tris-HCl solution containing 1% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma-Aldrich). The fluorescence intensity of the fluorescein ($\lambda_{Ex\ max}$ = 485 nm, $\lambda_{Em\ max}$ = 528 nm) was measured with a Tecan fluorescence microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro, Lyon, France) in order to quantify the living cells. The results were expressed as the % of control: (Fluorescence (assay)/Fluorescence (control)) × 100.

2.3.5. Measurement of Plasma Membrane Permeability with Propidium Iodide

Propidium iodide (PI) was used to evaluate the plasma membrane permeability and cell death. This dye penetrates cells with damaged plasma membranes considered as dead cells [71]. After 24 h of treatment with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM), C2C12 cells (adherent and non-adherent cells) were stained with a PI solution (1 µg/mL of PBS) for 5 min at 37 °C, and then immediately analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The red fluorescence was selected on a 630 nm band-pass filter and 10,000 cells were acquired for each sample. Data analyses were performed using FlowJo software (Carrboro, NC, USA).

2.3.6. Measurement of Oxidative Stress

Evaluation of Reactive Oxygen Species Production with Dihydroethidium

Dihydroethidium (DHE) was used to detect ROS, mainly superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$) production. DHE, a dye that can freely diffuse across cell membranes, is rapidly oxidized under the action of ROS to fluorescent ethidium. This latter exhibits an orange/red fluorescence ($\lambda_{Ex\ max}$ = 488 nm; $\lambda_{Em\ max}$ = 575 nm) [72]. After 24 h of treatment, C2C12 cells (adherent and non-adherent cells) were stained with a 2 µM DHE solution for 15 min at 37 °C and then analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The fluorescent signals of the DHE-stained cells were collected through a 580 nm band-pass filter and 10,000 cells were acquired for each sample. Data analyses were performed using FlowJo software.

Quantification of Antioxidant Enzymes Activities: Glutathione Peroxidase (GPx) and Superoxide Dismutase (SOD)

Glutathione peroxidase (GPx) activity was evaluated according to the method described by Flohe and Günzler [73]. After 24 h of treatment, C2C12 cells were trypsinized, lysed by sonication, and centrifuged at 20,000× *g* (30 min; 4 °C). The supernatant was incubated for 5 min at 25 °C with 0.1 mM of reduced glutathione (GSH) and phosphate buffer saline (50 mM, pH 7.8). The reaction was initiated by the addition of H_2O_2 and stopped by cell incubation with trichloroacetic acid, for 30 min on ice. After centrifugation at 1000× *g* for 10 min, the supernatant was transferred into a new tube and 0.32 M of $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ and 1 mM of DTNB were added to the supernatant and the color developed was measured at 412 nm. GPx activity was expressed as the percentage of control cells.

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured following the method of Beauchamp and Fridovich [74]. Cell lysates were incubated in the presence of 50 mM phosphate buffer, 0.1 mM EDTA, 13 mM L-methionine, 2 µM riboflavin, and 75 mM nitro bleu tetrazolium (NBT). The mixture was exposed to white light for 20 min. The developed blue color is proportional to SOD activity and was measured at 560 nm. Units of SOD activity are expressed as the amount of enzyme required to inhibit by 50% the reduction in NBT. SOD activity was expressed as a percentage of the controls. Antioxidant enzyme activity was expressed relative to the protein content, determined with a Bradford assay.

Measurement of Lipid Peroxidation Products: Malondialdehyde (MDA) and Conjugated Dienes (CDs)

Oxidation of polyunsaturated fatty acid was estimated by the measurement of the final lipid peroxidation products, such as malondialdehyde (MDA) and conjugated dienes (CDs).

Measurement of MDA level: The MDA level was measured using the method described by Yoshioka et al. [75]. Briefly, C2C12 cell lysates were mixed with 1.5 mL of a reactive mixture containing 20% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. The samples were incubated for 30 min in a water bath at a temperature of 95 °C. After cooling, 4 mL of n-butanol was added, and the mixture was centrifuged (1600× *g* for 10 min) to remove undissolved materials. Then, the absorbance was measured at 532 nm. The concentration of MDA was expressed as nmol/mg of protein.

Measurement of CDs level: The CDs level was quantified as previously described by Esterbauer et al. [76]. Lipids were extracted from C2C12 cell lysates using a chloroform and methanol mixture (2:1; *v/v*). After vigorous agitation for 2 min, the material was subjected to centrifugation (1200× *g*; 3 min), and the lower layer was aspirated, transferred into a new test tube, and evaporated under a nitrogen atmosphere. The residue was reconstituted with 1 mL of hexane and measured spectrophotometrically at 243 nm. The results were expressed as nmoles hydroperoxide/mg of protein.

Measurement of Protein Oxidation Products: Carbonylated Proteins (CPs)

Carbonylated proteins (CPs) concentration was measured as described by Oliver et al. [77]. This assay is based on the reaction between 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and CPs to form protein hydrazones. Briefly, C2C12 cell lysates were incubated with DNPH (10 mM in 2.5 N HCl) in the dark for 1 h at room temperature. Then, 20% trichloroacetic acid was added for a 10 min incubation time on ice and the tubes were centrifuged at 1600× *g* for 5 min. The protein pellets were washed with 10% trichloroacetic acid and ethanol-ethyl acetate (1:1; *v/v*) mixture to remove free DNPH. The final pellet was dissolved in a 6 M guanidine hydrochloride solution, and the absorbance was read at 370 nm. The concentration of CPs was expressed in nmol/mg of protein.

2.3.7. Evaluation of Mitochondrial Function

Measurement of Transmembrane Mitochondrial Potential with $DiOC_6(3)$

The variation in the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi m$) was detected using 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$) [67]. After 24 h of treatment, adherent and non-adherent C2C12 cells were pooled, stained with a solution of $DiOC_6(3)$ (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Montigny le Bretonneux, France) at 40 nM (15 min; 37 °C), and then analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The loss of $\Delta\Psi m$ is indicated by a decrease in the green fluorescence intensity collected through a 520 ± 10 nm band-pass filter. For each sample, 10,000 cells were acquired, and data analyses were performed with FlowJo software.

Measurement of ATP Levels

The adenosine triphosphate (ATP) assay was performed using the ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (ref # 11699709001, Roche, Meylan, France), according to the manufacturer's procedure. At the end of the treatments, cells were collected by trypsinization, adherent and non-adherent cells were mixed, and the ATP level was determined after cell lysis. To this end, 100 µL of cell lysis reagent was added on the cell pellets. After 10 min of incubation at RT, a centrifugation was realized at 1000× *g* for 5 min. Then, 50 µL of luciferase was added to 50 µL of each cell lysate to measure the bioluminescence of the samples using a microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro). A standard calibration curve was prepared from an ATP stock solution (10.5 mg/mL) using lyophilized ATP provided by the kit to determine the cellular ATP concentration.

Measurement of Mitochondrial Reactive Oxygen Species with MitoSOX-Red

Mitochondrial ROS production, including superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$), was measured by flow cytometry after staining with MitoSOX-Red (Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA). Once in the mitochondria, this probe is oxidized and exhibits an orange/red fluorescence ($\lambda_{Ex\ max}$ = 510 nm; $\lambda_{Em\ max}$ = 580 nm) [78]. After 24 h of treatment, adherent and non-adherent C2C12 cells were polled and stained with a 5 mM MitoSOX-Red solution for 15 min at 37 °C and then analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer. The fluorescent signals were collected through a 580 ± 20 nm band pass filter. For each sample, 10,000 cells were acquired, and data analyses were performed using FlowJo software.

2.3.8. Determination of the Peroxisomal Status

Evaluation of the Level and Topography of Abcd3 Peroxisomal Transporter by Structured Illumination Microscopy (Apotome)

ATP binding cassette subfamily D member (Abcd3) peroxisomal transporter was detected by indirect immunofluorescence [79,80]. Cells were cultured on glass slides in six-well plates. At the end of the treatment, adherent and non-adherent C2C12 cells were collected, fixed with 2% (*w/v*) paraformaldehyde for 15 min at RT, and then rinsed twice with PBS. Cells were permeabilized for 30 min at RT with a PFS buffer (PBS/0.05% saponin/10% FCS). After washing in PBS, cells were incubated (1 h, RT) with an appropriate rabbit polyclonal antibody raised against Abcd3 (# 11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA) diluted (1/500) in PFS buffer. Cells were washed and incubated in the dark (30 min, RT) with a goat anti-rabbit 488-Alexa antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted at 1/500 in PFS buffer. After washing in PBS, cells were stained with Hoechst 33342 (1 µg/mL) and then mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark). The slides were stored in the dark at 4 °C and examined with structured illumination microscopy (Apotome). The images were realized with ZEN imaging software (Zeiss).

Flow Cytometric Quantification of Abcd3 Peroxisomal Transporter

For flow cytometric analyses, adherent and non-adherent C2C12 cells were collected, fixed with 2% (*w*/*v*) paraformaldehyde diluted in PBS for 15 min at RT and then rinsed twice with PBS. Cells were permeabilized for 30 min at RT with PFS buffer. After washing in PBS, cells were incubated (1 h, RT) with an appropriate rabbit polyclonal antibody raised against Abcd3 (# 11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific) diluted (1/500) in PFS buffer. Cells were washed and incubated in the dark (30 min, RT) with a goat anti-rabbit 488-Alexa antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted at 1/500 in a PFS buffer. After washing in PBS, cells were resuspended in PBS and immediately analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The green fluorescence of 488-Alexa was collected with a 520 ± 20 nm band-pass filter. For each sample, 10,000 cells were acquired, and data analyses were performed using FlowJo software.

Gas Chromatography—Mass Spectrometry Analysis of Fatty Acids

Fatty acids, including very-long-chain fatty acids (VLCFA; C ≥ 22) [81], were analyzed using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), as previously described by Blondelle et al. [82]. Total cellular lipids were extracted, according to the method of Folch et al. [83]. Fatty acids were quantitated by calculating the relative response ratios to their closest internal standard. Calibration curves were obtained with fatty acid authentic standards processed as cell pellets.

Transmission Electron Microscopy Analysis

At the ultrastructural level, transmission electron microscopy (TEM) is the most powerful tools to observe morphological changes caused by various physical or chemical agents [84]. TEM was used to visualize mitochondrial and peroxisomal changes [80] in C2C12 cells cultured for 24 h in the presence or absence of 7β-OHC (50 µM) without or with PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM) [85]. The samples were fixed for 1 h at 4 °C in 2.5% (*w/v*) glutaraldehyde diluted in a cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed twice in cacodylate buffer, incubated in the dark for 1 h at 21 °C in Tris–HCl (0.05 M, pH 9.0) containing diaminobenzidine (DAB: 2.5 mg/mL) and H_2O_2 (10 µL/mL of a 3% solution); washed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 5 min at 21 °C; post-fixed in 1% (*w/v*) osmium tetroxide diluted in cacodylate sodium (0.1 M, pH 7.4) for 1 h at 21 °C in the dark; and rinsed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). The preparations were dehydrated in graded ethanol solutions and then embedded in Epon. Ultrathin sections were cut with an ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined using

an HT7800 electron microscope (Hitachi, Tokyo, Japan) operating at 100 kV and equipped with two advanced microscopy technique (AMT) cameras (Woburn, MA, USA).

Analysis of Abcd3 Peroxisomal Transporter mRNA by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Total mRNA from C2C12 cells were extracted and purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Total mRNA concentration was measured with TrayCell (Hellma, Paris, France) and the purity of the nucleic acids was controlled by the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm (ratios between 1.8 and 2.2 were considered satisfactory). One microgram of total mRNA from each sample was converted into single-stranded cDNA using the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad, Marne la Coquette, France) according to the following procedure: 5 min at 25 °C, 20 min at 46 °C, and 5 min at 95 °C. cDNA was then amplified using the Takyon TM Rox SYBR Master Mix dTTP Blue (Eurogentec, Liège, Belgium) and 300 nM of forward and reverse mouse Abcd3 primer. The forward and reverse Abcd3 primer sequences were the following: Forward: 5′-ctgggcgtgaaatgactagattg-3′; Reverse 5′-cttctcctgttgtgacaccattg-3′.

Thermal cycling conditions were as follows: activation of DNA polymerase (95 °C, 10 min), followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by a melting curve analysis to control for the absence of non-specific products. Gene expression was quantified using cycle to threshold (Ct) values and normalized by the 36B4 reference gene (Forward: 5′-gcgacctggaagtccaacta-3′; Reverse: 5′-atctgcttggagcccacat-3′). Abcd3 level was determined as fold induction of the control.

2.4. Gas Chromatography—Mass Spectrometry Analysis of Cholesterol and Oxysterols Oxidized at C7 (7-Ketocholesterol, 7β-Hydroxycholesterol) in the Plasma of Sarcopenic Patients

Cholesterol and oxysterols levels (7KC, 7β-OHC) were determined by GC-MS on plasma samples from Tunisian subjects. All subjects gave their written consent before being enrolled in this preliminary study. In total, 45 adults of 65 years and older (23 men, 22 women) were recruited over a period of 1 month from January to February 2019. All participants were recruited from a nursing home (Sousse, Tunisia). The Timed Up and Go (TUG) test was used to classify patients as sarcopenic (22 subjects; age = 80 ± 4.16; female/male = 15/7) and non-sarcopenic (23 subjects; age = 70.84 ± 4.38; female/male = 7/16). Blood samples were collected in EDTA tubes after overnight fasting. The blood samples were centrifuged at 800× *g* (10 min; 4 °C), and the plasma was divided into several aliquots that were immediately frozen at −80 °C and stored for one year until GC-MS analysis. Oxysterols were quantified as follows: in a glass tube, 300 µL of plasma was suspended in absolute ethanol containing BHT (50 µg/mL). 7KC (d7) and 7β-OHC (d7) (Avanti Polar Lipids, 700 Industrial Park Drive Alabaster, AL, USA) were used as internal standards. Samples were subjected to alkaline hydrolysis with 10 M KOH (1 h; 37 °C). The reaction mixture was washed with water in order to adjust to pH 7 and sterols were extracted with hexane. After solvent evaporation, 100 µL of a mixture of pyridine/hexamethyldisilazane (HMDS)/trimethylchlorosilane (TMCS) (3:2:1; *v/v/v*) (Acros Organics, Fisher Scientific, Asheville, NC, USA) was added, and samples were incubated at 60 °C for 30 min to form trimethylsilyl ethers. After evaporation, the residue was dissolved in 100 µL hexane for GC-MS analysis. GC-MS was performed using an Agilent Technology 6890 GC equipped with an HP7683 injector and a 5973-mass selective detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Chromatography was performed using an HP-5MS-fused silica capillary column (length: 25 m; i.d.: 0.25 mm; film thickness: 0.25 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). GC-MS conditions were as follows: carrier gas, helium at a flow rate of 1.1 mL/min; injector temperature, 250 °C; oven temperature180 °C, which increased at 10 °C/min to 260 °C, then at 1 °C/min to 280 °C and held for 5 min. The mass spectrometer was operated in the electron impact mode with electron energy of 70 eV. The ion source temperature and the quadrupole temperature were 230 °C and 150 °C, respectively. The ions used for analysis were 7β-OHC 456 m/z, 7β-OHC (d7) 463 m/z, and

7KC 472 *m*/*z*, 7KC (d7) 479 *m*/*z*. Calibration curves were obtained using authentic standards extracted with the method used for the samples.

2.5. Statistical Analysis

The experimental results were statistically analyzed with GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). In vitro data were expressed as the mean ± standard deviation (SD) and compared with an ANOVA test followed by a Tukey's test, which allows multiple comparisons and permits to assess any interaction. Clinical data were compared with a Student's *t*-test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The heatmap representation was realized with GraphPad Prism 8.0 software.

3. Results

3.1. Biochemical Composition of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil*

The profiles of polyphenols, flavonoids, and carotenoids contents in *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) were measured using colorimetric methods and the results are shown in Table 1. The amounts of total phenols, flavonoids, and carotenoids in PLSO are 28.50 ± 0.77 gallic acid equivalents (mg GAE/g of extract), 51.36 ± 2.30 catechin equivalent (mg CE/g of extract), and 2083.59 ± 55.00 (mg/kg of extract), respectively.

Table 1. Total phenols, flavonoids, and carotenoids contents of *Pistacia lentiscus* seed oil (PLSO).

	Total Phenols (mg GAE/g of Extract)	Flavonoids (mg CE/g of Extract)	Carotenoids (mg/kg)
***Pistacia lentiscus* seed oil**	28.50 ± 0.77	51.36 ± 2.30	2083.59 ± 55.00

GAE: gallic acid equivalent; CE: catechin equivalent. Each value represents the mean of three determinations ± standard deviation.

In PLSO, the polyphenols identified and characterized by HPLC coupled with UV analysis were protocatechuic acid, which is a dihydroxybenzoic acid and a type of phenolic acid, and coumarin, which belongs to a polyphenol subclass (hydroxycoumarins) (Table 2).

Table 2. *Pistacia lentiscus* seed oil polyphenol content (mg equivalents quercetin/100 g of oil).

Polyphenols	(mg Equivalents Quercetin/100 g of Oil)
Protocatechuic acid	0.140 ± 0.001
Coumarin	0.650 ± 0.003

Polyphenols chromatogram obtained by HPLC (Supplementary Figure S2). Each value represents the mean of three determinations ± standard deviation.

The fatty acid profile of PLSO, expressed as percentage of total fatty acids, was determined using GC and the results are presented in Table 3. The main fatty acids detected in PLSO were oleic acid (49.77 ± 0.12%), palmitic acid (27.20 ± 0.22%), and linoleic acid (17.19 ± 0.10%), followed by palmitoleic acid (2.25 ± 0.01%), vaccenic acid (1.51 ± 0.03%), and stearic acid (1.26 ± 0.01%). Likewise, PLSO also contains α-linolenic acid, gadoleic acid, and arachidic acid but in much smaller quantities (0.12–0.39%). Minor monounsaturated fatty acids, such as myristic acid, margaric acid, lignoceric acid, and behenic acid, were also detected, but in trace amounts (≤0.05%).

The sterol composition of PLSO was determined using GC and spectral analysis and the results are shown in Table 4. The most abundant detected phytosterols in PLSO were β-sitosterol (67.25 ± 3.24 mg/100 g oil), α-epoxysitostanol (33.36 ± 1.65 mg/100 g oil), and 24-methylene cycloartenol (16.10 ± 2.72 mg/100 g oil) followed by cycloartenol (9.35 ± 1.49 mg/100 g oil) and campestanol (4.48 ± 0.85 mg/100 g oil). All other phytosterols were present in small amounts.

Table 3. *Pistacia lentiscus* seed oil fatty acids profile (g/100 g of oil; % of total fatty acids).

Fatty Acids	g/100 g of Oil (*)	% (**)
∑SFA	32.333 ± 0.566	28.77 ± 0.24
Myristic acid (C14:0)	0.015 ± 0.000	0.05 ± 0.01
Palmitic acid (C16:0)	30.457 ± 0.355	27.20 ± 0.22
Margaric acid (C17:0)	0.022 ± 0.003	0.05 ± 0.00
Stearic acid (C18:0)	1.527 ± 0.124	1.26 ± 0.01
Arachidic acid (C20:0)	0.041 ± 0.012	0.12 ± 0.00
Behenic acid (C22:0)	0.271 ± 0.072	0.04 ± 0.00
Lignoceric acid (C24:0)	ND	0.05 ± 0.00
∑UFA	94.706 ± 2.910	71.25 ± 0.28
∑MUFA	64.736 ± 1.827	53.67 ± 0.17
Palmitoleic acid (C16:1 n−7)	2.623 ± 0.084	2.25 ± 0.01
Heptadecenoic acid (C17:1)	0.179 ± 0.058	ND
Oleic acid (C18:1 n−9)	60.183 ± 1.556	49.77 ± 0.12
Vaccenic acid (C18:1 n−7)	1.670 ± 0.073	1.51 ± 0.03
Gadoleic acid (C20:1 n−9)	0.081 ± 0.056	0.14 ± 0.01
∑PUFA	29.970 ± 1.083	17.58 ± 0.11
Linoleic acid (C18:2 n−6)	29.665 ± 0.990	17.19 ± 0.10
α-linolenic acid (C18:3 n−3)	0.305 ± 0.093	0.39 ± 0.01
∑SFA/∑UFA	0.34 ± 0.19	0.41 ± 0.86

SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids; ND: not detected. Each value represents the mean of three determinations ± standard deviation. (*): data obtained at the University of Monastir (Monastir, Tunisia) with (C19:0) used as internal standard; (**) data obtained at INRAE (Dijon, France) without an internal standard. Data were obtained with the same sample of PLSO. The corresponding chromatograms are shown in Supplementary Figure S3A,B.

Table 4. *Pistacia lentiscus* seed oil phytosterol profile (mg/100 g of oil).

Phytosterol	(mg/100 g of Oil)
Campesterol	4.48 ± 0.85
Stigmasterol	2.69 ± 0.23
β-Sitosterol	67.25 ± 3.24
Δ^5-Avenasterol	3.10 ± 0.90
β-Amyrine	1.81 ± 0.19
Cycloartenol	9.35 ± 1.49
24-Methylene cycloartenol	16.10 ± 2.72
α-Epoxysitostanol	33.36 ± 1.65
Other phytosterols	16.76 ± 2.83
Total	154.89 ± 5.40

The phytosterol chromatogram obtained by GC-FID is shown in Supplementary Figure S4. Each value represents the mean of three determinations ± standard deviation.

The α-tocopherol content of PLSO is given in Table 5. The results show that α-tocopherol represented 68.1 ± 3.41 mg/kg of oil.

Table 5. α-Tocopherol content (mg/kg) of *Pistacia lentiscus* seed oil (PLSO).

	α-Tocopherol (mg/kg)
***Pistacia lentiscus*seed oil**	68.10 ± 3.41

Values are the mean ± SD of three determinations.

3.2. Evaluation of the Antioxidant Properties of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil*

The antioxidant activities of PLSO were measured with different assays: DPPH, FRAP, FIC, and KRL. The results are shown in Table 6. PLSO exhibits free radical scavenging activity, as shown by the IC50 value (5.01 ± 0.095 mg/mL). The half-maximal inhibitory concentration (IC50) (volume of oil required to lower the initial DPPH concentration by

50%) was determined from the dose–response curve. This activity was less than those of ascorbic acid (AA) used as the standard.

Table 6. Antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* seed oil (PLSO).

	IC50 Values (mg/mL)			(Trolox Equivalent)
Samples	**DPPH**	**FRAP**	**Iron Chelating (FIC)**	**KRL**
PLSO	5.010 ± 0.095	1.15 ± 0.23	5.61 ± 0.14	4440.00 ± 493.60
AO	–	–	–	360.80 ± 153.60
EDTA (standard)	–	–	0.60 ± 0.09	–
AA (standard)	0.810 ± 0.270	0.41 ± 0.16	–	–
α-tocopherol	–	–	–	0.94 ± 0.01

Each value represents the mean of three determinations ± standard deviation. IC50: half-maximal inhibitory concentration; PLSO: *Pistacia lentiscus* L. seed oil; AO: argan oil, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; AA: ascorbic acid; DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FIC: Ferrous Iron Chelating FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power; KRL: Kit Radicaux Libres. For the KRL test, data are presented in Trolox equivalent: 1 mL of PLSO is equivalent to X moles of Trolox (value shown in the table).

The reducing power of PLSO measured by FRAP assay was investigated along with AA used as the standard reference. The IC50 value was 1.15 ± 0.23 mg/mL (Table 6). In addition, an iron-chelating activity evaluated with the FIC assay was observed in PLSO with an IC50 of 5.61 ± 0.14 mg/mL (Table 6).

The antioxidant properties of α-tocopherol, PLSO, and Argan Oil Roasted Agadir (AO) were evaluated with the KRL test. For the PLSO and AO, the antioxidant activities were expressed in Trolox equivalent (mole Trolox/mL of oil). For the KRL test, we used α-tocopherol as the positive control and AO stored for 5 years at 4 °C in the dark as the negative control (the corresponding AO freshly prepared has been previously characterized and described and was strongly antioxidant [86]). PLSO showed a higher KRL antioxidant status than the 5 years stored AO. KRL values were 4440.00 ± 493.60 and 360.8 ± 153.6 (Trolox equivalent) in PLSO and AO, respectively (Table 6), illustrating that after 5 years of storage, AO shows a notable decrease in antioxidant activity.

3.3. Evaluation of 7-Ketocholesterol and 7β-Hydroxycholesterol Plasma Levels in Sarcopenic and Non-Sarcopenic Subjects

As several studies support that 7KC and 7β-OHC, mainly resulting from cholesterol auto-oxidation, are involved in the development of major age-related diseases [31,87], these oxysterols as well as cholesterol were measured by GC-MS in the plasma of non-sarcopenic and sarcopenic subjects. In sarcopenic patients, the 7β-OHC level was significantly higher than in non-sarcopenic subjects whereas no significant difference in 7KC and cholesterol level was observed (Supplementary Figure S5). This plasma increase in 7β-OHC could favor the accumulation of this oxysterol in skeletal muscle. Indeed, in male Wistar rats in response to chronic alcohol feeding, there were significant increases in the soleus (type I fiber, glycolytic, aerobic activity) of 7α-OHC, 7β-OHC, and 7KC, whereas in the plantaris (type II fiber, anaerobic activity) only 7β-OHC was increased [88]. Furthermore, in zebra fish, 25-hydroxycholesterol alters muscle morphology and reduces mobility; a similar effect can be envisaged with 7β-OHC [89]. Based on this previous works, and knowing that lipotoxicity (defined as an abnormal accumulation of lipids in tissues such as skeletal muscles) leads to metabolic and functional dysfunctions [90], it is important to clarify whether 7β-OHC can have cytotoxic effects on skeletal muscle cells, and if so, to find treatments to counteract this toxicity. To evaluate this hypothesis, the C2C12 murine myoblast model cultured in the presence of 7β-OHC in the presence or absence of PLSO was used.

3.4. Evaluation of the Effects of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil on 7β-Hydroxycholesterol-Induced Morphological Changes and Cell Death*

At first, initial experiments were performed on C2C12 cells to evaluate whether PLSO and 7β-OHC alone induce cell death on murine C2C12 myoblast cells. To this end, C2C12 were incubated with various concentrations of PLSO (5 to 3200 μg/mL) for 24 h and cell viability was determined using an MTT assay. As shown in Supplementary Figure S6A, no cytotoxic effects of PLSO (5–800 μg/mL) were observed compared to untreated cells; however, in the presence of PLSO used at 1600 μg/mL and 3200 μg/mL, the percentage of viable cells decreased from 50 to 70%, respectively.

To define whether 7β-OHC was able to influence C2C12cell viability, C2C12 cells were exposed to various concentrations of 7β-OHC (12.5 to 200 μM) for 24 h. In the presence of 7β-OHC (50 μM), cell viability significantly decreased to 48.4% compared to untreated cells (Supplementary Figure S6B). Based on these results, PLSO (100 μg/mL) and 7β-OHC (50 μM) were selected to perform further experiments.

Thus, C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM) used as positive control for cytoprotection. PLSO and α-tocopherol were added 2 h prior 7β-OHC. Based on the observations performed by phase-contrast microscopy, morphological changes in C2C12 cells were observed under treatment with 7β-OHC. In 7β-OHC-treated C2C12 cells, compared to untreated cells, an increased number of round cells floating in the culture medium were observed, reflecting a loss of cell adhesion and an induction of cell death; a reduced number of adherent cells was also observed This effect was remarkably corrected when the cells were simultaneously incubated with PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM), indicating that PLSO and α-tocopherol provided protection against 7β-OHC-induced loss of cell adhesion and cell death (Supplementary Figure S7A). By phase-contrast microscopy, no effects on cell adhesion and cell growth of the different vehicles used were observed (Supplementary Figure S7B).

The cytoprotective effect of PLSO (100 μg/mL) was confirmed with the MTT assay. As shown in Figure 1A, the percentage of MTT-positive cells, reflecting metabolically active cells, was significantly decreased in the 7β-OHC (50 μM)-treated cells compared to the control. Noteworthy, when PLSO (100 μg/mL) was associated with 7β-OHC (50 μM), the percentage of MTT-positive cells was significantly increased: this demonstrates that PLSO attenuates 7β-OHC-induced cell death. Similar results were obtained with α-tocopherol.

To further investigate the effect of PLSO on plasma membrane permeability and/or cell death, staining with propidium iodide (PI) was used. As illustrated in Figure 1B, the percentage of PI-positive cells was significantly increased after exposure to 7β-OHC (50 μM), indicating that this oxysterol caused altered plasma membrane and/or cell death in C2C12 cells. In the presence of PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM) associated with 7β-OHC (50 μM), the percentage of PI-positive cells was significantly decreased compared to 7β-OHC-treated cells. Comparatively to untreated cells, no effect of PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM) alone was observed on plasma membrane permeability. Altogether, these data show that PLSO as well as α-tocopherol strongly attenuate 7β-OHC-induced C2C12 cell death.

3.5. Evaluation of the Effects of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil on 7β-Hydroxycholesterol-Induced Oxidative Stress*

To study the effect of PLSO (100 μg/mL) against 7β-OHC (50 μM)-induced oxidative stress, we measured the production of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation products (MDA, CDs), carbonylated proteins (CPs), and antioxidant enzyme activities (SOD, GPx) (Figure 2).

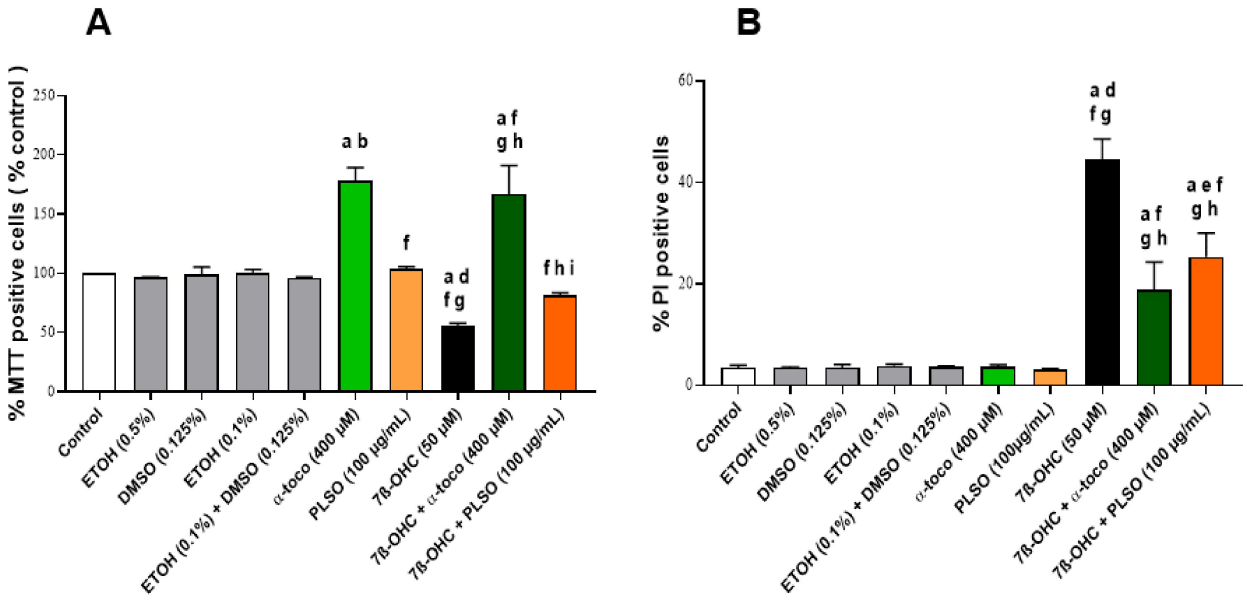


Figure 1. Effect of *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) and 7β-hydroxycholesterolin C2C12 cell viability. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM). The protective effect of PLSO and α-tocopherol against 7β-OHC-induced cell death was evaluated with the MTT assay (**A**) and by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI) (**B**). Data are the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 µM); g: comparison versus PLSO (100 µg/mL); h: comparison versus 7β-OHC (50 µM); i: comparison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells: EtOH (0.5%), DMSO (0.125%), EtOH (0.1%), and EtOH (0.1%) +DMSO (0.125%).

ROS overproduction was quantified by flow cytometry with DHE. As shown in Figure 2A, treatment with 7β-OHC induced a significant increase in the percentage of DHE-positive cells compared to the untreated (control) and vehicle-treated (EtOH 0.1%) cells; this increase in ROS production was significantly attenuated when 7β-OHC was associated with PLSO or α-tocopherol.

In addition, the levels of MDA, CDs, and CPs, which are the main products of lipid and protein oxidation, respectively, were significantly higher in 7β-OHC-treated cells compared to untreated (control) or vehicle-treated (EtOH 0.1%) cells; these increases were significantly reduced when the cells were incubated with 7β-OHC in the presence of PLSO or α-tocopherol, comparatively to 7β-OHC (Figure 2B–D).

In another hand, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities were significantly decreased in 7β-OHC-treated C2C12 cells when compared with untreated (control) and vehicle-treated (EtOH 0.1%) cells; these decreases were also significantly attenuated when 7β-OHC was associated with PLSO or α–tocopherol (Figure 3).

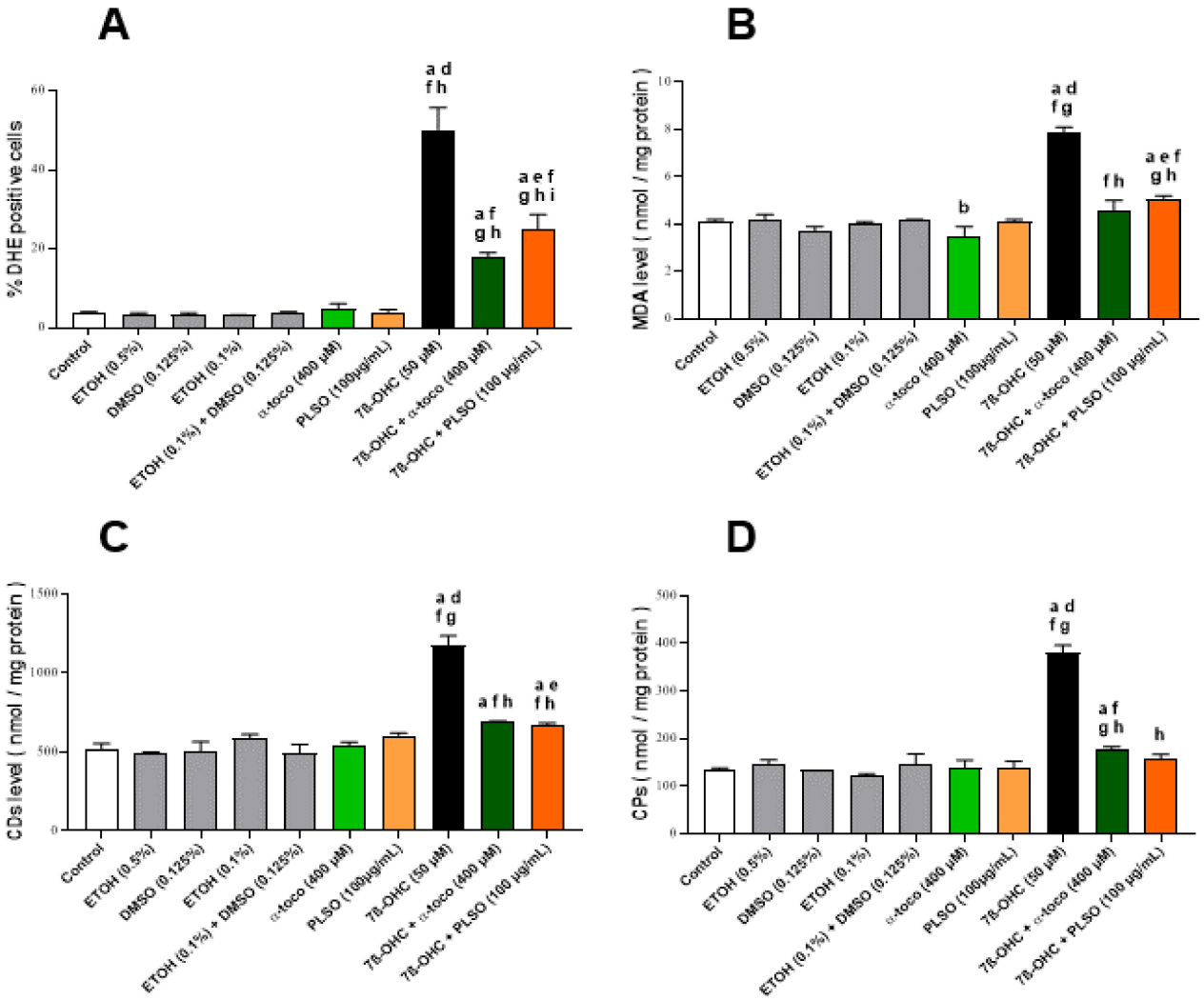


Figure 2. Effect of Pistacia lentiscus L. seed oil (PLSO) on 7β-hydroxycholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species (ROS) and lipid and protein oxidation products in C2C12 cells. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM). ROS overproduction was measured by flow cytometry after staining with dihydroethidium (DHE) (**A**). Lipid and protein oxidation products were determined with malondialdehyde (MDA) (**B**), conjugated dienes (CDs) (**C**) and carbonylated proteins (CPs) levels (**D**). Data are presented as the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 µM); g: comparison versus PLSO (100 µg/mL); h: comparison versus 7β-OHC (50 µM); i: comparison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells.

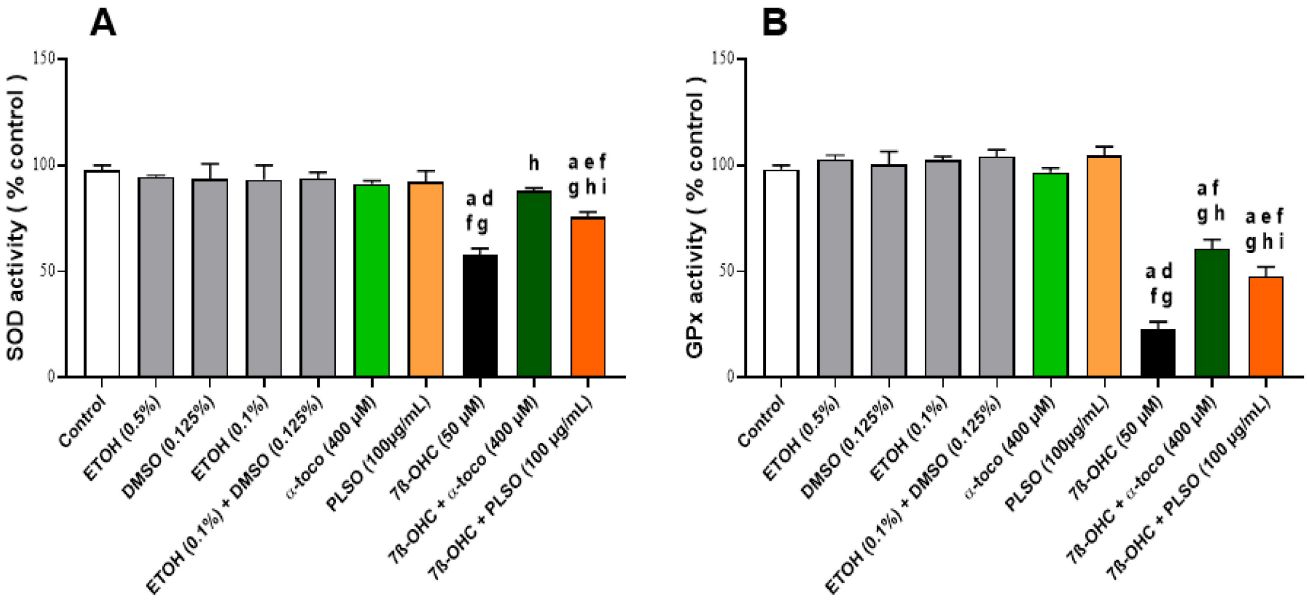


Figure 3. Effect of Pistacia lentiscus L. seed oil (PLSO) and 7β-hydroxycholesterol on antioxidant enzyme activities (SOD, GPx) in C2C12 cells. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM). The measurement of superoxide dismutase (SOD) activity (**A**) and glutathione peroxidase (GPx) activity (**B**) were realized. Data are presented as the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 µM); g: comparison versus PLSO (100 µg/mL); h: comparison versus 7β-OHC (50 µM); i: comparison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells.

3.6. Evaluation of the Effects of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil on 7β-Hydroxycholesterol-Induced Mitochondrial Damages*

To evaluate the effect of PLSO (100 µg/mL) against 7β-OHC (50 µM)-induced mitochondrial dysfunction, we measured the mitochondrial transmembrane potential (ΔΨm) after staining with $DiOC_6(3)$, the overproduction of ROS at the mitochondrial level after staining with MitoSOX-Red, as well as the ATP level by bioluminescence (Figure 4).

Under treatment with 7β-OHC, and comparatively to the untreated (control) and vehicle-treated (EtOH 0.1%) cells, a marked decrease in ΔΨm, revealed by an increase in the percentage of cells with depolarized mitochondria ($DiOC_6(3)$-negative cells), was observed (Figure 4A). In addition, a reduction in ATP production was observed under treatment with 7β-OHC (Figure 4B). With MitoSOX-Red, a marked increase in MitoSOX-Red-positive cells was revealed, confirming a disturbed oxidative phosphorylation and the induction of mitochondrial damage under treatment with 7β-OHC (Figure 4C). Interestingly, in the presence of PLSO or α-tocopherol, the loss of ΔΨm, decrease in ATP, as well as overproduction of mitochondrial ROS was strongly attenuated (Figure 4A–C). In the presence of MitoQ (1 µM), which blocks ROS overproduction at the mitochondrial level, a slight but not significant cytoprotective effect was observed with the FDA test whereas a significant and marked cytoprotection was found with PLSO and α-tocopherol (Supplementary Figure S8), supporting (i) that mitochondrial targeting with an antioxidant is not sufficient to prevent 7β-OHC-induced cell death; and (ii) that PLSO and α-tocopherol, which act at the mitochondrial levels, also have other cellular targets.

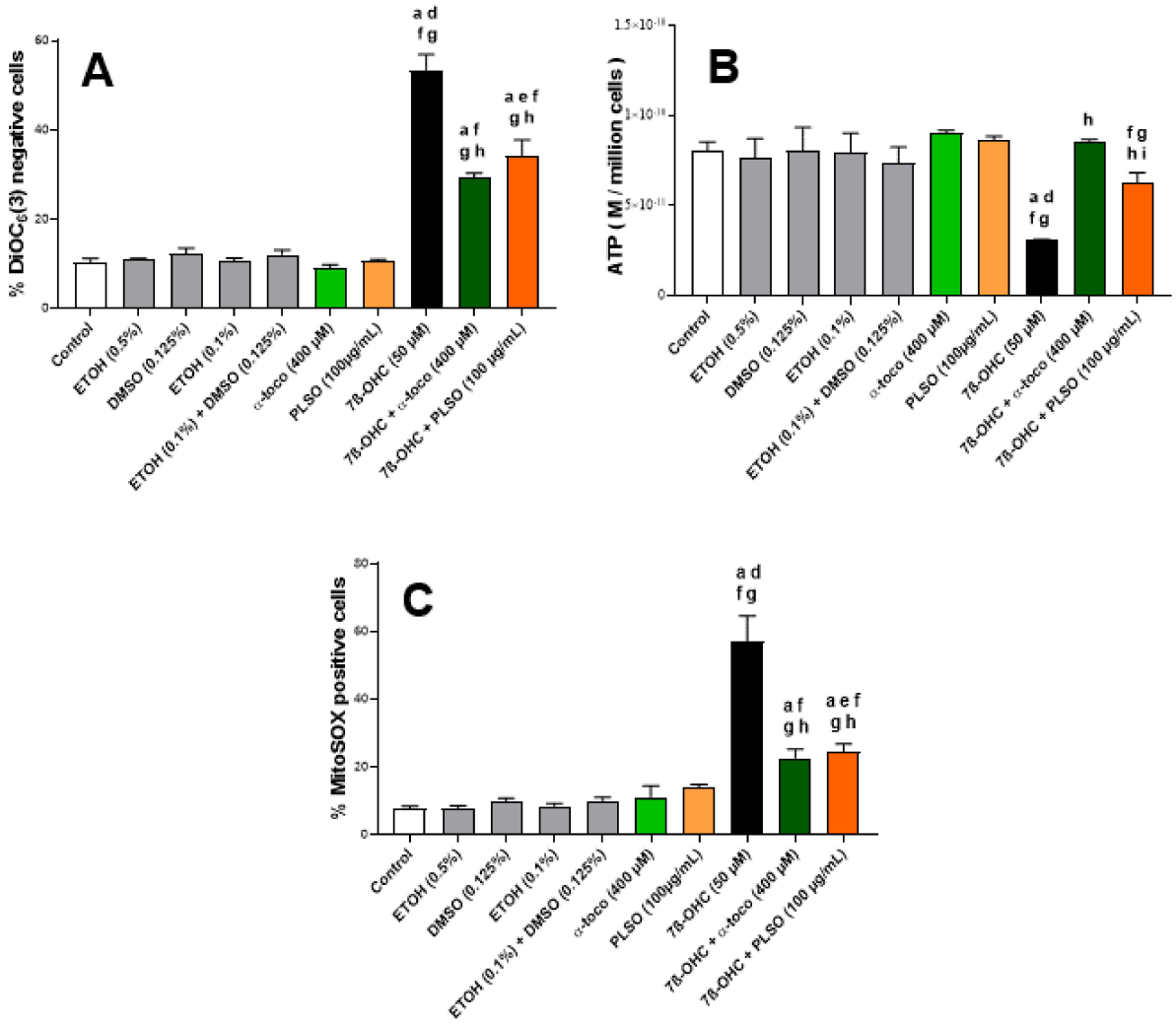


Figure 4. Effect of *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) on 7β-hydroxycholesterol-induced mitochondrial damage in C2C12 cells. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM). Mitochondrial transmembrane potential (ΔΨm) (**A**), mitochondrial ATP production (**B**), and mitochondrial production of superoxide anion($O_2^{\bullet -}$) (**C**) were measured. The data are presented as the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 µM); g: comparison versus PLSO (100 µg/mL); h: comparison versus 7β-OHC (50 µM); i: comparison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells.

3.7. Evaluation of the Effects of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil on 7β-Hydroxycholesterol-Induced Peroxisomal Damages*

Abcd3 (ATP binding cassette subfamily D member) is a major component of the peroxisomal membrane and a common constituent of peroxisomes in different tissues [91,92] (Supplementary Figure S9). This peroxisomal transporter is frequently used to evaluate the peroxisomal mass, thus providing information on peroxisome biogenesis [79]. The effect of 7β-OHC (50 µM) with and without PLSO (100 µg/mL) and α-tocopherol (400 µM) was determined on the topography and expression of Abcd3 revealed by indirect immunofluorescence using structured illumination microscopy (Apotome) and flow cytometry (Figure 5).

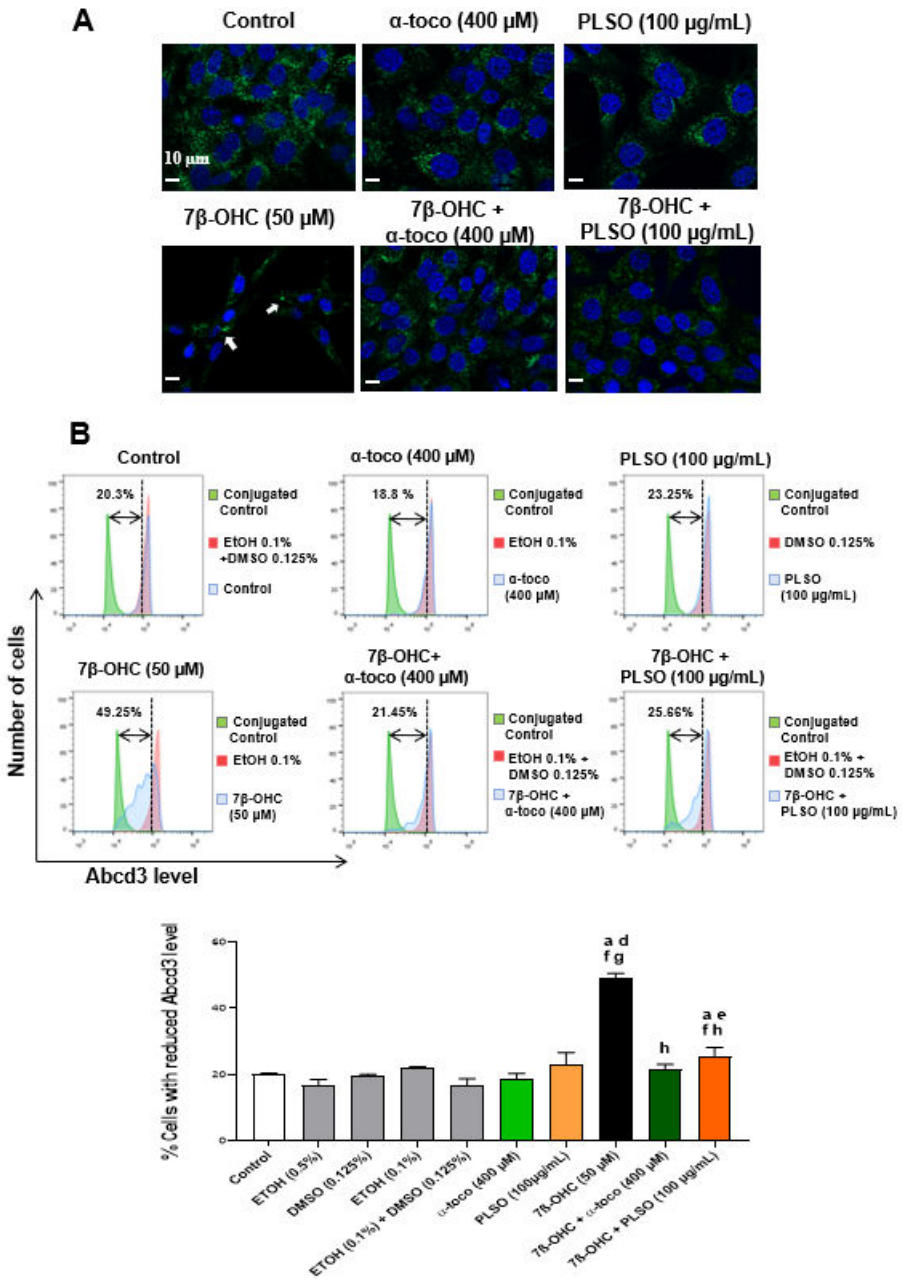


Figure 5. Effect of *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) and 7β-hydroxycholesterol on the expression of the major peroxisomal membrane transporter (Abcd3) used to evaluate the peroxisomal topography and mass. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM). The protective effect of PLSO and α-tocopherol (400 µM) against 7β-OHC were analyzed by structured illumination microscopy (apotome) (**A**) and flow cytometry (**B**). The white arrows point towards cells with an accumulation of peroxisomes in a particular area of the cytoplasm. The data are presented as the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 µM); g: comparison versus PLSO (100 µg/mL); h: comparison versus 7β-OHC (50 µM); i: comparison versus 7β-OHC (50 µM) + α-toco (400 µM). In addition, no significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells.

Using structure illumination microscopy (Figure 5A), a high density of peroxisomes was observed in the cytoplasm of untreated (control) cells, PLSO-, and α-tocopherol-treated cells. An important decrease in peroxisomal density was revealed under treatment with 7β-OHC. In addition, the peroxisomes were homogeneously distributed in the cytoplasm of the control and vehicle-treated cells as well as of PLSO- and α-tocopherol-treated cells, whereas they were preferentially amassed in a particular area of the cytoplasm in 7β-OHC-treated cells. When the cells were cultured in the presence of 7β-OHC associated with PLSO or α-tocopherol, the aspect of the peroxisome in the cytoplasm evocate those of untreated (control) and vehicle-treated cells, although the peroxisomal density remains lower.

Under treatment with 7β-OHC, the decrease in peroxisomal density observed by microscopy suggests a decrease in peroxisomal biogenesis. To confirm this hypothesis, flow cytometric analyses were performed (Figure 5B). The analysis of Abcd3 levels in C2C12 cells did not reveal any difference between untreated (control) and α-tocopherol-treated cells; a slight increase was observed in the presence of PLSO. Under treatment with 7β-OHC, a significant increase in the percentage of cells with a reduced Abcd3 level was observed. Interestingly, this decreased expression of Abcd3 was significantly inhibited when 7β-OHC was combined with PLSO or α-tocopherol.

With regard to peroxisome function, peroxisomal damages (alteration of peroxisomal β-oxidation) (Supplementary Figure S9) can favor the accumulation of very-long-chain fatty acids (VLCFA; $C \geq 22$) [81], which can contribute to amplify cell dysfunctions [93]. Therefore, we determined the effect of 7β-OHC (50 μM) associated or not with PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM) on VLCFA levels in C2C12 cells. In untreated cells (control) and the vehicle, no significant differences were found; similar levels of VLCFA (C22:0, C24:0, C24:1 n−9, C26:0, and C26:1 n−9) were observed (Figure 6). When C2C12cells were exposed to 7β-OHC, a significant increase in VLCFA was detected, and the latter was significantly reduced when 7β-OHC was associated with PLSO or α-tocopherol (Figure 6).

However, enhanced ELOVL1 activity could also be involved in the increased level of VLCFA. At the moment, seven enzymes termed ELOVL 1–7 (Elongation of Very-Long-Chain Fatty Acid), which are localized in the endoplasmic reticulum, have been identified. ELOVL1 is suggested to control VLCA synthesis up to C26:0. This is the most potent elongase for C24:0 and C26:0, whereas, depending on the cell type considered, similar elongase activity have been reported with ELOVL3 and ELOVL6 [94,95]. Our results also support an increase in the elongase activity index (which could correspond to ELOVL1, 3, and 6 activity; ratio (C24:0/C22:0), and ratio (C26:0/C22:0)) under treatment with 7β-OHC; these different elongase activity indexes were also strongly attenuated when 7β-OHC was associated with PLSO or α-tocopherol (Figure 7).

In addition, as shown by qRT-PCR, the important decreases in the Abcd3 mRNA levels, observed under treatment with 7β-OHC (50 μM), were prevented by treatment with PLSO (100 μg/mL), as well as α-tocopherol (400 μM) (Figure 8).

3.8. Evaluation by Transmission Electron Microscopy of the Effects of Pistacia lentiscus L. *Seed Oil on 7β-Hydroxycholesterol-Induced Cellular, Mitochondrial, and Peroxisomal Changes*

Transmission electron microscopy analysis was realized to study the morphological changes in C2C12 myoblasts (Figures 9 and 10).

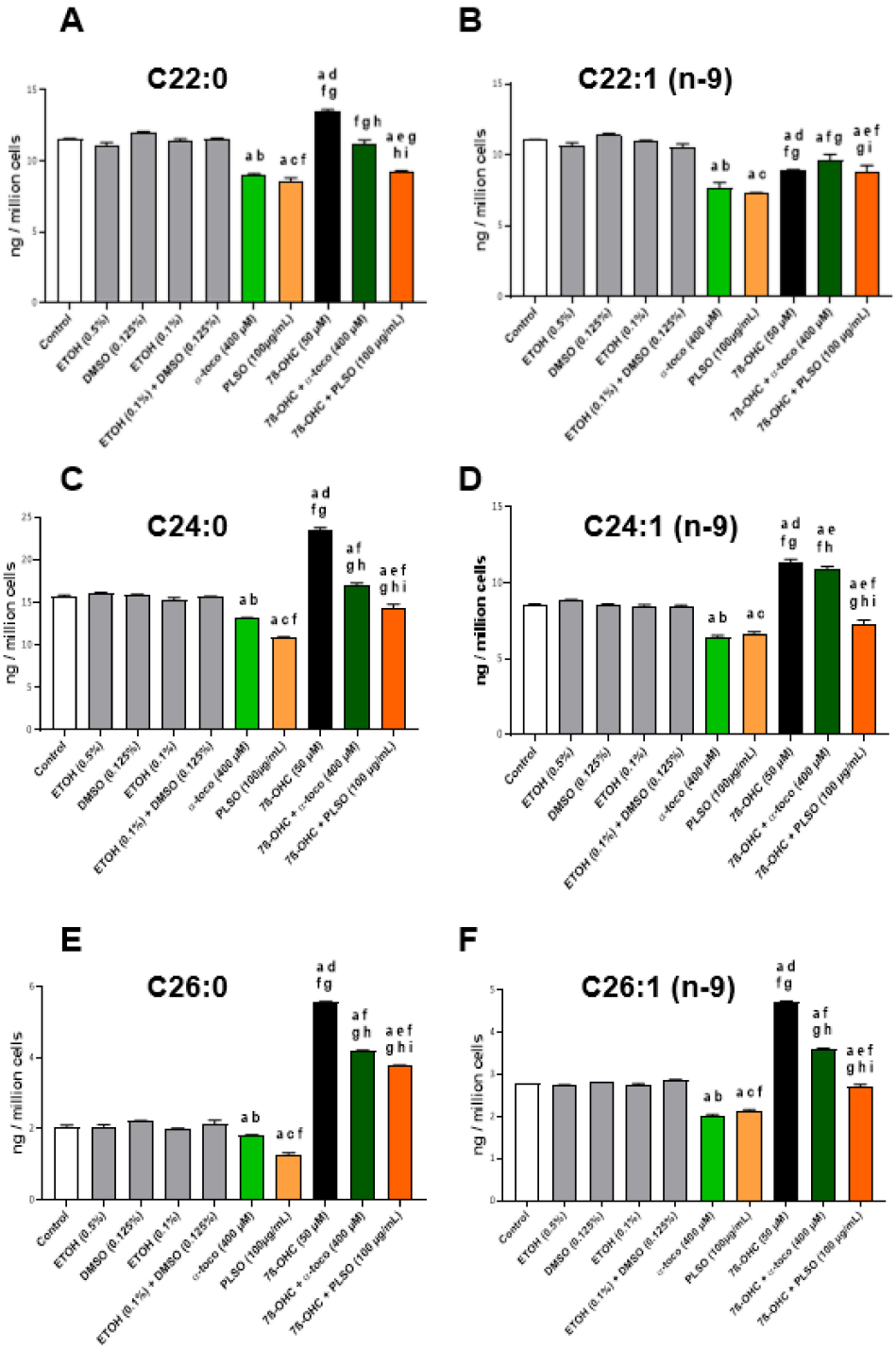


Figure 6. Effect of 7β-hydroxycholesterol with and without *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) on very-long-chain fatty acid (VLCFA) levels. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM). The level of VLCFA (C ≥ 22) was determined by GC-MS: C22:0 (**A**), C22:1 n−9 (**B**), C24:0 (**C**), C24:1 n−9 (**D**), C26:0 (**E**) and C26:1 n−9 (**F**). Data are the mean ± SD of two independent experiments. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 μM); g: comparison versus PLSO (100 μg/mL) ; h: comparison versus 7β-OHC (50 μM); i: comparison versus 7β-OHC (50 μM) + α-toco (400 μM). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells.

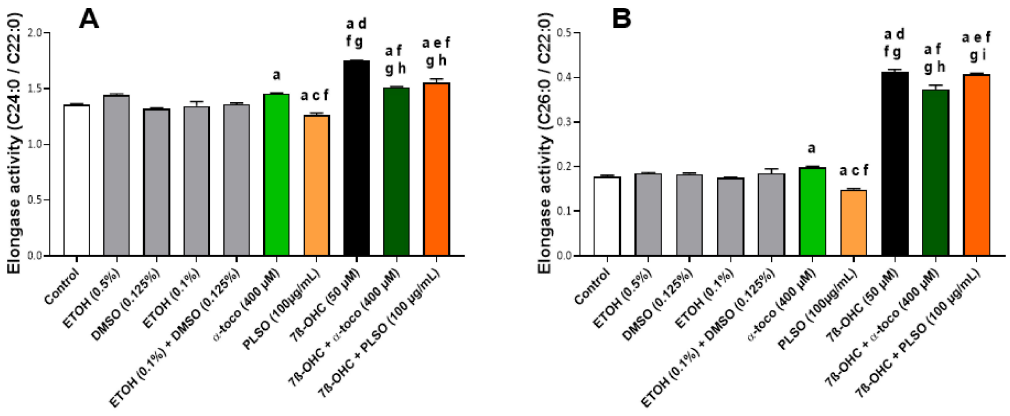


Figure 7. Effect of *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) and 7β-hydroxycholesterol on elongase activities. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM). The levels of C22:0, C24:0, and C26:0 were determined by GC-MS, and the corresponding elongase activity index, which could correspond to ELOVL1, 3, and 6 activity (ratio (C24:0/C22:0) (**A**) and ratio (C26:0/C22:0) (**B**)) were calculated. Data are the mean ± SD of two independent experiments. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 μM); g: comparison versus PLSO (100 μg/mL); h: comparison versus 7β-OHC (50 μM); i: comparison versus 7β-OHC (50 μM) + α-toco (400 μM). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells.

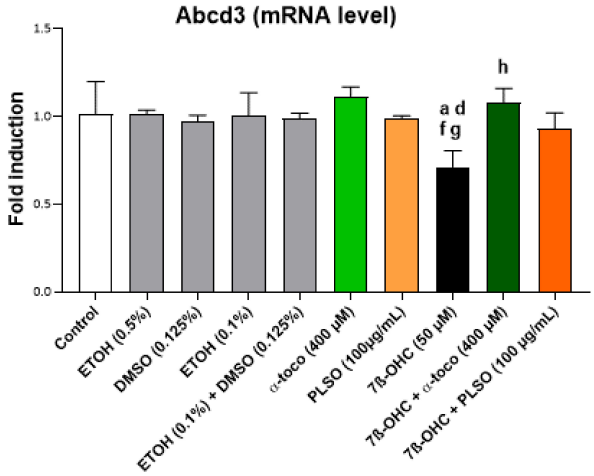


Figure 8. Effects of 7β-hydroxycholesterol with and without *Pistacia lentiscus* L. on Abcd3 gene expression. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM). The mRNA expression of Abcd3 was evaluated by qRT-PCR. Data shown are representative of three independent experiments. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. a: comparison versus control; b: comparison versus ETOH (0.5%); c: comparison versus DMSO (0.125%); d: comparison versus ETOH (0.1%); e: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); f: comparison versus α-toco (400 μM); g: comparison versus PLSO (100 μg/mL); h: comparison versus 7β-OHC (50 μM); i: comparison versus 7β-OHC (50 μM) + α-toco (400 μM). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells.

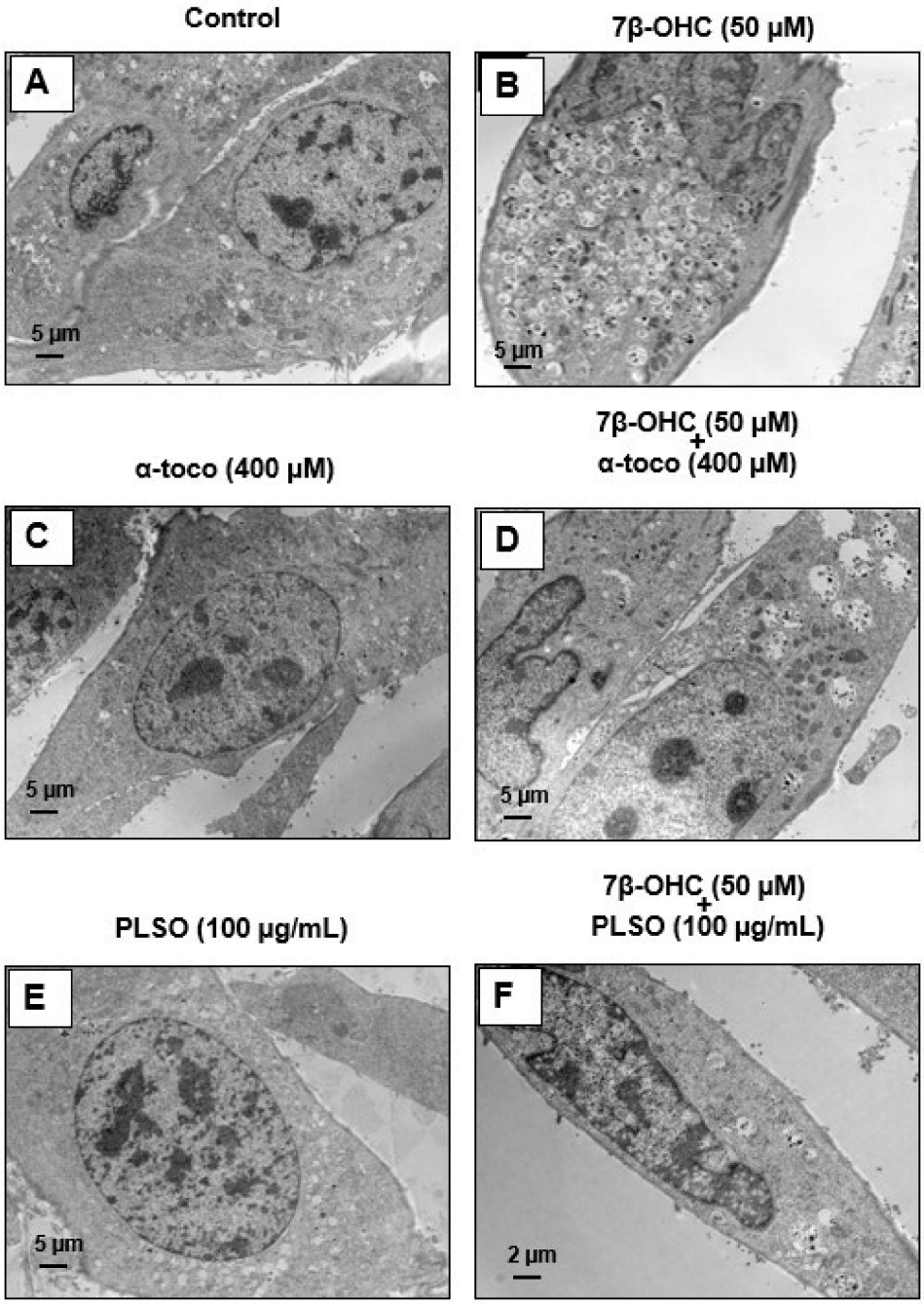


Figure 9. Analysis of morphological changes in C2C12 myoblasts using transmission electron microscopy. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of PLSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM). In untreated cells (control) (**A**), α-tocopherol (400 μM)-treated cells (**C**), and PLSO (100 μg/mL)-treated cells (**E**), cells have a fusiform shape, with large round central nuclei containing several nucleoli; they have several small empty vacuoles and morphologically normal mitochondria and peroxisomes. In the 7β-OHC (50 μM)-treated cells (**B**), cells have an abnormal morphology: they have a round shape, irregular nuclei, and a lot of cytoplasmic vacuoles containing cell debris, as well as altered mitochondria and peroxisomes. In (7β-OHC + α-tocopherol and 7β-OHC+ PLSO)-treated cells, mainly morphologically normal cells were observed; they contain empty vacuoles and have mainly mitochondria and peroxisomes resembling those present in the control cells (**D–F**). No differences were observed between the control (**A**), α-tocopherol-treated (**C**), and PLSO-treated cells (**E**). Representative TEM images of the C2C12 myoblasts cultured in the presence of the vehicles are shown in Supplementary Figure S10.

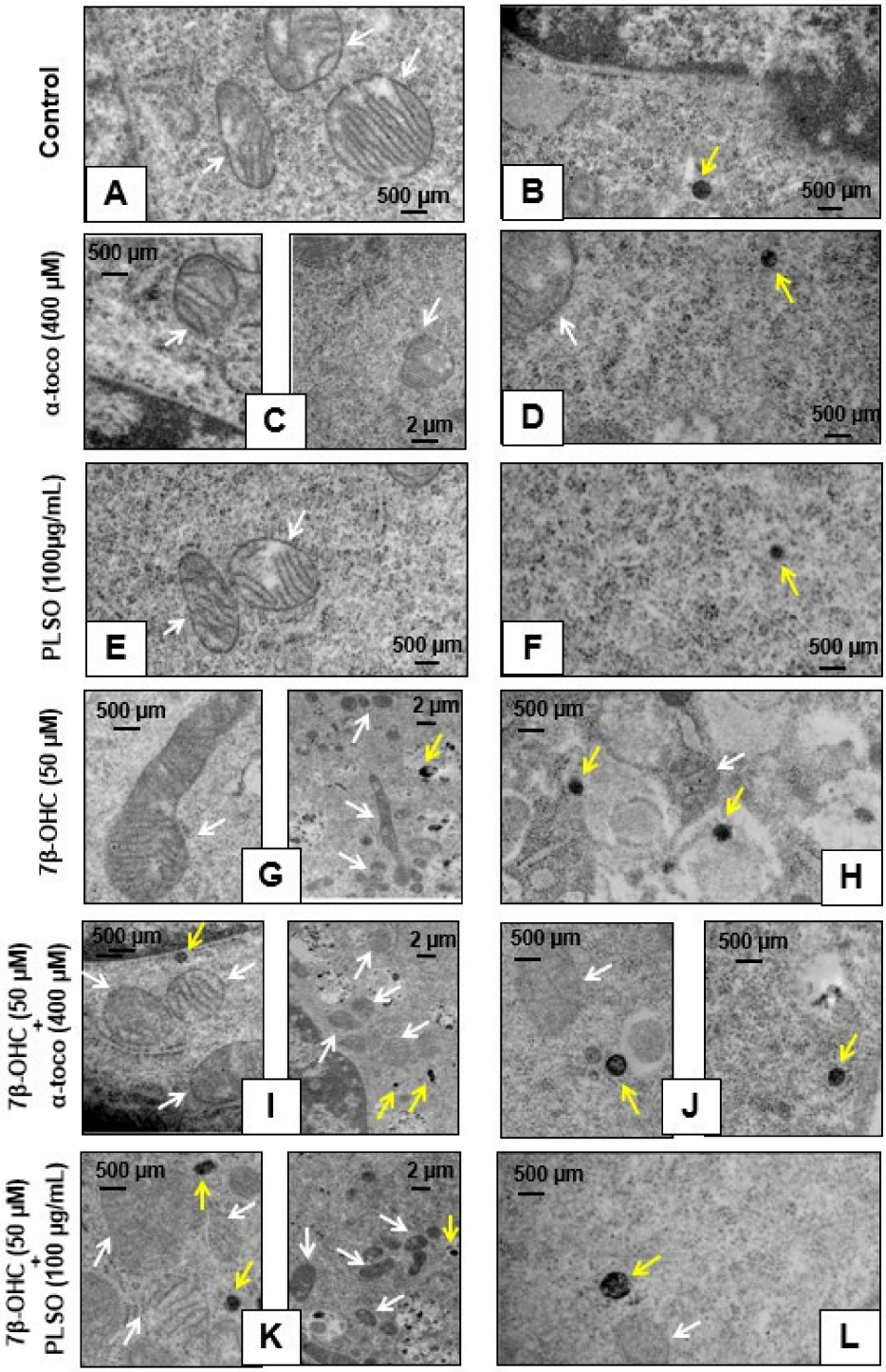


Figure 10. Visualization of the mitochondria and peroxisomes in C2C12 myoblasts by transmission electron microscopy. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 µM) in the presence or absence of PLSO (100 µg/mL) or α-tocopherol (400 µM). In untreated cells (control) (**A**,**B**), α-tocopherol (400 mM)-treated cells (**C**,**D**), and PLSO (100 µg/mL)-treated cells (**E**,**F**), numerous mitochondria with clear cristae as well as round and regular peroxisomes were detected. In 7β-OHC (50 µM)-treated cells (**G**,**H**), irregular mitochondria with an increased size, reduced matrix density, and disrupted cristae, as well as peroxisomes with abnormal sizes and shapes were visualized. In (7β-OHC + α-tocopherol)-treated (**I**,**J**) and (7β-OHC+ PLSO) (**K**,**L**)-treated cells, mainly mitochondria and peroxisomes morphologically similar than those present in the control cells were observed. The white arrows point towards mitochondria and the yellow arrows point towards peroxisomes.

Control cells (Figure 9A), α-tocopherol (400 mM)-treated cells (Figure 9C), and PLSO (100 µg/mL)-treated cells (Figure 9E) have a well-preserved cell morphology with a fusiform shape and a large central round nucleus containing some nucleoli; in the cytoplasm, they have small empty vacuoles and morphologically normal mitochondria and peroxisomes. Compared to C2C12 control cells, 7β-OHC (50 µM)-treated cells showed significant alterations in cell morphology: most often round cells with irregular nuclei were observed, they contained several cytoplasmic vacuoles associated with a lot of cell debris as well as altered mitochondria and peroxisomes (Figure 9B). This disturbed morphology was attenuated by α-tocopherol (400 mM) and PLSO (100 µg/mL) treatment (Figure 9D,F). α-Tocopherol- and PLSO-treated cells (Figure 9C,E) have a similar morphology than control cells (Figure 9A). No morphological differences were observed between the control (Supplementary Figure S10A) and vehicle-treated cells (Supplementary Figures S10B,D).

Moreover, TEM observation of the C2C12 cells allowed us to highlight the essential cellular constituents, namely, mitochondria and peroxisomes. Control cells, α-tocopherol (400 mM)-treated cells, and PLSO (100 µg/mL)-treated cells have morphologically normal mitochondria with numerous cristae as well as round peroxisomes that are homogeneous in size in the range of 0.4 ± 0.1 µm (Figure 10A,F). However, major changes in the size and shape of these organelles were observed when C2C12 cells were treated with 7β-OHC; thus, several mitochondria with abnormal sizes and shapes were observed: larger size, reduced matrix density, and disrupted cristae (Figure 10G). In addition, several peroxisomes were detected in numerous cytoplasmic vacuoles, evocating a pexophagy process (Figure 10G,H). It is noteworthy that these changes in mitochondrial and peroxisomal topography and/or morphology were attenuated when 7β-OHC was combined with α-tocopherol (400 µM) or PLSO (100 µg/mL) (Figure 10I,L).

Indeed, we note that the mitochondria returned to their rounded shapes and the peroxisomes present in the vacuoles were rarely detected. Altogether, our data by TEM confirm that 7β-OHC induced several mitochondrial and peroxisomal changes, and that α-tocopherol and PLSO have strong cytoprotective effects on these organelles.

4. Discussion

Aging is characterized by the variable decline in many biological functions, which can seriously alter the life quality of elderly people. Among the major alterations occurring during the aging process is sarcopenia, which corresponds to a loss of mass, quality, and strength of skeletal muscles [2,3]. Sarcopenia is generally accompanied by an impairment in muscle regeneration and a rupture of RedOx homeostasis, leading to ROS overproduction, which may, in turn, lead to the loss of muscle function [96]. ROS overproduction can favor lipid peroxidation, and increased levels of cholesterol auto-oxidation products, such as 7KC and 7β-OHC, are known to contribute to the development of several age-related diseases [31,81]. Interestingly, low physiological levels of ROS help maintain and heal skeletal muscle [97]; yet, tissue repair delay is caused by an excessive amount of ROS in the muscles, resulting in worsening the injury and creating atrophy [98]. Among the factors known to increase antioxidant defense and protect muscle from harmful effects of oxidative stress is nutrition. In that regard, in the current study, PLSO has been shown to contain a lot of compounds with antioxidant properties and this edible Mediterranean oil has a protective and antioxidant activity against 7β-OHC-induced cytotoxicity in C2C12 skeletal muscle cells. The data obtained are summarized in a heatmap (Figure 11).

Plants are an important source of bioactive molecules with therapeutic potential [99]. The genus *Pistacia* is a particular genus of the Anacardiaceae family due to its dioeciousness and naked flowers [100]. The species *Pistacia lentiscus* L. is a medicinal plant that grow wild in forests, low mountains, and in all types of soil [101]. Despite its limited distribution in the world, *Pistacia lentiscus* L. is known worldwide for several therapeutic properties, such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-proliferative, and neuro-protective effects [48–51].

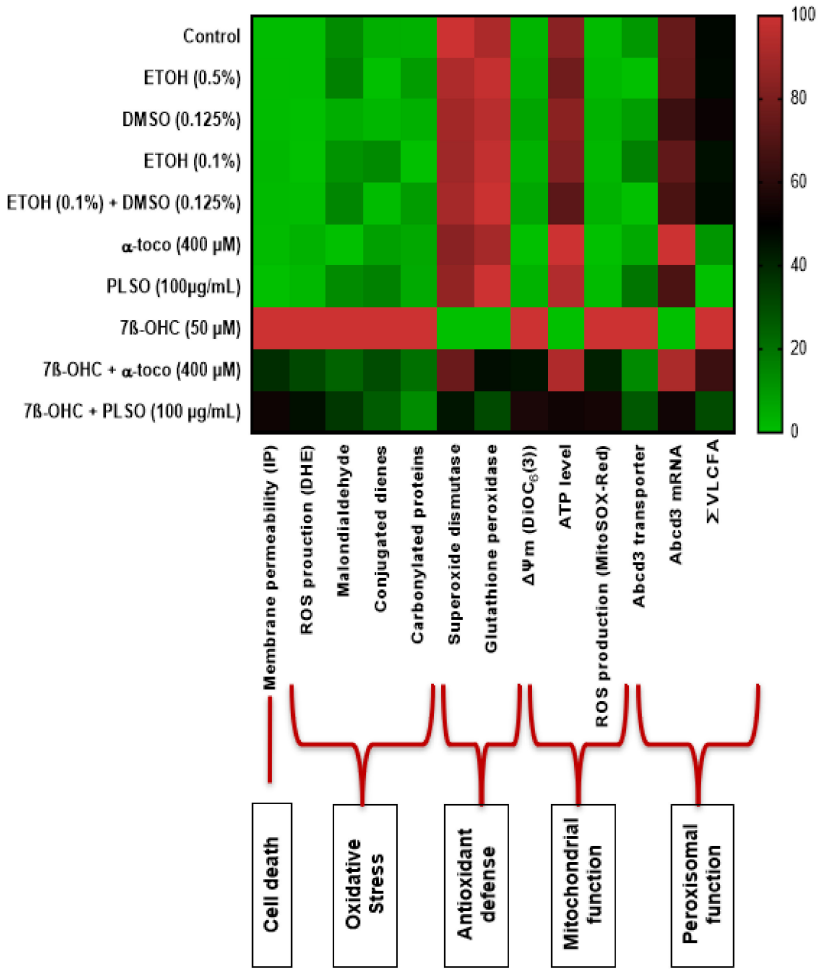


Figure 11. Heatmap representation of the toxicity of 7β-hydroxycholesterol and of the cytoprotective effects of PLSO and α-tocopherol on C2C12 cells. Heatmap graded from green (little or no effect: 0) to red (maximum effect: 100).

Using C2C12 cells cultured in the presence of 7β-OHC associated with many age-related diseases [31], our results show why there is interest in PLSO to prevent skeletal muscle cell dysfunction in a pro-oxidant environment. The results obtained establish that PLSO strongly attenuates the toxicity of 7β-OHC against which few cytoprotective molecules or mixtures of molecules have been identified [28]. Noteworthy, PLSO, which has a high nutritional value based on its biochemical profile established in this study, has a cytoprotective effects against 7β-OHC, which is of the same order of magnitude as that observed with α-tocopherol used at high concentration.

In the present study, we report that PLSO from Tunisia (area of Tabarka) has comparable amounts of total phenolics than PLSO from Algeria and Morocco (28.50 ± 0.77 mg/GAE/g vs. 25.15 ± 1.01 mg/GAE/g and 22.61 ± 1.42 mg/GAE/g, respectively) [102,103]. This similarity may be due to the fact that these three regions are in the same bioclimatic area. However, the flavonoids content of the PLSO used in this study was higher than the PLSO from Morocco [103].

The PLSO from Tunisia also showed a notable quantity of carotenoids. Thus, we could consider that PLSO is a great natural source for these pigments when compared to virgin olive oil (1.58–2.84 mg/kg of oil) [53]. These pigments, mainly β-carotene, are precursors of vitamin A. Dietary carotenoids are antioxidants thought to provide health benefits in the prevention of cardiovascular diseases and cancer [104,105]. In addition, β-carotene given to 8-week-old male mice by oral gavage for 7 or 14 days was able to maintain and enhance skeletal muscle mass by increasing the expression level of insulin-like growth

factor-1 (IGF-1) [106]. In addition, fatty acids are considered a genetic code of oils; they are major components of most naturally occurring lipids in plants. The analysis of the fatty acid profile of PLSO from Tunisia is in accordance with the finding of Brahmi et al., (fatty acid profile expressed in g/100 g of PLSO) [102] and Dhifi et al., (fatty acid profile expressed in %) [107]. It has been reported that the most abundant unsaturated fatty acids present in PLSO were oleic acid (OA; C18:1 n−9) and linoleic acid (LA; C18:2 n−6). OA is reputed for its effect on oils oxidative stability and its nutritional value [108]. OA also has strong antioxidant activities against 7-KC-induced cell death on murine microglial BV-2 cells [55,109]. LA is also an essential fatty acid and a precursor of polyunsaturated fatty acids with longer chains, which enhances the nutritional value of the vegetable shortening [110]. Lee et al., (2009) indicated that unsaturated fatty acids, especially OA and LA, enhanced the proliferation of C2C12 skeletal muscle cells [111]. In the current study, palmitic acid (C16:0) was the predominant saturated fatty acid found in PLSO, which is consistent with previous studies [107,112]. According to the literature, PLSO presents a higher palmitic acid content than olive oil (9.85–20.30%) and other vegetable oils, such as milk thistle seed oil (6.25–13.06%) and argan oil (12.11–13.05%) [62]. This saturated fatty acid has been thought to increase the total cholesterol, and specifically the LDL cholesterol levels, although a previous study demonstrated that high consumption of palmitic acid in healthy volunteers does not increase the cholesterol if it is combined with LA, as is the case in PLSO [113]. Noteworthy, the low saturated/unsaturated fatty acids ratio (0.404%) indicates that PLSO contains a huge amount of unsaturated fatty acids, which gives it valuable nutritional and dietetic value as well as curative properties [107].

The PLSO sterol profile also showed that β-sitosterol is the most abundant phytosterol (67.25 ± 3.24 mg/100 g of oil) followed by α-epoxysitostanol and 24-methylene cycloartenol. β-sitosterol was also the most representative sterol in the PLSO harvested from different Tunisian locations but the amount of this sterol changed according to geographic origin (99.61 mg/100 g of oil in Korbousand; 389.50 mg/100 g of oil in Rimel) [52]. A lower amount of β-sitosterol was found in Algerian PLSO (58.79 ± 1.19 mg/100 g of oil) [102]. β-sitosterol is one of the most abundant dietary phytosterols that have potential health benefits. Several experimental studies demonstrated that β-sitosterol could regulate the glucose and lipid metabolism [114] and inhibit inflammation and oxidative stress [115,116]. In addition, an in vitro study showed that C2C12 skeletal muscle cells treatment by β-sitosterol improves mitochondrial biogenesis and function via increasing mitochondrial electron transport and energy demand and by activating protein kinase/PGC-1 [117]; these observations give the PLSO a great nutritional and therapeutic value.

In addition, tocopherols are also major ingredients in the oils since they have high antioxidant activity [118]. They could protect polyunsaturated fatty acids (PUFA) from oxidation by scavenging lipid peroxyl radicals ($ROO^{\bullet}$) [119]. In PLSO, α-tocopherol is present in the highest quantity and contributes to the natural conservation of PLSO. It is important to highlight that PLSO is an excellent source of vitamin E, which is constituted of four tocopherols and four tocotrienols [120].

In another hand, the antioxidant potential of PLSO, evaluated by DPPH, FRAP, and FIC assays, demonstrated an important antioxidant potential of this oil, reinforcing our interest to study the cytoprotective properties of this oil in vitro. Consequently, in the context of sarcopenia, we evaluated the protective properties of PLSO against 7β-OHC-induced cytotoxicity on a model of murine C2C12 myoblast cells.

Indeed, several oxysterols, including 7β-OHC, are present at increased levels and high amounts in the plasma and tissues of patients with age-related diseases [31,121], and our preliminary data obtained by GC-MS on the plasma from subjects with and without sarcopenia have revealed significant higher plasma levels of 7β-OHC in sarcopenic patients. It has been shown that 7β-OHC, which is a potent inducer of oxidative stress by stimulating at least in part NAD(P)H activity [122], was among the most cytotoxic oxysterol on different cell types from different species [42]. Oxidative damage is supposed to be the main responsible factor for cellular aging. A potential oxidative alteration of

satellite cells could induce problems in muscle regeneration, as is the case in aging [123]. Therefore, in age-related diseases, including sarcopenia, the identification of molecules or mixture of molecules capable to attenuate 7β-OHC-induced cell death, defined as oxiapoptophagy [124], has a crucial interest to prevent and/or treat these diseases.

In the present study, 7β-OHC (50 μM, 24 h) showed cytotoxic effects on C2C12 myoblasts cells, which are characterized by an induction of cell death associated with ROS overproduction as well as mitochondrial and peroxisomal dysfunction. Some of these effects were previously obtained on vascular cells, hematopoietic and immune cells, retinal cells, and nerve cells exposed to 7β-OHC [30,109,125,126]. As previously reported on numerous adherent cells, 7β-OHC induces a loss of cell adhesion on C2C12 cells, which is characterized by an increase in round and floating cells, suggesting an alteration of membrane constituents associated with cell death. These alterations could be triggered by a RedOx imbalance and an induction of oxidative stress, which could modify the structure and the physical properties of plasma membranes, favoring the degradation of adhesion molecules and cell junctions by mechanisms involving the ROS-dependent activation of matrix metalloproteinases [127]. In addition, 7β-OHC-induced plasma membrane modifications, revealed in the present study by an increased permeability to PI, could modify the ionic homeostasis (Ca^{2+}, N^{+}, K^{+}) with important consequences on numerous signaling pathways, especially those involved in the activation of apoptosis [30,128] or the transmission of nerve influx [129]. In sarcopenic patients, the alteration in nerve influx could also amplify muscle dysfunction at the neuro–muscular junction. In support of the key role of oxidative stress in 7β-OHC-induced cell death [124], our results obtained in C2C12 cells showed that 7β-OHC also induced an overproduction of mitochondrial ROS, associated with an accumulation of lipid and protein oxidation products, such as MDA, CDs, and CPs, as well as a decrease in the major antioxidant enzymes activities (superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx)). These results evocate the cytotoxic effects observed with 7KC on different types of neuronal cells (158 N murine oligodendrocytes, BV-2 murine microglial cells, and N2a murine neuronal cells) on which the activation of the oxidative stress is at the origin of the toxicity of this oxysterol [126,130].

On C2C12 cells as well as on other cell types, under treatment with 7β-OHC, it can be considered that ROS overproduction results from the activation of different NADPH oxidase isoforms [35] and from mitochondrial dysfunctions. As ROS overproduction and mitochondrial dysfunction are considered as major phenomena involved in senescence and aging [131], our data support the hypothesis that 7β-OHC could contribute to the aging process in skeletal muscle cells. 7β-OHC induces ROS overproduction probably also contributes to the alterations in mitochondrial structures and of mitochondrial proteins present in the mitochondrial complexes contributing to oxidative phosphorylation. This could favor not only a loss of transmembrane mitochondrial potential ($\Delta\psi m$) but also a disruption of the respiratory chain function and a limitation in energy production, leading to the decreased ATP production observed in the present study. Consequently, in tissues with a low cell turnover, such as the skeletal muscle, alteration of the mitochondria under the action of 7β-OHC may have important detrimental effects on the muscular function.

Like mitochondria, the peroxisomes, which are metabolically tightly connected to the mitochondria [132], represent another important source of intracellular ROS (mainly H_2O_2), and it is now well established that peroxisomal dysfunctions increase ROS overproduction and disturb mitochondrial activity [80,133]. It has been shown on 158 N murine oligodendrocytes that the inactivation of the peroxisomal transporters ABCD1 and 2 associated with peroxisomal β-oxidation, as well as of ACOX1, which is the main limiting enzyme of peroxisomal β-oxidation, favor oxidative stress and increase ROS production in whole cells and at the mitochondrial level [134]. The peroxisome, in addition to its implication in the regulation of RedOx homeostasis, is implicated in the control of lipid metabolism and non-cytokinic inflammation [135]. It has also been suggested that the peroxisome may also play a crucial role in cellular aging [136]. However, still little is known about the contribution of the peroxisome in the aging process but an involvement of this organelle

in the amplification of mitochondrial dysfunction is quite well documented [93]. The present study realized on C2C12 cells clearly shows peroxisomal alterations in the presence of 7β-OHC, which is characterized by a reduced peroxisomal density and a lower level of Abcd3 peroxisomal transporter. As 7β-OHC could affect and reduce the peroxisomal transport and degradation of VLCFA (C24:0, C24:1, C26:0, and C26:1), whose intracellular accumulation can have toxic consequences [137], the levels of VLCFA have been measured by GC-MS and the elongase activity index of the enzyme ELOVL1 associated with VLCFA metabolism has been determined [138]. Measuring the level of some VLCFA in sarcopenia could be of interest since some fatty acids behave as metabolic inhibitors, uncouplers of oxidative phosphorylation, and membrane permeability transition (MPT) inducers; it is thus hypothesized that these pathophysiological mechanisms could contribute to the muscular symptoms in sarcopenia [139].

Based on the results obtained on C2C12, preventing the toxicity of 7β-OHC, which is essentially formed by auto-oxidation of cholesterol and is increased in many age-related diseases, remains a major challenge [28]. For this purpose, it is still necessary to identify the molecules or mixtures of molecules allowing to prevent or reduce its toxicity. Indeed, at the moment only few natural and synthetic molecules as well as mixtures of molecules capable to inhibit 7β-OHC-induced cytotoxicity have been identified [28]. Noteworthy, we reported that PLSO is an edible oil with high nutritional value containing several antioxidant nutrients known for their protective effects against various diseases associated with oxidative stress, and our data indicate that PLSO exhibits strong cytoprotective activities against 7β-OHC on C2C12 mouse skeletal muscle cells. The effects observed with PLSO were in the range of order of those obtained with α-tocopherol known to strongly counteract 7β-OHC-induced oxidative stress and cell death induction on several cell types [30]. In accordance with these findings, it has been reported that PLSO was able to inhibit H_2O_2-induced oxidative stress in human skin culture [140]. Besides PLSO, other oils and natural bioactive compounds, such as Schisandrae semen essential oil [141], isorhamnetin [142], resveratrol [143], and phloretin [144], were described as antioxidant molecules in C2C12 murine skeletal muscle cells. Our data clearly show that PLSO attenuates both mitochondrial and peroxisomal dysfunctions induced by 7β-OHC through the restoration of succinate dehydrogenase activity and $\Delta\psi m$, a reduction in mitochondrial ROS production, normalization of Abcd3 expression, and VLCFA levels. Thus, PLSO acts on the major targets involved in aging—those contributing to the development of major age-related diseases—namely, oxidative stress, mitochondria, and peroxisome. The cytoprotective results obtained with LPSO evocate those obtained with several other oils associated with the Mediterranean diet (olive oil, milk thistle seed oil, and argan oil) [86,109]. Thus, the value of the lipid mixtures is underscored by these different data to restrain cell death and oxidative stress induced by oxysterols.

5. Conclusions

This study demonstrates that 7β-OHC triggers oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunction, and cell death on C2C12 myoblast cells. Noteworthy, in the presence of PLSO as well as of α-tocopherol, these different cytotoxic effects were strongly attenuated and PLSO was as efficient as α-tocopherol used at a high concentration. Noteworthy, as MitoQ, which selectively accumulates in the mitochondria, did not attenuate 7β-OHC-induced cell death, our data suggest that attenuation of mitochondrial dysfunction is not sufficient to counteract 7β-OHC-induced cell death, and that PLSO, which strongly reduces mitochondrial dysfunction, also act on other cellular targets. On the basis of the biochemical composition of PLSO (fatty acids, tocopherols, and polyphenols), of its antioxidant properties, and of its cytoprotective effects, it is suggested that a diet associated with this oil could contribute to the prevention of skeletal muscle dysfunctions. In a therapeutic context, the bioavailability and the efficiency of the biological compounds present in PLSO could be improved using a number of approaches. These later could include micro- and nano-encapsulation strategies, chimeric tractable molecules, and targeted-specific cell

compartments and organelles (mitochondria, peroxisomes), such as Targeted Organelle Nano-therapy (TORN-therapy) [145,146] as well as functional foods.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/antiox10111772/s1. Supplementary Figure S1: Different stages of preparation of the Pistachia lentiscus L. seed oil (PLSO) with seeds collected in Tunisia (area of Tabarka); Supplementary Figure S2: polyphenols chromatogram obtained by HPLC (protocatechuic acid and coumarin were identified based on their UV spectra (280 nm)); Supplementary Figure S3: Fatty acid chromatogram obtained by GC; Supplementary Figure S4: Phytosterol chromatogram obtained by GC-FID; Supplementary Figure S5: Plasma levels of cholesterol, 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC) and 7-ketocholesterol in sarcopenic patients and non-sarcopenic patients; Supplementary Figure S6: Evaluation with the MTT assay of the effects of Pistacia lentiscus L. seed oil (PLSO) and 7β-hydroxycholesterol on C2C12 cell viability; Supplementary Figure S7A: Effect of 7β-hydroxycholesterol and Pistacia lentiscus L. seed oil (PLSO) on C2C12 cell morphology; Supplementary Figure S7B: Absence of effect of vehicles (EtOH 0.5%; DMSO 1.125%; EtOH 0.1%; EtOH 0.1%+ DMSO 0.125%) on C2C12 cell morphology; Supplementary Figure S8: Evaluation with the fluorescein diacetate (FDA) assay of the effect of MitoQ on 7β-hydroxycholesterol-induced cell death; Supplementary Figure S9: Biochemical pathway of the peroxisomal β-oxidation of very-long-chain fatty acids; Supplementary Figure S10: Comparison by transmission electron microscopy of cell morphology in control C2C12 myoblasts and vehicles-treated C2C12 myoblasts. Supplementary Table S1: List of available polyphenols spectra present in the database of LARA-Spiral company (Couternon, France).

Author Contributions: Conceptualization, A.Z. and G.L.; study management: G.L. and A.Z.; investigation/experimental work: I.G., A.Z., T.N., A.V. and S.H. (Souha Hammouda), S.B., M.L., F.F., D.L. amd A.Y. (molecular and cell biology); F.M., L.A., I.G. and G.L. (transmission electron microscopy); M.S. (organic chemistry); funding: G.L., M.H., S.B., S.P.B., N.L. and S.H. (Sonia Hammami); writing—original draft: I.G., A.Z. and G.L.; discussion: I.G., A.Z. and G.L.; proofreading: all authors (mainly I.G. and G.L.). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by Université de Bourgogne (Dijon, France) and Université Tunis El Manar (Tunis, Tunisia); University of Trento (Italy); Telethon and Provincia autonoma di Trento (Italy) (grant No. TCP13007 to SB); AFM-Téléthon (France) (grant No. #23758 to SB); Muscular Dystrophy Association (USA) (grant No. 874294 to SB).

Institutional Review Board Statement: The clinical study (quantification of oxysterols in the plasma of non-sarcopenic subjects and sarcopenic patients) was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethic Committee of the "University of Monastir, Faculty of Medicine, Monastir, Tunisia"; protocol code: IORG 0009738 n°79/OMB 0990-0279 (The pdf file of the original document has been provided to the Journal).

Informed Consent Statement: All subjects included in the clinical study gived their written informed consent (The anonymized pdf files have been provided to the Journal).

Data Availability Statement: Data from the in vitro study are available in the laboratory notebooks and on the computers from the Université de Bourgogne (EA7270) (Dijon, France) and from the University of Monastir (Monastir and Sousse, Tunisia). Data related to biochemical analysis and electron microscopy are stored on the computers from the Université de Bourgogne, INRAE (Dijon, France) and Lara-Spiral (Couternon, France).

Acknowledgments: The authors would like to thank the association "Mediterranean Nutrition and Health (NMS: Nutrition Méditerranéenne & Santé)". Emmanuelle Prost-Camus, Philippe Durand, and Michel Prost (PLSO polyphenols analysis and KRL assay; Laboratoire LARA-Spiral, Couternon, France), Lucy Martine and Niyazi Acar (PLSO fatty acids and phytosterols analysis; Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France), Imed Cheraief (PLSO fatty acids analysis; University of Monastir, Faculty of Medicine, LR12ES05, Lab-NAFS, Monastir, Tunisia), Valerio Leoni and Claudio Caccia (analysis of very-long-chain fatty acids; laboratory of Clinical Chemistry, Hospitals of Desio, ASST-Brianza and the Department of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy) and Jean-Paul Pais de Barros (α-tocopherol analysis in PLSO; plasma oxysterols analysis; Lipidomic Facility, Université de Bourgogne Franche-Comté (UBFC), 21078 Dijon, France) are warmly thanked for their technical support. Imen Ghzaiel received financial support from NMS and was awarded the NMS prize (Romanée-Conti) in 2021. The present work was presented as part of the 'Forum des Jeunes Chercheurs UBFC' (web meeting, 2021). Part of the cytotoxic effects of 7β-OHC was presented in an oral communication during the 10th ENOR symposium (web meeting, 16–17 September 2021) (https://www.oxysterols.net/). Imen Ghzaiel also received financial support from ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine; Dijon, France).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Knapowski, J.; Wieczorowska-Tobis, K.; Witowski, J. Pathophysiology of ageing. *J. Physiol. Pharmacol.* **2002**, *53*, 135–146. [PubMed]
2. Rosenberg, I.H.; Roubenoff, R. Stalking sarcopenia. *Ann. Intern. Med.* **1995**, *123*, 727–728. [CrossRef] [PubMed]
3. Mankhong, S.; Kim, S.; Moon, S.; Kwak, H.B.; Park, D.H.; Kang, J.H. Experimental Models of Sarcopenia: Bridging molecular mechanism and therapeutic strategy. *Cells* **2020**, *9*, 1385. [CrossRef] [PubMed]
4. Troen, B.R. The biology of aging. *Mt. Sinai J. Med.* **2003**, *70*, 3–22. [PubMed]
5. Melton, L.J.; Khosla, S.; Crowson, C.S.; O'Connor, M.K.; O'Fallon, W.M.; Riggs, B.L. Epidemiology of sarcopenia. *J. Am. Geriatr. Soc.* **2000**, *48*, 625–630. [CrossRef]
6. Pereira, A.F.; Silva, A.J.; Matos Costa, A.; Monteiro, A.M.; Bastos, E.M.; Cardoso Marques, M. Muscle tissue changes with aging. *Acta Med. Port.* **2013**, *26*, 51–55.
7. Marquez, D.X.; Hoyem, R.; Fogg, L.; Bustamante, E.E.; Staffileno, B.; Wilbur, J. Physical activity of urban community-dwelling older latino adults. *J. Phys. Act. Health* **2011**, *8*, S161–S170. [CrossRef]
8. Kirchengast, S.; Huber, J. Gender and age differences in lean soft tissue mass and sarcopenia among healthy elderly. *Anthropol. Anz.* **2009**, *67*, 139–151. [CrossRef]
9. Goodpaster, B.H.; Park, S.W.; Harris, T.B.; Kritchevsky, S.B.; Nevitt, M.; Schwartz, A.V.; Simonsick, E.M.; Tylavsky, F.A.; Visser, M.; Newman, A.B. The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: The health, aging and body composition study. *J. Gerontol. Med. Sci.* **2006**, *61*, 1059–1064. [CrossRef]
10. Rathnayake, N.; Alwis, G.; Lenora, J.; Lekamwasam, S. Concordance between appendicular skeletal muscle mass measured with DXA and estimated with mathematical models in middle-aged women. *J. Physiol. Anthropol.* **2018**, *37*, 19. [CrossRef]
11. Deshmukh, A.S. Proteomics of skeletal muscle: Focus on insulin resistance and exercise biology. *Proteomes* **2016**, *4*, 6. [CrossRef]
12. Gransee, H.M.; Mantilla, C.B.; Sieck, G.C. Respiratory muscle plasticity. *Compr. Physiol.* **2012**, *2*, 1441–1462.
13. Periasamy, M.; Herrera, J.L.; Reis, F.C.G. Skeletal muscle thermogenesis and its role in whole body energy metabolism. *Diabetes Metab. J.* **2017**, *41*, 327–336. [CrossRef]
14. Thomson, D.M.; Winder, W.W. AMPK control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiol.* **2009**, *196*, 147–154. [CrossRef]
15. Muscat, G.E.; Wagner, B.L.; Hou, J.; Tangirala, R.K.; Bischoff, E.D.; Rohde, P.; Petrowski, M.; Li, J.; Shao, G.; Macondray, G.; et al. Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* **2002**, *25*, 40722–40728. [CrossRef]
16. Evans, P.L.; McMillin, S.L.; Weyrauch, L.A.; Witczak, C.A. Regulation of skeletal muscle glucose transport and glucose metabolism by exercise training. *Nutrients* **2019**, *11*, 2432. [CrossRef]
17. Kelley, D.E.; Mandarino, L.J. Hyperglycemia normalizes insulin-stimulated skeletal-muscle glucose-oxidation and storage in noninsulin-dependent diabetes-mellitus. *J. Clin. Investig.* **1990**, *86*, 1999–2007. [CrossRef]
18. Li, Z.; Zhang, Z.; Ren, Y.; Wang, Y.; Fang, J.; Yue, H.; Ma, S.; Guan, F. Aging and age-related diseases: From mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology* **2021**, *22*, 165–187. [CrossRef]
19. Crowe, A.V.; McArdle, A.; McArdle, F.; Pattwell, D.M.; Bell, G.M.; Kemp, G.J.; Bone, J.M.; Griffiths, R.D.; Jackson, M.J. Markers of oxidative stress in the skeletal muscle of patients on haemodialysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2007**, *22*, 1177–1183. [CrossRef]
20. Gustafsson, T.; Ulfhake, B. Sarcopenia: What is the origin of this aging-induced disorder? *Front. Genet.* **2021**, *12*, 686526. [CrossRef]

21. Gomes, M.J.; Martinez, P.F.; Pagan, L.U.; Damatto, R.L.; Cezar, M.D.M.; Lima, A.R.R.; Okoshi, K.; Okoshi, M.P. Skeletal muscle aging: Influence of oxidative stress and physical exercise. *Oncotarget* **2017**, *8*, 20428–20440. [CrossRef]
22. Fulle, S.; Protasi, F.; Di Tano, G.; Pietrangelo, T.; Beltramin, A.; Boncompagni, S.; Vecchiet, L.; Fano, G. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. *Exp. Gerontol.* **2004**, *39*, 17–24. [CrossRef]
23. Seo, E.; Kang, H.; Choi, H.; Choi, W.; Jun, H.S. Reactive oxygen species-induced changes in glucose and lipid metabolism contribute to the accumulation of cholesterol in the liver during aging. *Aging Cell* **2019**, *18*, e12895. [CrossRef]
24. Simons, K.; Ikonen, E. How cells handle cholesterol. *Science* **2000**, *290*, 1721–1726. [CrossRef]
25. Iuliano, L. Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 457–468. [CrossRef]
26. Zerbinati, C.; Iuliano, L. Cholesterol and related sterols autoxidation. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *111*, 151–155. [CrossRef]
27. Anderson, A.; Campo, A.; Fulton, E.; Corwin, A.; Jerome III, W.G.; O'Connor, M.S. 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox Biol.* **2020**, *29*, 101380. [CrossRef]
28. Nury, T.; Yammine, A.; Ghzaiel, I.; Sassi, K.; Zarrouk, A.; Brahmi, F.; Samadi, M.; Rup-Jacques, S.; Vervandier-Fasseur, D.; de Barros, J.P.; et al. Attenuation of 7-ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced oxiapoptophagy by nutrients, synthetic molecules and oils: Potential for the prevention of age-related diseases. *Ageing Res. Rev.* **2021**, *68*, 101324. [CrossRef]
29. Mitic, T.; Andrew, R.; Walker, B.R.; Hadoke, P.W.F. 11b-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the regulation of 7-oxysterol levels in the arterial wall through the inter-conversion of 7-ketocholesterol and 7b-hydroxycholesterol. *Biochimie* **2013**, *95*, 548–555. [CrossRef]
30. Vejux, A.; Abed-Vieillard, D.; Hajji, K.; Zarrouk, A.; Mackrill, J.J.; Ghosh, S.; Nury, T.; Yammine, A.; Zaibi, M.; Mihoubi, W.; et al. 7-Ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *173*, 113648. [CrossRef]
31. Zarrouk, A.; Vejux, A.; Mackrill, J.; O'Callaghan, Y.; Hammami, M.; O'Brien, N.; Lizard, G. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res. Rev.* **2014**, *18*, 148–162. [CrossRef] [PubMed]
32. Mutemberezi, V.; Guillemot-Legris, O.; Muccioli, G.G. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Prog. Lipid Res.* **2016**, *64*, 152–169. [CrossRef] [PubMed]
33. Samadi, A.; Sabuncuoglu, S.; Samadi, M.; Isikhan, S.Y.; Chirumbolo, S.; Peana, M.; Lay, I.; Yalcinkaya, A.; Bjorklund, G. A Comprehensive Review on Oxysterols and Related Diseases. *Curr. Med. Chem.* **2021**, *28*, 110–136. [CrossRef] [PubMed]
34. Nury, T.; Zarrouk, A.; Vejux, A.; Doria, M.; Riedinger, J.M.; Delage-Mourroux, R.; Lizard, G. Induction of oxiapoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: Impairment by α-tocopherol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 714–719. [CrossRef] [PubMed]
35. Nury, T.; Zarrouk, A.; Mackrill, J.J.; Samadi, M.; Durand, P.; Riedinger, J.M.; Doria, M.; Vejux, A.; Limagne, E.; Delmas, D.; et al. Induction of oxiapoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7β-hydroxycholesterol-, or 24 (S)-hydroxycholesterol: Protective effects of α-tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22: 6 n-3). *Steroids* **2015**, *99*, 194–203. [CrossRef] [PubMed]
36. Klionsky, D.J.; Arcbdelmohsen, K.; Arobe, A.; Arbediasn, E.M.J.; Arbelimotovich, H.; Arioszena, A.R.A.; Armstrongdachi, J.L.H.; Arnouldams, T.C.M.; Adams, P.D.; Adeli, K.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **2016**, *12*, 1–222. [CrossRef] [PubMed]
37. Accad, M.; Farese, R.V. Cholesterol homeostasis: A role for oxysterols. *Curr. Biol.* **1998**, *8*, R601–R604. [CrossRef]
38. Samadi, A.; Gurlek, A.; Sendur, S.N.; Karahan, S.; Akbiyik, F.; Lay, I. Oxysterol species: Reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus. *J. Endocrinol. Investig.* **2019**, *42*, 7–17. [CrossRef]
39. Liu, Y.; Hulten, L.M.; Wiklund, O. Macrophages isolated from human atherosclerotic plaques produce IL-8, and oxysterols may have a regulatory function for IL-8 production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **1997**, *17*, 317–323. [CrossRef]
40. Bourdon, E.; Loreau, N.; Davignon, J.; Bernier, L.; Blache, D. Involvement of oxysterols and lysophosphatidylcholine in the oxidized LDL-induced impairment of serum albumin synthesis by HEPG2 cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 2643–2650. [CrossRef]
41. Hanley, K.; Ng, D.C.; He, S.S.; Lau, P.; Min, K.; Elias, P.M.; Bikle, D.D.; Mangelsdorf, D.J.; Williams, M.L.; Feingold, K.R. Oxysterols induce differentiation in human keratinocytes and increase Ap-1-dependent involucrin transcription. *J. Investig. Dermatol.* **2000**, *114*, 545–553. [CrossRef]
42. Lemaire-Ewing, S.; Prunet, C.; Montange, T.; Vejux, A.; Berthier, A.; Besseède, G.; Corcos, L.; Gambert, P.; Neel, D.; Lizalrd, G. Comparison of the cytotoxic, pro-oxidant and pro-inflammatory characteristics of different oxysterols. *Cell Biol. Toxicol.* **2005**, *21*, 97–114. [CrossRef]
43. Vergallo, C. Nutraceutical Vegetable Oil Nanoformulations for Prevention and Management of Diseases. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 1232. [CrossRef]
44. Kang, P.; Wang, Y.; Li, X.G.; Wan, Z.C.; Wang, X.Y.; Zhu, H.L.; Wang, C.W.; Zhao, S.J.; Chen, H.F.; Liu, Y.L. Effect of flaxseed oil on muscle protein loss and carbohydrate oxidation impairment in a pig model after lipopolysaccharide challenge. *Br. J. Nutr.* **2020**, *123*, 859–869. [CrossRef]
45. Daoued, K.B.; Chouaibi, M.; Gaout, N.; Haj, O.B.; Hamdi, S. Chemical composition and antioxidant activities of cold pressed lentisc (*Pistacialentiscus* L.) seed oil. *Riv. Grasse* **2016**, *93*, 31–38.
46. Le Floc'h, E. *Contribution à une étude Ethnobotanique de la Flore Tunisienne*; Imprimerie Officielle de la République Tunisienne: Radès, Tunisia, 1983.

47. Ben Khedir, S.; Bardaa, S.; Chabchoub, N.; Moalla, D.; Sahnoun, Z.; Rebai, T. The healing effect of Pistacialentiscus fruit oil on laser burn. *Pharm. Biol.* **2017**, *55*, 1407–1414. [CrossRef]
48. Saidi, S.A.; Ncir, M.; Chaaben, R.; Jamoussi, K.; van Pelt, J.; Elfeki, A. Liver injury following small intestinal ischemia reperfusion in rats is attenuated by Pistacia lentiscus oil: Antioxidant and anti-inflammatory effects. *Arch. Physiol. Biochem.* **2017**, *123*, 199–205. [CrossRef]
49. Milia, E.; Bullitta, S.M.; Mastandrea, G.; Szotáková, B.; Schoubben, A.; Langhansová, L.; Quartu, M.; Bortonet, A.; Eick, S. Leaves and Fruits Preparations of *Pistacialentiscus* L.: A Review on the Ethnopharmacological Uses and Implications in Inflammation and Infection. *Antibiotics* **2021**, *10*, 425.
50. Mezni, F.; Shili, S.; Ben Ali, N.; Khouja, M.L.; Khaldi, A.; Maaroufi, A. Evaluation of Pistacialentiscus seed oil and phenolic compounds for in vitro antiproliferative effects against BHK21 cells. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 747–751. [CrossRef]
51. Ammari, M.; Othman, H.; Hajri, A.; Sakly, M.; Abdelmelek, H. Pistacia lentiscus oil attenuates memory dysfunction and decreases levels of biomarkers of oxidative stress induced by lipopolysaccharide in rats. *Brain Res. Bull.* **2018**, *140*, 140–147. [CrossRef]
52. Trabelsi, H.; Sakouhi, F.; Renaud, J.; Villeneuve, P.; Khouja, M.L.; Mayer, P.; Boukhchina, S. Fatty acids, 4-desmethylsterols, and triterpene alcohols from Tunisian lentisc (Pistacialentiscus) fruits. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2012**, *114*, 968–973. [CrossRef]
53. Gimeno, E.; Castellote, A.I.; Lamuela-Raventós, R.M.; De la Torre, M.C.; López-Sabater, M.C. The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α-tocopherol, and β-carotene) in virgin olive oil. *Food Chem.* **2002**, *78*, 207–211. [CrossRef]
54. Matos, L.C.; Pereira, J.A.; Andrade, P.B.; Seabra, R.M.; Oliveira, M.B.P. Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chem.* **2007**, *102*, 976–983. [CrossRef]
55. Debbabi, M.; Zarrouk, A.; Bezine, M.; Meddeb, W.; Nury, T.; Badreddine, A.; Sghaier, R.; Bretillon, L.; Guyot, S.; Samadi, M.; et al. Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiapoptophagy in microglial BV-2 cells. *Chem. Phys. Lipids* **2017**, *207*, 151–170. [CrossRef]
56. Yammine, A.; Nury, T.; Vejux, A.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D.; Samadi, M.; Gretige-Gerges, H.; Auezova, L.; Lizard, G. Prevention of 7-Ketocholesterol-Induced Overproduction of Reactive Oxygen Species, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death with Major Nutrients (Polyphenols, ω3 and ω9 Unsaturated Fatty Acids) of the Mediterranean Diet on N2a Neuronal Cells. *Molecules* **2020**, *25*, 2296. [CrossRef]
57. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
58. Kim, D.O.; Chun, O.K.; Kim, Y.J.; Moon, H.Y.; Lee, C.Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6509–6515. [CrossRef]
59. Dhibi, M.; Issaoui, M.; Brahmi, F.; Mechri, B.; Mnari, A.; Cheraif, I.; etSkhiri, F.; Galzzah, N.; Hammami, M. Nutritional quality of fresh and heated Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oil: Trans-fatty acid isomers profiles and antioxidant properties. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *51*, 1442–1452. [CrossRef]
60. Moilanen, T.; Nikkari, T. The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clin. Chim. Acta* **1981**, *114*, 111–116. [CrossRef]
61. Morrison, W.R.; Smith, L.M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *J. Lipid Res.* **1964**, *5*, 600–608. [CrossRef]
62. Zarrouk, A.; Martine, L.; Grégoire, S.; Nury, T.; Meddeb, W.; Camus, E.; Badreddine, A.; Durand, P.; Namsi, A.; Yammine, A.; et al. Profile of fatty acids, tocopherols, phytosterols and polyphenols in mediterranean oils (argan oils, olive oils, milk thistle seed oils and nigella seed oil) and evaluation of their antioxidant and cytoprotective activities. *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 1791–1805. [CrossRef] [PubMed]
63. Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin. *J. Sci. Technol.* **2004**, *26*, 211–219.
64. Bassene, E. *Initiation à la Recherche sur les Substances Naturelles: Extraction-Analyse-Essais Biologiques*; Presses Universitaires de Dakar: Dakar, Sénégal, 2012.
65. Dinis, T.C.; Madeira, V.M.; Almeida, L.M. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *315*, 161–169. [CrossRef] [PubMed]
66. Rossi, R.; Pastorelli, G.; Corino, C. Application of KRL test to assess total antioxidant activity in pigs: Sensitivity to dietary antioxidants. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *94*, 372–377. [CrossRef]
67. Ragot, K.; Mackrill, J.J.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Aires, V.; Jacquin, A.; Athias, A.; de Barros, J.-P.P.; Vejux, A.; Riedinger, J.-M.; et al. Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochem. Pharm.* **2013**, *86*, 67–79. [CrossRef]
68. Jones, K.H.; Senft, J.A. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.* **1985**, *33*, 77–79. [CrossRef]
69. Patková, J.; Anděl, M.; Trnka, J. Palmitate-induced cell death and mitochondrial respiratory dysfunction in myoblasts are not prevented by mitochondria-targeted antioxidants. *Cell Physiol. Biochem.* **2014**, *33*, 1439–1451. [CrossRef]

70. Cui, L.; Zhou, Q.; Zheng, X.; Sun, B.; Zhao, S. Mitoquinone attenuates vascular calcification by suppressing oxidative stress and reducing apoptosis of vascular smooth muscle cells via the Keap1/Nrf2 pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, *161*, 23–31. [CrossRef]
71. Yeh, C.J.; His, B.L.; Faulk, W.P. Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *J. Immunol Methods* **1981**, *43*, 269–275. [CrossRef]
72. Rothe, G.; Valet, G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2′, 7′-dichlorofluorescin. *J. Leukoc. Biol.* **1990**, *47*, 440–448. [CrossRef]
73. Flohe, L.; Günzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzym.* **1984**, *105*, 114–120.
74. Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* **1971**, *44*, 276–287. [CrossRef]
75. Yoshioka, T.; Kawada, K.; Shimada, T.; Mori, M. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1979**, *135*, 372–376. [CrossRef]
76. Esterbauer, H.; Striegl, G.; Puhl, H.; Rotheneder, M. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* **1989**, *6*, 67–75. [CrossRef]
77. Oliver, C.N.; Ahn, B.W.; Moerman, E.J.; Goldstein, S.; Stadtman, E.R. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 5488–5491. [CrossRef]
78. Zarrouk, A.; Vejux, A.; Nury, T.; El Hajj, H.I.; Haddad, M.; Cherkaoui-Malki, M.; Rietdinger, J.-M.; Hammami, M.; Lizard, G. Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22: 0, C24: 0, or C26: 0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). *Oxidative Med. Cell Longev.* **2012**, *2012*, 623257. [CrossRef]
79. Gray, E.; Rice, C.; Hares, K.; Redondo, J.; Kemp, K.; Williams, M.; etBrown, A.; Scolding, N.; Wilkins, A. Reductions in neuronal peroxisomes in multiple sclerosis grey matter. *Mult. Scler. J.* **2014**, *20*, 651–659. [CrossRef]
80. Nury, T.; Sghaier, R.; Zarrouk, A.; Ménétrier, F.; Uzun, T.; Leoni, V.; Caccia, C.; Meddeb, W.; Namsi, A.; Sassi, K.; et al. Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: Attenuation by α-tocopherol. *Biochimie* **2018**, *153*, 181–202. [CrossRef]
81. Savary, S.; Trompier, D.; Andréoletti, P.; Le Borgne, F.; Demarquoy, J.; Lizard, G. Fatty acids-induced lipotoxicity and inflammation. *Curr. Drug Metab.* **2012**, *13*, 1358–1370. [CrossRef]
82. Blondelle, J.; de Barros, J.P.P.; Pilot-Storck, F.; Tiret, L. Targeted lipidomic analysis of myoblasts by GC-MS and LC-MS/MS. In *Skeletal Muscle Development*; Humana Press: New York, NY, USA, 2017; pp. 39–60.
83. Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G.S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509. [CrossRef]
84. Lizard, G.; Fournel, S.; Genestier, L.; Dhedin, N.; Chaput, C.; Flacher, M.; Mutin, M.; Panayet, G.; Revillalrd, J.-P. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytom. J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **1995**, *21*, 275–283. [CrossRef] [PubMed]
85. Baarine, M.; Ragot, K.; Genin, E.C.; El Hajj, H.; Trompier, D.; Andreoletti, P.; Ghandour, S.; Menetrier, F.; Cherkaoui-Malki, M.; Savary, S.; et al. Peroxisomal and mitochondrial status of two murine oligodendrocytic cell lines (158N, 158JP): Potential models for the study of peroxisomal disorders associated with dysmyelination processes. *J. Neurochem.* **2009**, *111*, 119–131. [CrossRef] [PubMed]
86. Badreddine, A.; Zarrouk, A.; Karym, E.M.; Debbabi, M.; Nury, T.; Meddeb, W.; Sghaier, R.; Bezine, M.; Vejux, A.; Martine, L.; et al. Argan oil-mediated attenuation of organelle dysfunction, oxidative stress and cell death induced by 7-ketocholesterol in murine oligodendrocytes 158N. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2220. [CrossRef] [PubMed]
87. Sottero, B.; Rossin, D.; Staurenghi, E.; Gamba, P.; Poli, G.; Testa, G. Omics analysis of oxysterols to better understand their pathophysiological role. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *144*, 55–71. [CrossRef]
88. Fujita, T.; Adachi, J.; Ueno, Y.; Peters, T.J.; Preedy, V.R. Chronic ethanol feeding increases 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols in rat skeletal muscle. *Metab. -Clin. Exp.* **2002**, *51*, 737–742. [CrossRef]
89. Jamadagni, P.; Patten, S.A. 25-hydroxycholesterol impairs neuronal and muscular development in zebrafish. *Neurotoxicology* **2019**, *75*, 14–23. [CrossRef]
90. Nishi, H.; Higashihara, T.; Inagi, R. Lipotoxicity in kidney, heart, and skeletal muscle dysfunction. *Nutrients* **2019**, *11*, 1664. [CrossRef]
91. Kemp, S.; Theodoulou, F.L.; Wanders, R.J. Mammalian peroxisomal ABC transporters: From endogenous substrates to pathology and clinical significance. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, *164*, 1753–1766. [CrossRef]
92. Tawbeh, A.; Gondcaille, C.; Trompier, D.; Savary, S. Peroxisomal ABC Transporters: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 6093. [CrossRef]
93. Trompier, D.; Vejux, A.; Zarrouk, A.; Gondcaille, C.; Geillon, F.; Nury, T.; etSavary, S.; Lizalrd, G. Brain peroxisomes. *Biochimie* **2014**, *98*, 102–110. [CrossRef]
94. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* **2006**, *45*, 237–249. [CrossRef]
95. Kihara, A. Very long-chain fatty acids: Elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.* **2021**, *152*, 387–395. [CrossRef]
96. Musaro, A.; Fulle, S.; Fano, G. Oxidative stress and muscle homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **2010**, *13*, 236–242. [CrossRef]

97. Powers, S.K.; Talbert, E.E.; Adhihetty, P.J. Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 2129–2138. [CrossRef]
98. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84. [CrossRef]
99. Pistollato, F.; Giampieri, F.; Battino, M. The use of plant-derived bioactive compounds to target cancer stem cells and modulate tumor microenvironment. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *75*, 58–70. [CrossRef]
100. Gaussen, H.; Leroy, J.F.; Ozenda, P. *Précis de Botanique. 2- Végétaux Supérieurs*, 2nd ed.; Editions Masson: Paris, France, 1982; pp. 307–308.
101. Fazeli-nasab, B.; Fooladvand, Z. Classification and Evaluation of medicinal plant and medicinal properties of mastic. *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* **2014**, *2*, 2155–2161.
102. Brahmi, F.; Haddad, S.; Bouamara, K.; Yalaoui-Guellal, D.; Prost-Camus, E.; De Barros, J.P.P.; Prost, M.; Atanasov, A.G.; Madani, K.; Boulekbache-Makhlouf, L.; et al. Comparison of chemical composition and biological activities of Algerian seed oils of *Pistacialentiscus* L., *Opuntia ficusindica* (L.) mill. and Argania spinosa L. Skeels. *Ind. Crop. Products* **2020**, *151*, 112456. [CrossRef]
103. Bouyahya, A.; Dakka, N.; Talbaoui, A.; El Moussaoui, N.; Abrini, J.; Bakri, Y. Phenolic contents and antiradical capacity of vegetable oil from *Pistacialentiscus* (L). *J. Mater. Environ. Sci.* **2018**, *9*, 1518–1524.
104. Maria, A.G.; Graziano, R.; Nicolantonio, D.O. Carotenoids: Potential allies of cardiovascular health? *Food Nutr. Res.* **2015**, *59*, 26762. [CrossRef]
105. Smith, T.A. Carotenoids and cancer: Prevention and potential therapy. *Br. J. Biomed. Sci.* **1998**, *55*, 268.
106. Kitakaze, T.; Harada, N.; Imagita, H.; Yamaji, R. β-Carotene increases muscle mass and hypertrophy in the soleus muscle in mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2015**, *61*, 481–487. [CrossRef]
107. Dhifi, W.; Jelali, N.; Chaabani, E.; Beji, M.; Fatnassi, S.; Omri, S.; Mnif, W. Chemical composition of Lentisk (*Pistacialentiscus* L.) seed oil. *Afr. J. Agric. Res.* **2013**, *8*, 1395–1400.
108. Aguilera, C.M.; Ramírez-Tortosa, M.C.; Mesa, M.D.; Gil, A. Do MUFA and PUFA have beneficial effects on the development of cardiovascular disease? *Recent Res. Dev. Lipids* **2000**, *4*, 369–390.
109. Debbabi, M.; Nury, T.; Zarrouk, A.; Mekahli, N.; Bezine, M.; Sghaier, R.; Grégoire, S.; Martine, L.; Durand, P.; Prost, E.; et al. Protective effects of α-tocopherol, γ-tocopherol and oleic acid, three compounds of olive oils, and no effect of trolox, on 7-ketocholesterol-induced mitochondrial and peroxisomal dysfunction in microglial BV-2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1973. [CrossRef]
110. Jandacek, R.J. Linoleic Acid: A Nutritional Quandary. *Healthcare* **2017**, *5*, 25. [CrossRef]
111. Lee, J.H.; Tachibana, H.; Morinaga, Y.; Fujimura, Y.; Yamada, K. Modulation of proliferation and differentiation of C2C12 skeletal muscle cells by fatty acids. *Life Sci.* **2009**, *84*, 415–420. [CrossRef] [PubMed]
112. Charef, M.; Yousfi, M.; Saidi, M.; Stocker, P. Determination of the fatty acid composition of acorn (Quercus), Pistacialentiscus seeds growing in Algeria. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 921–924. [CrossRef]
113. French, M.A.; Sundram, K.; Clandinin, M.T. Cholesterolaemic effect of palmitic acid in relation to other dietary fatty acids. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2002**, *11*, S401–S407. [CrossRef] [PubMed]
114. Hwang, S.-L.; Kim, H.-N.; Jung, H.-H.; Kim, J.-E.; Choi, D.-K.; Hur, J.-M.; Lee, J.-Y.; Song, H.; Song, K.-S.; Huh, T.-L. Beneficial effects of β-sitosterol on glucose and lipid metabolism in L6 myotube cells are mediated by AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 1253–1258. [CrossRef] [PubMed]
115. Liao, P.-C.; Lai, M.-H.; Hsu, K.-P.; Kuo, Y.-H.; Chen, J.; Tsai, M.-C.; Li, C.-X.; Yin, X.-J.; Jetyashoke, N.; Chao, L.K.-P. Identification of β-sitosterol as in vitro anti-inflammatory constituent in Moringa oleifera. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 10748–10759. [CrossRef]
116. Gupta, R.; Sharma, A.K.; Dobhal, M.P.; Sharma, M.C.; Gupta, R.S. Antidiabetic and antioxidant potential of β-sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *J. Diabetes* **2011**, *3*, 29–37. [CrossRef]
117. Wong, H.S.; Leong, P.K.; Chen, J.; Leung, H.Y.; Chan, W.M.; Ko, K.M. β-Sitosterol increases mitochondrial electron transport by fluidizing mitochondrial membranes and enhances mitochondrial responsiveness to increasing energy demand by the induction of uncoupling in C2C12 myotubes. *J. Funct. Foods* **2016**, *23*, 253–260. [CrossRef]
118. Chen, Y. Endogenous Phenolics from Expeller-Pressed Canola Oil Refining Byproducts: Evaluation of Antioxidant Activities in Cell Culture and Deep-Fat Frying Models. Master's Thesis, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada, 2014.
119. Zingg, J.M.; Meydani, M. Interaction between vitamin E and polyunsaturated fatty acids. In *Vitamin E in Human Health*; Humana Press: Cham, Switzerland, 2019; pp. 141–159.
120. Rimbach, G.; Minihane, A.M.; Majewicz, J.; Fischer, A.; Pallauf, J.; Virgli, F.; Weinberg, P.D. Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc. Nutr. Soc.* **2002**, *61*, 415–425. [CrossRef]
121. Testa, G.; Rossin, D.; Poli, G.; Biasi, F.; Leonarduzzi, G. Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases. *Biochimie* **2018**, *153*, 220–231. [CrossRef]
122. Pedruzzi, E.; Guichard, C.; Ollivier, V.; Driss, F.; Fay, M.; Prunet, C.; Marie, J.-C.; Pouzet, C.; Samadi, M.; Elbim, C.; et al. NAD (P) H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 10703–10717. [CrossRef]
123. Szentesi, P.; Csernoch, L.; Dux, L.; Keller-Pintér, A. Changes in redox signaling in the skeletal muscle with aging. *Oxidative Med. Cell Longev.* **2019**, *2019*. [CrossRef]

124. Nury, T.; Zarrouk, A.; Yammine, A.; Mackrill, J.J.; Vejux, A.; Lizard, G. Oxiapoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols. *Br. J. Pharmacol.* **2021**, *178*, 3115–3123. [CrossRef]
125. Sghaier, R.; Nury, T.; Leoni, V.; Caccia, C.; De Barros, J.-P.P.; Cherif, A.; Vejux, A.; Moreau, T.; Limem, K.; Samadi, M.; et al. Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiapoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7β-hydroxycholesterol. *J. Steroidbiochemistry Mol.* **2019**, *194*, 105432. [CrossRef]
126. Yammine, A.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Vejux, A.; Latruffe, N.; Vervandier-Fasseur, D.; Samadi, M.; Mackrill, J.J.; Greige-Gerges, H.; Auezova, L.; et al. Prevention by dietary polyphenols (resveratrol, quercetin, apigenin) against 7-ketocholesterol-induced oxiapoptophagy in neuronal N2a cells: Potential interest for the treatment of neurodegenerative and age-related diseases. *Cells* **2020**, *9*, 2346. [CrossRef]
127. Poli, G.; Biasi, F.; Leonarduzzi, G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 125–130. [CrossRef]
128. Kunzelmann, K. Ion channels in regulated cell death. *Cell Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 2387–2403. [CrossRef]
129. Bezine, M.; Namsi, A.; Sghaier, R.; Ben Khalifa, R.B.; Hamdouni, H.; Brahmi, F.; Badreddine, I.; Mihoubi, W.; Nury, T.; Vejux, A.; et al. The effect of oxysterols on nerve impulses. *Biochimie* **2018**, *153*, 46–51. [CrossRef]
130. Zarrouk, A.; Ben Salem, Y.B.; Hafsa, J.; Sghaier, R.; Charfeddine, B.; Limem, K.; etHammami, M.; Maljdoub, H. 7β-hydroxycholesterol-induced cell death, oxidative stress, and fatty acid metabolism dysfunctions attenuated with sea urchin egg oil. *Biochimie* **2018**, *153*, 210–219. [CrossRef]
131. Rufini, A.; Tucci, P.; Celardo, I.; Melino, G. Senescence and aging: The critical roles of p53. *Oncogene* **2013**, *32*, 5129–5143. [CrossRef]
132. Lismont, C.; Nordgren, M.; Van Veldhoven, P.P.; Fransen, M. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 35. [CrossRef]
133. Pascual-Ahuir, A.; Manzanares-Estreder, S.; Proft, M. Pro-and antioxidant functions of the peroxisome-mitochondria connection and its impact on aging and disease. *Oxidative Med. Cell Longev.* **2017**, *2017*, 9860841. [CrossRef]
134. Baarine, M.; Andreoletti, P.; Athias, A.; Nury, T.; Zarrouk, A.; Ragot, K. Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid–treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience* **2012**, *213*, 1–18. [CrossRef] [PubMed]
135. Wanders, R.J. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* **2014**, *98*, 36–44. [CrossRef]
136. Titorenko, V.I.; Terlecky, S.R. Peroxisome metabolism and cellular aging. *Traffic* **2011**, *12*, 252–259. [CrossRef]
137. Unger, R.H.; Orci, L. Lipoapoptosis: Its mechanism and its diseases. *Biochim. Et Biophys. Acta -Mol. Cell Biol. Lipids* **2002**, *1585*, 202–212. [CrossRef]
138. Amery, L.; Fransen, M.; De Nys, K.; Mannaerts, G.P.; Van Veldhoven, P.P. Mitochondrial and peroxisomal targeting of 2-methylacyl-CoA racemase in humans. *J. Lipid Res.* **2000**, *41*, 1752–1759. [CrossRef]
139. Cecatto, C.; Amaral, A.U.; Roginski, A.C.; Castilho, R.F.; Wajner, M. Impairment of mitochondrial bioenergetics and permeability transition induction caused by major long-chain fatty acids accumulating in VLCAD deficiency in skeletal muscle as potential pathomechanisms of myopathy. *Toxicol. Vitr.* **2020**, *62*, 104665. [CrossRef] [PubMed]
140. Ben Khedir, S.; Moalla, D.; Jardak, N.; Mzid, M.; Sahnoun, Z.; Rebai, T. Pistacia lentiscus fruit oil reduces oxidative stress in human skin explants caused by hydrogen peroxide. *Biotech. Histochem.* **2016**, *91*, 480–491. [CrossRef]
141. Kang, J.S.; Han, M.H.; Kim, G.-Y.; Kim, C.M.; Chung, H.Y.; Hwang, H.J.; Kim, B.W.; Choi, Y.H. Schisandrae semen essential oil attenuates oxidative stress-induced cell damage in C2C12 murine skeletal muscle cells through Nrf2-mediated upregulation of HO-1. *Int. J. Mol.* **2015**, *35*, 453–459. [CrossRef]
142. Choi, Y.H. Protective effects of isorhamnetin against hydrogen peroxide-induced apoptosis in c2c12 murine myoblasts. *J. Korean Med. Obes. Res.* **2015**, *15*, 93–103. [CrossRef]
143. Leporini, L.; Giampietro, L.; Amoroso, R.; Ammazzalorso, A.; Fantacuzzi, M.; Menghini, L.; Maccallini, C.; Ferrante, C.; Brunetti, L.; Orlando, G.; et al. In vitro protective effects of resveratrol and stilbene alkanoic derivatives on induced oxidative stress on C2C12 and MCF7 cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* **2017**, *31*, 589–601.
144. Li, J.; Yang, Q.; Han, L.; Pan, C.; Lei, C.; Chen, H.; Lan, X. C2C12 mouse myoblasts damage induced by oxidative stress is alleviated by the antioxidant capacity of the active substance phloretin. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 953. [CrossRef]
145. Badreddine, A.; Zarrouk, A.; Meddeb, W.; Nury, T.; Rezig, L.; Debbabi, M.; Bessam, F.Z.; Brahmi, F.; Vejux, A.; Mejri, M.; et al. Antioxidant and neuroprotective properties of Mediterranean Oils: Argan Oil, Olive Oil, and Milk Thistle Seed Oil. In *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2020; pp. 143–154.
146. Brahmi, F.; Vejux, A.; Sghaier, R.; Zarrouk, A.; Nury, T.; Meddeb, W.; Rezig, L.; Namsi, A.; Sassi, K.; Yammine, A.; et al. Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2019**, *59*, 3179–3198. [CrossRef]

Steroids 183 (2022) 109032

Contents lists available at ScienceDirect

Steroids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/steroids

Protective effects of milk thistle (*Sylibum marianum*) seed oil and α-tocopherol against 7β-hydroxycholesterol-induced peroxisomal alterations in murine C2C12 myoblasts: Nutritional insights associated with the concept of pexotherapy

Imen Ghzaiel [a,b,c], Amira Zarrouk [b,d,*], Soukaina Essadek [a,e], Lucy Martine [f], Souha Hammouda [b], Aline Yammine [a,g], Mohamed Ksila [a,c], Thomas Nury [a], Wiem Meddeb [a], Mounia Tahri Joutey [a,e], Wafa Mihoubi [h], Claudio Caccia [i], Valerio Leoni [i], Mohammad Samadi [j], Niyazi Acar [f], Pierre Andreoletti [a], Sonia Hammami [b], Taoufik Ghrairi [c], Anne Vejux [a], Mohamed Hammami [b], Gérard Lizard [a,*]

[a] Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA7270/Inserm, University Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France
[b] Lab-NAFS 'Nutrition–Functional Food & Vascular Health', Faculty of Medicine, University of Monastir, LR12ES05, 5000 Monastir, Tunisia
[c] Faculty of Sciences of Tunis, University Tunis-El Manar, 2092 Tunis, Tunisia
[d] Faculty of Medicine, University of Sousse, 4000 Sousse, Tunisia
[e] Laboratory of Biochemistry, Neurosciences, Natural Resources and Environment, Faculty of Sciences & Techniques, University Hassan I, BP 577, 26000 Settat, Morocco
[f] Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, 21065 Dijon, France
[g] Bioactive Molecules Research Laboratory, Doctoral School of Sciences and Technologies, Faculty of Sciences, Lebanese University, Fanar, Jdeidet P.O. Box 90656, Lebanon
[h] Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes, Centre de Biotechnologie de Sfax, B.P 1177, Université de Sfax, 3018 Sfax, Tunisia
[i] Laboratory of Clinical Chemistry, Hospitals of Desio, ASST-Brianza and Department of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, 20900 Monza, Italy
[j] LCPMC-A2, ICPM, Department of Chemistry, University Lorraine, Metz Technopôle, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Keywords:
7β-hydroxycholesterol
C2C12 myoblasts
Milk thistle seed oil
Peroxisome
Pexotherapy
Sarcopenia

ABSTRACT

Peroxisomes play an important role in regulating cell metabolism and RedOx homeostasis. Peroxisomal dysfunctions favor oxidative stress and cell death. The ability of 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC; 50 μM, 24 h), known to be increased in patients with age-related diseases such as sarcopenia, to trigger oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunction was studied in murine C2C12 myoblasts. The capacity of milk thistle seed oil (MTSO, 100 μg/mL) as well as α-tocopherol (400 μM; reference cytoprotective agent) to counteract the toxic effects of 7β-OHC, mainly at the peroxisomal level were evaluated. The impacts of 7β-OHC, in the presence or absence of MTSO or α-tocopherol, were studied with complementary methods: measurement of cell density and viability, quantification of reactive oxygen species (ROS) production and transmembrane mitochondrial potential (ΔΨm), evaluation of peroxisomal mass as well as topographic, morphologic and functional peroxisomal changes. Our results indicate that 7β-OHC induces a loss of cell viability and a decrease of cell adhesion associated with ROS overproduction, alterations of mitochondrial ultrastructure, a drop of ΔΨm, and several peroxisomal modifications. In the presence of 7β-OHC, comparatively to untreated cells, important quantitative and qualitative peroxisomal modifications were also identified: a) a reduced number of peroxisomes with abnormal sizes and shapes, mainly localized in cytoplasmic vacuoles, were observed; b) the peroxisomal mass was decreased as indicated by lower protein and mRNA levels of the peroxisomal ABCD3 transporter; c) lower mRNA level of *Pex5* involved in peroxisomal biogenesis as well as higher mRNA levels of *Pex13* and *Pex14,* involved in peroxisomal biogenesis and/or pexophagy, was found; d) lower levels of ACOX1 and MFP2 enzymes, implicated in peroxisomal β-oxidation, were detected; e) higher levels of very-long-chain fatty acids, which are substrates of peroxisomal β-oxidation, were found. These different cytotoxic effects were strongly attenuated by

* Corresponding authors at: Laboratory Bio-PeroxIL, University of Bourgogne, 21000 Dijon, France (Gérard Lizard) and Lab-NAFS, University of Monastir, 5000 Monastir, Tunisia (Amira Zarrouk).
E-mail addresses: zarroukamira@gmail.com (A. Zarrouk), gerard.lizard@u-bourgogne.fr (G. Lizard).

https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109032
Received 25 January 2022; Received in revised form 15 March 2022; Accepted 31 March 2022
Available online 4 April 2022
0039-128X/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

MTSO, in the same range of order as with α-tocopherol. These findings underline the interest of MTSO and α-tocopherol in the prevention of peroxisomal damages (pexotherapy).

1. Introduction

Due to the increase in life expectancy, which is multifactorial with important differences between men and women whatever the country considered [1,2], the incidence of age-related diseases is increasing [3,4]. These include cardiovascular diseases associated with atherosclerosis, type 2 diabetes which is also influenced by nutritional habits, certain neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease, Parkinson's disease), eye diseases (age-related macular degeneration (AMD), cataract), osteoporosis, sarcopenia, and certain cancers such as prostate cancer [5,6]. In addition, ageing depends both on genetic and extrinsic risk factors which can contribute to obesity and favor COVID-19 infections mainly in the elderly, leading to serious complications and sometimes fatal outcomes [7]. Some of these diseases (cardiovascular, neurodegenerative, AMD, cataract, sarcopenia) are associated with an enhancement of the oxidative stress not only at the lesion and/or tissue level, but also systemically [5]. This oxidative stress, which leads to an overproduction of reactive oxygen species (ROS) and sometimes reactive nitrogen species (RNS), favors lipid peroxidation and can induce the carbonylation of proteins and the formation of 8-hydroxyguanine at the DNA level, which predisposes to mutations [8–10]. The auto-oxidation of cholesterol can also lead to the formation of oxidized derivatives, called oxysterols [11], which can be considered as important but underestimated components of the exposome whose composition can influence ageing [12]. Due to the double bond in the 5,6 position on the sterane ring of cholesterol, free radical attack on carbon 7 is most likely and leads to the formation of 7-ketocholesterol (7KC) but also 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC), these two oxysterols being interconvertible via the enzymes 7β-hydroxycholesterol dehydrogenase-1 (7β-HSD1: conversion of 7KC to 7β-OHC) and 7β-hydroxycholesterol dehydrogenase-2 (7β-HSD2: conversion of 7β-OHC to 7KC) [13,14]. In cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, AMD and cataract, severe forms of SARS-CoV2 and sarcopenia, increased levels of 7KC and 7β-OHC have been found at the lesion site and/or plasma level [15–18]. In addition, it has been shown that 7KC levels can permit distinction between normal and pathological ageing [19,20]. Currently, in some age-related diseases (cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, and AMD), the involvement of 7KC and/or 7β-OHC in the pathophysiology is widely suspected since these oxysterols can initiate signal transduction pathways that are relevant to the development of these diseases [14,21]. In sarcopenia, plasma increases in 7β-OHC and 7KC have also been observed, with the increase in 7β-OHC being significant [22]. In sarcopenia, which contributes to the loss of autonomy in the elderly and is associated with a loss of mobility representing a serious handicap [23], a better understanding of the effects of 7β-OHC on myogenesis is an important issue. In this context, the effects of 7β-OHC on skeletal muscle need to be clarified.

For this purpose, murine C2C12 myoblasts were chosen as a model. In these cells, we have previously shown that 7β-OHC induces cell death associated with strong oxidative stress (overproduction of ROS) leading to mitochondrial and peroxisomal dysfunctions [22]. These different cellular alterations induced by 7β-OHC are strongly attenuated by the *Pistacia Lentiscus* L. seed oil (PLSO) often used in Tunisian cooking but also by α-tocopherol known for its cytoprotective effects on different types of cells treated with toxic oxysterols (7KC, 7β-OHC and 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC)) [24–26]. Among the oils from the Mediterranean basin, milk thistle seed oil (MTSO) has been used for a long time in traditional medicine, in particular, to treat liver disorders [27]. The hepatoprotective effect of MTSO could be mainly due to silybin. This molecule which is a flavonolignan, is the main component but also the most active ingredient of milk thistle (Sylibum marianum) fruit extract (silymarin) [28]. MTSO, regardless of where the seeds are collected in Tunisia, is richer in α-tocopherol than Tunisian olive oil and its concentration can be higher than in argan oils from Morocco [29,30]. Based on several tests of anti-oxidant activities (DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (ferric reducing-antioxidant power), KRL (Kit radicaux libres), and CPFI (chelation power on ferrous ions)), MTSO also showed a very good anti-oxidant profile [30,31]. In the context of the prevention of neurodegeneration, we also have already demonstrated on 158 N murine oligodendrocytes treated with 7KC that MTSO prevents cell death by oxiapoptophagy involving OXIdative stress, APOPTOsis and autoPHAGY [32–35]. However, the biological activities of MTSO are still poorly studied on other cells, such as skeletal muscle cells, in the context of the prevention of age-related diseases by considering in particular its impact on organelles.

To this end, in the present study, the cytoprotective effects of MTSO (obtained by Meddeb *et al.* [29] from seeds collected in the area of Sousse and characterized by Zarrouk *et al.* [30]) as well as of α-tocopherol (present at a high concentration in MTSO (441.23 ± 46.59 μM) and used as a reference cytoprotective agent) [24 30] were evaluated on murine C2C12 myoblasts. The ability of MTSO to attenuate cell death and oxidative stress induced by 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC) was evaluated on C2C12 with a special focus to the effects at the peroxisomal level. The peroxisomes are cytoplasmic organelles often circular in appearance from 0.1 to 1 μm in diameter; they are highly dynamic and move along microtubules [36–38]. The peroxisomes are present in all cells, except erythrocytes, and their activity is important in the metabolism of lipids (very long chain and branched fatty acids; cholesterol and bile acids; plasmalogens; eicosanoids) and the catabolism of polyamines [39–41]. The peroxisomes also participate in cellular RedOx balance [42], and several studies suggest that peroxisomal dysfunctions contribute to ageing [43–45] and neurodegeneration [46–48]. In addition, the peroxisomes that results from the import of proteins from the endoplasmic reticulum are closely connected to the mitochondria (involved in normal and pathological ageing) both at the spatial and functional level, and the activities of one strongly influence the activities of the other [49]. It is therefore essential to better understand the peroxisomal modifications induced by 7β-OHC on skeletal muscle by using C2C12 cells as a model in the context of sarcopenia in order to identify natural or synthetic molecules as well as mixtures of molecules (oils) that can prevent peroxisomal dysfunctions. Like mitotherapy, which is a promising approach to prevent neurodegeneration [50], pexotherapy could constitute a new therapeutic axis to address ageing but also to prevent and/or treat age-related diseases. In this context, the identification of natural products associated with the Mediterranean diet, such as MTSO and its major nutrients, offers a lot of opportunities [51,52]. Our data obtained on C2C12 cells show the ability of MTSO and α-tocopherol to strongly attenuate 7β-OHC-induced cytotoxicity (ROS overproduction and cell death) as well as the associated peroxisomal changes.

2. Material and methods

2.1. Cell culture and treatments

Murine C2C12 myoblasts, which have the ability to differentiate in myotubes in particular culture conditions, were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza, Amboise, France) containing 10% (v/v) of heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) and 1% antibiotics (penicillin, streptomycin) (Pan Biotech). The cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator and passaged twice a week. Once 80% confluence was

achieved, the cells were seeded either into Petri dishes of 10 cm in diameter (1.2×10^6 cells per Petri dish), in six-well plates (2×10^5 cells per well), or in 96-well plates (10×10^4 cells per well). 7β-OHC was either from Sigma-Aldrich or provided by Mohammad Samadi (University of Lorraine, Metz, France); the purity was higher than 98%. The stock solution of 7β-OHC (800 μg/mL = 2 mM) was prepared as previously described [24]. The stock solution of MTSO and PLSO was prepared at 80 mg/mL in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich). α-tocopherol (Sigma-Aldrich) solution was prepared to 80 mM in absolute ethanol, as previously described [24]. The stock solution of oleic acid (Sigma-Aldrich) was prepared at 50 mM in ethanol as previously described [53], and oleic acid (100 μM) was used as a positive control to induce lipid droplets formation [53]. After 12 h of cell culture, the growth medium was removed and the cells were incubated with 7β-OHC (50 μM) for 24 h with or without MTSO (100 μg/mL), or α-tocopherol (400 μM) (used as a positive control for cytoprotection). The concentrations of 7β-OHC, MTSO, and α-tocopherol as well as the times of treatment were in accordance with our previous study [22].

2.2. Analysis of cell morphology by phase-contrast microscopy

Cell morphology (adherent and non-adherent cells) and cell density was observed and photographed after 24 h of treatment in the absence or presence of 7β-OHC (50 μM) with or without MTSO (100 μg/mL), or α-tocopherol (400 μM), under an inverted phase-contrast microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss, Jena, Germany) equipped with a digital camera (Axiocam lCm1, Zeiss).

2.3. Measurement of cell viability with the fluorescein diacetate (FDA) assay

Living C2C12 cells were determined using a lipophilic fluorochrome, fluorescein diacetate (FDA; Sigma-Aldrich). After 24 h of treatment with or without 7β-OHC in the presence or absence of MTSO, or α-tocopherol, C2C12 cells were incubated in the dark with FDA (15 μg/mL in PBS, 5 min, 37 °C) and rinsed with PBS. The fluorescence intensity of the fluorescein ($\lambda_{Ex\ max} = 485$ nm, $\lambda_{Em\ max} = 528$ nm) was measured with a Tecan fluorescence microplate reader (Tecan Infinite M200 Pro, Lyon, France). The experiments were realized in triplicate, and the data were expressed as% of control: (Fluorescence (assay) × 100)/Fluorescence (control)).

2.4. Measurement of cell viability with the MTT assay

MTT (3-(4-,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to evaluate the effects of MTSO and α-tocopherol on cell viability. This colorimetric assay is based upon the ability to reduce a tetrazolium salt (MTT) and form a blue formazan product by the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase [54,55]. Cells were seeded in 96-well plates and treated with different concentrations of MTSO and α-tocopherol for 24 h. At the end of the treatment, cells were incubated with MTT (0.05 mg/mL) for 3 h in the dark. The formazan crystals formed were solubilized with 200 μL DMSO. The plates were read at 570 nm with a microplate reader (TECAN Sunrise, Tecan, Lyon, France).

2.5. Quantification of adherent cells with the sulforhodamine 101 (SR101) assay

Sulforhodamine 101 (SR101; Sigma Aldrich) was used to quantify adherent cells by its ability to stain cellular proteins [56]. After 24 h of treatment with or without 7β-OHC in the presence or absence of MTSO, or α-tocopherol, C2C12 cells were fixed with ethanol 70% for 20 min at 4 °C. After two washes in PBS, cells were stained with an SR101 solution (1.5 μg/mL, 30 min, and 4 °C). Then, the cells were washed twice with PBS and the fluorescence was measured with a fluorescent plate reader (Infinite M200, TECAN) using Ex 535 nm/Em 610 nm. The experiments were realized in triplicate and the data were expressed as% of control.

2.6. Measurement of transmembrane mitochondrial potential (ΔΨm) with $DiOC_6(3)$

The variation in the mitochondrial transmembrane potential (ΔΨm) was detected using 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$) [24]. After 24 h of treatment, adherent and non-adherent C2C12 cells were pooled, stained with a solution of $DiOC_6(3)$ (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Montigny le Bretonneux, France) at 40 nM (15 min; 37 °C), and analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). Mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the green fluorescence intensity collected through a 520 ± 10 nm band-pass filter. For each sample, 10,000 cells were acquired, and data analyses were performed with FlowJo software (Carrboro, NC, USA)).

2.7. Measurement of intracellular ROS with dihydroethidium staining

The production of ROS, including the intracellular superoxide anion ($O_2^{\bullet -}$), was quantified by flow cytometry after staining with dihydroethidium (DHE; Thermo Fisher Scientific). After 24 h of treatment, C2C12 cells (adherent and non-adherent cells) were stained with a 2 μM DHE solution for 15 min at 37 °C and then analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer. The production of ROS was monitored by oxidized DHE that exhibits an orange/red fluorescence ($\lambda_{Ex\ Max} = 488$ nm; $\lambda_{Em\ Max} = 575$ nm) [57]. The fluorescent signals of the DHE-stained cells were collected through a 580 nm band-pass filter. 10,000 cells were acquired for each sample. Data analyses were performed using FlowJo software.

2.8. Microscopical visualization of lipid droplets with oil red O (ORO)

Lipid droplets are dynamic organelles and function as a storage structure for neutral lipids, including triglycerides and cholesterol esters [58]. The presence of neutral lipids was investigated by staining with Oil Red O (ORO; Sigma Aldrich). ORO is soluble in neutral lipids and remains dissolved in triglycerides after washing. To this end, at the end of treatments, C2C12 cells cultured in 6 well-plates were washed with PBS and stained with ORO solution (three parts 0.5% ORO dye in isopropanol into two parts water) for 30 min, and stored in the dark at room temperature [53]. The stained cells were washed three times with water and three contiguous observation fields always taken in the center of a 6-well plate were observed under an inverted phase contrast microscope (Axiovert 40 CFL, Zeiss).

2.9. Determination of the peroxisomal status

2.9.1. Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was realized as previously described [22] to simultaneously visualize peroxisomal and mitochondrial ultrastructure and morphology in C2C12 cells treated for 24 h with or without 7β-OHC in the presence or absence of MTSO, or α-tocopherol. The sample preparation technique used is specifically adapted to allow the detection of peroxisomes. C2C12 myoblasts (10^6 cells) were fixed for 1 h at 4°C in 2.5% (w/v) glutaraldehyde diluted in a cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4), washed twice in cacodylate buffer, incubated in the dark for 1 h at 21 °C in Tris–HCl (0.05 M, pH 9.0) containing diaminobenzidine (DAB: 2.5 mg/mL) and H_2O_2 (10 μL/mL of a 3% solution); washed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) for 5 min at 21 °C; post-fixed in 1% (w/v) osmium tetroxide diluted in cacodylate sodium (0.1 M, pH 7.4) for 1 h at 21 °C in the dark; and rinsed in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4). The preparations were dehydrated in graded ethanol solutions and then embedded in Epon. Ultrathin sections were cut with an ultramicrotome, contrasted with uranyl acetate and lead citrate, and examined using an HT7800 electron microscope (Hitachi,

Tokyo, Japan).

2.9.2. Apotome evaluation of the level and topography of ABCD3 peroxisomal transporter

ABCD3 peroxisomal transporter was detected by indirect immunofluorescence [59]. Cells were cultured on glass slides in six-well plates. After 24 h of treatment, adherent and non-adherent C2C12 cells were collected, fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde for 15 min at room temperature (RT), and rinsed twice with PBS. Cells were permeabilized for 30 min at RT with a PFS buffer (PBS/0.05% saponin/10% FCS). After washing in PBS, cells were incubated (1 h, RT) with an appropriate rabbit polyclonal antibody raised against ABCD3 (# 11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific, Asheville, NC, USA) diluted (1/500) in PFS buffer. Cells were washed and incubated in the dark (30 min, RT) with a goat anti-rabbit 488-Alexa antibody (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluted at 1/500 in PFS buffer. After washing in PBS, cells were stained with Hoechst 33,342 (1 μg/mL) and then mounted in Dako fluorescent mounting medium (Dako, Copenhagen, Denmark). The slides were stored in the dark at 4°C and examined with structured illumination microscopy (Apotome 2 Imaging System, Zeiss). The images were realized with ZEN imaging software (Zeiss).

2.9.3. Flow cytometric quantification of ABCD3 peroxisomal transporter

For flow cytometric analyses, adherent cells were detached by trypsinization, mixed with non-adherent C2C12 cells, fixed with 2% (w/v) paraformaldehyde diluted in PBS for 15 min at RT and then rinsed twice with PBS. Cells were permeabilized for 30 min at RT with PFS buffer. After washing in PBS, cells were incubated (1 h, RT) with an appropriate rabbit polyclonal antibody raised against ABCD3 (# 11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific) diluted (1/500) in PFS buffer. Cells were washed and incubated in the dark (30 min, RT) with a goat anti-rabbit 488-Alexa antibody (Santa-Cruz Biotechnology) diluted at 1/500 in a PFS buffer. After washing in PBS, cells were resuspended in PBS and immediately analyzed on a BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences). The green fluorescence of 488-Alexa was collected with a 520 ± 20 nm band-pass filter. For each sample, 10,000 cells were acquired, and data analyses were performed using FlowJo software.

2.9.4. Quantification by RT-qPCR of gene expression associated with peroxisomal β-oxidation

RNA extraction from myoblasts was performed using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions. The purity of each mRNA sample was controlled by the ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm (ratios of 1.8–2.2 were considered satisfactory). 1 μg of total mRNA from each sample was converted into single-stranded cDNA using the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad, Marne la Coquette, France) according to the following procedure: 5 min at 25 °C, 20 min at 46 °C, and 5 min at 95 °C. cDNA was then amplified using Takyon TM Rox SYBR Master Mix dTTP Blue (Eurogentec, Liège, Belgium) and specific forward and reverse primers. The following primers were used:

- *Abcd3*: forward 5′-ctgggcgtgaaatgactagattg-3′ and reverse 5′-cttctcctgttgtgacaccattg-3′
- *Pex 5*: forward 5′-gtgggcagcagagtttatacag-3′ and reverse 5′-ctccctcctcaagtcgatgc-3′
- *Pex13*: forward 5′-aaccaacacttacaagagtgcc-3′ and reverse 5′-ccgtaggctccatatccagaag-3′
- *Pex14*: forward 5′-acagcagtgaagttcctacaga-3′ and reverse 5′-gccaggtcaatctcttcgtct-3′

Thermal cycling conditions were as follows: activation of DNA polymerase (95 °C, 10 min), followed by 40 cycles of amplification at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by a melting curve analysis to control for the absence of nonspecific products. Gene expression was quantified using cycle to threshold (Ct) values and normalized by the *36B4* reference gene (forward 5′-gcgacctggaagtccaacta-3′ and reverse 5′-atctgcttggagcccacat-3′). The quantitative expression of *Abcd3*, *Pex5*, *Pex13*, and *Pex14* was determined as fold induction of the control.

2.9.5. Characterization and quantification of ABCD3, ACOX1, and MFP2 peroxisomal proteins by western blotting

After 24 h of treatment, C2C12 cells were trypsinized, washed with PBS, harvested, and lysed in a RIPA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet NP40, 0.5% Na deoxycholate, 0.1% SDS, 2 mM EDTA and 50 mM NaF) containing a complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) diluted 1/25 for 30 min on ice. After centrifugation at 20,000 g for 20 min at 4 °C, the total protein concentration of supernatant was measured using bicinchoninic acid reagent as a standard (Sigma Aldrich). 70 μg of protein were separated on a 14%, 12%, or 8% SDS-PAGE gel and blotted onto a PVDF membrane (Bio-Rad). After blocking non-specific binding sites with 5% milk powder in PBST (PBS, 0.1% Tween 20, pH 7.2) for 1 h, membranes were incubated overnight (4°C) with the primary antibody diluted in 5% milk PBST. The peroxisomal β-oxidation was evaluated by using the following rabbit polyclonal antibodies: anti-ABCD3 1/500 (#11523651, Pierce/Thermo Fisher Scientific), anti-multifunctional enzyme type 2 (MFP2) 1/1000 (#GTX114978, Gentex/Euromedex, Souffelweyersheim, France), and anti-ACOX1 1/200 (rabbit polyclonal antibody) detecting the three ACOX1 isoforms at 75, 50, and 25 kDa [60]. An antibody directed against β-actin (A2228; mouse monoclonal antibody; Sigma-Aldrich) was used at a final concentration of 1/10,000. The membranes were washed three 5 min with PBST and incubated with a secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (#7074; Cell Signaling) or an anti-mouse antibody (#sc-2005, Santa-Cruz Biotechnology) diluted at 1/5,000 in 1% milk powder in PBST. The membranes were then washed, and antibody binding was revealed using an enhanced chemiluminescence detection kit (Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Fisher Scientific) and a Chemidoc XRS+ (Bio-Rad). The levels of ABCD3, ACOX1, and MFP2 were determined versus β-actin and were calculated with Image Lab software (Bio-Rad).

2.9.6. Characterization and quantification of very-long-chain fatty acids (VLCFA) by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS)

Fatty acids, including very-long-chain fatty acids (VLCFA; C ≥ 22) [61], were analyzed using GC/MS as previously described by Blondelle et al. [62]. Total cellular lipids were extracted by Folch's method [63]. Fatty acids were quantitated with the use of an internal standard (C19:0), and calibration curves were obtained with fatty acid authentic standards.

2.10. Mass spectrometry analysis of sterols

Cellular homogenates were added to a screw-capped vial sealed with a teflon septum together with deuterium labeled or structural homologous internal standards, butylated hydroxytoluene and EDTA and flushed with argon for 20 min to remove air. Alkaline hydrolysis was allowed to proceed at room temperature (22°C) with magnetic stirring for 30 min in the presence of ethanolic 0.5 M potassium hydroxide solution. Sterols and oxysterols were collected by liquid to liquid extraction with hexane. Oxysterols were purified by SPE separation [64]. After correction of pH (<3) with HCl, all metabolites were extracted in sequential liquid to liquid extraction with hexane and ethylacetate. The organic solvents were evaporated under a gentle stream of argon and converted into trimethylsilyl ethers with [N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] (BSTFA) with trimethylchlorosilane (TCS) 1% (Pierce/Thermo Fisher Scientific). GC–MS analysis was performed as previously described [65].

2.11. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Data were represented as the mean ± standard deviation (SD) and compared either with a Student's *t*-test or with an ANOVA test followed by a Tukey's test, which allows multiple comparisons and permits to assess any interaction. The heatmap representation was realized with GraphPad Prism 8.0 software. Data were considered statistically significant at a value of $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Phytochemical profile of milk thistle seed oil (MTSO)

The MTSO used was from a Tunisian region (Sousse). It was prepared as previously described [29] and its phytochemical profile was established by Zarrouk et al. [30]. The main characteristics of MTSO, which is a Mediterranean oil containing an elevated level of α-tocopherol, are summarized in Table 1.

3.2. Attenuation of 7β-hydroxycholesterol-induced cell death by MTSO and α-tocopherol on C2C12 cells

The impact of MTSO on cell growth, transmembrane mitochondrial potential (ΔΨm), and ROS production were evaluated on 7β-OHC-treated C2C12 cells. To this end, C2C12 cells were cultured with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of MTSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM) and then stained either with fluorescein diacetate (FDA), sulforhodamine 101 (SR101), 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$) or dihydroethidium (DHE). The concentration of 7β-OHC used corresponds to the 50% inhibiting concentration (IC50); it inhibits by 50% the viability of C2C12 cells (**Supplementary S1A**). Concentrations of MTSO and α-tocopherol used significantly increase the viability of C2C12 cells (**Supplementary S1B and S1C**). In addition, it has also previously been shown on 158 N murine oligodendrocytes i) that the concentration of 400 μM was the highest non-cytotoxic concentration of α-tocopherol and ii) that this latter, compared to lower concentrations, was the most efficient to counteract 7β-OHC- and 7KC-induced cell death [24].

With the FDA and SR101 assays, a marked decrease in cell viability and density was observed under treatment with 7β-OHC compared to control and vehicle (ETOH and/or DMSO)-treated cells. Comparatively to untreated cells, the cytotoxic effects of 7β-OHC were characterized by a lower percentage of FDA-positive cells (cells with altered plasma membrane) and a lower percentage of SR101-positive cells (lower number of adherent cells) (Fig. 1**A-B**), whereas no significant differences were observed between untreated cells (control), vehicle-treated cells, MTSO-, and α-tocopherol-treated cells (Fig. 1**A-B**). These cytotoxic effects were strongly and significantly attenuated with MTSO and α-tocopherol (Fig. 1**A-B**), indicating that MTSO and α-tocopherol provided cytoprotection against 7β-OHC induced-cell death which is associated with a loss of cell adhesion as shown by the presence of round cells floating in the culture medium by phase-contrast microscopy (**Supplementary Figure S2**). In addition, by phase microscopy, no difference was observed between control, vehicle-treated cells, MTSO-, and α-tocopherol-treated cells: the cell density and morphology were similar (**Supplementary Figure S2**). This cytoprotective effect of MTSO and α-tocopherol could be due at least in part to the ability of MTSO and α-tocopherol to reduce the cellular accumulation 7β-OHC in C2C12 cells from around 25% and 50%, respectively (Table 2). As MTSO contains high levels of fatty acids [30], mainly oleic acid, which can favor lipid droplets formation with cytoprotective activities against 7-ketocholesterol (7KC) – induced oxidative stress and cell death [53], the ability of MTSO and α-tocopherol to trigger lipid droplets formation was determined after staining with Oil Red O (ORO). Under our different conditions of treatments, no lipid droplets were observed in control, vehicle-treated cells and α-tocopherol-treated cells as well as in MTSO-, (7β-OHC + MTSO)-, and (7β-OHC + α-tocopherol) treated cells whereas around 10% of ORO positive cells were detected in 7β-OHC-treated cells. (**Supplementary Figure S3**).

In addition, after staining with $DiOC_6(3)$, used to measure ΔΨm, a significant increase in C2C12 cells with depolarized mitochondria ($DiOC_6(3)$ negative cells) was observed under treatment with 7β-OHC. Interestingly, MTSO and α-tocopherol strongly prevent the loss of ΔΨm, as shown by lower percentages of cells with depolarized mitochondria (Fig. 1**C**). Similar percentages of cells with depolarized mitochondria (in the range of 10%) were observed in control, vehicle-treated cells, MTSO-, and α-tocopherol-treated cells (Fig. 1**C**).

After staining with DHE, a strong increase in intracellular ROS level (DHE positive cells) was observed in the presence of 7β-OHC (Fig. 1**D**). This percentage of DHE positive cells was significantly attenuated by MTSO and α-tocopherol (Fig. 1**D**). Similar percentages of DHE positive cells (in the range of 5%) were observed in control, vehicle-treated cells, MTSO-, and α-tocopherol-treated cells (Fig. 1**D**).

3.3. Prevention of 7β-hydroxycholesterol-induced peroxisomal changes by MTSO and α-tocopherol on C2C12 cells

Peroxisomes are key metabolic organelles that participate in the control of RedOx homeostasis and lipid metabolism [66,67]. There are functionally connected to mitochondria and endoplasmic reticulum; peroxisomes located in the vicinity of mitochondria are often observed [68]. It is therefore supposed that peroxisomal changes (including morphologic, topographic and functional modifications) could favor mitochondrial dysfunctions contributing to the cytotoxic activities of 7β-OHC on C2C12 cells. Therefore, several peroxisomal parameters were studied with the use of complementary methods: transmission electron microscopy, fluorescence microscopy (Apotome) and flow cytometry, western blotting, RT-qPCR, and GC/MS.

Under standard electron microscopy conditions all organelles are visualized except peroxisomes. However, under our particular staining conditions of cell samples with diaminobenzidine, all organelles (including peroxisomes) can be simultaneously visualized [59]. Thus, the observations of C2C12 cells by transmission electron microscopy allowed us to simultaneously reveal essential cellular constituents, namely peroxisomes, mitochondria, and endoplasmic reticulum. Control cells, MTSO (100 μg/mL)- and α-tocopherol (400 μM)- treated cells have

Table 1
Phytochemical profile of milk thistle seed oil (MTSO) from Tunisia.

	MTSO (Sousse-Tunisia)
Fatty acid content (% of total fatty acids)	
∑UFA	80.83 ± 1.86
∑SFA	56.77 ± 0.57% linoleic acid; 21.39 ± 0.02% oleic acid
	19.24 ± 0.17
	13.06 ± 0.07% palmitic acic
Tocopherol content (mg/kg of oil)	
Total tocopherol content	274 ± 24
α-tocopherol	190 ± 20
Phytosterol content (mg/kg of oil)	
Total phytosterol content	5891 ± 118
Polyphenol content (mg equivalent quercetin/kg of oil)	
Vanillin	3.30 ± 0.01

The data presented in the table are extracted from Wiem Meddeb's PhD thesis (Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France; title: '*Extraction, caractérisation physicochimique, profil lipidique et activité cytoprotectrice d'huiles de Chardon-Marie de Tunisie'*, 2018) as well as from previous works realized in the laboratory [29,30]. UFA: unsaturated fatty acids, SFA: saturated fatty acids. In the MTSO used (Sousse, Tunisia), among tocopherols, α-tocopherol was present in highest quantity [30]. The following phytosterols were mainly present: β-sitosterol > campesterol > schotenol > stigmasterol > Δ5 avenasterol [30]. Vanillin was the only polyphenol identified [29].

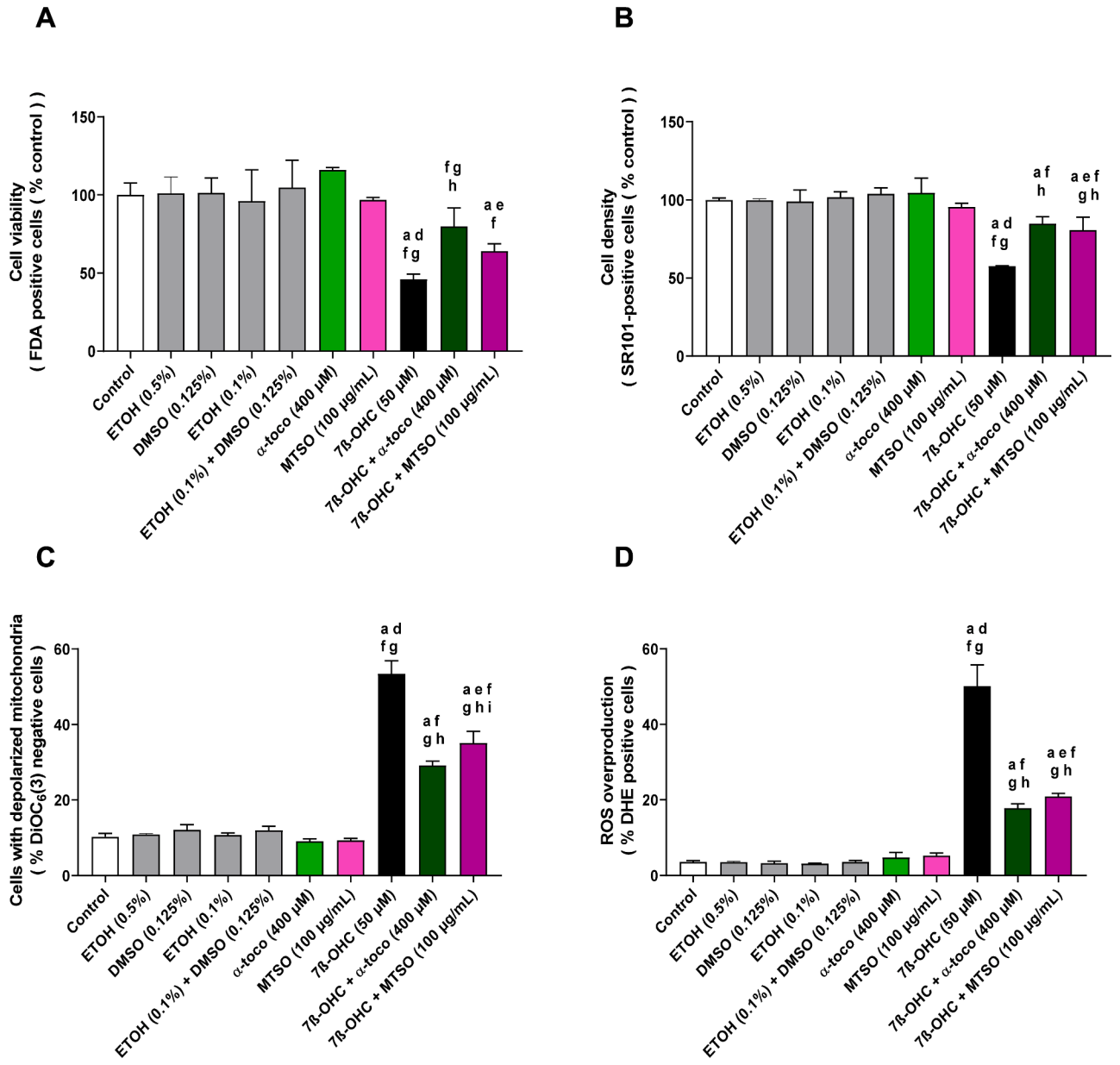


Fig. 1. Cytoprotective effect of milk thistle seed oil (MTSO, *Sylibum marianum*) and α-tocopherol on 7β-hydroxycholesterol-induced cell death, loss of transmembrane mitochondrial potential (ΔΨm), and reactive oxygen species (ROS) overproduction on C2C12 cells. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of MTSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (α-toco, 400 μM). Under these conditions, cell viability and cell density were determined with the fluorescein diacetate (FDA) and sulforhodamine 101 (SR101) assays, respectively (**A-B**). Loss of transmembrane mitochondrial potential (ΔΨm) was measured by flow cytometry after staining with $DiOC_6(3)$ and evaluated by the percentage of $DiOC_6(3)$ negative cells (**C**). ROS overproduction was measured by flow cytometry after staining with dihydroethidine (DHE) and evaluated by the percentage of DHE positive cells. Data are the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, considering the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, consider the vehicle used. **a**: comparison versus control; **b**: comparison versus ETOH (0.5%); **c**: comparison versus DMSO (0.125%); **d**: comparison versus ETOH (0.1%); **e**: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); **f**: comparison versus α-toco (400 μM); **g**: comparison versus MTSO (100 μg/mL); **h**: comparison versus 7β-OHC (50 μM); **i**: comparison versus (7β-OHC (50 μM) + α-toco (400 μM)). No significant differences were observed between the untreated (control) and vehicle-treated cells: EtOH (0.5%), DMSO (0.125%), EtOH (0.1%), and (EtOH (0.1%) + DMSO (0.125%)).

morphologically normal mitochondria with numerous cristae, round peroxisomes that are homogeneous in size (in the range of 0.4 ± 0.1 μm) and an endoplasmic reticulum (ER) which is rich in ribosomes and easily identified (Fig. 2**A, C and E**). In the presence of 7β-OHC (50 μM), major changes in the size and shape of the mitochondria and peroxisomes were detected. Several peroxisomes were observed in numerous cytoplasmic vacuoles, evocating a pexophagy process, and some elongated mitochondria were present (Fig. 2**B**). These changes were attenuated by MTSO and α-tocopherol treatment: the number of vacuoles containing peroxisomes was decreased whereas the number of morphologically normal mitochondria was increased (Fig. 2**D and F**).

Moreover, the peroxisomal transporter ABCD3 is considered as a good marker for assessing peroxisomal mass and may also provide information on peroxisome biogenesis [69]. After staining with an anti-ABCD3 polyclonal antibody, stacks of structured illumination microscopy images obtained in untreated cells, MTSO-, and α-tocopherol-treated cells showed a high density and a homogeneous distribution of peroxisomes in the cytoplasm (Fig. 3**A**). After incubation with 7β-OHC, a

Table 2
Accumulation of *7β*-hydroxycholesterol in C2C12 cells exposed to 7β-OHC (7β-OHC) with or without α-tocopherol (α-toco) or milk thistle seed oil (MTSO).

	7β-OHC (ng/million cells)
Control	1.24 ± 0.02
ETOH (0.5%)	1.73 ± 0.03
DMSO (0.125%)	2.28 ± 0.03
ETOH (0.1%)	1.45 ± 0.02
ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)	1.42 ± 0.01
α-toco (400 μM)	0.60 ± 0.01
MTSO (100 μg/mL)	2.70 ± 0.04
7β-OHC (50 μM)	3972.84 ± 84.59 [a f g h]
7β-OHC + α-toco (400 μM)	1699.09 ± 6.90 [a f i]
7β-OHC + MTSO (100 μg/mL)	3196.43 ± 96.05 [a e g i j]

Data are the mean ± SD of two independent experiments realized in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, taking into account the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. As *Pistacia Lentiscus* L. seed oil (PLSO) also showed cytoprotective activities against 7β-OHC-induced cytotoxic effects [22], the accumulation of 7β-OHC was also measured with this oil. Noteworthy, in the presence of PLSO, the cellular concentration of 7β-OHC was similar than in control cells (PLSO 1.36 ± 0.03). However, when PLSO was associated with 7β-OHC, the intracellular accumulation of 7β-OHC was twice lower than with MTSO (7β-OHC + PLSO (100 μg/mL): 1880.13 ± 68.91 [a e h i k]) and in the same range than with α-tocopherol. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, take into account the vehicle used. **a**: comparison versus control; **b**: comparison versus ETOH (0.5%); **c**: comparison versus DMSO (0.125%); **d**: comparison versus ETOH (0.1%); **e**: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); **f**: comparison versus α-toco (400 μM); **g**: comparison versus MTSO (100 μg/mL); **h**: comparison versus PLSO (100 μg/mL), **i:** comparison versus 7β-OHC (50 μM); **j**: comparison versus (7β-OHC (50 μM) + α-toco (400 μM)); **k**: comparison versus (7β-OHC (50 μM) + MTSO (100 μg/mL)). No significant differences were observed between untreated cells (control) and vehicle-treated cells. ETOH: ethanol.

marked decrease in peroxisomal density, as well as peroxisomal aggregates (which could correspond to pexophagy vesicles), were seen. In the presence of MTSO and α-tocopherol, these peroxisomal changes were attenuated **(**Fig. 3**A).** By flow cytometry, in agreement with the observations made by fluorescence microscopy (Apotome), a significant increase in the percentage of cells with ABCD3 reduced level (in the range of 50%), indicating a decrease of the peroxisomal mass, was observed (Fig. 3**B-C**). Interestingly, this decrease of peroxisomal mass induced by 7β-OHC was strongly counteracted in the presence of MTSO and α-tocopherol (Fig. 3**A-C**). Indeed, the percentage of cells with reduced ABCD3 level was in the range of 25% and of 20% when 7β-OHC was associated with MTSO and α-tocopherol, respectively (Fig. 3**B-C**). Comparatively to untreated cells, no effects of vehicles (ETOH, DMSO), MTSO, and α-tocopherol were observed on the peroxisomal mass: the percentages of cells with reduced ABCD3 were similar (around 20%) in these different conditions (Fig. 3**B-C**). In addition, RT-qPCR was applied to quantify *Abcd3* gene expression levels. In the presence of MTSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (400 μM), no differences in the mRNA expression level of *Abcd3* was observed compared to untreated, MTSO, α-tocopherol, and vehicle-treated cells. However, with 7β-OHC, the mRNA expression level of *Abcd3* gene was significantly decreased (Fig. 3**D**). The association of MTSO or α-tocopherol with 7β-OHC counteracted this decrease (Fig. 3**D**). Noteworthy, the results obtained by RT-qPCR agreed with those of western blot analysis **(**Fig. 4**).**

In order to precise the impact of 7β-OHC on peroxisomal biogenesis the expression and level of peroxins, including Pex5, Pex13, and Pex14, were studied. Pex5 transports newly synthesized proteins from the cytosol to the peroxisomal matrix [70]. Pex13 and Pex14 are key components of the peroxisomal docking complex localized at the peroxisomal membrane level and are required for peroxisome formation [71]. As shown by RT-qPCR, a significant decrease in *Pex5* mRNA level was observed in 7β-OHC-treated cells compared to control, MTSO-, and α-tocopherol-treated cells (Fig. 3**E**). However, in the presence of 7β-OHC, an increase in *Pex13* and *Pex14* mRNA levels were observed (**Supplementary Figure S4**) underlying that peroxin expressions are differentially regulated under treatment with 7β-OHC.

In addition, the effect of 7β-OHC on peroxisomal β-oxidation, which allows the degradation of very-long-chain fatty acids (VLCFA, C ≥ 22), was also studied (Fig. 4**A**). This pathway involves Acyl-CoA Oxidase 1 (ACOX1) and the multifunctional protein 2 (MFP2). As shown by Western blot, significant decreases in ACOX1 (isoforms 75, 50, and 25 kDa) and MFP2 occurred in the presence of 7β-OHC (Fig. 4**B**). When MTSO or α-tocopherol were associated with 7β-OHC, these decreases were strongly and significantly attenuated (Fig. 4**B**). As 7β-OHC induces a decreased level of ACOX1 and MFP2 involved in peroxisomal β-oxidation (Fig. 4**A-B**), this effect should favor the accumulation of VLCFA, which can contribute to cellular dysfunctions (oxidative stress and cell death induction) [72,73]. Therefore, the intracellular level of VLCFA was determined by GC/MS in our different culture conditions. As shown in Fig. 5, the analysis of VLCFA revealed a significant increase in behenic acid (C22:0), lignoceric acid (C24:0), nervonic acid (C24:1n-9), cerotic acid (C26:0), and hexacosenoic acid (C26:1n-9) levels, following treatment with 7β-OHC. This increase was normalized when 7β-OHC-treated C2C12 cells were simultaneously exposed to MTSO or α-tocopherol (Fig. 5).

Altogether, our findings demonstrate that 7β-OHC-induced several peroxisomal changes i) which impact peroxisomal topography and mass, biogenesis, as well as β-oxidation and ii) which are strongly attenuated by MTSO and α-tocopherol. These data are summarized in the heatmap presented in Fig. 6.

4. Discussion

The oxysterols, formed either by auto-oxidation of cholesterol or enzymatically or by both processes, have a wide range of biological activities [74] and some of them are cytotoxic both in vitro and in vivo [11]. This is the case of 7β-OHC, which is a pro-oxidant and pro-inflammatory molecule [14]. Moreover, 7β-OHC can also activate different types of cell death: apoptosis, autophagy, necrosis, and oxiapoptophagy [14,35,75]. Depending on the cell type considered, the ability of 7β-OHC to induce other types of cell death, such as ferroptosis, cannot be excluded [76]. Given its characteristics and the high levels of 7β-OHC observed in biological fluids and lesions of certain age-related diseases (vascular wall in the case of cardiovascular diseases; cerebral cortex in the case of Alzheimer's disease) [14], it seems that 7β-OHC likely contributes to the pathophysiology of these diseases and is also involved in ageing [17,77,78]. Recently, we have also shown that 7β-OHC was significantly increased (student's *t*-test; p less than 0.05) in the plasma of normocholesterolemic patients aged 65 and over suffering from sarcopenia (7β-OHC plasma level: non sarcopenic subjects: 0.5 to 4 nM, 2.12 ± 0.61 nM; sarcopenic patients: 1 to 7 nM, 3.29 ± 1.28 nM), characterized by a loss of muscle mass and strength, which is a factor of frailty in the elderly [22]. The plasma level of 7β-OHC + 7KC, which can be converted in 7β-OHC [14], was also significantly increased (student's *t*-test; p less than 0.05) in the same subjects (7β-OHC + 7KC: non sarcopenic subjects: 3 to 13 nM, 7.66 ± 2.62 nM; sarcopenic patients: 7 to 30 nM, 12.65 ± 4.50 nM) [22]. In addition, on C2C12 cells differentiated into myotubes, we observed that the toxicity of 7β-OHC was greater than that of 7KC (our data not shown). Altogether, these data led us to choose C2C12 murine myoblasts as a cell model to demonstrate the strong cytotoxic activity of 7β-OHC [22]. To this end, 7β-OHC was used at its IC50 value (50 μM). Although this IC50 is elevated in the context of sarcopenia, while it is physiologically acceptable for cardiovascular diseases and Alzheimer's disease [15], the concentration of 7β-OHC used on C2C12 makes it possible to compare the effects of this oxysterol from one cell type to another by addressing under well-defined conditions the effects of 7β-OHC on organelles, oxidative stress and cell death

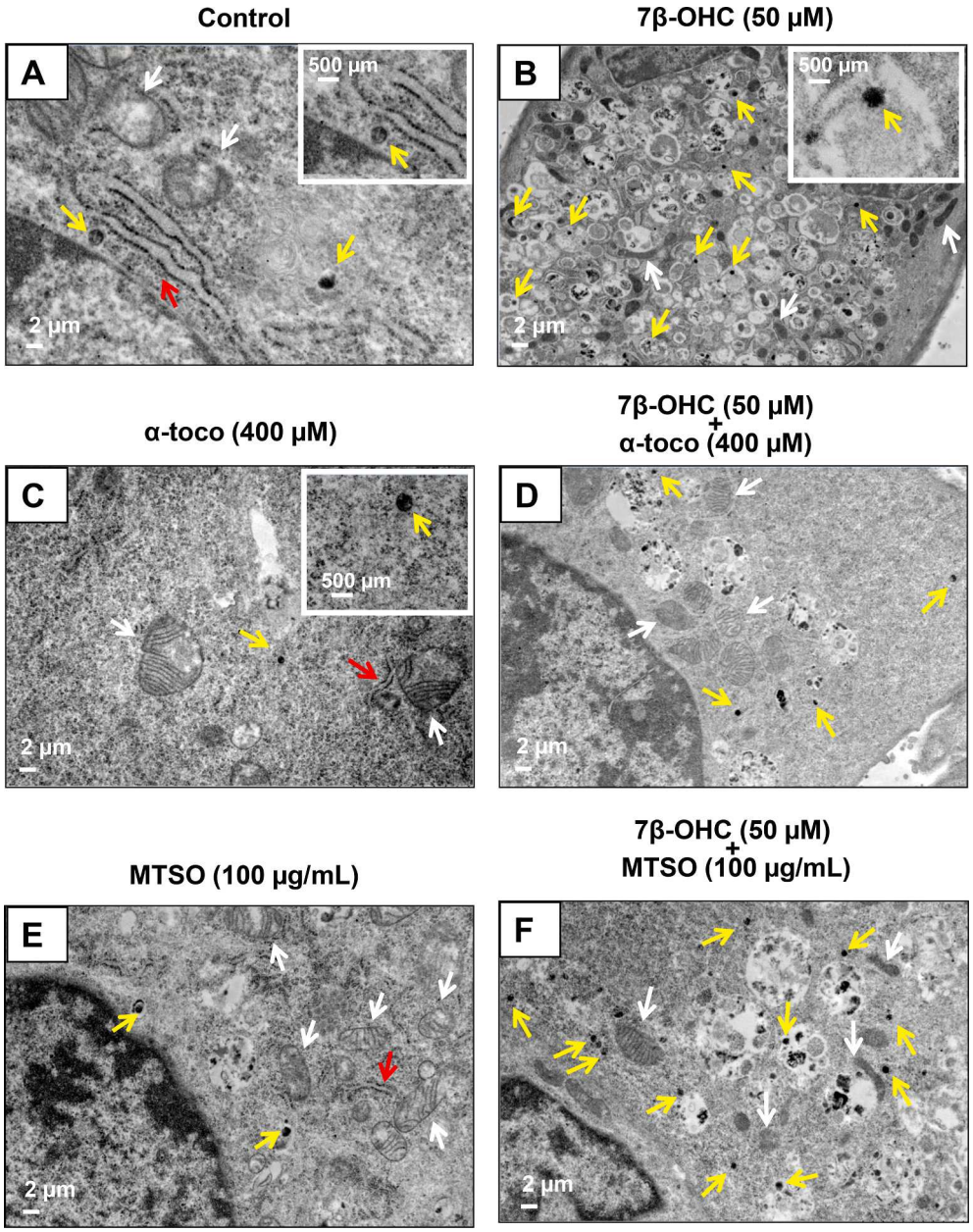
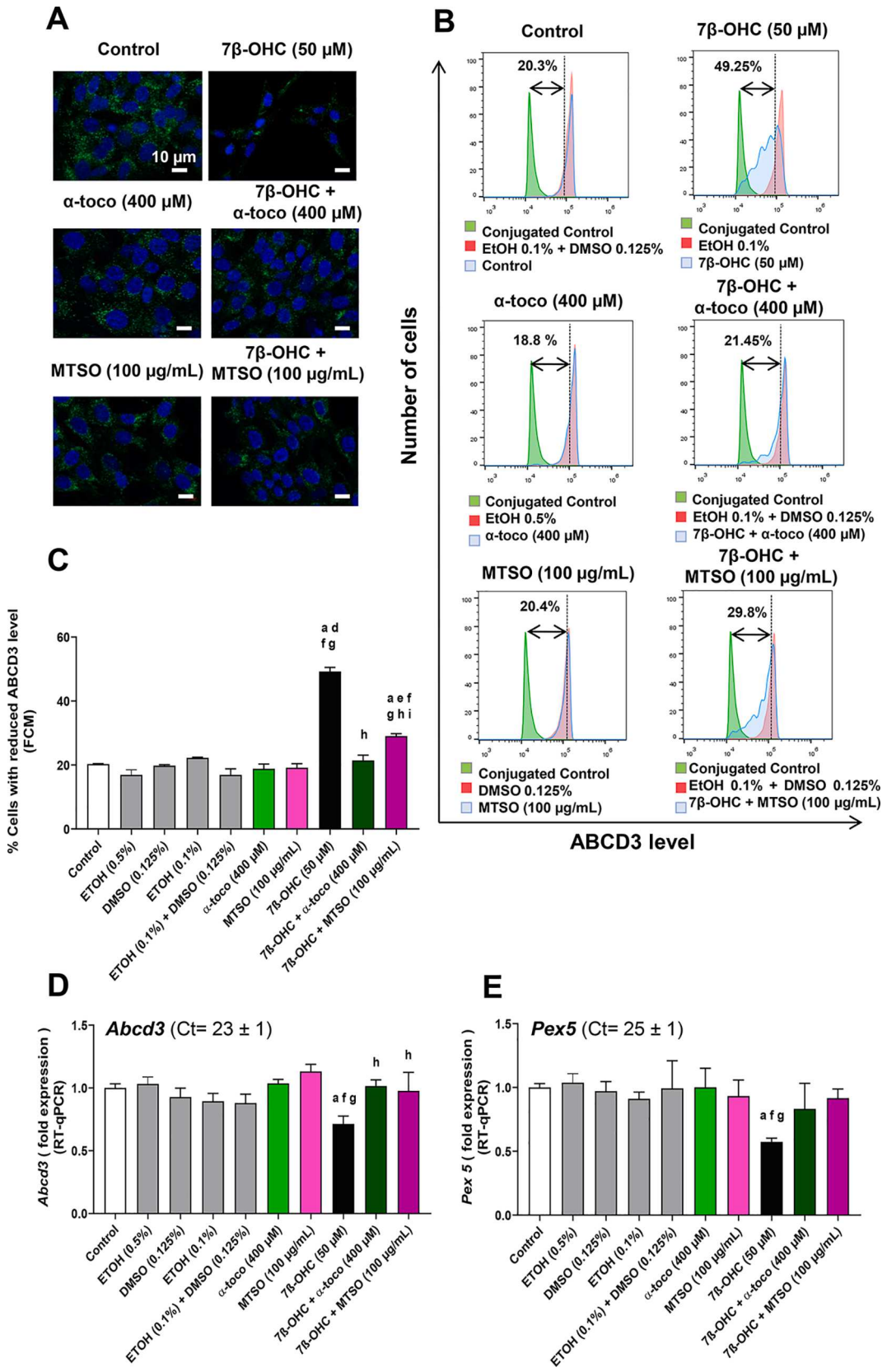


Fig. 2. Transmission electron microscopy: ultrastructural characterization of peroxisomes, mitochondria and endoplasmic reticulum on C2C12 cells cultured with or without 7β-hydroxycholesterol in the presence or absence of milk thistle seed oil (MTSO) or α-tocopherol. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of MTSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (α-toco, 400 μM). Ultrastructural aspects of peroxisomes, mitochondria and endoplasmic reticulum in untreated cells (control) (**A**), α-tocopherol-treated cells (**C**), and MTSO-treated cells (**E**): numerous mitochondria with regular and homogenous shapes, clear and regular cristae as well as round and regular peroxisomes were detected; the endoplasmic reticulum is also clearly observed. In 7β-OHC-treated cells (**B**), irregular mitochondria with an increased size, reduced matrix density, and disrupted cristae, as well as peroxisomes with abnormal sizes and shapes were visualized. In (7β-OHC + α-tocopherol)-treated cells (**D**) and (7β-OHC + MTSO)-treated cells (**F**), mainly mitochondria and peroxisomes morphologically similar than those present in the control cells were observed. The white arrows point towards mitochondria, the yellow arrows point towards peroxisomes and the red arrows point towards endoplasmic reticulum.

[14]. Thus, on C2C12 cells, the effects of 7β-OHC were characterized by an induction of oxidative stress, alterations of organelles (mitochondria, peroxisome), and induction of cell death [22]. The observed cytotoxicity was also strongly mitigated by Tunisian *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO), rich in antioxidants and widely used in traditional Tunisian cooking [22]. Another Mediterranean oil used both in Tunisian cuisine and in traditional medicine is milk thistle seed oil (MTSO) [79]. In the present study, we are particularly interested in the effects of MTSO from the Sousse region (Tunisia) [30]. Given that 7β-OHC-induced mitochondrial dysfunctions are quite well described both morphologically and functionally on different cell types [80], and as mitochondria and peroxisomes are functionally connected organelles, we focused on the characterization of 7β-OHC-induced peroxisomal changes [81]. Indeed, mitochondrial dysfunction can favor peroxisomal dysfunction and reciprocally [49]. In the present study, we show that MTSO, enriched with α-tocopherol [30], strongly attenuates 7β-OHC-induced cell death on C2C12 cells. In addition, we are particularly interested in the ability of this oil to correct the peroxisomal alterations induced by 7β-OHC. We show that MTSO prevents peroxisomal topographical, morphological and functional changes induced by 7β-OHC as efficiently as α-tocopherol (one of the most potent lipid-soluble antioxidants in the body) [82], employed at high concentration (400 μM) often used as a cytoprotective molecule to attenuate the deleterious effects of cytotoxic oxysterols including 7-ketocholesterol (7KC), 7β-OHC and 24S-hydroxycholesterol [14,24,26].

On C2C12 myoblasts, 7β-OHC (50 μM, 24 h) is a toxic compound that triggers a mode of cell death associated with ROS overproduction. It is well established that this overproduction is partly mitochondrial [22]. However, in the presence of 7β-OHC, as observed with 7KC, an activation of NADP(H) oxidase cannot be excluded [83]. In addition, peroxisomal dysfunctions could also contribute to the increase in ROS production. Indeed, on C2C12 cells, 7β-OHC induce a decrease of *Abcd1* and *Acox1* mRNA levels. It has been also shown on 158 N murine oligodendrocytes that decreasing *Abcd1* and *Acox1* expression with siRNAs increases ROS production [73]. As the overproduction of ROS is known to promote inflammation [84], it is hypothesized that the ability of 7β-



(caption on next page)

Fig. 3. Attenuation by milk thistle seed oil (MTSO) and α-tocopherol of 7β-hydroxycholesterol-induced changes of the peroxisomal topography, mass and biogenesis on C2C12 cells. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of MTSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (α-toco, 400 μM). The effect of MTSO and α-tocopherol against 7β-OHC-induced changes of peroxisomal membrane transporter (ABCD3) was analyzed by structured illumination microscopy (apotome) (**A**) as well as flow cytometry (FCM) (**B-C**). The relative gene expression of *Abcd3* (**D**) and *Pex 5* (**E**) mRNAs was determined by real time-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The data are presented as the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate. A multiple comparative analysis between the groups, considering the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, consider the vehicle used. **a**: comparison versus control; **b**: comparison versus ETOH (0.5%); **c**: comparison versus DMSO (0.125%); **d**: comparison versus ETOH (0.1%); **e**: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); **f**: comparison versus α-toco (400 μM); **g**: comparison versus MTSO (100 μg/mL); **h**: comparison versus 7β-OHC (50 μM); **i**: comparison versus (7β-OHC (50 μM) + α-toco (400 μM)). No significant differences were observed between untreated cells (control) and vehicle-treated cells.

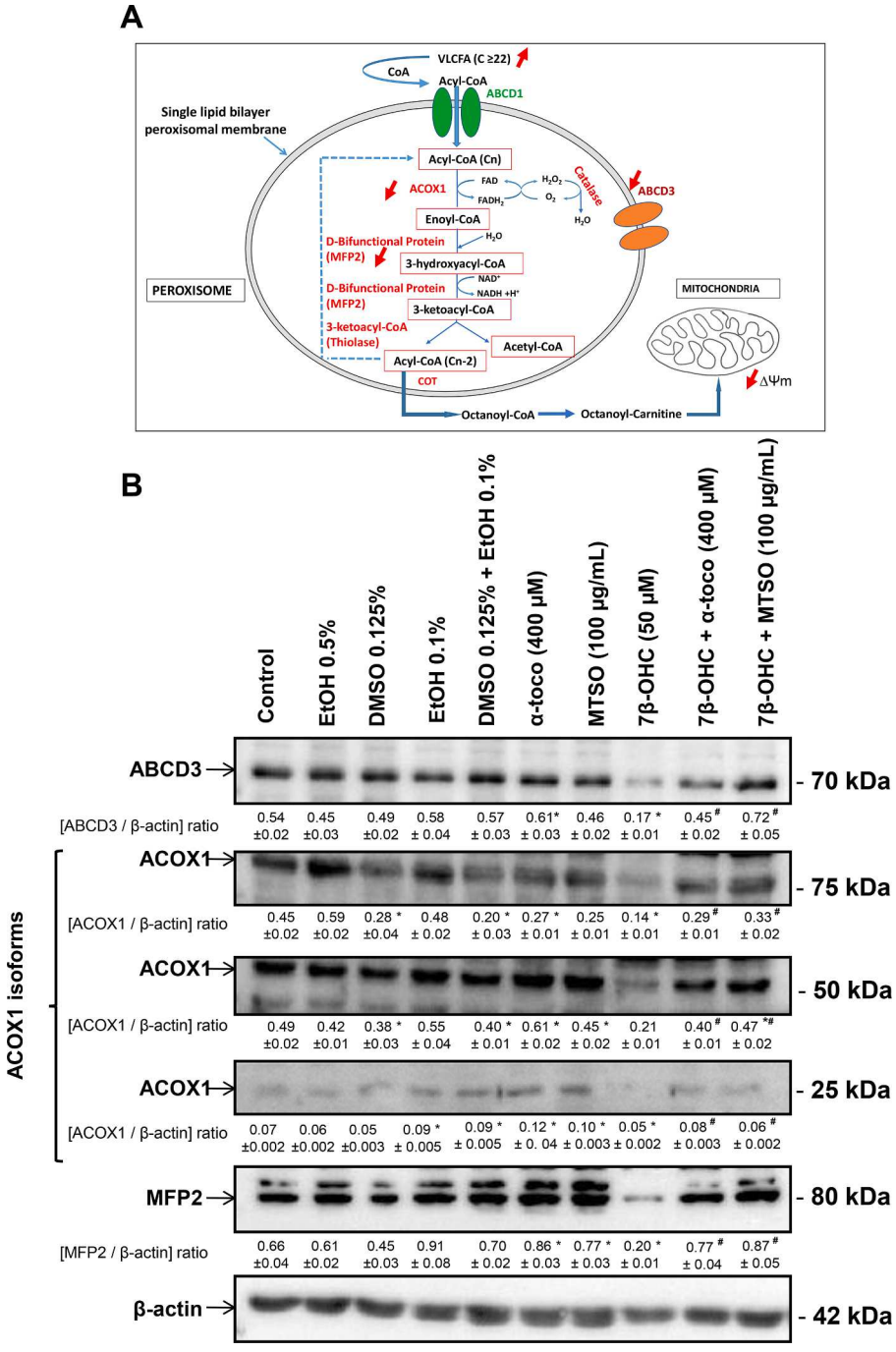
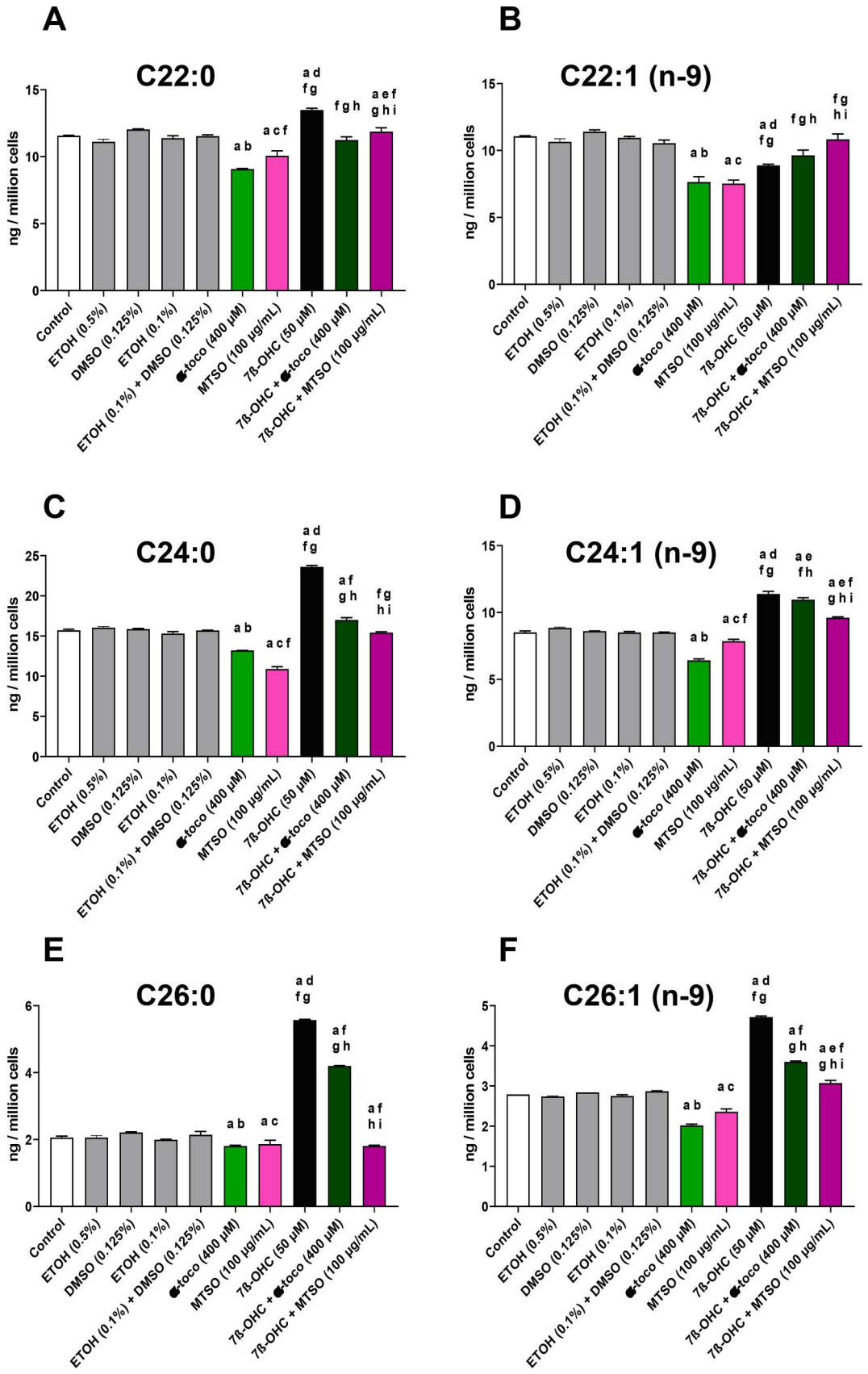


Fig. 4. Effect of milk thistle seed oil (MTSO) and α-tocopherol on the level of ABCD3 peroxisomal transporter and enzymes of the peroxisomal β-oxidation (ACOX1, MFP2) in untreated cells and 7β-hydroxycholesterol-treated C2C12 cells. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of MTSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (α-toco, 400 μM). Schematic representation of the biochemical pathway of the peroxisomal β-oxidation of very-long-chain fatty acids (VLCFA) (**A**). Peroxisomal β-oxidation was characterized by Western blotting with different antibodies (**B**): transporter, peroxisomal acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1), and peroxisomal multifunctional enzyme type 2 (MFP2). The data are presented as the mean ± SD of two independent experiments performed in triplicate and compared with a student's t Test. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences are indicated by different symbols: * comparison between MTSO, α-tocopherol, 7β-OHC, and (7β-OHC + MTSO) versus the corresponding vehicle; # comparison between 7β-OHC, (7β-OHC + MTSO) and (7β-OHC + α-toco). No significant differences were observed between untreated cells (control) and vehicle-treated cells.

OHC to trigger mitochondrial and peroxisomal dysfunctions leading to a rupture of RedOx homeostasis could favor the increase of pro-inflammatory cytokines often observed in patients with severe forms of sarcopenia [85].

On C2C12 cells, the 7β-OHC-induced oxidative stress is associated with a mode of cell death characterized by important morphological



(caption on next page)

Fig. 5. Attenuation by milk thistle seed oil (MTSO) and α-tocopherol of 7β-hydroxycholesterol-induced accumulation of very-long-chain fatty acids (VLCFA) in C2C12 cells. C2C12 cells were incubated for 24 h with or without 7β-OHC (50 μM) in the presence or absence of MTSO (100 μg/mL) or α-tocopherol (α-toco, 400 μM). The level of VLCFA (C ≥ 22) was determined by GC–MS: C22:0 (**A**), C22:1n−9 (**B**), C24:0 (**C**), C24:1n−9 (**D**), C26:0 (**E**) and C26:1n−9 (**F**). Data are the mean ± SD of two independent experiments. A multiple comparative analysis between the groups, considering the interactions, was carried out using an ANOVA test followed by a Tukey's test. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant. The statistically significant differences between the groups, which are indicated by different letters, consider the vehicle used. **a**: comparison versus control; **b**: comparison versus ETOH (0.5%); **c**: comparison versus DMSO (0.125%); **d**: comparison versus ETOH (0.1%); **e**: comparison versus (ETOH (0.1%) + DMSO (0.125%)); **f**: comparison versus α-toco (400 μM); **g**: comparison versus PLSO (100 μg/mL); **h**: comparison versus 7β-OHC (50 μM); **i**: comparison versus (7β-OHC (50 μM) + α-toco (400 μM)). No significant differences were observed between untreated cells (control) and vehicle-treated cells.

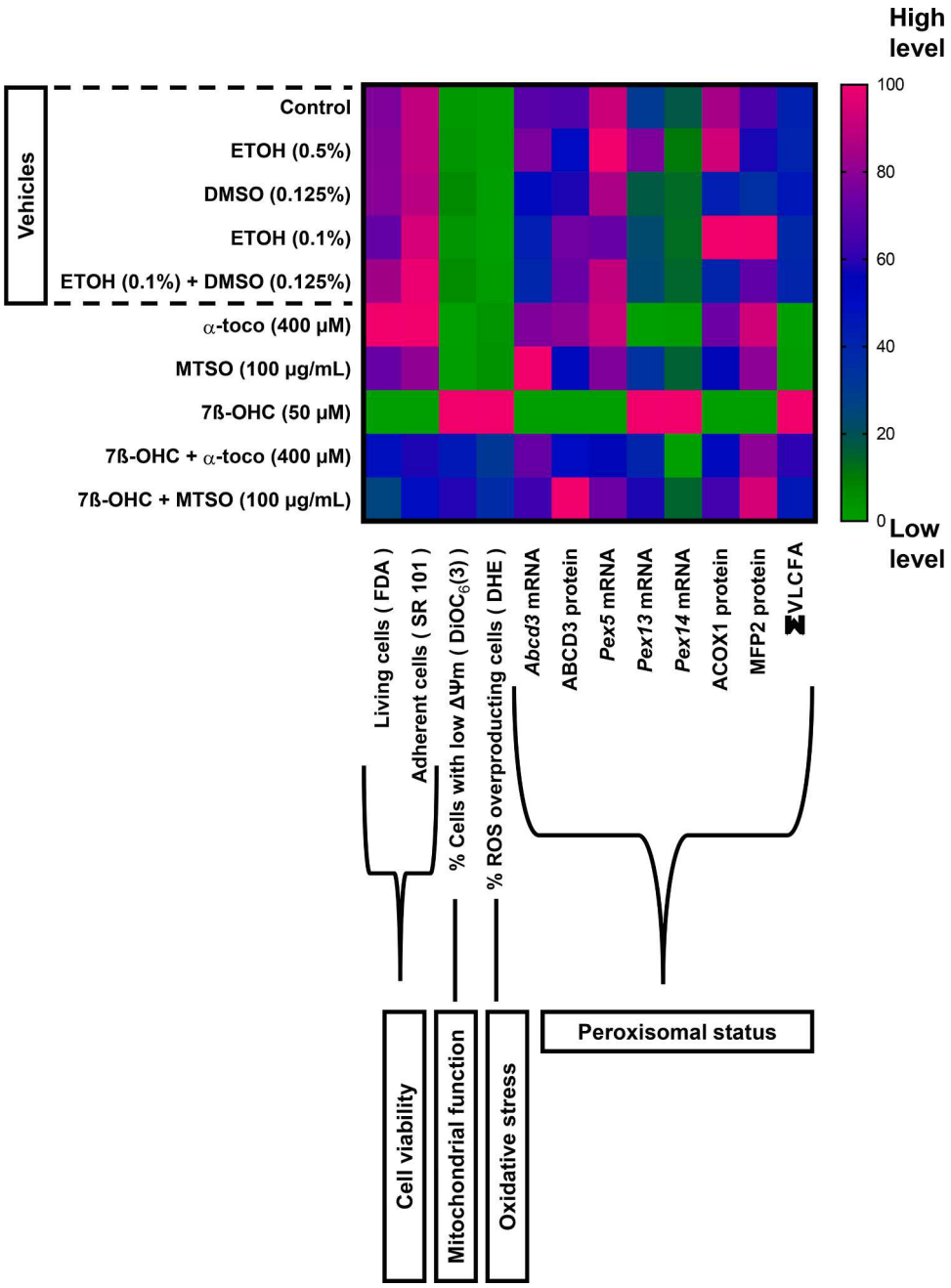


Fig. 6. Heatmap representation of the cytoxicity of 7β-hydroxycholesterol and of the cytoprotective effects of milk thistle seed oil (MTSO) and α-tocopherol on C2C12 cells by considering cell death, transmembrane mitochondrial potential, ROS overproduction and peroxisomal status. Heatmap graded from green (little or no effect: 0) to pink (maximum effect: 100).

changes as revealed by phase-contrast microscopy and TEM. As previously reported on 7β-OHC-treated adherent cells, 7β-OHC-induced cell death is associated with a reduced number of adherent cells and an increased number of cells floating in the culture medium [14,80]. As oxysterols, including 7β-OHC, have an important impact on the biophysical properties of the plasma membrane, including the formation of liquid-ordered domains, this could at least in part contribute to the loss of cell adhesion [86]. In this context, deleterious effects of 7β-OHC on

the biophysical properties of organelle membranes (mitochondria, peroxisome) are also very likely. It has been previously shown by video microscopy on A7r5 rat smooth muscle cells, that this loss of cell adhesion was preceded by the drop of ΔΨm analyzed with the use of $DiOC_6(3)$ [87]. By analogy, the important mitochondrial changes triggered by 7β-OHC on C2C12 cells, especially the loss of ΔΨm, could contribute to this process. Note that this functional change is also associated with ultrastructural modifications of mitochondria revealed by the presence of swollen and large mitochondria also observed on other cell types, such as 158 N murine oligodendrocytes, in the presence of toxic oxysterols such as 7β-OHC [88]. It is suggested that these modifications aimed to increase the surface area of the mitochondrial cristae, which are the site of oxidative phosphorylation for ATP production [89]. These ultrastructural modifications could thus be considered as a cellular response to mitigate mitochondrial energy dysfunctions and to prevent cell death and major peroxisomal activities requiring ATP production, such as the transport of various types of fatty acids (VLCFA, docosahexahenoic acid (C22:6n-3), pristanic acid, di- and trihydroxy-cholestanoic acid (DHCA and THCA), and dicarboxylic acid (DCA)) in the peroxisome via ATP binding cassette transporter subtype D (ABCD1, ABCD2, and ABCD3), whose activity requires ATP [90].

If we consider that ROS overproduction and mitochondrial dysfunctions can have several consequences on the peroxisomal status and subsequently on the activity of skeletal muscle cells, other modifications, independent of these parameters are also to be envisaged. This has led to the clarification of 7β-OHC effects not only on peroxisomal β-oxidation but also on peroxisomal mass, topography, and ultrastructure. To date, little is known on the role of peroxisomes in skeletal muscle cells in normal and pathological conditions. However, in patients with congenital peroxisomopathies (adrenomyeloneuropathies, Refsum disease), skeletal muscle damages have been reported and are characterized by exercise intolerance and myalgia suggesting that peroxisomal abnormalities affect muscle function [91]. With the different complementary parameters considered in this study to evaluate the effects of 7β-OHC on this organelle, it emerges that 7β-OHC (as shown with 7KC on 158 N murine oligodendrocytes [92,93], BV-2 microglial cells [94] and N2a neuronal cells [95]) induces several and important peroxisomal modifications. Therefore, in several age-related diseases (cardiovascular diseases, Alzheimer's disease, age-related macular degeneration, cataract, sarcopenia), where increased levels in 7β-OHC and/or 7KC are often observed in the organs affected by the disease but also in the biological fluids (plasma and/or cerebrospinal fluid), peroxisomal alterations are likely to occur. It was therefore of interest to analyze and characterize the effects of 7β-OHC at the peroxisomal level using C2C12 cells as cell model. Interestingly, 7β-OHC level is increased in the plasma of sarcopenic patients [22]. Therefore, it is also important to find molecules or mixtures of molecules able to counteract these peroxisomal modifications leading to peroxisomal dysfunctions: this is the purpose of pexotherapy.

From an ultrastructural point of view, the results on 7β-OHC-treated C2C12 myoblasts evoke those obtained on 158 N oligodendrocytes when these latter were cultured with either 7β-OHC or 7KC [80]: the peroxisomes are heterogeneous in morphology and size and are often present in vacuoles whose number is increased compared to untreated cells. In highly specialized hospital pathology laboratories, these peroxisomal ultrastructural changes could serve as biomarkers of oxysterol toxicity in tissues of different organs. Electron microscopy (in the absence of molecular biomarkers that can be used routinely) could exceptionally be a tool to consolidate a pathophysiological hypothesis to address peroxisomal alterations. The presence of vacuoles containing altered peroxisomes suggests a process of pexophagy as demonstrated in 7KC-treated 158 N cells [93]. This hypothesis is supported by the decrease in peroxisomal mass quantified by flow cytometry using ABCD as a peroxisomal mass marker [59,69,94]. Furthermore, by RT-qPCR, a decrease in the *Abcd3* mRNA level is also observed. The decrease in peroxisomal mass and the morphological alterations observed are also associated with a reduction of the expression of the gene encoding for the Pex5 protein, involved in peroxisomal biogenesis: Pex5 acts as a shuttle for the import of peroxisomal matrix proteins [70]. Altogether, our data support that the decrease in peroxisomal mass in 7β-OHC-treated C2C12 cells could be the consequence of an induction of pexophagy and a decrease in peroxisomal biogenesis. As a decreased Pex5 level has been described during ageing in cortical neurons in male and female mouse brains [96], our data suggest that 7β-OHC could also affect ageing in myoblasts. On the other hand, in the presence of 7β-OHC, we also observed an increase in the mRNAs of two peroxins, Pex13 and Pex14, which are also involved in peroxisomal biogenesis [71] and are often deficient in Zellweger's disease, a rare and fatal peroxisomopathy [97]. However, it has been described that Pex14 can contribute to autophagy [98]. Pex14 could therefore favor pexophagy that can be induced by 7β-OHC. Similarly, the peroxin Pex13 was involved in peroxisomal biogenesis and has been associated to the activation of selective autophagy of Sindbis virus (virophagy) and to autophagy of altered mitochondria (mitophagy) [99]. Thus, under the effect of 7β-OHC, the activation of a mitophagy process involving Pex13 could be explained at least in part by the fact that this oxysterol induces several mitochondrial dysfunctions.

Furthermore, at the peroxisomal level, western blot analyses showed a decrease in the expression of the peroxisomal enzymes; ACOX1 and MFP2, involved in the peroxisomal β-oxidation of VLCFA [39]. Such results were also observed with 7β-OHC on 158 N cells as well as in the presence of 7KC on 158 N, BV-2, and N2a cells [80]. This decrease in the expression of ACOX1 and MFP2 results in a decrease in peroxisomal β-oxidation which favors an intracellular accumulation of VLCFA that can contribute to the lipotoxicity induced by 7β-OHC: activation of oxidative stress and induction of cell death [100]. It is proposed that intracellular accumulation of VLCFA could be a common metabolic biomarker for cytotoxic oxysterols in different cell types.

According to the results obtained with 7β-OHC on C2C12 myoblasts, but also on other types of cells (vascular wall cells, monocytes/macrophages, nerve cells), the prevention of this oxysterol toxicity is always associated with a strong attenuation of oxidative stress and mitochondrial dysfunction [14,80]. According to the few studies carried out to date, mainly in our laboratory on 158 N and C2C12 cells, natural molecules (α-tocopherol; docosahexaenoic acid (DHA); biotin) or synthetic molecules (dimethyl fumarate (DMF); monomethyl fumarate (MMF)) as well as *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO), which strongly attenuate 7β-OHC-induced cell death, also prevent the peroxisomal changes induced by this oxysterol [80]. These different molecules are therefore of interest not only in mitotherapy but also in pexotherapy. The present study carried out on C2C12 cells, also shows that MTSO, which strongly reduces the overproduction of ROS, the drop of ΔΨm and cell death on C2C12 cells also strongly counteract peroxisomal alterations. Thus, to date, our data establish that two Mediterranean oils characterized by their strong antioxidant power, MTSO and PLSO, are able to reduce the toxicity of 7β-OHC on vascular, nerve and muscle cells. From a nutritional point of view, these oils, which are rich in α-tocopherol [30], are of potential interest to prevent and/or slow down the development of frequent age-related diseases: cardiovascular and neurodegenerative diseases and sarcopenia. Based on the results presented in this study (Table 1) and described above by Zarrouk et al. [30], and those previously described by Ghzaiel et al. for PLSO [22], the concentrations of α-tocopherol provided by the MTSO and PLSO in the culture medium are 44 and 15 nmoles/L, respectively. It is therefore unlikely that cytoprotection could be due to α-tocopherol. It is however important to note that the cytoprotective effects observed with MTSO as well as PLSO are similar and are comparable to α-tocopherol, used at high concentration (400 μM) to serve as a reference cytoprotective molecule. Therefore, other molecules with potential cytoprotective activities must be taken in consideration and synergic activities between these molecules (fatty acids, polyphenols, tocopherols) must be considered because of the ability of these compounds to act simultaneously on several signaling

pathways involved in 7β-OHC toxicity [80]. Among polyphenols, vanillin is the only one identified in MTSO, however, its low level (3.30 ± 0.01 mg equivalent of quercetin/kg of oil) does not allow to envisage a cytoprotective activity under our experimental conditions. As for phytosterols mainly present in MTSO (β-sitosterol > campesterol > schotenol > stigmasterol > Δ5 avenasterol), no data are available concerning their in vitro cytoprotective effects. Since fatty acids, especially oleic acid, are main compounds of MTSO but also PLSO [22,30], assessing their ability to prevent oxysterols-induced cell death is a major point. As it has been previously shown that oleic acid has a cytoprotective activity against 7-KC [53], this could be also the case against 7β-OHC. It is therefore hypothesized that the cytoprotection observed with MTSO as well as PLSO could be the consequence of an esterification with oleic acid on the carbon 3 of 7KC and 7β-OHC [32]. This hypothesis could explain similar cytoprotective activities with MTSO and PLSO. In addition, as oleic acid induces the formation of lipid droplets on murine microglial BV-2 cells [53] and as lipid droplets can reduce oxidative stress and lipotoxicity [101,102], it was important to determine wether MTSO, which is rich in oleic acid, was able to induce lipid droplet formation. The hypothesis of a cytoprotective effect of MTSO, as well as α-tocopherol, involving lipid droplets formation is excluded since no ORO-positive droplets were observed in our different culture conditions except in the presence of oleic acid used as positive control and 7β-OHC-treated cells. With cytotoxic oxysterols, 24S-OHC, 25-hydroxycholesterol [26], and 7KC [103], which also modifies the ratio (polar lipids/neutral lipids) [104,105], the presence of lipid droplets has previously been reported. Therefore, with cytotoxic oxysterols, including 7β-OHC, the presence of lipid droplets could be considered as a response to oxidative stress. According to our result, the absence of lipid droplets with MTSO is a positive point. Indeed, a cytoprotection with lipid compounds that do not lead to the formation of lipid droplets is unlikely to lead in vivo to undesirable steatosis in different cell types. In addition, whereas MTSO and PLSO have several common points in terms of cytoprotective activities [22], we also have observed that PLSO more efficiently decreases the cellular accumulation of 7β-OHC than MTSO. It can therefore be assumed that in long term treatments required to prevent the development of age-related diseases associated with increased levels of 7β-OHC and/or 7KC, the cytoprotective efficacy of PLSO could be greater than that of MTSO.

5. Conclusion

In nerve cells (glial, microglial and neuronal cells), it was previously reported that 7β-OHC as well as 7KC induce quantitative and qualitative peroxisomal modifications [106]. In the present study, on C2C12 cells, we demonstrated that 7β-OHC-induced cell death is also associated with important morphological, topographical and functional modifications of peroxisome These effects are strongly attenuated by MTSO as well as by α-tocopherol. The ability of both MTSO and *Pistacia lentiscus* L. seed oil (PLSO) to counteract both peroxisomal and mitochondrial dysfunctions shows that the concept of pexotherapy and mitotherapy can be applied in nutrition with foods, such as oils from plant seeds used in herbal medicine. In a therapeutic context focused on pexotherapy, the bioavailability and the efficiency of the beneficial compounds present in MTSO could be improved using different approaches. This can include microencapsulation strategies, nano-emulsions, functionalized nanoparticles, chimeric trackable molecules allowing to target specific cell compartments as well as organelles (mitochondria or peroxisome) with specifically designed nanoplatforms associated with cytoprotective compounds present in MTSO (Targeted Organelle Nano-therapy [TORN-therapy]) [107,108] as well as functional foods. Thus, beyond sarcopenia, the use of MTSO and its major nutrients opens new perspectives for the prevention and/or treatment of diseases, such as age-related diseases, in which alterations of the peroxisome can be involved.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Emmanuelle Prost-Camus and Michel Prost for polyphenols analysis (Laboratoire LARA-Spiral, Couternon, France) as well as Franck Ménétrier (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté) and Laure Avoscan (Agroécologie, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, University Bourgogne Franche-Comté, Plateforme DimaCell) for their major contribution in transmission electron microscopy. The authors also thank Prof. Hervé Alexandre (Institut Universitaire de la Vigne et du Vin, Université de Bourgogne, Dijon, France) for providing the flow cytometer. The present work was presented in part in an oral communication during the 10th ENOR symposium (web meeting, 16–17 September 2021) (https://www.oxysterols.net/). Imen Ghzaiel also received financial support from ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine; Dijon, France). This work was also funded by the Université de Bourgogne (Dijon, France), University of Monastir (Monastir, Tunisia) and the University Tunis El Manar (Tunis, Tunisia).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109032.

References

[1] E.H. Gordon, R.E. Hubbard, Differences in frailty in older men and women, Med. J. Aust. 212 (4) (2020) 183–188.
[2] M. Bhadra, P. Howell, S. Dutta, C. Heintz, W.B. Mair, Alternative splicing in aging and longevity, Hum. Genet. 139 (3) (2020) 357–369.
[3] M. Tosato, V. Zamboni, A. Ferrini, M. Cesari, The aging process and potential interventions to extend life expectancy, Clin. Interv. Aging 2 (3) (2007) 401–412.
[4] E. Jaul, J. Barron, Age-related diseases and clinical and public health implications for the 85 years old and over population, Front. Public Health 5 (2017) 335.
[5] I. Liguori, G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, P. Abete, Oxidative stress, aging, and diseases, Clin. Interv. Aging 13 (2018) 757–772.
[6] C. Izzo, P. Vitillo, P. Di Pietro, V. Visco, A. Strianese, N. Virtuoso, M. Ciccarelli, G. Galasso, A. Carrizzo, C. Vecchione, The role of oxidative stress in cardiovascular aging and cardiovascular diseases, Life (Basel) 11 (1) (2021).
[7] M. Zarbafian, S. Dayan, S.G. Fabi, Teachings from COVID-19 and aging-An oxidative process, J. Cosmet. Dermatol. 19 (12) (2020) 3171–3176.
[8] P.A. Grimsrud, H. Xie, T.J. Griffin, D.A. Bernlohr, Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes, J. Biol. Chem. 283 (32) (2008) 21837–21841.
[9] A.K. Hauck, D.A. Bernlohr, Oxidative stress and lipotoxicity, J. Lipid Res. 57 (11) (2016) 1976–1986.
[10] V. Rani, G. Deep, R.K. Singh, K. Palle, U.C. Yadav, Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies, Life Sci. 148 (2016) 183–193.
[11] V. Mutemberezi, O. Guillemot-Legris, G.G. Muccioli, Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators, Prog. Lipid Res. 64 (2016) 152–169.
[12] B.B. Misra, The chemical exposome of human aging, Front. Genet. 11 (2020), 574936.
[13] A. Anderson, A. Campo, E. Fulton, A. Corwin, W.G. Jerome 3rd, M.S. O'Connor, 7-Ketocholesterol in disease and aging, Redox Biol. 29 (2020), 101380.
[14] A. Vejux, D. Abed-Vieillard, K. Hajji, A. Zarrouk, J.J. Mackrill, S. Ghosh, T. Nury, A. Yammine, M. Zaibi, W. Mihoubi, H. Bouchab, B. Nasser, Y. Grosjean, G. Lizard, 7-Ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol: In vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity, Biochem. Pharmacol. 173 (2020), 113648.
[15] A. Zarrouk, A. Vejux, J. Mackrill, Y. O'Callaghan, M. Hammami, N. O'Brien, G. Lizard, Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes, Ageing Res. Rev. 18 (2014) 148–162.
[16] G. Testa, D. Rossin, G. Poli, F. Biasi, G. Leonarduzzi, Implication of oxysterols in chronic inflammatory human diseases, Biochimie 153 (2018) 220–231.
[17] A. Samadi, S. Sabuncuoglu, M. Samadi, S.Y. Isikhan, S. Chirumbolo, M. Peana, I. Lay, A. Yalcinkaya, G. Bjørklund, A comprehensive review on oxysterols and related diseases, Curr. Med. Chem. 28 (1) (2021) 110–136.

[18] I. Ghzaiel, K. Sassi, A. Zarrouk, T. Nury, M. Ksila, V. Leoni, B. Bouhaouala-Zahar, S. Hammami, M. Hammami, J.J. Mackrill, M. Samadi, T. Ghrairi, A. Vejux, G. Lizard, 7-Ketocholesterol: effects on viral infections and hypothetical contribution in COVID-19, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 212 (2021), 105939.

[19] J.B. Lin, A. Sene, A. Santeford, H. Fujiwara, R. Sidhu, M.M. Ligon, V.A. Shankar, N. Ban, I.U. Mysorekar, D.S. Ory, R.S. Apte, Oxysterol signatures distinguish age-related macular degeneration from physiologic aging, EBioMedicine 32 (2018) 9–20.

[20] H. Shokr, I.H. Dias, D. Gherghel, Oxysterols and retinal microvascular dysfunction as early risk markers for cardiovascular disease in normal, ageing individuals, Antioxidants (Basel) 10 (11) (2021).

[21] G. Leonarduzzi, S. Gargiulo, P. Gamba, G. Testa, B. Sottero, D. Rossin, E. Staurenghi, G. Poli, Modulation of cell signaling pathways by oxysterols in age-related human diseases, Free Radic. Biol. Med. 75 (Suppl 1) (2014) S5.

[22] I. Ghzaiel, A. Zarrouk, T. Nury, M. Libergoli, F. Florio, S. Hammouda, F. Ménétrier, L. Avoscan, A. Yammine, M. Samadi, N. Latruffe, S. Biressi, D. Levy, S.P. Bydlowski, S. Hammami, A. Vejux, M. Hammami, G. Lizard, Antioxidant properties and cytoprotective effect of Pistacia lentiscus L. seed oil against 7β-hydroxycholesterol-induced toxicity in C2C12 myoblasts: reduction in oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunctions and attenuation of cell death, Antioxidants (Basel) 10 (11) (2021).

[23] J.Y. Lim, W.R. Frontera, Single skeletal muscle fiber mechanical properties: a muscle quality biomarker of human aging, Eur. J. Appl. Physiol. (2022).

[24] K. Ragot, J.J. Mackrill, A. Zarrouk, T. Nury, V. Aires, A. Jacquin, A. Athias, J. P. Pais de Barros, A. Véjux, J.M. Riedinger, D. Delmas, G. Lizard, Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes, Biochem. Pharmacol. 86 (1) (2013) 67–79.

[25] T. Nury, A. Zarrouk, J.J. Mackrill, M. Samadi, P. Durand, J.M. Riedinger, M. Doria, A. Vejux, E. Limagne, D. Delmas, M. Prost, T. Moreau, M. Hammami, R. Delage-Mourroux, N.M. O'Brien, G. Lizard, Induction of oxiapoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7β-hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: protective effects of α-tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3), Steroids 99 (Pt B) (2015) 194–203.

[26] A. Suzuki, Y. Urano, T. Ishida, N. Noguchi, Different functions of vitamin E homologues in the various types of cell death induced by oxysterols, Free Radic. Biol. Med. 176 (2021) 356–365.

[27] L. Abenavoli, R. Capasso, N. Milic, F. Capasso, Milk thistle in liver diseases: past, present, future, Phytother. Res. 24 (10) (2010) 1423–1432.

[28] M. Bijak, Silybin, a Major Bioactive Component of Milk Thistle (Silybum marianum L. Gaernt.)-Chemistry, Bioavailability, and Metabolism, Molecules 22 (11) (2017).

[29] W. Meddeb, L. Rezig, M. Abderrabba, G. Lizard, M. Mejri, Tunisian milk thistle: an investigation of the chemical composition and the characterization of its cold-pressed seed oils, Int. J. Mol. Sci. 18 (12) (2017).

[30] A. Zarrouk, L. Martine, S. Grégoire, T. Nury, W. Meddeb, E. Camus, A. Badreddine, P. Durand, A. Namsi, A. Yammine, B. Nasser, M. Mejri, L. Bretillon, J.J. Mackrill, M. Cherkaoui-Malki, M. Hammami, G. Lizard, Profile of fatty acids, tocopherols, phytosterols and polyphenols in mediterranean oils (Argan oils, olive oils, milk thistle seed oils and nigella seed oil) and evaluation of their antioxidant and cytoprotective activities, Curr. Pharm. Des. 25 (15) (2019) 1791–1805.

[31] S. Hammouda, I. Ghzaiel, P. Picón-Pagès, W. Meddeb, W. Khamlaoui, S. Hammami, F.J. Muñoz, M. Hammami, A. Zarrouk, Nigella and milk thistle seed oils: potential cytoprotective effects against 7β-hydroxycholesterol-induced toxicity on SH-SY5Y cells, Biomolecules 11 (6) (2021).

[32] S. Monier, M. Samadi, C. Prunet, M. Denance, A. Laubriet, A. Athias, A. Berthier, E. Steinmetz, G. Jürgens, A. Nègre-Salvayre, G. Bessède, S. Lemaire-Ewing, D. Néel, P. Gambert, G. Lizard, Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate, Biochem. Biophys. Res. Commun. 303 (3) (2003) 814–824.

[33] T. Nury, A. Zarrouk, A. Vejux, M. Doria, J.M. Riedinger, R. Delage-Mourroux, G. Lizard, Induction of oxiapoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: impairment by α-tocopherol, Biochem. Biophys. Res. Commun. 446 (3) (2014) 714–719.

[34] W. Meddeb, L. Rezig, A. Zarrouk, T. Nury, A. Vejux, M. Prost, L. Bretillon, M. Mejri, G. Lizard, Cytoprotective activities of milk thistle seed oil used in traditional tunisian medicine on 7-ketocholesterol and 24S-hydroxycholesterol-induced toxicity on 158N murine oligodendrocytes, Antioxidants (Basel) 7 (7) (2018).

[35] T. Nury, A. Zarrouk, A. Yammine, J.J. Mackrill, A. Vejux, G. Lizard, Oxiapoptophagy: A type of cell death induced by some oxysterols, Br. J. Pharmacol. 178 (16) (2021) 3115–3123.

[36] M. Schrader, J.K. Burkhardt, E. Baumgart, G. Lüers, A. Völkl, H.D. Fahimi, The importance of microtubules in determination of shape and intracellular distribution of peroxisomes, Ann. N. Y. Acad. Sci. 804 (1996) 669–671.

[37] M. Schrader, H.D. Fahimi, Growth and division of peroxisomes, Int. Rev. Cytol. 255 (2006) 237–290.

[38] M. Schrader, H.D. Fahimi, The peroxisome: still a mysterious organelle, Histochem. Cell Biol. 129 (4) (2008) 421–440.

[39] R.J. Wanders, H.R. Waterham, Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited, Annu. Rev. Biochem. 75 (2006) 295–332.

[40] R.J. Wanders, Metabolic functions of peroxisomes in health and disease, Biochimie 98 (2014) 36–44.

[41] R.J.A. Wanders, F.M. Vaz, H.R. Waterham, S. Ferdinandusse, Fatty acid oxidation in peroxisomes: enzymology, metabolic crosstalk with other organelles and peroxisomal disorders, Adv. Exp. Med. Biol. 1299 (2020) 55–70.

[42] M. Fransen, C. Lismont, Peroxisomes and cellular oxidant/antioxidant balance: protein redox modifications and impact on inter-organelle communication, Subcell. Biochem. 89 (2018) 435–461.

[43] S.R. Terlecky, J.I. Koepke, P.A. Walton, Peroxisomes and aging, BBA 1763 (12) (2006) 1749–1754.

[44] C.R. Giordano, S.R. Terlecky, Peroxisomes, cell senescence, and rates of aging, BBA 1822 (9) (2012) 1358–1362.

[45] M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang, O. Apanasets, P.P. Van Veldhoven, Aging, age-related diseases and peroxisomes, Subcell. Biochem. 69 (2013) 45–65.

[46] G. Lizard, O. Rouaud, J. Demarquoy, M. Cherkaoui-Malki, L. Iuliano, Potential roles of peroxisomes in Alzheimer's disease and in dementia of the Alzheimer's type, J. Alzheimers Dis. 29 (2) (2012) 241–254.

[47] D. Trompier, A. Vejux, A. Zarrouk, C. Gondcaille, F. Geillon, T. Nury, S. Savary, G. Lizard, Brain peroxisomes, Biochimie 98 (2014) 102–110.

[48] A. Zarrouk, T. Nury, H.I. El Hajj, C. Gondcaille, P. Andreoletti, T. Moreau, M. Cherkaoui-Malki, J. Berger, M. Hammami, G. Lizard, A. Vejux, Potential involvement of peroxisome in multiple sclerosis and Alzheimer's disease: peroxisome and neurodegeneration, Adv. Exp. Med. Biol. 1299 (2020) 91–104.

[49] C. Lismont, M. Nordgren, P.P. Van Veldhoven, M. Fransen, Redox interplay between mitochondria and peroxisomes, Front. Cell Dev. Biol. 3 (2015) 35.

[50] G. Nascimento-Dos-Santos, E. de-Souza-Ferreira, R. Linden, A. Galina, H. Petrs-Silva, Mitotherapy: unraveling a promising treatment for disorders of the central nervous system and other systemic conditions, Cells 10 (7) (2021).

[51] A.G. Atanasov, S.B. Zotchev, V.M. Dirsch, C.T. Supuran, Natural products in drug discovery: advances and opportunities, Nat. Rev. Drug Discov. 20 (3) (2021) 200–216.

[52] L. Santos, The impact of nutrition and lifestyle modification on health, Eur. J. Intern. Med. (2021).

[53] M. Debbabi, A. Zarrouk, M. Bezine, W. Meddeb, T. Nury, A. Badreddine, E. M. Karym, R. Sghaier, L. Bretillon, S. Guyot, M. Samadi, M. Cherkaoui-Malki, B. Nasser, M. Mejri, S. Ben-Hammou, M. Hammami, G. Lizard, Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiapoptophagy in microglial BV-2 cells, Chem. Phys. Lipids 207 (Pt B) (2017) 151–170.

[54] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65 (1–2) (1983) 55–63.

[55] G. Lizard, S. Gueldry, V. Deckert, P. Gambert, L. Lagrost, Evaluation of the cytotoxic effects of some oxysterols and of cholesterol on endothelial cell growth: methodological aspects, Pathol. Biol. (Paris) 45 (4) (1997) 281–290.

[56] A. Namsi, T. Nury, A.S. Khan, J. Leprince, D. Vaudry, C. Caccia, V. Leoni, A. G. Atanasov, M.C. Tonon, O. Masmoudi-Kouki, G. Lizard, Octadecaneuropeptide (ODN) induces N2a cells differentiation through a PKA/PLC/PKC/MEK/ERK-dependent pathway: incidence on peroxisome, mitochondria, and lipid profiles, Molecules 24 (18) (2019).

[57] G. Rothe, G. Valet, Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin, J. Leukoc. Biol. 47 (5) (1990) 440–448.

[58] T.C. Walther, R.V. Farese Jr., Lipid droplets and cellular lipid metabolism, Annu. Rev. Biochem. 81 (2012) 687–714.

[59] M. Debbabi, T. Nury, I. Helali, E.M. Karym, F. Geillon, C. Gondcaille, D. Trompier, A. Najid, S. Terreau, M. Bezine, A. Zarrouk, A. Vejux, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, S. Savary, G. Lizard, Flow cytometric analysis of the expression pattern of peroxisomal proteins, Abcd1, Abcd2, and Abcd3 in BV-2 murine microglial cells, Methods Mol. Biol. 1595 (2017) 257–265.

[60] L. Schepers, P.P. Van Veldhoven, M. Casteels, H.J. Eyssen, G.P. Mannaerts, Presence of three acyl-CoA oxidases in rat liver peroxisomes. An inducible fatty acyl-CoA oxidase, a noninducible fatty acyl-CoA oxidase, and a noninducible trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase, J. Biol. Chem. 265 (9) (1990) 5242–5246.

[61] S. Savary, D. Trompier, P. Andréoletti, F. Le Borgne, J. Demarquoy, G. Lizard, Fatty acids - induced lipotoxicity and inflammation, Curr. Drug Metab. 13 (10) (2012) 1358–1370.

[62] J. Blondelle, J.P. Pais de Barros, F. Pilot-Storck, L. Tiret, Targeted lipidomic analysis of myoblasts by GC-MS and LC-MS/MS, Methods Mol. Biol. 1668 (2017) 39–60.

[63] J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, J. Biol. Chem. 226 (1) (1957) 497–509.

[64] S. Dzeletovic, O. Breuer, E. Lund, U. Diczfalusy, Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry, Anal. Biochem. 225 (1) (1995) 73–80.

[65] V. Leoni, T. Nury, A. Vejux, A. Zarrouk, C. Caccia, M. Debbabi, A. Fromont, R. Sghaier, T. Moreau, G. Lizard, Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α-tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 169 (2017) 96–110.

[66] R.J. Wanders, J.M. Tager, Lipid metabolism in peroxisomes in relation to human disease, Mol. Aspects Med. 19 (2) (1998) 69–154.

[67] M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang, O. Apanasets, Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease, BBA 1822 (9) (2012) 1363–1373.

[68] A. Sugiura, S. Mattie, J. Prudent, H.M. McBride, Newly born peroxisomes are a hybrid of mitochondrial and ER-derived pre-peroxisomes, Nature 542 (7640) (2017) 251–254.

[69] E. Gray, C. Rice, K. Hares, J. Redondo, K. Kemp, M. Williams, A. Brown, N. Scolding, A. Wilkins, Reductions in neuronal peroxisomes in multiple sclerosis grey matter, Mult. Scler. 20 (6) (2014) 651–659.

[70] W. Wang, S. Subramani, Role of PEX5 ubiquitination in maintaining peroxisome dynamics and homeostasis, Cell Cycle 16 (21) (2017) 2037–2045.

[71] J.Y. Wang, L. Li, R.Y. Chai, H.P. Qiu, Z. Zhang, Y.L. Wang, X.H. Liu, F.C. Lin, G. C. Sun, Pex13 and Pex14, the key components of the peroxisomal docking complex, are required for peroxisome formation, host infection and pathogenicity-related morphogenesis in Magnaporthe oryzae, Virulence 10 (1) (2019) 292–314.

[72] S. Hein, P. Schönfeld, S. Kahlert, G. Reiser, Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture, Hum. Mol. Genet. 17 (12) (2008) 1750–1761.

[73] M. Baarine, P. Andréoletti, A. Athias, T. Nury, A. Zarrouk, K. Ragot, A. Vejux, J. M. Riedinger, Z. Kattan, G. Bessede, D. Trompier, S. Savary, M. Cherkaoui-Malki, G. Lizard, Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid–treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins, Neuroscience 213 (2012) 1–18.

[74] F.A. de Freitas, D. Levy, A. Zarrouk, G. Lizard, S.P. Bydlowski, Impact of oxysterols on cell death, proliferation, and differentiation induction: current status, Cells 10 (9) (2021).

[75] A. Vejux, G. Lizard, Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis, Mol. Aspects Med. 30 (3) (2009) 153–170.

[76] H. Xu, S. Zhou, Q. Tang, H. Xia, F. Bi, Cholesterol metabolism: New functions and therapeutic approaches in cancer, Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer 1874 (1) (2020), 188394.

[77] G. Poli, F. Biasi, G. Leonarduzzi, Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases, Redox Biol. 1 (1) (2013) 125–130.

[78] S. Saberianpour, A. Karimi, M.H. Saeed Modaghegh, M. Ahmadi, Different types of cell death in vascular diseases, Mol. Biol. Rep. 48 (5) (2021) 4687–4702.

[79] C.S. Chambers, V. Holečková, L. Petrásková, D. Biedermann, K. Valentová, M. Buchta, V. Křen, The silymarin composition… and why does it matter??? Food Res. Int. 100 (Pt 3) (2017) 339–353.

[80] T. Nury, A. Yammine, I. Ghzaiel, K. Sassi, A. Zarrouk, F. Brahmi, M. Samadi, S. Rup-Jacques, D. Vervandier-Fasseur, J.P. Pais de Barros, V. Bergas, S. Ghosh, M. Majeed, A. Pande, A. Atanasov, S. Hammami, M. Hammami, J. Mackrill, B. Nasser, P. Andreoletti, M. Cherkaoui-Malki, A. Vejux, G. Lizard, Attenuation of 7-ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced oxiapoptophagy by nutrients, synthetic molecules and oils: Potential for the prevention of age-related diseases, Ageing Res. Rev. 68 (2021), 101324.

[81] M. Fransen, C. Lismont, P. Walton, The peroxisome-mitochondria connection: how and why? Int. J. Mol. Sci. 18 (6) (2017).

[82] Y. Saito, Diverse cytoprotective actions of vitamin E isoforms- role as peroxyl radical scavengers and complementary functions with selenoproteins, Free Radic. Biol. Med. 175 (2021) 121–129.

[83] E. Pedruzzi, C. Guichard, V. Ollivier, F. Driss, M. Fay, C. Prunet, J.C. Marie, C. Pouzet, M. Samadi, C. Elbim, Y. O'Dowd, M. Bens, A. Vandewalle, M. A. Gougerot-Pocidalo, G. Lizard, E. Ogier-Denis, NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells, Mol. Cell. Biol. 24 (24) (2004) 10703–10717.

[84] C.L. Fattman, L.M. Schaefer, T.D. Oury, Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine, Free Radic. Biol. Med. 35 (3) (2003) 236–256.

[85] A. Thoma, T. Akter-Miah, R.L. Reade, A.P. Lightfoot, Targeting reactive oxygen species (ROS) to combat the age-related loss of muscle mass and function, Biogerontology 21 (4) (2020) 475–484.

[86] V.M. Olkkonen, R. Hynynen, Interactions of oxysterols with membranes and proteins, Mol. Aspects Med. 30 (3) (2009) 123–133.

[87] J.M. Zahm, S. Baconnais, S. Monier, N. Bonnet, G. Bessède, P. Gambert, E. Puchelle, G. Lizard, Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy, Cytometry A 52 (2) (2003) 57–69.

[88] R. Sghaier, T. Nury, V. Leoni, C. Caccia, J.P. Pais De Barros, A. Cherif, A. Vejux, T. Moreau, K. Limem, M. Samadi, J.J. Mackrill, A.S. Masmoudi, G. Lizard, A. Zarrouk, Dimethyl fumarate and monomethyl fumarate attenuate oxidative stress and mitochondrial alterations leading to oxiapoptophagy in 158N murine oligodendrocytes treated with 7β-hydroxycholesterol, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 194 (2019), 105432.

[89] R. Quintana-Cabrera, A. Mehrotra, G. Rigoni, M.E. Soriano, Who and how in the regulation of mitochondrial cristae shape and function, Biochem. Biophys. Res. Commun. 500 (1) (2018) 94–101.

[90] S. Kemp, F.L. Theodoulou, R.J. Wanders, Mammalian peroxisomal ABC transporters: from endogenous substrates to pathology and clinical significance, Br. J. Pharmacol. 164 (7) (2011) 1753–1766.

[91] A. D'Amico, E. Bertini, Metabolic neuropathies and myopathies, Handb. Clin. Neurol. 113 (2013) 1437–1455.

[92] A. Badreddine, A. Zarrouk, E.M. Karym, M. Debbabi, T. Nury, W. Meddeb, R. Sghaier, M. Bezine, A. Vejux, L. Martine, S. Grégoire, L. Bretillon, E. Prost-Camus, P. Durand, M. Prost, T. Moreau, M. Cherkaoui-Malki, B. Nasser, G. Lizard, Argan oil-mediated attenuation of organelle dysfunction, oxidative stress and cell death induced by 7-ketocholesterol in murine oligodendrocytes 158N, Int. J. Mol. Sci. 18 (10) (2017).

[93] T. Nury, R. Sghaier, A. Zarrouk, F. Ménétrier, T. Uzun, V. Leoni, C. Caccia, W. Meddeb, A. Namsi, K. Sassi, W. Mihoubi, J.M. Riedinger, M. Cherkaoui-Malki, T. Moreau, A. Vejux, G. Lizard, Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: attenuation by α-tocopherol, Biochimie 153 (2018) 181–202.

[94] T. Nury, A. Zarrouk, K. Ragot, M. Debbabi, J.M. Riedinger, A. Vejux, P. Aubourg, G. Lizard, 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: potential roles of 7-keto-cholesterol in the pathophysiology of X-ALD, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 169 (2017) 123–136.

[95] A. Yammine, A. Zarrouk, T. Nury, A. Vejux, N. Latruffe, D. Vervandier-Fasseur, M. Samadi, J.J. Mackrill, H. Greige-Gerges, L. Auezova, G. Lizard, Prevention by dietary polyphenols (Resveratrol, Quercetin, Apigenin) against 7-ketocholesterol-induced oxiapoptophagy in neuronal N2a cells: potential interest for the treatment of neurodegenerative and age-related diseases, Cells 9 (11) (2020).

[96] N.E. Uzor, D.M. Scheihing, G.S. Kim, J.F. Moruno-Manchon, L. Zhu, C. R. Reynolds, J.M. Stephenson, A. Holmes, L.D. McCullough, A.S. Tsvetkov, Aging lowers PEX5 levels in cortical neurons in male and female mouse brains, Mol. Cell. Neurosci. 107 (2020), 103536.

[97] F.C. Klouwer, K. Berendse, S. Ferdinandusse, R.J. Wanders, M. Engelen, B.T. Poll-The, Zellweger spectrum disorders: clinical overview and management approach, Orphanet J. Rare Dis. 10 (2015) 151.

[98] L. Jiang, S. Hara-Kuge, S. Yamashita, Y. Fujiki, Peroxin Pex14p is the key component for coordinated autophagic degradation of mammalian peroxisomes by direct binding to LC3-II, Genes Cells 20 (1) (2015) 36–49.

[99] M.Y. Lee, R. Sumpter Jr., Z. Zou, S. Sirasanagandla, Y. Wei, P. Mishra, H. Rosewich, D.I. Crane, B. Levine, Peroxisomal protein PEX13 functions in selective autophagy, EMBO Rep. 18 (1) (2017) 48–60.

[100] R.J. Wanders, S. Ferdinandusse, P. Brites, S. Kemp, Peroxisomes, lipid metabolism and lipotoxicity, BBA 1801 (3) (2010) 272–280.

[101] A.P. Bailey, G. Koster, C. Guillermier, E.M. Hirst, J.I. MacRae, C.P. Lechene, A. D. Postle, A.P. Gould, Antioxidant role for lipid droplets in a stem cell niche of Drosophila, Cell 163 (2) (2015) 340–353.

[102] J.D. Pressly, M.Z. Gurumani, J.T. Varona Santos, A. Fornoni, S. Merscher, H. Al-Ali, Adaptive and maladaptive roles of lipid droplets in health and disease, Am. J. Physiol. Cell Physiol. (2022).

[103] P. Calle, A. Muñoz, A. Sola, G. Hotter, CPT1a gene expression reverses the inflammatory and anti-phagocytic effect of 7-ketocholesterol in RAW264.7 macrophages, Lipids Health Dis. 18 (1) (2019) 215.

[104] E. Kahn, A. Vejux, D. Dumas, T. Montange, F. Frouin, V. Robert, J.M. Riedinger, J. F. Stoltz, P. Gambert, A. Todd-Pokropek, G. Lizard, FRET multiphoton spectral imaging microscopy of 7-ketocholesterol and Nile Red in U937 monocytic cells loaded with 7-ketocholesterol, Anal. Quant. Cytol. Histol. 26 (6) (2004) 304–313.

[105] A. Vejux, E. Kahn, D. Dumas, G. Bessède, F. Ménétrier, A. Athias, J.M. Riedinger, F. Frouin, J.F. Stoltz, E. Ogier-Denis, A. Todd-Pokropek, G. Lizard, 7-Ketocholesterol favors lipid accumulation and colocalizes with Nile Red positive cytoplasmic structures formed during 7-ketocholesterol-induced apoptosis: analysis by flow cytometry, FRET biphoton spectral imaging microscopy, and subcellular fractionation, Cytometry A 64 (2) (2005) 87–100.

[106] T. Nury, A. Yammine, F. Menetrier, A. Zarrouk, A. Vejux, G. Lizard, 7-Ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced peroxisomal disorders in glial, microglial and neuronal cells: potential role in neurodegeneration: 7-keto-cholesterol and 7β-hydroxycholesterol-induced peroxisomal disorders and neurodegeneration, Adv. Exp. Med. Biol. 1299 (2020) 31–41.

[107] A. Badreddine, A. Zarrouk, W. Meddeb, T. Nury, L. Rezig, M. Debbabi, F.Z. Bessam, F. Brahmi, A. Vejux, M. Mejri, B. Nasser, G. Lizard, Chapter 10 - Antioxidant and neuroprotective properties of Mediterranean oils: Argan oil, olive oil, and milk thistle seed oil, in: C.R. Martin, V.R. Preedy (Eds.), Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases, Academic Press2020, pp. 143-154.

[108] F. Brahmi, A. Vejux, R. Sghaier, A. Zarrouk, T. Nury, W. Meddeb, L. Rezig, A. Namsi, K. Sassi, A. Yammine, I. Badreddine, D. Vervandier-Fasseur, K. Madani, L. Boulekbache-Makhlouf, B. Nasser, G. Lizard, Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 59 (19) (2019) 3179–3198.

REDOX EXPERIMENTAL MEDICINE

I Ghzaiel and others | 2022:1 | R40–R56

REVIEW

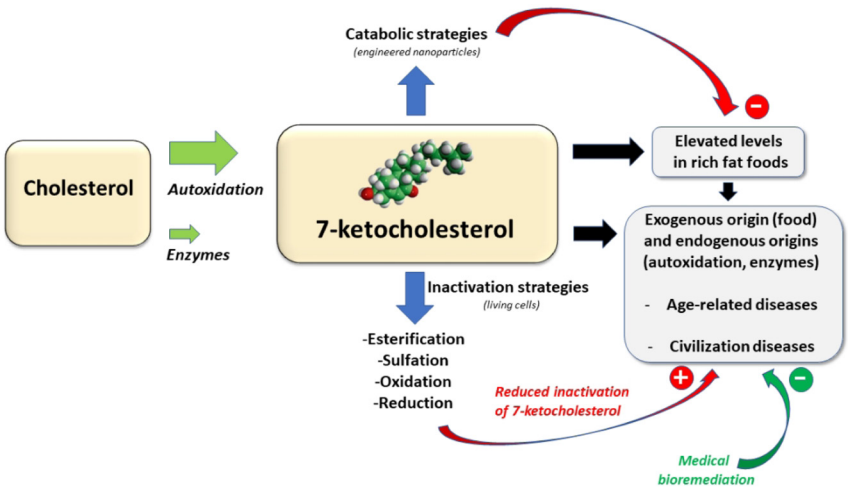
Sources of 7-ketocholesterol, metabolism and inactivation strategies: food and biomedical applications

Imen Ghzaiel[1,2,3], Khouloud Sassi[1], Amira Zarrouk[2,4], Shubhrima Ghosh[5], Irundika H K Dias[6], Thomas Nury[1], Mohamed Ksila[1,7], Soukaina Essadek[1,8], Mounia Tahri Joutey[1,8], Fatiha Brahmi[9], Wafa Mihoubi[10], Sandrine Rup-Jacques[11], Mohammad Samadi[11], Leila Rezig[12,13], Smail Meziane[14], Taoufik Ghrairi[7], Olfa Masmoudi-Kouki[7], Sonia Hammami[2], Boubker Nasser[8], Mohamed Hammami[2], Yuqin Wang[15], William J Griffiths[15], Anne Vejux[1] and Gérard Lizard[1]

[1]Team 'Biochemistry of the Peroxisome, Inflammation and Lipid Metabolism' EA7270/Inserm, University Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France
[2]Lab-NAFS 'Nutrition-Functional Food & Vascular Health', Faculty of Medicine, University of Monastir, Monastir, Tunisia
[3]Faculty of Sciences of Tunis, University Tunis-El Manar, Tunis, Tunisia
[4]Faculty of Medicine, University of Sousse, Sousse, Tunisia
[5]School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Trinity College Dublin, The University of Dublin, College Green, Dublin 2, Ireland
[6]Aston Medical School, Aston University, Birmingham, UK
[7]Department of Biology, Faculty of Sciences, University Tunis-El Manar, Loboratory of Neurophysiology, Cellular Physiopathology and Valorisation of BioMolecules, LR18ES03, Tunis, Tunisia
[8]Laboratory of Biochemistry, Neurosciences, Natural Resources and Environment, Faculty of Sciences & Techniques, University Hassan I, Settat, Morocco
[9]Laboratory Biomathématique, Biochimie, Biophysique et Scientométrie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia, Bejaia, Algeria
[10]Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes, Centre de Biotechnologie de Sfax, Université de Sfax, Sfax, Tunisia
[11]LCPMC-A2, ICPM, Department of Chemistry, University Lorraine, Metz Technopôle, Metz, France
[12]University of Carthage, National Institute of Applied Sciences and Technology, LR11ES26, LIP-MB 'Laboratory of Protein Engineering and Bioactive Molecules', Tunis, Tunisia
[13]University of Carthage, High Institute of Food Industries, El Khadra City, Tunis, Tunisia
[14]Institut Européen des Antioxydants, Neuves-Maisons, France
[15]Swansea University Medical School, Swansea, Wales, UK

Correspondence should be addressed to G Lizard Email gerard.lizard@u-bourgogne.fr

Graphical abstract



Key Words

- age-related diseases
- bioremediation
- 7-ketocholesterol
- metabolism
- nutrition

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

Abstract

7-Ketocholesterol (or 7-oxocholesterol) is an oxysterol essentially formed by cholesterol autoxidation. It is often found at enhanced levels in the body fluids and/or target tissues of patients with age-related diseases (cardiovascular, neuronal, and ocular diseases) as well as in subjects concerned with civilization diseases (type 2 diabetes, bowel diseases, and metabolic syndrome). The involvement of increased 7-ketocholesterol levels in the pathophysiology of these diseases is widely suspected. Indeed, 7-ketocholesterol at elevated concentrations is a powerful inducer of oxidative stress, inflammation, and cellular degeneration which are common features of all these diseases. It is important to better know the origin of 7-ketocholesterol (diet, incidence of environmental factors, and endogenous formation (autoxidation and enzymatic synthesis)) and its inactivation mechanisms which include esterification, sulfation, oxidation, and reduction. This knowledge will make it possible to act at different levels to regulate 7-ketocholesterol level and counteract its toxicity in order to limit the incidence of diseases associated with this oxysterol. These different points as well as food and biomedical applications are addressed in this review.

Redox Experimental Medicine (2022) **2022**, R40–R56

Introduction

7-ketocholesterol (7KC; $C_{27}H_{44}O_2$; PubChem CID 91474; also named 7-oxocholesterol) is a lipid molecule. It is a cholesterol oxide derivative (oxysterol) essentially resulting from the autoxidation of cholesterol which is the most abundant member of a family of polycyclic compounds known as sterols. 7KC was first identified in large quantities in oxidized low-density lipoproteins (LDLox) and in atherosclerotic plaques (Brown & Jessup 1999, Vejux & Lizard 2009). It is also present in high quantities in the retina of patients with age-related macular degeneration (AMD) (Rodríguez & Larrayoz 2010) and in the cortex of Alzheimer's patients (Testa *et al.* 2016). The contribution of 7KC to Alzheimer's disease is well documented (Mahalakshmi *et al.* 2021). 7KC is also increased in the plasma of sarcopenic patients (Ghzaiel *et al.* 2021*b*). 7KC is also elevated in plasma and tissues of patients with rare diseases such as Smith–Lemli–Opitz syndrome (SLO) (PMID: 26976653), Nieman Pick disease type C (PMID: 29626102), and type B (PMID: 31009661), as well as in patients with severe forms of X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD, PMID: 300100) (Nury *et al.* 2017). *In vitro*, 7KC induces oxidative stress, as well as cytokinic and non-cytokinic inflammation, often leading to an apoptotic mode of cell death associated with autophagy criteria. The type of cell death frequently induced by 7KC, as well as by other cytotoxic oxysterols (7β-hydroxycholesterol, 24S-hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, 5,6 epoxycholesterol isomers), is defined as oxiapoptophagy (Nury *et al.* 2021*b*) and has been observed on different cell types: human monocytic U397 cells (Monier *et al.* 2003), human myeloma cells (Jaouadi *et al.* 2021), nerve cells (158N oligodendrocytes (Nury *et al.* 2014, 2015), murine microglial BV-2 cells (Nury *et al.* 2017), murine neuronal N2a-cells (Yammine *et al.* 2020), human bone marrow mesenchymal stem cells (Paz *et al.* 2019), and L929 mouse fibroblast cells (You *et al.* 2021). Currently, due to the ability of 7KC to trigger cytotoxic activities (oxidative stress, inflammation, cell death induction) characterizing frequent age-related diseases (cardiovascular, ocular, and neurodegenerative diseases), the involvement of this oxysterol in the pathophysiology of these illnesses is well accepted (Zarrouk *et al.* 2014, Samadi *et al.* 2021). Consequently, to efficiently treat these highly disabling diseases which have a high cost for society, a better knowledge of the production and inactivation of 7KC is required. However, if 7KC is mainly studied for its cytotoxic activities, this should not lead to ignore that this molecule could also have beneficial effects on the immune response, control of infectious diseases, and cell proliferation and differentiation (Lembo *et al.* 2016, de Freitas *et al.* 2021, Ghzaiel *et al.* 2021*a*).

Cholesterol and related sterols autoxidation: formation of 7-ketocholesterol

Cholesterol autoxidation falls within the lipid peroxidation field. Cholesterol oxide derivatives (also named oxysterols) are 27 carbons molecules formed by the addition of oxygen to the cholesterol molecule (an overview of oxysterols

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

formation is provided on the LipidWeb website: https://lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/simple/chol-der/index.htm; May 2022). This addition of oxygen to cholesterol can be achieved by non-enzymatic and/or enzymatic reactions (Mutemberezi *et al.* 2016*a*, Brown *et al.* 2021). Electrochemical oxidation of cholesterol-generating numerous oxysterols, including 7KC, in a short time has also been described (Weber *et al.* 2016). The term autoxidation refers to non-enzymatic oxidation which can be considered as a part of chemical reactions which contribute to produce cholesterol derivatives (Morzycki 2014). For cholesterol, a distinction is made between type I autoxidation induced by reactive oxygen species (ROS such as superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) and hydroxyl anion ($HO^{\cdot}$)), reactive nitrogen species (RNS such as nitric oxide (NO) and peroxynitrite $ONOO^{\cdot}$), Fenton reaction ($H_2O_2 + Me^{n+} \rightarrow HO^{\cdot} + OH^- + Me^{(n+1)+}$ where Me is a transition metal such as copper, iron, or aluminium) or Haber–Weiss reaction ($O_2^{\cdot -} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\cdot} + HO^- + O_2$)), and type II autoxidation induced by ozone (O_3), hypochlorite (HOCl), and singlet oxygen ($^1\Delta gO_2$) (Iuliano 2011). The preferred site for cholesterol autoxidation is at carbon 7 where the carbon–hydrogen bond is weak (Iuliano 2011). The three oxysterols, 7-ketocholesterol (7KC), 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC), and 7α-hydroxycholesterol (7α-OHC), are mainly formed by type I autoxidation and 7KC is the most abundant (Anderson *et al.* 2020, Nury *et al.* 2021*a*) (Fig. 1A). Hydroperoxycholesterol C4, C5, and C6 are also produced by type I autoxidation and give 4α-hydroxycholesterol (4α-OHC), 5α- or 5β-hydroxycholesterol (5α-OHC or 5β-OHC: 5α/β-hydroxycholesterol), and 6α- or 6β-hydroxycholesterol (6α-OHC or 6β-OHC: 6α/β-hydroxycholesterol), respectively (Zerbinati & Iuliano 2017) (Fig. 1B). 4β-hydroxycholesterol (4β-OHC) is enzymatically formed by CYP3A4 and CYP3A5 in humans (Diczfalusy *et al.* 2011, Mutemberezi *et al.* 2016*a*). As for cholesterol epoxides (5α,6α-epoxycholesterol and 5β,6β-epoxycholesterol), which are stable molecules (Paillasse *et al.* 2012), they can be formed either by type I autoxidation or type II autoxidation (with O_3) and can give cholestane 3β,5α,6β-triol (cholestane-triol) (Noguer *et al.* 2017) which can also be enzymatically formed from 5α,6α-epoxycholesterol by the cholesterol epoxide hydrolase (Ch-EH) (Iuliano 2011, Silvente-Poirot & Poirot 2012, Zerbinati & Iuliano 2017) (Fig. 1B). Noteworthy, whereas the reactions on the cholesterol side chain are mostly enzymatic reactions, 25-hydroxycholesterol

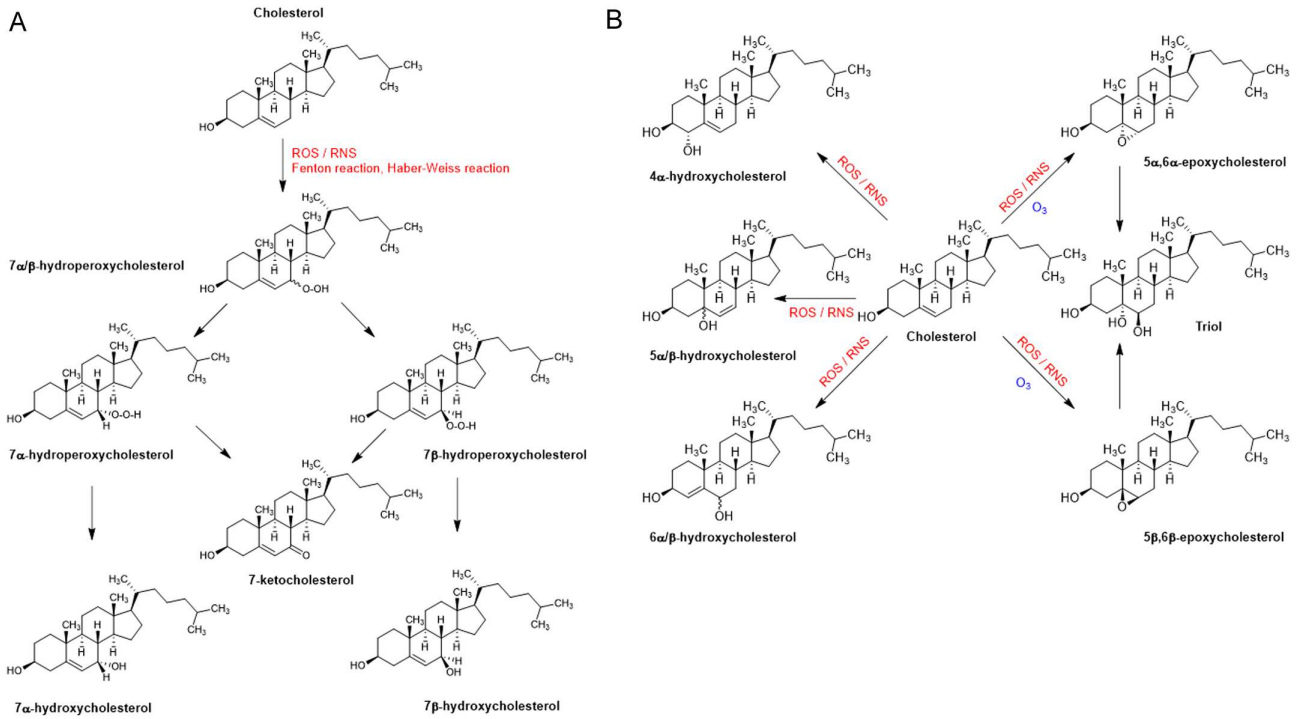


Figure 1

Production of oxysterols, including 7-ketocholesterol, by cholesterol autoxidation. (A) 7-Ketocholesterol can be formed by type I autoxidation as well as Fenton and Haber–Weiss reactions. (B) 4α-Hydroxycholesterol, 5α (or 5β)-hydroxycholesterol (5α/β-hydroxycholesterol), and 6α (or 6β)-hydroxycholesterol (6α/β-hydroxycholesterol) are formed by cholesterol autoxidation involving type I autoxidation (ROS/RNS), whereas 5α,6α-epoxycholesterol and 5β,6β-epoxycholesterol can be formed by type I autoxidation (ROS/RNS) and type II autoxidation (Ozone: O_3). Triol is formed from 5α,6α epoxycholesterol or 5β,6β epoxycholesterol in an acidic environment.

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

(25-OHC) can be formed both by autoxidation as well as enzymatically by the enzyme 25-hydroxylase (cholesterol + AH_2 + O_2 ↔ 25-hydroxycholesterol + A + H_2O) (Lund *et al.* 1998).

Exogenous and endogenous sources of 7-ketocholesterol

Dietary origin of 7-ketocholesterol

Oxysterols formed by autoxidation, such as 7KC, are often present in high amounts in manufactured food products (Yan 1999, Rodriguez-Estrada *et al.* 2014, Poli *et al.* 2022). With the following oxysterols (7α-hydroxycholesterol (7α-OHC), 7β-hydroxycholesterol (7β-OHC), 5α,6α-epoxycholesterol (5α,6α-EPOC), 5β,6β-epoxycholesterol (5β,6β-EPOC), cholestane-3β,5α,6β-triol (cholestane-triol), and 25-hydroxycholesterol (25-OHC)), 7KC is one of the oxysterols present in significant quantities in food products of animal origin (Maraschiello *et al.* 1998, Petrón *et al.* 2003, Canzoneri *et al.* 2022). While 7KC is metabolized by the liver (Lyons *et al.* 1999), the lack of regulation on the content of cytotoxic oxysterols mainly formed by autoxidation (7KC, 7β-OHC, 5β,6β-EPOC, cholestane-triol) and present in manufactured food products constitutes a real public health problem when they are consumed regularly and in large quantities. Thus, 7KC is abundant in industrial foods associated with a complex manufacturing process involving raw materials where cholesterol is present in large quantities (butter, cream, eggs, meat, milk, milk chocolates) (Clariana & García-Regueiro 2011, Risso *et al.* 2021, 2022). In addition, during the industrial processes, high heating steps and exposure to air favour cholesterol autoxidation (Sabolová *et al.* 2017). Prolonged storage of butter, pastries, shellfish, and meat also promotes the formation of 7KC (Nielsen *et al.* 1996, Lee *et al.* 2001, Mazalli & Bragagnolo 2007, Hernández Becerra *et al.* 2014). In traditional cuisine, the way of cooking can also lead to more or less important 7KC formation (Echarte *et al.* 2005, Lee *et al.* 2006). It is also important to highlight that several oxysterols, including 7KC, have been identified in high quantities in baby's and children's foods (Sander *et al.* 1989, Kilvington *et al.* 2021). Some data support the serious consequences of oxysterols on the intellectual and physical development of children (Kilvington *et al.* 2021) and underline that they could promote metabolic syndrome and obesity (Guillemot-Legris *et al.* 2016, Mutemberezi *et al.* 2016*b*), as well as inflammatory bowel disease (Guina *et al.* 2015). Therefore, in the food industry, it seems important to take appropriate measures to control and limit oxysterol levels in food. In a first step, oxysterols profile (realized by HPLC-mass spectrometry or gas chromatography-mass spectrometry) could be implemented as a guarantee of quality, safety, and nutritional value in the selection of ingredients but also during processing and storage (van de Bovenkamp *et al.* 1988, Razzazi-Fazeli *et al.* 2000, Gorassini *et al.* 2017). In addition, some oxysterols present in the digestive tract, such as 7KC, can also come from cholesterol-rich foods and can be the consequence of digestion in the stomach. Indeed, the acidic pH of the latter, and the presence of free iron and heme proteins, such as myoglobin provided by red meats, make it a very pro-oxidant medium which can favour cholesterol autoxidation (Kanner & Lapidot 2001, Lapidot *et al.* 2005). It is suggested that the presence of 7KC in the stomach could destabilize the gastric epithelial cell barrier (Gajewski *et al.* 2016).

Metabolic origin of 7-ketocholesterol

The production of 7KC by type I autoxidation is the most frequent and it is well established in several age-related diseases (Zarrouk *et al.* 2014, Zerbinati & Iuliano 2017, Nury *et al.* 2021*a*). However, 7KC can also be obtained enzymatically (Fig. 2). Thus, 7KC can also be formed enzymatically from 7β-OHC by the hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β-HSD2; HSD11B2 gene, OMIM 614232) which is mainly expressed in the kidney, colon, and placenta (Ferrari 2010). In addition, in patients with cerebrotendinous xanthomatosis or with SLO syndrome, 7KC can be formed from 7-dehydrocholesterol (7DHC, a direct precursor in cholesterol biosynthesis belonging to the Kandutsch–Russel pathway (Petrov *et al.* 2016)) by the enzyme cholesterol-7α-hydroxylase (CYP7A1) (Liu *et al.* 2013, Björkhem *et al.* 2014).

Age-related diseases and civilization diseases associated with 7-ketocholesterol

7KC is greatly increased in the tissues (vascular wall, retina, and certain brain regions) of patients with cardiovascular diseases, AMD, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease (Zarrouk *et al.* 2014, Pariente *et al.* 2019), and most likely in X-ALD which is also associated with important oxidative stress (Deon *et al.* 2016, Nury *et al.* 2017). It is now well accepted that 7KC, which triggers oxidative stress and inflammation leading to numerous cell damages, plays key roles in the pathophysiology and in the outcome of

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

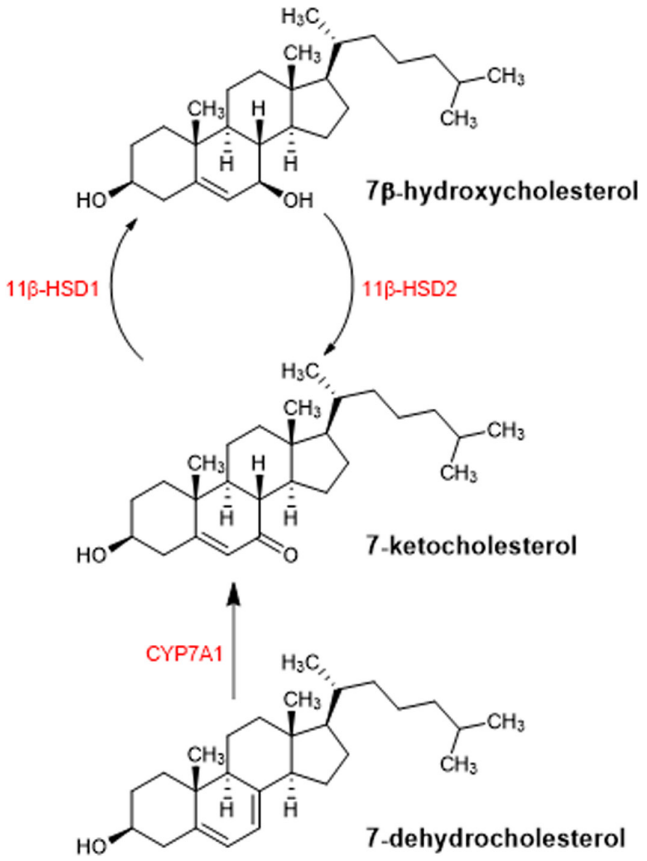


Figure 2
Enzymatic synthesis of 7-ketocholesterol. 7-ketocholesterol can be formed from 7β-hydroxycholesterol by the 11β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β-HSD2) and from 7-dehydrocholesterol by cholesterol-7α-hydroxylase (CYP7A1). 7-Ketocholesterol can also give 7β-hydroxycholesterol via the 11β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β-HSD1).

age-related diseases (Samadi *et al.* 2021). Several data also support that 7KC can contribute to ageing (de Medina *et al.* 2022) as well as civilization diseases such as diabetes type 2 (Endo *et al.* 2008, Samadi *et al.* 2019), bowel diseases (Poli *et al.* 2013), metabolic syndrome, and obesity (Murdolo *et al.* 2016) resulting from life habits (diet, physical activity), environmental pollution (air pollution, endocrine disrupters, and obesogens), and neuroemotional pollution (chronic stress). Currently, different types of relationships have been found between environmental pollution that can promote age-related and civilization diseases and 7KC. Thus, it has been reported that 7KC accumulates in vessels as a result of the stress caused by air pollution (Rao *et al.* 2014), is an endogenous modulator for the aryl hydrocarbon receptor which interacts with dioxin (Savouret *et al.* 2001), contributes to cigarette smoke side effects (Steffen *et al.* 2012), could favour asthma (Zanjani *et al.* 2022) as well as silicosis (Aksu *et al.* 2020), and increases the toxicity of nanoparticles (Kahn *et al.* 2010). In civilization diseases, it is suggested that 7KC, when present at increased levels, may act as an adipokine modulating the adipogenic potential of undifferentiated adipose precursor cells (Murdolo *et al.* 2016). There are also evidences that dietary 7KC accelerates hepatic steatosis and inflammation in obese mice models (Chang *et al.* 2020). Currently, several studies also support that 7KC acts on adipogenic differentiation factor (de Freitas *et al.* 2021). In the context of osteoporosis, it has also been reported that 7KC induces miR107-5p which promotes the differentiation of osteoclasts by downregulating mitogen-activated protein kinase 1 (MKP1) (Li *et al.* 2022).

Characteristics of 7-ketocholesterol-induced cytotoxic effects

7KC has been shown to accumulate in lipid rafts (Royer *et al.* 2009, Ragot *et al.* 2013). 7KC disrupts plasma membrane organization (Kahn *et al.* 2011, Wnętrzak *et al.* 2022) and enhances plasma membrane rigidity (Olkkonen & Hynynen 2009, Vejux *et al.* 2009), as well as permeability (Vejux *et al.* 2020, Nury *et al.* 2021*a*). 7KC is also a strong inducer of oxidative stress and triggers organelles dysfunctions (mitochondria, peroxisome, lysosome, endoplasmic reticulum), inflammation, and cell death (Nury *et al.* 2021*a*) (Fig. 3). 7KC activates cell death on different cell types (primary cultures, cell lines) of different species in a concentration range of 25–50 μM after 24–48 h of culture. 7KC-induced cell death can be either a mode of cell death by apoptosis (caspases-dependent cell death) or a caspases-independent cell death process (Fig. 4). 7KC-induced apoptosis has been described on vascular wall cells, monocytes/macrophages, and nerve cells (neurons, glial cells (oligodendrocytes), and microglial cells). On human monocytic THP-1 cells, 7KC-induced cell death is associated with a sustained increase of Ca^{2+} which elicits the mitochondrial pathway of apoptosis (Berthier *et al.* 2004). A non-apoptotic mode of cell death, without caspases activation, has been described on human fibroblasts, MCF-7 mammary tumor cells, which are deficient in caspase-3, as well as on C6 rat glioblastoma cells (Vejux *et al.* 2020), and in some cases on ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell lines with differentiated properties (Dugas *et al.* 2010). A caspase-independent cell death has also been observed on C2C12 murine myoblasts (Ghzaiel *et al.* 2021*b*). In all the cases, whether it is an apoptotic mode of cell death or a caspases-independent cell death process, significant mitochondrial and peroxisomal alterations have been found. Thus, topographical and morphological changes

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

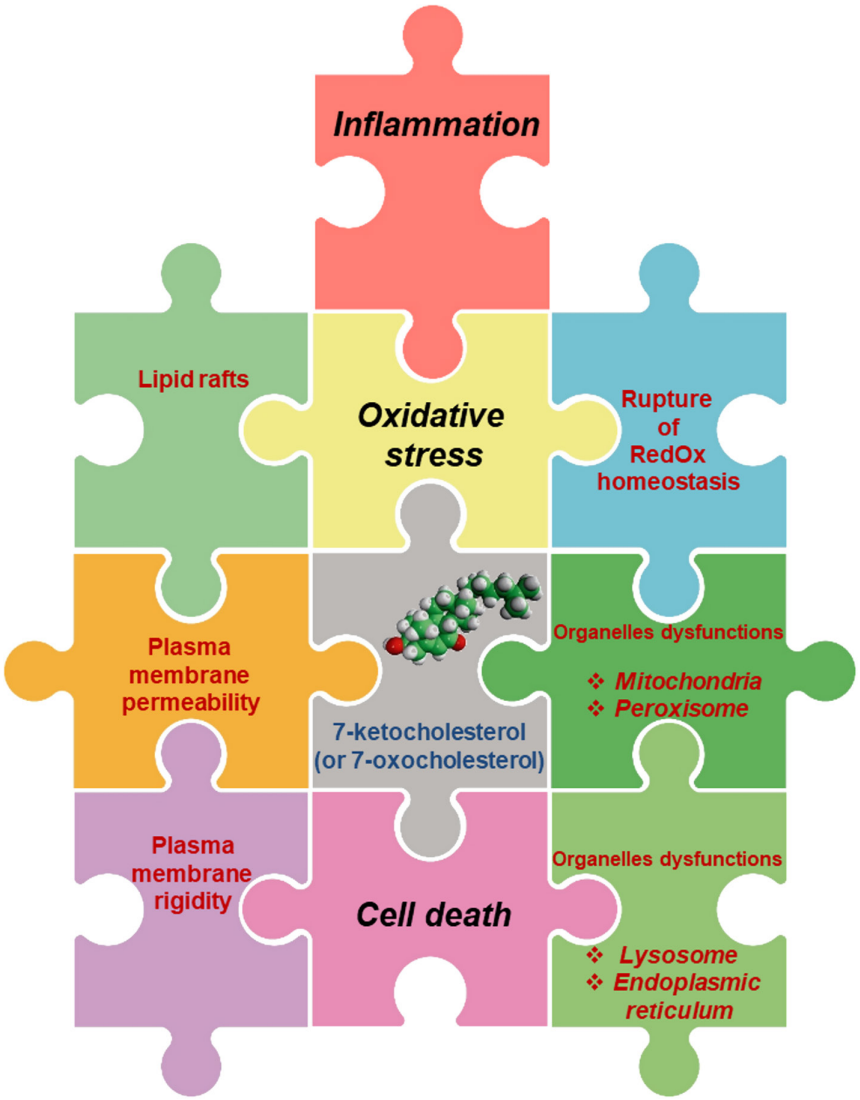


Figure 3
Major characteristics of 7-ketocholesterol-associated cytotoxic effects. The main cytotoxic effects of 7-ketocholesterol, which are also hallmarks of age-related diseases and civilization diseases, are oxidative stress and inflammation which can contribute to trigger cell death.

in mitochondria have been observed; these changes were associated with a drop in transmembrane mitochondrial potential (ΔΨm) (Nury *et al.* 2021*a*). On A7r5 rat aorta smooth muscle cells, it has been shown that the drop of ΔΨm induced by 7KC precedes the activation of apoptosis associated with a loss of cell adhesion (Zahm *et al.* 2003). In addition, under treatment with 7KC, the Krebs cycle (also called the citric acid cycle), as well as the oxidative phosphorylation, is also strongly altered leading to lower glycolysis and a decrease in ATP production (Leoni *et al.* 2017). Overproduction of reactive oxygen species (ROS), especially superoxide anions ($O_2^{\cdot-}$), is also observed at the mitochondrial level (Nury *et al.* 2021*a*). Like mitochondria, the peroxisome, which is functionally connected to the mitochondria and vice versa (Lismont *et al.* 2015, Fransen *et al.* 2017), is also subject to significant topographical and morphological changes. In addition, a reduction in peroxisomal mass is always observed, as well as a decrease in peroxisomal β-oxidation which results in a cytoplasmic accumulation of very long-chain fatty acids (VLCFA) known for their cytotoxic and pro-oxidant activities (Zarrouk *et al.* 2012, Nury *et al.* 2018). This alteration of the peroxisome, in particular, the decrease in the levels of peroxisomal proteins, ATP-binding cassette subfamily D member 1 (ABCD1, involved in the transport of VLCFA from the cytoplasm inside the peroxisome) and acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1, the first and rate-limiting enzyme in peroxisomal fatty acid β-oxidation of VLCFA), could contribute to 7KC-induced oxidative stress (Trompier *et al.* 2014). Indeed, on 158N rat oligodendrocytes, it has been shown that the decreased expression of ABCD1 and ACOX1 induced by RNA silencing triggered a strong overproduction of ROS and reactive nitrogen species (RNS) (Baarine *et al.* 2012).

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

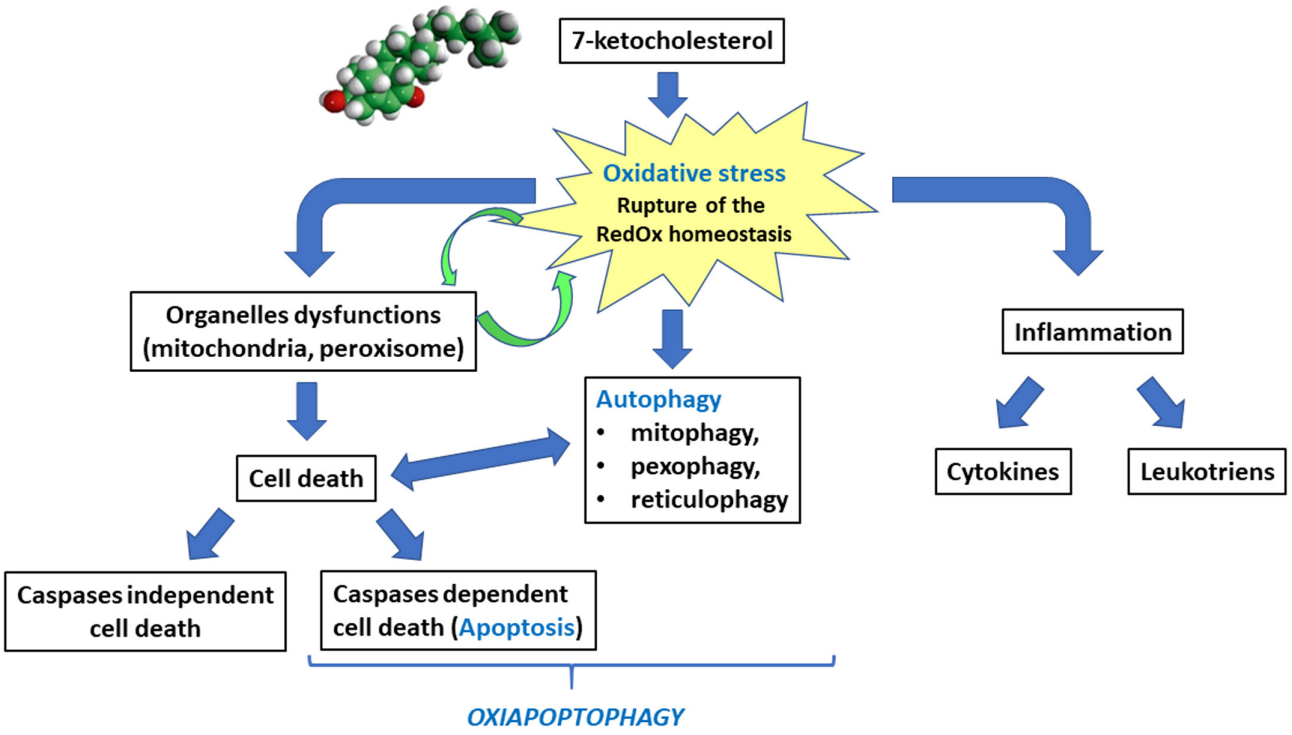


Figure 4
Hypothetical connection between 7-ketocholesterol-induced oxidative stress, inflammation, and cell death. 7-ketocholesterol (also named 7-oxocholesterol) can induce either a caspase-dependent mode of cell death defined as oxiapoptophagy (OXIdative stress + APOPTOsis + autoPHAGY) on different cell types from different species (Nury *et al.* 2021*b*) or a caspase-independent mode of cell death (Dugas *et al.* 2010). These different types of cell death are associated with an important oxidative stress, plasma membrane alterations, and organelles dysfunctions (especially mitochondrial and peroxisomal dyfunctions) leading to cell death. On A7r5 rat smooth muscle cells and 158N oligodendrocytes, an accumulation of 7-ketocholesterol (7KC) in lipid raft has been shown (Royer *et al.* 2009, Ragot *et al.* 2013). Detailed signalling pathways associated with 7KC-induced cytotoxicity are described in the reviews by Vejux *et al.* (2020) and Nury *et al.* (2021*a*).

Thus, regardless of the type of cell death induced by 7KC (caspases-dependent or independent), mitochondrial and peroxisomal dysfunctions could favour oxidative stress. This latter could not only be due to mitochondrial and peroxisomal dysfunctions but also to the activation of NADPH oxidases. In addition, this oxidative stress is associated with a disruption of the RedOx equilibrium which results (i) in changes in the activity of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase) and (ii) in lipid peroxidation leading to the generation of aldehydes such as malondialdehyde (MDA)-promoting protein carbonylation (Vejux *et al.* 2020, Nury *et al.* 2021*a*). Therefore, 7KC-induced oxidative stress appears a major element in cellular dysfunctions leading to caspases-dependent and independent cell death. Moreover, among the events associated with cell death, 7KC also activates an autophagic process considered as survival autophagy (Yammine *et al.* 2020, Zhang *et al.* 2020). This latter is observed either during apoptosis or caspases-independent cell death. When autophagy is associated with oxidative stress and apoptosis, the term 'oxiapoptophagy' (OXIdation + APOPTOsis + autoPHAGY) is used to define 7KC-induced cell death (Fig. 4) (Nury *et al.* 2021*b*). The signalling pathways associated with this type of cell death have been described in the detail by Vejux *et al.* (2020) and Nury *et al.* (2021*a*). In the case of oxiapoptophagy, the autophagy observed (mitophagy, pexophagy, and/or reticulophagy) corresponds to survival autophagy (Yuan *et al.* 2016). Indeed, when 7KC is combined with 3-methyl adenine (an autophagy inhibitor), cell death increases, while when combined with rapamycin (an autophagy activator), cell death decreases (Yammine *et al.* 2020). In addition, 7KC also has pro-inflammatory activities. By interacting with the TLR4 receptor (Erridge *et al.* 2007, Huang *et al.* 2014), it promotes the production of inflammatory cytokines (Prunet *et al.* 2006), increases the rate of adhesion molecules (Lemaire *et al.* 1998, Shimozawa *et al.* 2004), and promotes the transition of macrophages from the anti-inflammatory M1 phenotype to the pro-inflammatory M2 phenotype (Buttari *et al.* 2013). On ARPE-19 cells, a link between 7KC-induced autophagy, inflammation, and angiogenesis

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

has been shown: the inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway by rapamycin suppresses 7KC-induced IL-6, IL-8, and vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by downregulating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (Yang *et al.* 2022). 7KC also favours non-cytokinic inflammation. Thus, in human mesangial cell, 7KC induces ROS-mediated mRNA expression of 12-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 (Watanabe *et al.* 2018). 7KC-induced oxidative stress also suppresses docosahexaenoic acid (DHA)-derived resolvins like RvD1 which prevents atheromatous plaque instability; it is suggested that 7KC could increase the ratio of (nuclear: non-nuclear lipoxygenase) which would decrease RvD1 (Fredman *et al.* 2016). 7KC could also be involved in adipogenesis and vascularization (Chang *et al.* 2020, de Freitas *et al.* 2021).

To reduce the cytotoxic activities of 7KC and to prevent and/or cure the diseases of civilizations and age-related diseases associated with increased levels of 7KC, several strategies are possible. In this context, the identification of natural or synthetic molecules allowing to reduce the toxicity of 7KC takes an important place. Among the natural cytoprotective molecules are many nutrients present in the Mediterranean diet: tocopherols, fatty acids, and polyphenols (Nury *et al.* 2021*a*). Many Mediterranean oils (argan oil, olive oil, milk thistle seed oil, and *Pistacia lentiscus* L. seed oil) also reduce the toxicity of this oxysterol (Nury *et al.* 2021*a*). Among the synthetic molecules, dimethyl fumarate used in the treatment of multiple sclerosis under the name Tecfidera as well as its major metabolite, monomethyl fumarate, also has powerful cytoprotective activities (Zarrouk *et al.* 2017). Another strategy, probably more specific, is to promote the catabolism of 7KC to conteract or attenuate its toxicity. This concept was initially validated *in vitro* by Mathieu *et al.* under the name of medical bioremediation, by specifically targeting the degradation of 7KC in the lysosome in which this oxysterol accumulates (Mathieu *et al.* 2008, Schloendorn *et al.* 2009). Better knowledge of the production of 7KC and on its catabolism will contribute to open innovative and promising therapeutic perspectives.

Inactivation of 7-ketocholesterol

Many of the enzymatic pathways which contribute to metabolize cholesterol are also able to act on oxysterols (Gill *et al.* 2008). The major oxysterol metabolite routes for oxysterol inactivation are esterification, sulfation, oxidation, and reduction (Brown & Jessup 2009).

Esterification

Both acyl-CoA cholesterol acyl transferase (ACAT), also named sterol-O-acyltransferase (SOAT), and lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT) can esterify oxysterols in cells and plasma, respectively (Szedlacsek *et al.* 1995, Brown & Jessup 2009, Rogers *et al.* 2015). Excess cholesterol in the cells is esterified under the action of ACAT, which is a normal cellular mechanism for limiting the level of free cholesterol (unesterified cholesterol) in cell membranes to maintain normal membrane structure (Chang *et al.* 2006). The esterified cholesterol is stored in lipid droplets (Luo *et al.* 2020). However, in macrophage foam cells from human atherosclerotic lesions, 7KC levels are the highest in the endosomal and lysosomal compartments (Brown *et al.* 2000), where it inhibits sphingomyelinase and facilitates the intralysosomal accumulation of both sphingomyelin and cholesterol (Maor *et al.* 1995), and in 7KC-treated human monocytic U937 cells, an important 7KC-accumulation has been observed in multilamellar structures named myelin figures (Vejux & Lizard 2009). While ACAT is also able to esterify many oxysterols, cholesterol is superior to 7KC or 7α-OHC as an allosteric activator of this enzyme (Zhang *et al.* 2003). It has also been reported that the esterification of 7KC to fatty acids involves the combined action of cytosolic phospholipase A2 alpha (cPLA2α) and sterol O-acyltransferase (SOAT1) (Lee *et al.* 2015). Inhibition of either one of these enzymes ablates 7KC-fatty acid ester (7KFAE) formation. The 7KFAEs are not toxic and do not induce inflammatory responses. An additional function of high-density lipoproteins (HDL) would be to favour the elimination of 7KC by returning 7KFAEs to the liver for bile acid formation. However, 7KC could also inactivate 7α-hydroxylase (CYP7A1), a major hepatic enzyme involved in bile acid synthesis (Lyons & Brown 1999, Tempel *et al.* 2014).

Sulfation

Cytosolic SULT2 family of cytosolic sulfotransferase family 2 (SULT2B1b) shows a particular affinity for cholesterol and for oxysterols (Javitt *et al.* 2001). SULTs sulfonates at the third position of the ring A of 7KC form 7-ketocholesterol-3- sulphate (7KCS). Sulfation is known to act as a detoxification pathway for the removal of 7KC (Fuda *et al.* 2007, Sanchez *et al.* 2021). Previous work demonstrated that human breast cancer MCF-7 cells expressing high levels of SULT2B1b are significantly more resistant to the cytotoxic effect of 7KC than human embryonic kidney 293T cells that do not express this

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

isozyme (Fuda *et al.* 2007). Over-expressing SULT2B1b in 293T cells increased sterol and 7KC sulfation and decreased the 7KC-mediated toxicity. Since SULTB1b expression is not universal, this detoxification pathway is not present in some important tissues such as retina where 7KC toxic effects are prominent (Rodriguez & Fliesler 2009, Vejux *et al.* 2011). Expression of SULT2B1b was not observed in neural retinal cells in rats, monkeys, or human (Moreira *et al.* 2009, Rodriguez & Fliesler 2009, Rodríguez & Larrayoz 2010). However, when added to cultured retinal cells *in vitro*, 7KCS attenuates cholesterol transporter, ATP-binding cassette transporter ABCA1 (member 1 of human transporter sub-family ABCA), and vascular endothelial growth factor (VEGF) inductions by 7KC (Moreira *et al.* 2009). Gene transactivation of liver X receptors (LXRs) requires recruitment of co-activators in a ligand-dependent manner and 7KCS inhibited reporter gene activation by LXRα (Song *et al.* 2001). Despite these early investigations, there is more scope to understand the role of 7KCS on cholesterol homeostasis and pathophysiological consequences.

Oxidation

In humans, the enzyme sterol 27-hydroxylase cytochrome P450 27A1 (CYP27A1) eliminates cholesterol and likely 7KC from the retina and many other tissues (Charvet *et al.* 2011, Heo *et al.* 2011). CYP27A1 is a mitochondrial cytochrome P450 enzyme and the first enzyme of the acidic bile acid pathway; CYP27A1 is responsible for the initial metabolism of 7KC by HepG2 cells, a human hepatoblastoma cell line (Lyons & Brown 2001). Thus, via the enzyme CYP27A1, 7KC gives 27-hydroxycholesterol-7-ketocholesterol (27OHC-7KC). The contribution of CYP27A1 in the catabolism of 7KC has also been previously described in the context of the analysis of the cytotoxic effects of 7KC on 158N and BV-2 cells (Bezine *et al.* 2018). In the insect, the enzyme CYP306A1 has 25-hydroxylase activity and allows the formation of 25-hydroxycholesterol-7-ketocholesterol (25OHC-7KC) from 7KC (Pan *et al.* 2021).

Reduction

The enzymatic conversion of 7KC to 7β-OHC by hydroxysteroid dehydrogenase 11β-HSD1 (11βHSD1/EC 1.1.1.146 also known as cortisone reductase; HSD11B1 gene, OMIM 600713) can occur in many tissues (Mitić *et al.* 2013*a*,*b*). The conversion of 7KC in 7β-OHC by 11β-HSD1 is well established in the arterial wall (Mitić *et al.* 2013*a*). Noteworthy, the activity and reaction direction of adipose 11β-HSD1 are altered in oxysterol excess and could impact the pathophysiology of obesity and its complications (Wamil *et al.* 2008). The contribution of 11β-HSD1 in the catabolism of 7KC has also been previously described in the context of the analysis of the cytotoxic effects of 7KC on 158N and BV-2 cells (Bezine *et al.* 2018).

Biodegradation with bacterial enzymes: nutritional and biomedical aspects

The catabolic insufficiency of the human body to inactivate and degrade harmful oxysterols, such as 7KC, leads to their progressive accumulation which can have pathophysiological consequences and trigger the development of diseases. An interesting solution termed 'Medical Bioremediation', proposes the use of exogenous enzymes derived from micro-organisms to degrade 7KC either into less toxic metabolites or towards complete mineralization and further explores the delivery of these enzymes in disease conditions. The pioneering works in this field were reported as part of a pilot study funded by the Strategy for Engineered Negligible Senescence(SENS) research foundation (https://www.sens.org/; May 2022) where several bacterial strains such as *Psedomonas aeruginosa, Rhodococcus jostii* RHA1, *Sphingomonas* sp. JEM-1, *Nocardia nova,* and *Proteobacterium* Y-134 were explored for their 7KC degradation capability (de Grey *et al.* 2005, Rittmann & Schloendorn 2007, Mathieu *et al.* 2008, 2009, Schloendorn *et al.* 2009). Further, genes responsible for 7KC degradation by *Rhodococcus* RHA1 were studied through transcriptomic studies, and several steroid catabolism gene clusters were found to be expressed, along with enzymes such as dioxygenase (hsaC), 7-keto reductase, and dehydratase (Mathieu *et al.* 2010). Taking a cue, other researchers reported the high 7KC degradation by *Pseudomonas aeruginosa* PseA and *Rhodococcus erythropolis* MTCC 3951, facilitated by the production of the enzymes cholesterol oxidase, lipase, dehydrogenase, and reductase. Some of the identified degradation products were cholesta-3, 5-dien-7-one/cholesta-4, 6-dien-3-one for *P. aeruginosa,* while in case of *R. erythropolis*, chol-5-en-3,7-dione and androsta-4-ene-3,7,17-trione were identified (Ghosh & Khare 2016, 2017, Vejux *et al.* 2020, Ravi *et al.* 2021). Several other 7KC degrading strains were reported including *Thermobifida fusca* IP1, *Alcanivorax jadensis* IP4, *Streptomyces auratus* IP2, and *Serratia marcescens* IP3 (Perveen 2016, Perveen *et al.* 2018). From the above studies, the importance of the first enzyme of the 7KC biodegradation pathway, cholesterol oxidase, cannot be undermined in reducing

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

7KC cytotoxicity in cells. Thus, a plasmid construct of pEGFP-N3, containing the *Chromobacterium* DS-1 cholesterol oxidase gene fused with the signal sequence and transmembrane domain of the lysosomal membrane protein LAMP1, was found to localize into the lysosome, providing the cytoprotective effect in human fibroblast cells treated with 7KC (Mathieu *et al.* 2012). Cholesterol oxidase immobilized on magnetic iron (II, III) oxide nanoparticles have also been reported to convert cholesterol and 7KC to 4-cholesten-3-one and 4-cholesten-3, 7-dione, respectively, in solution, which find applications as pharmaceutically important steroid precursors (Ghosh *et al.* 2018*a*,*b*). An interesting study to mention is the biosorption of 7KC by the probiotic strain *Lactobacillus casei* ATCC334 which could be further explored in inhibiting 7KC absorption via intestine (Machorro-Méndez *et al.* 2013). Thus, the use of bacteria and their degradative enzyme explore a promising route for remediation of 7KC-mediated cytotoxicity which has important applications in food industry and in pharmacology.

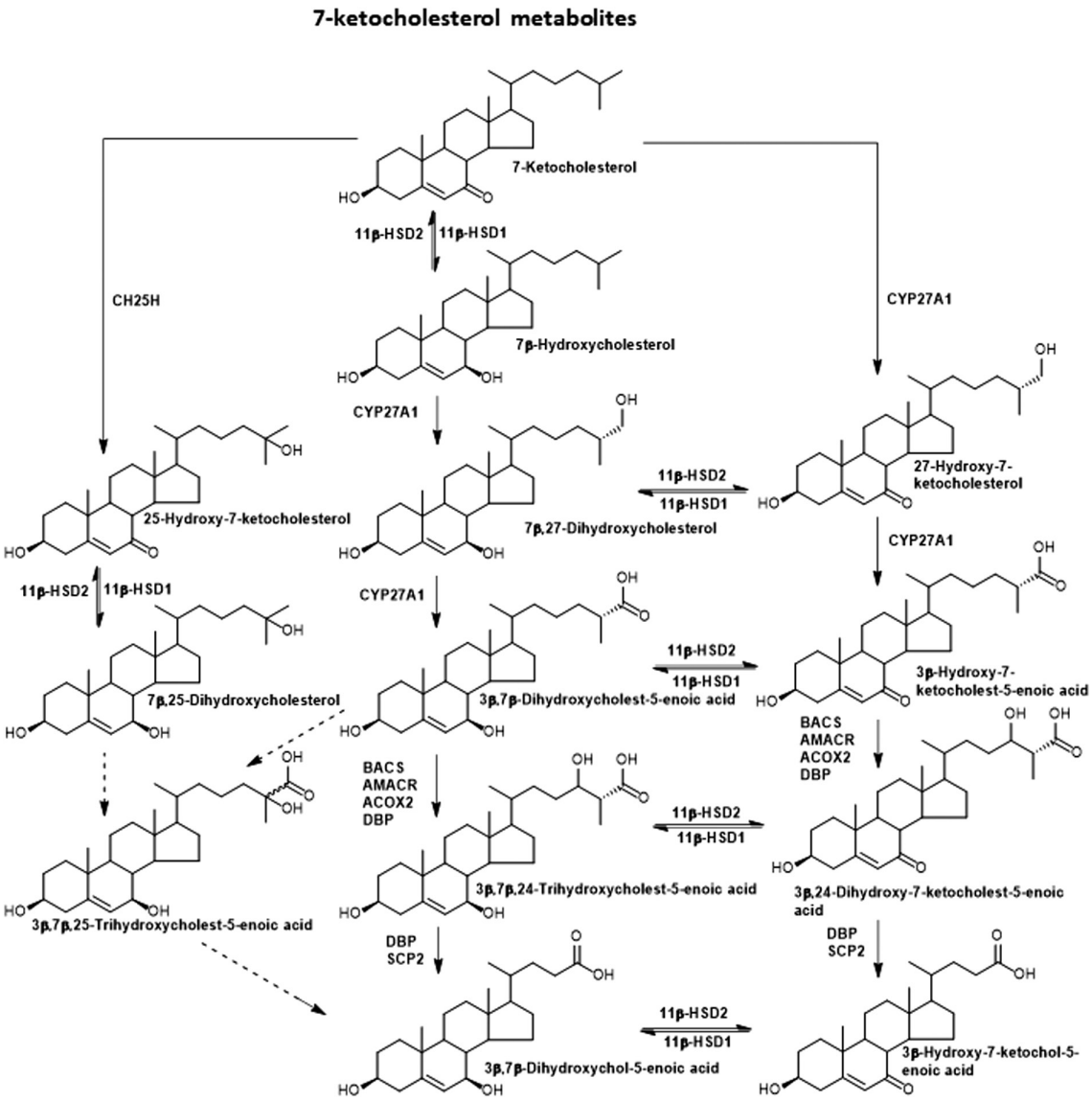


Figure 5
Metabolism of 7-ketocholesterol. The enzymes required for side-chain shortening are presumed to be those utilized in the acidic pathway of bile acid synthesis (Zhou & Hylemon 2014). Reactions catalysed by unknown enzymes are shown by broken arrows. 11β-HSD1, hydroxysteroid dehydrogenase type 1; 11β-HSD2, hydroxysteroid dehydrogenase type 2; CYP27A1, 27-hydroxylase cytochrome P450 27A1. The enzymes involved in bile acid synthesis are peroxisomal enzymes (ACOX2, acyl-coenzyme A oxidase 2; DBP, D bifuntional protein; SCP2, sterol carrier protein 2) and mitochondrial/peroxisomal enzymes (AMACR, alpha-methylacyl-CoA-racemase; BACS, bile acyl CoA-synthase).

https://rem.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/REM-22-0005
© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

Metabolism of 7-ketocholesterol in patients with genetic diseases affecting cholesterol metabolism

The metabolism of 7KC is of interest to limit its accumulation and consequently reduce its side effects. Information on the metabolism of 7KC is often obtained from cell lines (Lyons & Brown 2001, Heo *et al.* 2011) and from samples of patients where levels of 7KC are particularly high as in patients with Niemann–Pick disease type A, B, C1, and C2 (NPA, NPB, and NPC), lysosomal acid lipase deficiency (LALD) (Griffiths *et al.* 2019), and SLO syndrome (Björkhem *et al.* 2014, Griffiths *et al.* 2017). 7KC could also be used as a biomarker of neonatal cholestasis (López de Frutos *et al.* 2021). In the catabolism of 7KC, different pathways have been identified (Fig. 5). Numerous enzymes are involved such as the 11β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11β-HSD1), the 11β hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (11β-HSD2), the sterol 27-hydroxylase cytochrome P450 27A1 (CYP27A1), and the cholesterol 25 hydroxylase (CH25H). The following enzymes are also involved in bile acid synthesis: several peroxisomal enzymes (acyl-coenzyme A oxidase 2 (ACOX2), D bifuntional protein (DBP), sterol carrier protein 2 (SCP2)), as well as alpha-methylacyl-CoA-racemase (AMACR), localized in the mitochondria and the peroxisome, and also the bile acyl CoA-synthase (BACS) (Griffiths *et al.* 2019).

Overview and conclusion

7KC is the most frequently formed oxysterol by autoxidation (Anderson *et al.* 2020, Nury *et al.* 2021*a*). This oxysterol, which is a biomarker of oxidative stress (Iuliano *et al.* 2003, Seet *et al.* 2010, Samadi *et al.* 2019), is present in high amounts in several foods (Canzoneri *et al.* 2022) and it is formed in the stomach from cholesterol (Kanner & Lapidot 2001). The increase in oxidative stress during ageing and under the influence of environmental factors (lifestyle habits, stress, and pollution) can also, depending on the individual, contribute to a more or less important accumulation of 7KC in different tissues (Zarrouk *et al.* 2014, de Medina *et al.* 2022). This last aspect can lead to highly disabling diseases (cardiovascular, neurodegenerative, and ocular diseases, as well as metabolic syndrome) with significant societal consequences. It is therefore essential to better know the metabolism of 7KC in humans, and with appropriate models (Vejux *et al.* 2020), to identify molecules counteracting 7KC-induced cytotoxicity (Brahmi *et al.* 2019, Nury *et al.* 2021*a*), and to develop new strategies to control the level of this oxysterol in food and in the body in order to avoid its toxic effects: oxidative stress, inflammation, and cell degeneration. Thus, 7KC, which is one of the oldest oxysterols identified, still deserves our full attention.

Declaration of interest

Gérard Lizard and Amira Zarrouk are Editorial Board Members of Redox Experimental Medicine. Gérard Lizard and Amira Zarrouk were not involved in the review or editorial process for this paper, on which they are listed as authors. The other authors have nothing to disclose.

Funding

This work was funded by Université de Bourgogne (Dijon, France), Université Tunis El Manar (Tunis, Tunisia), Université de Monastir (Monastir, Tunisia), and Université Hassan 1er (Settat, Morocco). This work was supported by PHC UTIQUE 2021–2022 (Dr Taoufik Ghrairi, Tunisia and Dr Gérard Lizard, France; code CMCU: 22G0809/Code Campus France: 47608VJ). Imen Ghzaiel also received financial support from ABASIM (Association Bourguignonne pour les Applications des Sciences de l'Information en Médecine ; Dijon, France).

Acknowledgements

The authors acknowledge Mrs Nathalie Bancod for her efficient contribution to iconography. The authors also acknowledge the ENOR network (https://www.oxysterols.net/; May 2022) thanks to which scientific interactions were possible between the authors to optimize the quality of this review.

References

Aksu N, Samadi A, Yalçınkaya A, Çetin T, Eser B, Lay İ, Öziş TN, Öztaş Y & Sabuncuoğlu S 2020 Evaluation of oxysterol levels of patients with silicosis by LC-MS/MS method. *Molecular and Cellular Biochemistry* **467** 117–125. (https://doi.org/10.1007/s11010-020-03706-w)

Anderson A, Campo A, Fulton E, Corwin A, Jerome 3rd WG & O'Connor MS 2020 7-Ketocholesterol in disease and aging. *Redox Biology* **29** 101380.(https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101380)

Baarine M, Andréoletti P, Athias A, Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Vejux A, Riedinger JM, Kattan Z, Bessede G, *et al.* 2012 Evidence of oxidative stress in very long chain fatty acid – treated oligodendrocytes and potentialization of ROS production using RNA interference-directed knockdown of ABCD1 and ACOX1 peroxisomal proteins. *Neuroscience* **213** 1–18. (https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.058)

Berthier A, Lemaire-Ewing S, Prunet C, Monier S, Athias A, Bessède G, Pais De Barros JP, Laubriet A, Gambert P, Lizard G, *et al.* 2004 Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death and Differentiation* **11** 897–905. (https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401434)

Bezine M, Maatoug S, Ben Khalifa R, Debbabi M, Zarrouk A, Wang Y, Griffiths WJ, Nury T, Samadi M, Vejux A, *et al.* 2018 Modulation of Kv3.1b potassium channel level and intracellular potassium concentration in 158N murine oligodendrocytes and BV-2 murine microglial cells treated with 7-ketocholesterol, 24S-hydroxycholesterol or tetracosanoic acid (C24:0). *Biochimie* **153** 56–69. (https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.02.008)

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

Björkhem I, Diczfalusy U, Lövgren-Sandblom A, Starck L, Jonsson M, Tallman K, Schirmer H, Ousager LB, Crick PJ, Wang Y, *et al.* 2014 On the formation of 7-ketocholesterol from 7-dehydrocholesterol in patients with CTX and SLO. *Journal of Lipid Research* **55** 1165–1172. (https://doi.org/10.1194/jlr.P048603)

Brahmi F, Vejux A, Sghaier R, Zarrouk A, Nury T, Meddeb W, Rezig L, Namsi A, Sassi K, Yammine A, *et al.* 2019 Prevention of 7-ketocholesterol-induced side effects by natural compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59** 3179–3198. (https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1491828)

Brown AJ & Jessup W 1999 Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **142** 1–28. (https://doi.org/10.1016/s0021-9150(98)00196-8)

Brown AJ & Jessup W 2009 Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* **30** 111–122. (https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.005)

Brown AJ, Mander EL, Gelissen IC, Kritharides L, Dean RT & Jessup W 2000 Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells. Accumulation of oxidized esters in lysosomes. *Journal of Lipid Research* **41** 226–237. (https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32056-3)

Brown AJ, Sharpe LJ & Rogers MJ 2021 Oxysterols: from physiological tuners to pharmacological opportunities. *British Journal of Pharmacology* **178** 3089–3103. (https://doi.org/10.1111/bph.15073)

Buttari B, Segoni L, Profumo E, D'Arcangelo D, Rossi S, Facchiano F, Businaro R, Iuliano L & Riganò R 2013 7-Oxo-cholesterol potentiates pro-inflammatory signaling in human M1 and M2 macrophages. *Biochemical Pharmacology* **86** 130–137. (https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.04.008)

Canzoneri F, Leoni V, Rosso G, Risso D, Menta R & Poli G 2022 Oxysterols as reliable markers of quality and safety in cholesterol containing food ingredients and products. *Frontiers in Nutrition* **9** 853460. (https://doi.org/10.3389/fnut.2022.853460)

Chang TY, Chang CC, Ohgami N & Yamauchi Y 2006 Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22** 129–157. (https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104656)

Chang J, Koseki M, Saga A, Kanno K, Higo T, Okuzaki D, Okada T, Inui H, Tanaka K, Asaji M, *et al.* 2020 Dietary oxysterol, 7-ketocholesterol accelerates hepatic lipid accumulation and macrophage infiltration in obese mice. *Frontiers in Endocrinology* **11** 614692. (https://doi.org/10.3389/fendo.2020.614692)

Charvet C, Liao WL, Heo GY, Laird J, Salomon RG, Turko IV & Pikuleva IA 2011 Isolevuglandins and mitochondrial enzymes in the retina: mass spectrometry detection of post-translational modification of sterol-metabolizing CYP27A1. *Journal of Biological Chemistry* **286** 20413–20422. (https://doi.org/10.1074/jbc.M111.232546)

Clariana M & García-Regueiro JA 2011 Effect of high pressure processing on cholesterol oxidation products in vacuum packaged sliced dry-cured ham. *Food and Chemical Toxicology* **49** 1468–1471. (https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.027)

de Freitas FA, Levy D, Zarrouk A, Lizard G & Bydlowski SP 2021 Impact of oxysterols on cell death, proliferation, and differentiation induction: current status. *Cells* **10** 2301. (https://doi.org/10.3390/cells10092301)

de Grey AD, Alvarez PJ, Brady RO, Cuervo AM, Jerome WG, Mccarty PL, Nixon RA, Rittmann BE & Sparrow JR 2005 Medical bioremediation: prospects for the application of microbial catabolic diversity to aging and several major age-related diseases. *Ageing Research Reviews* **4** 315–338. (https://doi.org/10.1016/j.arr.2005.03.008)

de Medina P, Silvente-Poirot S & Poirot M 2022 Oxysterols are potential physiological regulators of ageing. *Ageing Research Reviews* **77** 101615. (https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101615)

Deon M, Marchetti DP, Donida B, Wajner M & Vargas C 2016 Oxidative stress in patients with X-linked adrenoleukodystrophy. *Cellular and Molecular Neurobiology* **36** 497–512. (https://doi.org/10.1007/s10571-015-0234-2)

Diczfalusy U, Nylén H, Elander P & Bertilsson L 2011 4β-Hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *British Journal of Clinical Pharmacology* **71** 183–189. (https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03773.x)

Dugas B, Charbonnier S, Baarine M, Ragot K, Delmas D, Ménétrier F, Lherminier J, Malvitte L, Khalfaoui T, Bron A, *et al.* 2010 Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *European Journal of Nutrition* **49** 435–446. (https://doi.org/10.1007/s00394-010-0102-2)

Echarte M, Conchillo A, Ansoren D & Astiasarán I 2005 Cholesterol oxidation products in fresh and frozen shrimps, raw and grilled. *Nutricion Hospitalaria* **20** 293–296.

Endo K, Oyama T, Saiki A, Ban N, Ohira M, Koide N, Murano T, Watanabe H, Nishii M, Miura M, *et al.* 2008 Determination of serum 7-ketocholesterol concentrations and their relationships with coronary multiple risks in diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* **80** 63–68. (https://doi.org/10.1016/j.diabres.2007.10.023)

Erridge C, Webb DJ & Spickett CM 2007 25-Hydroxycholesterol, 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol upregulate interleukin-8 expression independently of toll-like receptor 1, 2, 4 or 6 signalling in human macrophages. *Free Radical Research* **41** 260–266. (https://doi.org/10.1080/10715760601070091)

Ferrari P 2010 The role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. *Biochimica et Biophysica Acta* **1802** 1178–1187. (https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.10.017)

Fransen M, Lismont C & Walton P 2017 The peroxisome-mitochondria connection: how and why? *International Journal of Molecular Sciences* **18** 1126. (https://doi.org/10.3390/ijms18061126)

Fredman G, Hellmann J, Proto JD, Kuriakose G, Colas RA, Dorweiler B, Connolly ES, Solomon R, Jones DM, Heyer EJ, *et al.* 2016 An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. *Nature Communications* **7** 12859. (https://doi.org/10.1038/ncomms12859)

Fuda H, Javitt NB, Mitamura K, Ikegawa S & Strott CA 2007 Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *Journal of Lipid Research* **48** 1343–1352. (https://doi.org/10.1194/jlr.M700018-JLR200)

Gajewski A, Mnich E, Szymański K, Hinc K, Obuchowski M, Moran AP & Chmiela M 2016 Helicobacter pylori antigens, acetylsalicylic acid, LDL and 7-ketocholesterol – their potential role in destabilizing the gastric epithelial cell barrier. An in vitro model of Kato III cells. *Acta Biochimica Polonica* **63** 145–152. (https://doi.org/10.18388/abp.2015_1122)

Ghosh S & Khare SK 2016 Biodegradation of cytotoxic 7-ketocholesterol by Pseudomonas aeruginosa PseA. *Bioresource Technology* **213** 44–49. (https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.079)

Ghosh S & Khare SK 2017 Biodegradation of 7-ketocholesterol by Rhodococcus erythropolis MTCC 3951: process optimization and enzymatic insights. *Chemistry and Physics of Lipids* **207** 253–259. (https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.05.008)

Ghosh S, Ahmad R, Gautam VK & Khare SK 2018*a* Cholesterol-oxidase-magnetic nanobioconjugates for the production of 4-cholesten-3-one and 4-cholesten-3,7-dione. *Bioresource Technology* **254** 91–96. (https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.030)

Ghosh S, Ahmad R & Khare SK 2018*b* Immobilization of cholesterol oxidase: an overview. *Open Biotechnology Journal* **12** 176–188. (https://doi.org/10.2174/1874070701812010176)

Ghzaiel I, Sassi K, Zarrouk A, Nury T, Ksila M, Leoni V, Bouhaouala-Zahar B, Hammami S, Hammami M, Mackrill JJ, *et al.* 2021*a* 7-Ketocholesterol: effects on viral infections and hypothetical contribution in COVID-19. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **212** 105939. (https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105939)

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

Ghzaiel I, Zarrouk A, Nury T, Libergoli M, Florio F, Hammouda S, Ménétrier F, Avoscan L, Yammine A, Samadi M, *et al.* 2021*b* Antioxidant properties and cytoprotective effect of Pistacia lentiscus L. seed oil against 7β-hydroxycholesterol-induced toxicity in C2C12 myoblasts: reduction in oxidative stress, mitochondrial and peroxisomal dysfunctions and attenuation of cell death. *Antioxidants* **10** 1772. (https://doi.org/10.3390/antiox10111772)

Gill S, Chow R & Brown AJ 2008 Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Progress in Lipid Research* **47** 391–404. (https://doi.org/10.1016/j.plipres.2008.04.002)

Gorassini A, Verardo G, Fregolent SC & Bortolomeazzi R 2017 Rapid determination of cholesterol oxidation products in milk powder based products by reversed phase SPE and HPLC-APCI-MS/MS. *Food Chemistry* **230** 604–610. (https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.080)

Griffiths WJ, Abdel-Khalik J, Crick PJ, Ogundare M, Shackleton CH, Tuschl K, Kwok MK, Bigger BW, Morris AA, Honda A, *et al.* 2017 Sterols and oxysterols in plasma from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **169** 77–87. (https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.018)

Griffiths WJ, Yutuc E, Abdel-Khalik J, Crick PJ, Hearn T, Dickson A, Bigger BW, Hoi-Yee Wu T, Goenka A, Ghosh A, *et al.* 2019 Metabolism of non-enzymatically derived oxysterols: clues from sterol metabolic disorders. *Free Radical Biology and Medicine* **144** 124–133. (https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.04.020)

Guillemot-Legris O, Mutemberezi V, Cani PD & Muccioli GG 2016 Obesity is associated with changes in oxysterol metabolism and levels in mice liver, hypothalamus, adipose tissue and plasma. *Scientific Reports* **6** 19694. (https://doi.org/10.1038/srep19694)

Guina T, Deiana M, Calfapietra S, Cabboi B, Maina M, Tuberoso CI, Leonarduzzi G, Gamba P, Gargiulo S, Testa G, *et al.* 2015 The role of p38 MAPK in the induction of intestinal inflammation by dietary oxysterols: modulation by wine phenolics. *Food and Function* **6** 1218–1228. (https://doi.org/10.1039/c4fo01116c)

Heo GY, Bederman I, Mast N, Liao WL, Turko IV & Pikuleva IA 2011 Conversion of 7-ketocholesterol to oxysterol metabolites by recombinant CYP27A1 and retinal pigment epithelial cells. *Journal of Lipid Research* **52** 1117–1127. (https://doi.org/10.1194/jlr.M014217)

Hernández Becerra JA, Ochoa Flores AA, Valerio-Alfaro G, Soto-Rodriguez I, Rodríguez-Estrada MT & García HS 2014 Cholesterol oxidation and astaxanthin degradation in shrimp during sun drying and storage. *Food Chemistry* **145** 832–839. (https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.098)

Huang JD, Amaral J, Lee JW & Rodriguez IR 2014 7-Ketocholesterol-induced inflammation signals mostly through the TLR4 receptor both in vitro and in vivo. *PLoS ONE* **9** e100985. (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100985)

Iuliano L 2011 Pathways of cholesterol oxidation via non-enzymatic mechanisms. *Chemistry and Physics of Lipids* **164** 457–468. (https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.06.006)

Iuliano L, Micheletta F, Natoli S, Ginanni Corradini S, Iappelli M, Elisei W, Giovannelli L, Violi F & Diczfalusy U 2003 Measurement of oxysterols and alpha-tocopherol in plasma and tissue samples as indices of oxidant stress status. *Analytical Biochemistry* **312** 217–223. (https://doi.org/10.1016/s0003-2697(02)00467-0)

Jaouadi O, Limam I, Abdelkarim M, Berred E, Chahbi A, Caillot M, Sola B & Ben Aissa-Fennira F 2021 5,6-Epoxycholesterol isomers induce oxiapoptophagy in myeloma cells. *Cancers* **13** 3747. (https://doi.org/10.3390/cancers13153747)

Javitt NB, Lee YC, Shimizu C, Fuda H & Strott CA 2001 Cholesterol and hydroxycholesterol sulfotransferases: identification, distinction from dehydroepiandrosterone sulfotransferase, and differential tissue expression. *Endocrinology* **142** 2978–2984. (https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8244)

Kahn E, Baarine M, Pelloux S, Riedinger JM, Frouin F, Tourneur Y & Lizard G 2010 Iron nanoparticles increase 7-ketocholesterol-induced cell death, inflammation, and oxidation on murine cardiac HL1-NB cells. *International Journal of Nanomedicine* **5** 185–195. (https://doi.org/10.2147/ijn.s8458)

Kahn E, Baarine M, Dauphin A, Ragot K, Tissot N, Seguin A, Ménétrier F, Kattan Z, Bachelet CM, Frouin F, *et al.* 2011 Impact of 7-ketocholesterol and very long chain fatty acids on oligodendrocyte lipid membrane organization: evaluation via laurdan and FAMIS spectral image analysis. *Cytometry: Part A* **79** 293–305. (https://doi.org/10.1002/cyto.a.21017)

Kanner J & Lapidot T 2001 The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine* **31** 1388–1395. (https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00718-3)

Kilvington A, Barnaba C, Rajasekaran S, Laurens Leimanis ML & Medina-Meza IG 2021 Lipid profiling and dietary assessment of infant formulas reveal high intakes of major cholesterol oxidative product (7-ketocholesterol). *Food Chemistry* **354** 129529. (https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129529)

Lapidot T, Granit R & Kanner J 2005 Lipid hydroperoxidase activity of myoglobin and phenolic antioxidants in simulated gastric fluid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** 3391–3396. (https://doi.org/10.1021/jf040400w)

Lee JI, Kang S, Ahn DU & Lee M 2001 Formation of cholesterol oxides in irradiated raw and cooked chicken meat during storage. *Poultry Science* **80** 105–108. (https://doi.org/10.1093/ps/80.1.105)

Lee HW, Chien JT & Chen BH 2006 Formation of cholesterol oxidation products in marinated foods during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54** 4873–4879. (https://doi.org/10.1021/jf060461p)

Lee JW, Huang JD & Rodriguez IR 2015 Extra-hepatic metabolism of 7-ketocholesterol occurs by esterification to fatty acids via cPLA2α and SOAT1 followed by selective efflux to HDL. *Biochimica et Biophysica Acta* **1851** 605–619. (https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.01.007)

Lemaire S, Lizard G, Monier S, Miguet C, Gueldry S, Volot F, Gambert P & Néel D 1998 Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Letters* **440** 434–439. (https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01496-3)

Lembo D, Cagno V, Civra A & Poli G 2016 Oxysterols: an emerging class of broad spectrum antiviral effectors. *Molecular Aspects of Medicine* **49** 23–30. (https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.04.003)

Leoni V, Nury T, Vejux A, Zarrouk A, Caccia C, Debbabi M, Fromont A, Sghaier R, Moreau T & Lizard G 2017 Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α-tocopherol: impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **169** 96–110. (https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.029)

Li G, Sul OJ, Yu R & Choi HS 2022 7-Ketocholesterol-induced micro-RNA-107-5p increases number and activity of osteoclasts by targeting MKP1. *International Journal of Molecular Sciences* **23** 3697. (https://doi.org/10.3390/ijms23073697)

Lismont C, Nordgren M, Van Veldhoven PP & Fransen M 2015 Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **3** 35. (https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00035)

Liu W, Xu L, Lamberson CR, Merkens LS, Steiner RD, Elias ER, Haas D & Porter NA 2013 Assays of plasma dehydrocholesteryl esters and oxysterols from Smith-Lemli-Opitz syndrome patients. *Journal of Lipid Research* **54** 244–253. (https://doi.org/10.1194/jlr.M031732)

López de Frutos L, Cebolla JJ, De Castro-Orós I, Irún P & Giraldo P 2021 Neonatal cholestasis and Niemann-pick type C disease: a literature review. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* **45** 101757. (https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101757)

Lund EG, Kerr TA, Sakai J, Li WP & Russell DW 1998 cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **273** 34316–34327. (https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.34316)

Luo J, Yang H & Song BL 2020 Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* **21** 225–245. (https://doi.org/10.1038/s41580-019-0190-7)

Lyons MA & Brown AJ 1999 7-Ketocholesterol. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **31** 369–375. (https://doi.org/10.1016/s1357-2725(98)00123-x)

Lyons MA & Brown AJ 2001 Metabolism of an oxysterol, 7-ketocholesterol, by sterol 27-hydroxylase in HepG2 cells. *Lipids* **36** 701–711. (https://doi.org/10.1007/s11745-001-0775-8)

Lyons MA, Samman S, Gatto L & Brown AJ 1999 Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol in vivo: implications for dietary oxysterols. *Journal of Lipid Research* **40** 1846–1857. (https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)34901-4)

Machorro-Méndez IA, Hernández-Mendoza A, Cardenia V, Rodriguez-Estrada MT, Lercker G, Spinelli F, Cellini A & García HS 2013 Assessment of in vitro removal of cholesterol oxidation products by Lactobacillus casei ATCC334. *Letters in Applied Microbiology* **57** 443–450. (https://doi.org/10.1111/lam.12132)

Mahalakshmi K, Parimalanandhini D, Sangeetha R, Livya Catherene M, Beulaja M, Thiagarajan R, Arumugam M, Janarthanan S & Manikandan R 2021 Influential role of 7-ketocholesterol in the progression of Alzheimer's disease. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **156** 106582. (https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2021.106582)

Maor I, Mandel H & Aviram M 1995 Macrophage uptake of oxidized LDL inhibits lysosomal sphingomyelinase, thus causing the accumulation of unesterified cholesterol-sphingomyelin-rich particles in the lysosomes. A possible role for 7-ketocholesterol. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **15** 1378–1387. (https://doi.org/10.1161/01.atv.15.9.1378)

Maraschiello C, Esteve E & García Regueiro JA 1998 Cholesterol oxidation in meat from chickens fed alpha-tocopherol- and beta-carotene-supplemented diets with different unsaturation grades. *Lipids* **33** 705–713. (https://doi.org/10.1007/s11745-998-0260-4)

Mathieu J, Schloendorn J, Rittmann BE & Alvarez PJ 2008 Microbial degradation of 7-ketocholesterol. *Biodegradation* **19** 807–813. (https://doi.org/10.1007/s10532-008-9183-5)

Mathieu JM, Schloendorn J, Rittmann BE & Alvarez PJ 2009 Medical bioremediation of age-related diseases. *Microbial Cell Factories* **8** 21. (https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-21)

Mathieu JM, Mohn WW, Eltis LD, Leblanc JC, Stewart GR, Dresen C, Okamoto K & Alvarez PJ 2010 7-Ketocholesterol catabolism by Rhodococcus jostii RHA1. *Applied and Environmental Microbiology* **76** 352–355. (https://doi.org/10.1128/AEM.02538-09)

Mathieu JM, Wang F, Segatori L & Alvarez PJ 2012 Increased resistance to oxysterol cytotoxicity in fibroblasts transfected with a lysosomally targeted Chromobacterium oxidase. *Biotechnology and Bioengineering* **109** 2409–2415. (https://doi.org/10.1002/bit.24506)

Mazalli MR & Bragagnolo N 2007 Effect of storage on cholesterol oxide formation and fatty acid alterations in egg powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55** 2743–2748. (https://doi.org/10.1021/jf063267b)

Mitić T, Andrew R, Walker BR & Hadoke PW 2013*a* 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the regulation of 7-oxysterol levels in the arterial wall through the inter-conversion of 7-ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol. *Biochimie* **95** 548–555. (https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.08.007)

Mitić T, Shave S, Semjonous N, Mcnae I, Cobice DF, Lavery GG, Webster SP, Hadoke PW, Walker BR & Andrew R 2013*b* 11β-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 contributes to the balance between 7-keto- and 7-hydroxy-oxysterols in vivo. *Biochemical Pharmacology* **86** 146–153. (https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.002)

Monier S, Samadi M, Prunet C, Denance M, Laubriet A, Athias A, Berthier A, Steinmetz E, Jürgens G, Nègre-Salvayre A, *et al.* 2003 Impairment of the cytotoxic and oxidative activities of 7 beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol by esterification with oleate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303** 814–824. (https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00412-1)

Moreira EF, Larrayoz IM, Lee JW & Rodríguez IR 2009 7-Ketocholesterol is present in lipid deposits in the primate retina: potential implication in the induction of VEGF and CNV formation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **50** 523–532. (https://doi.org/10.1167/iovs.08-2373)

Morzycki JW 2014 Recent advances in cholesterol chemistry. *Steroids* **83** 62–79. (https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.02.001)

Murdolo G, Piroddi M, Tortoioli C, Bartolini D, Schmelz M, Luchetti F, Canonico B, Papa S, Zerbinati C, Iuliano L, *et al.* 2016 Free radical-derived oxysterols: novel adipokines modulating adipogenic differentiation of adipose precursor cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **101** 4974–4983. (https://doi.org/10.1210/jc.2016-2918)

Mutemberezi V, Guillemot-Legris O & Muccioli GG 2016*a* Oxysterols: from cholesterol metabolites to key mediators. *Progress in Lipid Research* **64** 152–169. (https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.09.002)

Mutemberezi V, Masquelier J, Guillemot-Legris O & Muccioli GG 2016*b* Development and validation of an HPLC-MS method for the simultaneous quantification of key oxysterols, endocannabinoids, and ceramides: variations in metabolic syndrome. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **408** 733–745. (https://doi.org/10.1007/s00216-015-9150-z)

Nielsen JH, Olsen CE, Jensen C & Skibsted LH 1996 Cholesterol oxidation in butter and dairy spread during storage. *Journal of Dairy Research* **63** 159–167. (https://doi.org/10.1017/s0022029900031630)

Noguer E, Soules R, Netter C, Nagarathinam C, Leignadier J, Huc-Claustre E, Serhan N, Rives A, de Medina P, Silvente-Poirot S, *et al.* 2017 Quantitative analysis of the tumor suppressor dendrogenin A using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Chemistry and Physics of Lipids* **207** 81–86. (https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.06.010)

Nury T, Zarrouk A, Vejux A, Doria M, Riedinger JM, Delage-Mourroux R & Lizard G 2014 Induction of oxiapoptophagy, a mixed mode of cell death associated with oxidative stress, apoptosis and autophagy, on 7-ketocholesterol-treated 158N murine oligodendrocytes: impairment by α-tocopherol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **446** 714–719. (https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.081)

Nury T, Zarrouk A, Mackrill JJ, Samadi M, Durand P, Riedinger JM, Doria M, Vejux A, Limagne E, Delmas D, *et al.* 2015 Induction of oxiapoptophagy on 158N murine oligodendrocytes treated by 7-ketocholesterol-, 7β-hydroxycholesterol-, or 24(S)-hydroxycholesterol: protective effects of α-tocopherol and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6 n-3). *Steroids* **99** 194–203. (https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.003)

Nury T, Zarrouk A, Ragot K, Debbabi M, Riedinger JM, Vejux A, Aubourg P & Lizard G 2017 7-Ketocholesterol is increased in the plasma of X-ALD patients and induces peroxisomal modifications in microglial cells: potential roles of 7-ketocholesterol in the pathophysiology of X-ALD. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **169** 123–136. (https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.037)

Nury T, Sghaier R, Zarrouk A, Ménétrier F, Uzun T, Leoni V, Caccia C, Meddeb W, Namsi A, Sassi K, *et al.* 2018 Induction of peroxisomal changes in oligodendrocytes treated with 7-ketocholesterol: attenuation by α-tocopherol. *Biochimie* **153** 181–202. (https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.07.009)

Nury T, Yammine A, Ghzaiel I, Sassi K, Zarrouk A, Brahmi F, Samadi M, Rup-Jacques S, Vervandier-Fasseur D, Pais De Barros JP, *et al.* 2021*a* Attenuation of 7-ketocholesterol- and 7β-hydroxycholesterol-induced oxiapoptophagy by nutrients, synthetic molecules and oils: potential for the prevention of age-related diseases. *Ageing Research Reviews* **68** 101324. (https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101324)

Nury T, Zarrouk A, Yammine A, Mackrill JJ, Vejux A & Lizard G 2021*b* Oxiapoptophagy: a type of cell death induced by some oxysterols.

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

British Journal of Pharmacology **178** 3115–3123. (https://doi.org/10.1111/bph.15173)

Olkkonen VM & Hynynen R 2009 Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Molecular Aspects of Medicine* **30** 123–133. (https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.004)

Paillasse MR, Saffon N, Gornitzka H, Silvente-Poirot S, Poirot M & de Medina P 2012 Surprising unreactivity of cholesterol-5,6-epoxides towards nucleophiles. *Journal of Lipid Research* **53** 718–725. (https://doi.org/10.1194/jlr.M023689)

Pan X, Connacher RP & O'Connor MB 2021 Control of the insect metamorphic transition by ecdysteroid production and secretion. *Current Opinion in Insect Science* **43** 11–20. (https://doi.org/10.1016/j.cois.2020.09.004)

Pariente A, Peláez R, Pérez-Sala Á & Larráyoz IM 2019 Inflammatory and cell death mechanisms induced by 7-ketocholesterol in the retina. Implications for age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research* **187** 107746. (https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107746)

Paz JL, Levy D, Oliveira BA, De Melo TC, de Freitas FA, Reichert CO, Rodrigues A, Pereira J & Bydlowski SP 2019 7-Ketocholesterol promotes oxiapoptophagy in bone marrow mesenchymal stem cell from patients with acute myeloid leukemia. *Cells* **8** 482. (https://doi.org/10.3390/cells8050482)

Perveen I, SS, Naz I, Raza MA & Jahangir A 2016 Biodegradation of 7-ketocholestrol (7-KC) by Thermobifidafusca IP. *International Journal of Biosciences* **8** 83–93. (https://doi.org/10.12692/ijb/8.4.83-93)

Perveen I, Raza MA, Sehar S, Naz I, Memon MI & Ahmed S 2018 Studies on degradation of 7-ketocholesterol by environmental bacterial isolates. *Applied Biochemistry and Microbiology* **54** 262–268. (https://doi.org/10.1134/S0003683818030110)

Petrón MJ, García-Regueiro JA, Martín L, Muriel E & Antequera T 2003 Identification and quantification of cholesterol and cholesterol oxidation products in different types of Iberian hams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** 5786–5791. (https://doi.org/10.1021/jf034100a)

Petrov AM, Kasimov MR & Zefirov AL 2016 Brain cholesterol metabolism and its defects: linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction. *Acta Naturae* **8** 58–73. (https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-58-73)

Poli G, Biasi F & Leonarduzzi G 2013 Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. *Redox Biology* **1** 125–130. (https://doi.org/10.1016/j.redox.2012.12.001)

Poli G, Leoni V, Biasi F, Canzoneri F, Risso D & Menta R 2022 Oxysterols: from redox bench to industry. *Redox Biology* **49** 102220. (https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102220)

Prunet C, Montange T, Véjux A, Laubriet A, Rohmer JF, Riedinger JM, Athias A, Lemaire-Ewing S, Néel D, Petit JM, *et al.* 2006 Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients. *Cytometry: Part A* **69** 359–373. (https://doi.org/10.1002/cyto.a.20272)

Ragot K, Mackrill JJ, Zarrouk A, Nury T, Aires V, Jacquin A, Athias A, Pais De Barros JP, Véjux A, Riedinger JM, *et al.* 2013 Absence of correlation between oxysterol accumulation in lipid raft microdomains, calcium increase, and apoptosis induction on 158N murine oligodendrocytes. *Biochemical Pharmacology* **86** 67–79. (https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.02.028)

Rao X, Zhong J, Maiseyeu A, Gopalakrishnan B, Villamena FA, Chen LC, Harkema JR, Sun Q & Rajagopalan S 2014 CD36-dependent 7-ketocholesterol accumulation in macrophages mediates progression of atherosclerosis in response to chronic air pollution exposure. *Circulation Research* **115** 770–780. (https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304666)

Ravi S, Duraisamy P, Krishnan M, Martin LC, Manikandan B, Raman T, Sundaram J, Arumugam M & Ramar M 2021 An insight on 7-ketocholesterol mediated inflammation in atherosclerosis and potential therapeutics. *Steroids* **172** 108854. (https://doi.org/10.1016/j.steroids.2021.108854)

Razzazi-Fazeli E, Kleineisen S & Luf W 2000 Determination of cholesterol oxides in processed food using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionisation. *Journal of Chromatography: A* **896** 321–334. (https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00719-6)

Risso D, Leoni V, Fania C, Arveda M, Falchero L, Barattero M, Civra A, Lembo D, Poli G & Menta R 2021 Effect of industrial processing and storage procedures on oxysterols in milk and milk products. *Food and Function* **12** 771–780. (https://doi.org/10.1039/d0fo02462g)

Risso D, Leoni V, Canzoneri F, Arveda M, Zivoli R, Peraino A, Poli G & Menta R 2022 Presence of cholesterol oxides in milk chocolates and their correlation with milk powder freshness. *PLoS ONE* **17** e0264288. (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264288)

Rittmann BE & Schloendorn J 2007 Engineering away lysosomal junk: medical bioremediation. *Rejuvenation Research* **10** 359–365. (https://doi.org/10.1089/rej.2007.0594)

Rodriguez IR & Fliesler SJ 2009 Photodamage generates 7-keto- and 7-hydroxycholesterol in the rat retina via a free radical-mediated mechanism. *Photochemistry and Photobiology* **85** 1116–1125. (https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00568.x)

Rodríguez IR & Larrayoz IM 2010 Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *Journal of Lipid Research* **51** 2847–2862. (https://doi.org/10.1194/jlr.R004820)

Rodriguez-Estrada MT, Garcia-Llatas G & Lagarda MJ 2014 7-Ketocholesterol as marker of cholesterol oxidation in model and food systems: when and how. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **446** 792–797. (https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.02.098)

Rogers MA, Liu J, Song BL, Li BL, Chang CC & Chang TY 2015 Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **151** 102–107. (https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.09.008)

Royer MC, Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Monier S, Pais De Barros JP, Athias A, Néel D & Lagrost L 2009 7-Ketocholesterol incorporation into sphingolipid/cholesterol-enriched (lipid raft) domains is impaired by vitamin E: a specific role for alpha-tocopherol with consequences on cell death. *Journal of Biological Chemistry* **284** 15826–15834. (https://doi.org/10.1074/jbc.M808641200)

Sabolová M, Pohořelá B, Fišnar J, Kouřimská L, Chrpová D & Pánek J 2017 Formation of oxysterols during thermal processing and frozen storage of cooked minced meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **97** 5092–5099. (https://doi.org/10.1002/jsfa.8386)

Samadi A, Gurlek A, Sendur SN, Karahan S, Akbiyik F & Lay I 2019 Oxysterol species: reliable markers of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Endocrinological Investigation* **42** 7–17. (https://doi.org/10.1007/s40618-018-0873-5)

Samadi A, Sabuncuoglu S, Samadi M, Isikhan SY, Chirumbolo S, Peana M, Lay I, Yalcinkaya A & Bjørklund G 2021 A comprehensive review on oxysterols and related diseases. *Current Medicinal Chemistry* **28** 110–136. (https://doi.org/10.2174/0929867327666200316142659)

Sanchez LD, Pontini L, Marinozzi M, Sanchez-Aranguren LC, Reis A & Dias IHK 2021 Cholesterol and oxysterol sulfates: pathophysiological roles and analytical challenges. *British Journal of Pharmacology* **178** 3327–3341. (https://doi.org/10.1111/bph.15227)

Sander BD, Addis PB, Park SW & Smith DE 1989 Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *Journal of Food Protection* **52** 109–114. (https://doi.org/10.4315/0362-028X-52.2.109)

Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E & Casper RF 2001 7-Ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *Journal of Biological Chemistry* **276** 3054–3059. (https://doi.org/10.1074/jbc.M005988200)

Schloendorn J, Webb T, Kemmish K, Hamalainen M, Jackemeyer D, Jiang L, Mathieu J, Rebo J, Sankman J, Sherman L, *et al.* 2009 Medical bioremediation: a concept moving toward reality. *Rejuvenation Research* **12** 411–419. (https://doi.org/10.1089/rej.2009.0917)

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

Seet RC, Lee CY, Lim EC, Tan JJ, Quek AM, Chong WL, Looi WF, Huang SH, Wang H, Chan YH, *et al.* 2010 Oxidative damage in Parkinson disease: measurement using accurate biomarkers. *Free Radical Biology and Medicine* **48** 560–566. (https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.11.026)

Shimozawa M, Naito Y, Manabe H, Uchiyama K, Kuroda M, Katada K, Yoshida N & Yoshikawa T 2004 7-Ketocholesterol enhances the expression of adhesion molecules on human aortic endothelial cells by increasing the production of reactive oxygen species. *Redox Report: Communications in Free Radical Research* **9** 370–375. (https://doi.org/10.1179/135100004225006902)

Silvente-Poirot S & Poirot M 2012 Cholesterol epoxide hydrolase and cancer. *Current Opinion in Pharmacology* **12** 696–703. (https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.07.007)

Song C, Hiipakka RA & Liao S 2001 Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids* **66** 473–479. (https://doi.org/10.1016/s0039-128x(00)00239-7)

Steffen Y, Vuillaume G, Stolle K, Roewer K, Lietz M, Schueller J, Lebrun S & Wallerath T 2012 Cigarette smoke and LDL cooperate in reducing nitric oxide bioavailability in endothelial cells via effects on both eNOS and NADPH oxidase. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **27** 176–184. (https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.06.006)

Szedlacsek SE, Wasowicz E, Hulea SA, Nishida HI, Kummerow FA & Nishida T 1995 Esterification of oxysterols by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* **270** 11812–11819. (https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.11812)

Tempel W, Grabovec I, Mackenzie F, Dichenko YV, Usanov SA, Gilep AA, Park HW & Strushkevich N 2014 Structural characterization of human cholesterol 7α-hydroxylase. *Journal of Lipid Research* **55** 1925–1932. (https://doi.org/10.1194/jlr.M050765)

Testa G, Staurenghi E, Zerbinati C, Gargiulo S, Iuliano L, Giaccone G, Fantò F, Poli G, Leonarduzzi G & Gamba P 2016 Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: their involvement in neuroinflammation. *Redox Biology* **10** 24–33. (https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.001)

Trompier D, Vejux A, Zarrouk A, Gondcaille C, Geillon F, Nury T, Savary S & Lizard G 2014 Brain peroxisomes. *Biochimie* **98** 102–110. (https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.09.009)

van de Bovenkamp P, Kosmeijer-Schuil TG & Katan MB 1988 Quantification of oxysterols in Dutch foods: egg products and mixed diets. *Lipids* **23** 1079–1085. (https://doi.org/10.1007/BF02535656)

Vejux A & Lizard G 2009 Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Molecular Aspects of Medicine* **30** 153–170. (https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.02.006)

Vejux A, Guyot S, Montange T, Riedinger JM, Kahn E & Lizard G 2009 Phospholipidosis and down-regulation of the PI3-K/PDK-1/Akt signalling pathway are vitamin E inhibitable events associated with 7-ketocholesterol-induced apoptosis. *Journal of Nutritional Biochemistry* **20** 45–61. (https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.12.001)

Vejux A, Samadi M & Lizard G 2011 Contribution of cholesterol and oxysterols in the physiopathology of cataract: implication for the development of pharmacological treatments. *Journal of Ophthalmology* **2011** 471947. (https://doi.org/10.1155/2011/471947)

Vejux A, Abed-Vieillard D, Hajji K, Zarrouk A, Mackrill JJ, Ghosh S, Nury T, Yammine A, Zaibi M, Mihoubi W, *et al.* 2020 7-Ketocholesterol and 7β-hydroxycholesterol: in vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. *Biochemical Pharmacology* **173** 113648. (https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.113648)

Wamil M, Andrew R, Chapman KE, Street J, Morton NM & Seckl JR 2008 7-oxysterols modulate glucocorticoid activity in adipocytes through competition for 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type. *Endocrinology* **149** 5909–5918. (https://doi.org/10.1210/en.2008-0420)

Watanabe Y, Yamaguchi T, Ishihara N, Nakamura S, Tanaka S, Oka R, Imamura H, Sato Y, Ban N, Kawana H, *et al.* 2018 7-Ketocholesterol induces ROS-mediated mRNA expression of 12-lipoxygenase, cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines in human mesangial cells: potential role in diabetic nephropathy. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* **134** 16–23. (https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.11.002)

Weber D, Ni Z, Vetter D, Hoffmann R & Fedorova M 2016 Electrochemical oxidation of cholesterol: an easy way to generate numerous oxysterols in short reaction times. *European Journal of Lipid Science and Technology* **118** 325–331. (https://doi.org/10.1002/ejlt.201500101)

Wnętrzak A, Chachaj-Brekiesz A, Stępniak A, Kobierski J & Dynarowicz-Latka P 2022 Different effects of oxysterols on a model lipid raft – langmuir monolayer study complemented with theoretical calculations. *Chemistry and Physics of Lipids* **244** 105182. (https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105182)

Yammine A, Zarrouk A, Nury T, Vejux A, Latruffe N, Vervandier-Fasseur D, Samadi M, Mackrill JJ, Greige-Gerges H, Auezova L, *et al.* 2020 Prevention by dietary polyphenols (resveratrol, quercetin, apigenin) against 7-ketocholesterol-induced oxiapoptophagy in neuronal N2a cells: potential interest for the treatment of neurodegenerative and age-related diseases. *Cells* **9** 2346. (https://doi.org/10.3390/cells9112346)

Yan PS 1999 Cholesterol oxidation products. Their occurrence and detection in our foodstuffs. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **459** 79–98. (https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4853-9_6)

Yang L, Yu P, Chen M & Lei B 2022 Mammalian target of rapamycin inhibitor rapamycin alleviates 7-ketocholesterol induced inflammatory responses and vascular endothelial growth factor elevation by regulating MAPK pathway in human retinal pigment epithelium cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* **38** 189–200. (https://doi.org/10.1089/jop.2021.0082)

You JS, Lim H, Seo JY, Kang KR, Kim DK, Oh JS, Seo YS, Lee GJ, Kim JS, Kim HJ, *et al.* 2021 25-Hydroxycholesterol-induced oxiapoptophagy in L929 mouse fibroblast cell line. *Molecules* **27** 199. (https://doi.org/10.3390/molecules27010199)

Yuan XM, Sultana N, Siraj N, Ward LJ, Ghafouri B & Li W 2016 Autophagy induction protects against 7-oxysterol-induced cell death via lysosomal pathway and oxidative stress. *Journal of Cell Death* **9** 1–7. (https://doi.org/10.4137/JCD.S37841)

Zahm JM, Baconnais S, Monier S, Bonnet N, Bessède G, Gambert P, Puchelle E & Lizard G 2003 Chronology of cellular alterations during 7-ketocholesterol-induced cell death on A7R5 rat smooth muscle cells: analysis by time lapse-video microscopy and conventional fluorescence microscopy. *Cytometry: Part A* **52** 57–69. (https://doi.org/10.1002/cyto.a.10027)

Zanjani BN, Samadi A, Isikhan SY, Lay I, Beyaz S, Gelincik A, Buyukozturk S & Arda N 2022 Plasma levels of oxysterols 7-ketocholesterol and cholestane-3β, 5α, 6β-triol in patients with allergic asthma. *Journal of Asthma* **2022** 1–10. (https://doi.org/10.1080/02770903.2022.2045310)

Zarrouk A, Vejux A, Nury T, El Hajj HI, Haddad M, Cherkaoui-Malki M, Riedinger JM, Hammami M & Lizard G 2012 Induction of mitochondrial changes associated with oxidative stress on very long chain fatty acids (C22:0, C24:0, or C26:0)-treated human neuronal cells (SK-NB-E). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2012** 623257. (https://doi.org/10.1155/2012/623257)

Zarrouk A, Vejux A, Mackrill J, O'Callaghan Y, Hammami M, O'Brien N & Lizard G 2014 Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Research Reviews* **18** 148–162. (https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.09.006)

Zarrouk A, Nury T, Karym EM, Vejux A, Sghaier R, Gondcaille C, Andreoletti P, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M, *et al.* 2017 Attenuation of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy by dimethyl fumarate on 158N

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access

murine oligodendrocytes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **169** 29–38. (https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.024)

Zerbinati C & Iuliano L 2017 Cholesterol and related sterols autoxidation. *Free Radical Biology and Medicine* **111** 151–155. (https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.013)

Zhang Y, Yu C, Liu J, Spencer TA, Chang CC & Chang TY 2003 Cholesterol is superior to 7-ketocholesterol or 7 alpha-hydroxycholesterol as an allosteric activator for acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1. *Journal of Biological Chemistry* **278** 11642–11647. (https://doi.org/10.1074/jbc.M211559200)

Zhang YY, Shi YN, Zhu N, Wang W, Deng CF, Xie XJ, Liao DF & Qin L 2020 Autophagy: a killer or guardian of vascular smooth muscle cells. *Journal of Drug Targeting* **28** 449–455. (https://doi.org/10.1080/1061186X.2019.1705312)

Zhou H & Hylemon PB 2014 Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids* **86** 62–68. (https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.04.016)

Received 25 May 2022
Accepted 31 May 2022

© 2022 The authors
Published by Bioscientifica Ltd.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.

Downloaded from Bioscientifica.com at 07/29/2022 08:16:35AM
via free access