



UNIVERSITE DE LILLE – DROIT ET SANTE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE – SANTE

# THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

DISCIPLINE : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

SPECIALITE : Physiologie

Présentée et soutenue publiquement par

**QUENTIN THOREL**

Le 19 Novembre 2021

---

## **ROLE DE L'HORLOGE CIRCADIENTE DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE : IMPLICATIONS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES**

---

Thèse dirigée par le Dr. Yasmine SEBTI

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Hélène DUEZ

Présidente du jury

Madame le Docteur Capucine TROLLET

Rapporteuse

Monsieur le Docteur Stoyan IVANOV

Rapporteur

Monsieur le Docteur Pascal MAIRE

Examineur

Monsieur le Professeur Bart STAELS

Invité

Madame le Docteur Yasmine SEBTI

Directrice de thèse





---

## Remerciements

---

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements au Docteur Capucine Trollet qui a accepté de participer à mon jury de thèse et de juger mon travail. Je vous remercie également pour l'assistance que vous avez portée à mon cher ami Alexis.

Je souhaite également remercier le Docteur Stoyan Ivanov de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie le Docteur Pascal Maire pour sa bienveillance durant mes précédents CSI et je vous remercie une nouvelle fois de me faire le privilège de répondre présent pour ma soutenance de thèse.

J'adresse également mes remerciements à la Fondation de Recherche Médicale pour avoir financé ma dernière année de thèse.

J'aimerais également remercier notre directeur d'unité, le Professeur Bart Staels, de m'avoir permis de faire ce travail dans les meilleures conditions possibles. Outre votre point de vue éclairé sur mes recherches, j'ai également beaucoup appris à votre contact lors des réunions scientifiques et conseils d'unité.

Je voudrais surtout remercier du fond du cœur ma tutrice de thèse, Yasmine Sebti. Yasmine, grâce à toi, j'ai pu connaître une progression galopante tout au long de ma thèse. Je te remercie de m'avoir permis de développer mon esprit scientifique sans jamais me contraindre, de m'avoir inculqué l'autonomie sans pour autant me laisser à l'abandon. Tu as toujours veillé à mon bien-être, à ma santé et à me traiter d'égal à égal. Même si, je l'ai toujours montré de façon excessive, je ne peux ici que t'adresser encore mon admiration pour ton travail, ton soutien mais surtout pour ta gentillesse absolue. Tu es la meilleure directrice que l'on puisse avoir.

Hélène, merci d'avoir cru en moi au début de mon aventure dans ton équipe. Cette confiance m'a permis de trouver la force et la détermination pour finaliser cette thèse et, j'espère, ce projet. J'ai toujours apprécié nos discussions scientifiques, tes conseils et ta dévotion pour ton travail.

Je me dois également de remercier l'un des principaux artisans de ce travail de thèse, Stéphane. Merci pour ton aide pendant toutes ces années, d'avoir toujours répondu présent armé de ton enthousiasme légendaire qui te caractérise tant. Même si je dois être en partie responsable du nombre incalculable de cheveux blancs dont tu as hérité. Merci d'avoir toujours

amené une bonne ambiance grâce à ton humour si décapant tout en veillant sur toute notre équipe.

Christian, tu es la personne la plus gentille que je connaisse. J'ai été ravi de partager ces derniers mois en ta compagnie même si notre collaboration n'a pas toujours eu les résultats escomptés (Dilution !). Cependant, je suis très fier d'avoir pu travailler avec toi au rythme des 4 seules blagues de ton répertoire. Nos conversations profondes sur le sens de la vie entre deux manip me manqueront et j'espère garder contact avec toi malgré ton téléphone préhistorique.

Alicia, merci d'avoir participé à ma progression durant mes premières années ici. Je te dois beaucoup et j'ai toujours apprécié nos expériences communes. Je n'ai aucun doute sur la réussite de ta carrière et j'ai toujours été impressionné par ton management. D'ailleurs, je pense qu'une ultime image en guise de récompense serait tout à fait appropriée.

Mamounette, je te remercie simplement d'être toi-même, une femme d'un certain âge ayant une gentillesse absolue (du moins avant que Benoit ne te contamine trop), merci pour tous ces moments passés en ta compagnie que ce soit le matin au café, le midi au soleil ou à minuit avec un burger king. Il va bientôt être temps pour toi de laisser partir ton fiston du laboratoire. Merci pour tous les souvenirs qui me resteront de notre complicité, que ce soit nos rires, nos petites vanes, nos danses endiablées ou nos moments sportifs au « keep cool ». Reste comme tu es !

Je tiens également à remercier mon ami Benoit qui m'a énormément appris sur la vie de scientifique aguerri. Je pense que notre temps passé à la paillasse en face l'un de l'autre va me manquer autant que notre temps passé dans les bars à danser jusqu'au bout de la nuit. Grâce à toi j'ai pu développer un raisonnement scientifique de façon presque aussi spectaculaire que le développement de ma future cirrhose. Tu représentes un modèle pour moi en tant que scientifique mais aussi en tant que personne. J'ai toujours eu le sentiment que tu te voyais plus jeune en moi mais ce qui est sûr c'est que j'aimerai te ressembler quand je serai (beaucoup) plus vieux.

Je tiens également à remercier chaleureusement le Professeur Steve Lancel pour son soutien, ses conseils, et bien évidemment ses incroyables compétences culinaires. Je me suis toujours senti privilégié par notre relation dépassant le cadre professionnel. Même si j'ai toujours pratiqué intensément avec toi le « brown-noising », sache que nos nombreuses conversations me manquent.

Ma chère Cécici, merci pour tous ces bons moments passés en ta compagnie. Ton talent n'a d'égal que ta malchance légendaire. Je te souhaite le meilleur, ton humour à la hauteur du mien va me manquer.

Ma chère Aurore, bien que ton arrivée au sein de notre équipe soit relativement récente, ta gentillesse, ta persévérance mais surtout tes envolées de voix et tes tics de langage m'ont toujours fait passer un bon moment en ta compagnie que ce soit durant nos longues conversations dans le bureau ou durant la nuit devant le FACS. Ne change rien ! Je n'ai aucun doute sur ta réussite.

Une petite pensée pour Justine, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant quelques années. Merci pour ton aide et surtout pour ta personnalité si agréable.

Merci Marion pour ta compagnie. Je ne croyais jamais dire ça mais tes petites onomatopées et ton hoquet vont me manquer.

Mélissa, je te souhaite le meilleur et j'espère que tu resteras encore un moment avec nous. Ta personnalité agréable et surprenante m'a toujours fait passer de bons moments en ta compagnie.

J'adresse également mes remerciements à ma vieille stagiaire, Bettina. Ce fut un plaisir (au moins pour moi) de travailler en ta compagnie. J'ai tout fait pour que tu apprécies la science mais encore plus pour que tu apprécies le silence au moment de mon départ. Amuse-toi bien tout au long de ta thèse et prends bien soin de notre bébé !

Audrey, je ne comptais pas écrire énormément pour toi sachant que je t'avais déjà largement remercié dans mon rapport de M2. Quoiqu'il en soit, je suis fier d'avoir partagé cette longue aventure à tes côtés. De ton arrivée timide au laboratoire, aux verres partagés où je n'ai réussi à placer que deux mots qui ont évolué en sorties plus fréquentes, en fous rires et en complicité grandissante toutes ces années. Tu es quelqu'un d'absolument adorable, de fantastique et la thèse n'aurait pas eu la même saveur si je ne l'avais pas faite avec toi. Merci pour tout, même si je continue de préférer Marine.

Marine (Zazou), ces 4 dernières années n'auraient pas été les mêmes sans toi. Merci pour ton amitié, ton soutien, ton sourire jour après jour et merci pour tous ces bons moments passés ensemble (même si certains moments ont été plus agréables pour moi que pour toi !). Après l'écriture de ce manuscrit, je peux dire que je t'admire vu la facilité avec laquelle tu as relevé ce défi. J'espère que notre amitié perdurera car tu es une personne formidable.

Mon cher Boulinguez, déjà deux ans que vous m'avez abandonné à mon triste sort, et cependant, votre présence au laboratoire a laissé une trace ineffable dans le cœur de tous

vos collègues, y compris le mien. Je vous remercie pour toutes ces années où nous avons partagé le même bureau et bien plus encore. En effet, vous m'avez apporté tant de choses durant notre collaboration si fortuite, des discussions pas toujours sérieuses, des fous rires mémorables, et votre personnalité à double tranchant n'a cessé de me faire rire, me surprendre, et me faire vous apprécier de façon exponentielle.

Je tiens à remercier également Anaïs avec qui j'ai eu le plaisir de partager un bureau à mon arrivée ici. Merci pour ta gentillesse et ton soutien encore maintenant. Tu as toujours été un modèle pour moi.

J'adresse également une pensée sincère pour Barbara avec qui j'ai eu l'immense plaisir de partager un bureau et beaucoup de rires durant les dernières années. Je me rappellerai de la personne formidable que tu étais, de ton rire si communicatif et de ton authenticité. Notre chère amie déguisée en Télétubbies rose nous manque à tous.

Je tiens également à remercier mon cher collègue Belge Laurent avec qui j'ai eu le plaisir de partager un bureau durant de long mois (surtout pour toi). Merci d'avoir toujours trouvé le temps de répondre à mes questions d'étudiant en master, merci pour ton humour et ta véritable vocation à râler. Merci de m'avoir toujours fait me sentir excellent au basket comparé à toi et merci de m'avoir toujours fait me sentir indispensable durant tes pauses ... lorsque Pelin, Sébastien et Émilie n'étaient pas là.

Olivier, je tiens à remercier le collègue qui n'a jamais refusé de participer à mes tris jusque tard le soir mais je tiens surtout à remercier l'ami et le voisin. J'ai toujours apprécié nos conversations, ta vision de la vie, ton recul et ta bonne humeur si communicative. Merci pour tous les conseils que tu m'as donnés tout ce temps et je te souhaite bien évidemment tout le bonheur du monde.

Merci également à Laurent Pineau pour ton aide inestimable durant ma thèse mais merci surtout pour ton soutien et ta joie de vivre. Merci d'avoir accompagné toutes nos sessions de tri par des blagues, des punchlines avisées et surtout des expressions dont toi seul a le secret.

Pelin, it's been a real pleasure to be around you over the past few years. You knew how to keep your smile in any situation. Stay as you are and I wish you the best for the rest of your brilliant career.

Valentine (alias Valoche), merci pour ton soutien sans faille au labo mais également en dehors. Merci infiniment pour tout ce que tu m'apportes, pour ton aide au quotidien et surtout merci pour m'avoir fait me sentir drôle durant ces dernières années. J'ai absolument confiance en toi et en tes capacités à réussir ta thèse. Tu es une personne formidable et j'espère que nous « collaborerons » encore longtemps ensemble.

Mon cher Bruno, je ne pouvais pas manquer de remercier l'autre grand fan de Kaamelott du labo. Tu es le maître incontesté et tu représentes un modèle de professionnalisme et de gentillesse. Merci pour tous les coups de main que tu m'as donné durant les dernières années puisque, comme tu le dis si bien : « on n'est jamais trop aidé ».

Et j'en profite pour remercier Marie-Hélène pour sa gentillesse et sa bonne humeur à mon égard.

J'aimerais également remercier l'ensemble des étudiants que j'ai eu le plaisir d'encadrer et tout particulièrement Antoine.

J'adresse ma sympathie à toutes les autres personnes du laboratoire avec qui j'ai eu l'immense plaisir d'interagir ces dernières années comme Thara, Nathalie, Emilie, Dori, Delphine, Sandrine, Charlène, Isabelle, Pauline, Valeria, Margaux, Réjane, Sarah, Manjula, Joel, Sébastien, David, Viktor, Kevin, Thomas, Dani, Simon.

Je souhaite remercier mon entourage proche qui m'a soutenu avec un savoureux mélange de rires, de danses et d'alcools ces dernières années alors merci à Donkey, Harmony, Yoann, Margaux, Axel, Nico, Clémence, Flore, Maxence, Leslie et également tous mes amis normands de longue date Rafoo, Théo, Nicolas, Jamin, Clément et Marine.

Je souhaite remercier ma mère pour tous ses sacrifices qui m'ont permis d'en arriver là.

Enfin, j'adresse une pensée particulière à mon père.

---

## RESUME

---

L'homéostasie du muscle squelettique est assurée par sa remarquable aptitude à réguler différents paramètres physiologiques tels que ses fonctions métaboliques ou sa masse. La régulation de la masse musculaire représente un enjeu important pour l'organisme car une dérégulation de cette dernière impacte le métabolisme énergétique global ainsi que d'autres paramètres tels que la locomotion. Ce tissu présente également une capacité importante de régénération suite à des blessures causées par des exercices intensifs ou des myopathies. La régénération du muscle squelettique nécessite une interaction spatio-temporelle précise entre les cellules satellites (SC) et les cellules immunitaires, qui fournissent le microenvironnement optimal pour la prolifération et la différenciation des SCs.

Les rythmes circadiens, générés par notre horloge biologique, contrôlent diverses fonctions physiologiques telles que le métabolisme et l'immunité. Ce système permet aux organismes d'anticiper des changements environnementaux prévisibles tels que l'alternance jour/nuit. Au niveau métabolique, il coordonne la mise en place des voies nécessaires au stockage des nutriments ou au contraire à la dépense énergétique. Concernant l'immunité, le rôle majeur de l'horloge est de réguler la circulation et la fonction des différentes cellules immunitaires afin de préparer ce système durant les phases de la journée où le risque d'infection est le plus élevé. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au rôle de l'horloge circadienne dans le contrôle de la masse du muscle squelettique mais également dans sa capacité régénérative. Le laboratoire a préalablement démontré un rôle majeur de Rev-erb $\alpha$ , un composant moléculaire de l'horloge circadienne, dans la fonction du muscle squelettique. En effet, ce récepteur nucléaire régule la capacité oxydative musculaire en contrôlant les processus de biogenèse mitochondriale et d'autophagie. Les résultats obtenus durant ma thèse mettent en évidence un rôle essentiel de Rev-erba dans le contrôle de la masse musculaire. Précisément, une délétion globale de *Rev-erba* chez la souris entraîne une diminution de la masse musculaire associée à une augmentation de l'expression des gènes relatifs à l'atrophie musculaire. De façon intéressante, l'activation pharmacologique de ce récepteur permet de contrer l'atrophie musculaire induite par un traitement aux glucocorticoïdes.

En parallèle, j'ai également mis en évidence le rôle de l'horloge biologique dans le processus de régénération musculaire. Nous avons montré que des perturbations environnementale et génétique de l'horloge ont un impact sur la régénération du muscle squelettique associé à une altération du recrutement des cellules immunitaires et principalement des cellules myéloïdes. En outre, l'utilisation de modèles génétiques d'altération de l'horloge dans les cellules myéloïdes a mis en évidence des défauts de régénération démontrant l'importance d'une

horloge fonctionnelle au sein de cette population pour contrôler la réparation du muscle squelettique. Des analyses transcriptomiques nous ont permis de relier ce défaut de régénération à une expression perturbée de chimiokines, essentielles dans la communication entre les cellules immunitaires et les cellules satellites, pouvant être à l'origine du défaut de myogenèse observé dans nos modèles.

Par ailleurs, nous nous sommes intéressés dans ce contexte de régénération musculaire à l'étude d'une population immunitaire nouvellement identifiée : les cellules lymphoïdes innées (ILCs). Ces cellules de l'immunité innée sont présentes essentiellement dans les tissus muqueux comme les poumons ou les intestins où elles assurent un rôle de sentinelle. Dans ce contexte, nous avons montré que les ILCs, et principalement les ILC2, étaient présentes dans le muscle squelettique après une blessure. De surcroît, nous avons mis en évidence que la délétion en ILC2 conduisait à un processus de régénération altéré.

---

## ABSTRACT

---

Skeletal muscle homeostasis is ensured by its remarkable ability to control many of its physiological parameters such as its metabolic function or its mass according to the needs of the organism. Muscle mass regulation is essential for global health since its deregulation not only impacts overall energy metabolism but also other parameters such as locomotion. This tissue has an important capacity to regenerate following injuries caused by intensive exercises or myopathies. Skeletal muscle regeneration requires a well-orchestrated spatio-temporal interaction between satellite cells (SCs) and immune cells, which provides the optimal microenvironment for SC proliferation and differentiation.

Circadian rhythms, generated by our biological clock, control various physiological functions such as metabolism and immunity. This ancestral system is present in all organisms allowing them to anticipate and optimize physiological functions to predictable daily changes. The clock integrates signals related to energy state and, in turn, regulates many metabolic pathways gating them to the most relevant time of the day. Concerning immunity, the major role of the clock is to coordinate leucocyte circulation and function allowing the body to anticipate phases of the day with higher risk of infections. In this context, we are interested in the role of the circadian clock in the control of skeletal muscle mass but also in its regenerative capacity. The role of *Rev-erba*, a key component of the biological clock, has already been demonstrated in this tissue by our laboratory. Indeed, this nuclear receptor regulates muscle oxidative capacity by controlling mitochondrial biogenesis and autophagy. My thesis results highlight that *Rev-erba* is also essential in the regulation of muscle mass. Specifically, global deletion of *Rev-erba* leads to muscle mass decrease associated with increased expression of genes related to muscle atrophy. Interestingly, pharmacological activation of this receptor prevents muscle atrophy induced by glucocorticoid treatment.

During my thesis, I also highlighted the role of the circadian clock in the control of muscle regeneration process. We have shown that environmental and genetic clock disruption lead to defective skeletal muscle regeneration associated with an alteration of immune cells recruitment, mainly myeloid cells. Furthermore, regenerative process defects observed in our myeloid cells-specific genetic clock disruption models bring out the importance of a functional clock in these cells to control skeletal muscle repair. Transcriptomic analyses allowed us to associate this regeneration defect to disturbed expression of chemokines essential in the communication between immune cells and satellite cells, which could elicit myogenesis alteration.



In the context of muscle regeneration, we also investigated the role of a newly identified immune population: innate lymphoid cells (ILCs). These innate immune cells are located essentially in mucosal tissues such as lung or intestine where they ensure a sentinel function. We have shown that ILCs, and mainly ILC2, are present in skeletal muscle after injury. Interestingly, we have demonstrated that ILC2 depletion results in impaired regenerative process.

---

## SOMMAIRE

---

Introduction.....	27
1. Le muscle squelettique .....	28
1.1 Généralités sur le muscle squelettique .....	28
1.2 Développement embryonnaire du muscle squelettique.....	29
1.3 Structure du muscle squelettique.....	30
1.4 La contraction musculaire.....	32
1.4.1 La jonction neuro-musculaire .....	32
1.4.2 Interaction DHPR – RYR et libération de calcium dans le cytosol .....	34
1.4.3 Stimulation du sarcomère .....	34
1.4.4 Le relâchement musculaire .....	37
1.5 Régulation de la masse musculaire .....	37
1.5.1 Régulation de l'hypertrophie musculaire .....	38
1.5.1.1 La voie Insulin/IGF-1 – AKT – mTOR .....	38
1.5.1.2 La voie des $\beta$ -adrénergiques .....	39
1.5.1.3 Autres régulateurs soutenant la croissance musculaire .....	40
1.5.2 Régulation de l'atrophie musculaire .....	42
1.5.2.1 Le système du protéasome .....	42
1.5.2.2 Le système autophagie – lysosome.....	43
1.5.2.3 La voie TGF $\beta$ /Myostatine – Activine – BMP – Smad .....	44
1.5.2.4 La voie des glucocorticoïdes (GCs) .....	45
1.5.2.5 Le rôle des cytokines dans l'atrophie musculaire .....	46
1.5.2.6 Le stress réticulaire .....	47
1.5.2.7 Les dysfonctions mitochondriales .....	48
1.5.2.8 Implication d'autres cellules du muscle squelettique dans la régulation de sa masse .....	48
2. Régénération du muscle squelettique .....	49
2.1 La cellule souche musculaire.....	49

2.1.1 La quiescence des cellules souches musculaires .....	50
2.1.2 L'activation et la prolifération des cellules souches musculaires .....	51
2.1.3 La différenciation et la fusion des cellules souches musculaires .....	52
2.1.4 Le métabolisme des cellules myogéniques .....	54
2.2 L'inflammation dans la régénération musculaire .....	56
2.2.1 Initiation de l'inflammation .....	56
2.2.2 Inflammation précoce .....	58
2.2.3 Les macrophages et leur polarisation durant la régénération musculaire .....	59
2.2.4 L'implication des lymphocytes mTregs dans la régénération musculaire .....	64
2.3 Les progéniteurs fibro-adipogéniques .....	66
2.4 L'angiogénèse et l'hypoxie durant la régénération musculaire .....	69
2.4.1 Le rôle des cellules endothéliales dans la myogénèse .....	69
2.4.2 L'hypoxie au sein du muscle blessé .....	72
2.5 La communication entre les cellules immunitaires et les différents acteurs de la régénération musculaire .....	74
2.5.1 Les cytokines favorisant la prolifération des cellules myogéniques .....	74
2.5.2 Les cytokines et facteurs de croissance favorisant la différenciation et la fusion des myoblastes .....	77
3. L'horloge circadienne .....	79
3.1 Composition de l'horloge circadienne .....	80
3.2 Les récepteurs nucléaires Rev-erba et RORα .....	82
3.2.1 Les récepteurs nucléaires .....	82
3.2.1.1 Structure d'un récepteur nucléaire (RN) .....	82
3.2.1.2 Classification et mécanisme d'action .....	83
3.2.2 Le récepteur nucléaire RORα .....	85
3.2.2.1 Isoformes et ligands des RORs .....	85
3.2.2.2 RORα, régulateur métabolique .....	85
3.2.2.3 RORα, un régulateur immunitaire .....	86
3.2.3 Le récepteur nucléaire Rev-erba .....	88

3.2.3.1	Structure et particularités de Rev-erba .....	88
3.2.3.2	La régulation du métabolisme par Rev-erba .....	89
3.2.3.3	La régulation de l'immunité par Rev-erba .....	91
3.3	L'horloge circadienne et le métabolisme.....	92
3.3.1	Interaction entre l'horloge circadienne et le métabolisme .....	92
3.3.2	Contrôle du métabolisme par l'horloge biologique.....	95
3.3.2.1	Contrôle du métabolisme glucidique par l'horloge biologique .....	95
3.3.2.2	Contrôle du métabolisme lipidique par l'horloge biologique .....	97
3.3.2.3	Chronothérapies associés au métabolisme .....	99
3.4	Contrôle de la fonction musculaire par l'horloge biologique .....	99
3.4.1	L'horloge circadienne dans le développement et l'homéostasie du muscle squelettique .....	100
3.4.2	L'horloge circadienne dans la fonction du muscle squelettique .....	101
3.4.3	L'horloge circadienne durant l'exercice .....	103
3.5	L'horloge circadienne et l'immunité.....	104
3.5.1	La régulation circadienne du trafic leucocytaire.....	105
3.5.1.1	Développement et migration des cellules de la moelle osseuse à partir des progéniteurs hématopoïétiques .....	105
3.5.1.2	Recrutement des leucocytes au sein des tissus .....	107
3.5.2	Contrôle circadien des protéines chimioattractantes et des signaux inflammatoires .....	108
3.5.3	L'horloge circadienne régule la fonction des cellules immunitaires.....	111
3.5.4	Chronothérapies visant les cellules immunes.....	114
4.	Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) .....	116
4.1	Origine et développement des ILCs.....	116
4.2	Les différents types d'ILCs .....	118
4.2.1	Les cellules Natural Killer .....	118
4.2.2	Les ILCs 1.....	120
4.2.3	Les ILC2 .....	121
4.2.3.1	Les ILC2 mémoires .....	123

4.2.3.2 Les ILC2 régulateurs .....	124
4.2.4 Les ILC3 .....	125
4.2.5 Les cellules LTi .....	127
4.3 Plasticité des ILCs .....	128
4.3.1 Plasticité ILC1 – ILC3 .....	128
4.3.2 Plasticité ILC1 – Cellules NK.....	128
4.3.3 Plasticité ILC2 – ILC1 .....	129
4.3.4 Plasticité ILC2 – ILC3 .....	129
5. Objectifs de l'étude .....	131
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>133</b>
1. Modèles et expérimentation animale.....	134
1.1 Etude de la masse musculaire chez des souris .....	134
1.1.1 Induction d'une atrophie musculaire.....	134
1.1.2 Surexpression <i>in vivo</i> de Rev-erba chez des souris WT .....	134
1.2 Modèles génétiques associés à l'étude de l'horloge circadienne dans la régénération musculaire.....	135
1.2.1 Souris <i>Rev-erba</i> <sup>-/-</sup> .....	135
1.2.2 Souris <i>LysM</i> <sup>Cre/+</sup> ; <i>Rev-erba</i> <i>DBD</i> <sup>fl/fl</sup> .....	135
1.2.3 Souris <i>LysM</i> <sup>Cre/+</sup> ; <i>Rora</i> <sup>fl/fl</sup> .....	135
1.2.4 Souris <i>LysM</i> <sup>Cre/+</sup> ; <i>TG(Rev-erba)</i> <sup>Fl/Fl</sup> .....	135
1.3 Protocoles d'altération de l'horloge environnementale.....	136
1.3.1 Souris WT blessées à différents temps de la journée.....	136
1.3.2 Souris WT soumises à un « jetlag » .....	136
1.3.3 Souris WT soumises à une lumière constante .....	137
1.4 Modèle génétique associée à l'étude du rôle des ILC2 dans la régénération musculaire .....	137
1.5 Protocole de blessure du TA .....	137
2. Modèles cellulaires .....	137
2.1 Isolement et culture de myoblastes murins primaires .....	137

2.2 Traitements <i>in vitro</i> sur lignée cellulaire C2C12.....	138
3. Digestion des muscle et marquages pour la cytométrie en flux.....	138
3.1 Marquage des populations immunitaires intervenant durant les deux premiers jours de la régénération (Chapitre 2).....	139
3.2 Marquage des populations immunitaires intervenant entre 2 et 7 jours après la blessure musculaire (Chapitre 2).....	140
3.3 Sélection des populations immunitaires pour la cinétique des ILCs durant la régénération.....	141
3.4 Etude de l'origine des leucocytes au sein des muscles blessés .....	143
3.5 Tri des macrophages durant la régénération musculaire par cytométrie en flux.....	144
3.6 Etude de la prolifération des cellules souches musculaires par injection d'Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) .....	144
4. Marquages immuno-histochimiques.....	146
4.1 Marquage de la lignée C2C12 .....	146
4.2 Marquage de coupes histologiques de muscles (Projet 1) .....	147
4.2.1 Etude de la taille des fibres chez les souris <i>Rev-erba</i> <sup>+/+</sup> et <i>Rev-erba</i> <sup>-/-</sup> .....	147
4.2.2 Analyses histologiques (Projet 1) .....	147
4.3 Marquage des coupes histologiques de muscles blessés (Projet 2-3) .....	147
4.3.1 Immuno-marquage du contour des fibres et coloration des noyaux .....	148
4.3.2 Marquage histologique à l'Hematoxyline et l'Eosine.....	148
4.3.3 Marquage histologique au Rouge Sirius.....	148
4.3.4 Analyses histologiques (Projet 2-3).....	149
5. Etude de l'expression génique par RT-qPCR.....	149
5.1 Extraction d'ARN .....	149
5.1.1 Extraction à partir de muscles .....	149
5.1.2 Extraction à partir des C2C12 .....	149
5.1.3 Partie commune de l'extraction d'ARNm .....	150
5.1.4 Extraction et amplification des ARNm issus de macrophages triés .....	150
5.2 Rétro-Transcription (RT).....	150

5.3 Réaction de polymérisation en chaîne (qPCR) et analyse quantitative des résultats .....	150
5.4 Analyses transcriptomiques par puces à ADN .....	152
6. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) .....	152
7. Mesure de l'activité protéasomale.....	153
<b>Résultats.....</b>	<b>154</b>
Chapitre 1 : Rev-erb- $\alpha$ régule les gènes relatifs à l'atrophie pour contrôler la masse du muscle squelettique .....	155
1.1 Impact de la délétion de <i>Rev-erba</i> <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> sur la masse musculaire et la taille des fibres .....	155
1.2 Régulation par Rev-erb $\alpha$ des voies cataboliques et anti-anaboliques dans le muscle squelettique.....	159
1.3 Impact de la surexpression ou de l'activation pharmacologique de Rev-erb $\alpha$ sur l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone .....	163
1.4 Rev-erb $\alpha$ contrôle la translocation nucléaire des FoxOs et cible directement les gènes relatifs à l'atrophie .....	167
Chapitre 2 : Rôle de l'horloge circadienne sur le processus de régénération musculaire : importance des cellules myéloïdes .....	170
2.1 Impact d'une altération environnementale de l'horloge sur le processus de régénération du muscle squelettique ainsi que sur la cinétique des cellules myéloïdes .....	171
2.2 Impact de l'heure de la blessure sur le processus de régénération musculaire.....	180
2.3 Impact d'une altération génétique de l'horloge circadienne au sein des cellules myéloïdes sur le processus de régénération musculaire .....	189
2.4 Impact d'une délétion génétique de l'horloge sur la fonction des macrophages recrutés au cours de la régénération musculaire.....	195
Chapitre 3 : Rôle des ILCs 2 dans la régénération du muscle squelettique.....	200
3.1 Mise en évidence de la présence de cellules lymphoïdes innées (ILCs) au cours de la régénération musculaire .....	200
3.2 Impact d'une déplétion en en ILC2 sur le processus de régénération musculaire..	202

3.3 Impact d'une déplétion en ILC2 sur la prolifération et la différenciation/fusion des myoblastes .....	204
3.4 Impact d'une déplétion en ILC2 sur l'inflammation au cours de la régénération musculaire.....	205
3.5 Impact d'une re-blessure sur le sous-type et le nombre d'ILC2 au sein du muscle blessé.....	206
<b>Discussion .....</b>	<b>208</b>
Chapitre 1 : Rev-erb- $\alpha$ régule les gènes relatifs à l'atrophie pour contrôler la masse du muscle squelettique .....	209
Chapitre 2 : Rôle de l'horloge circadienne dans la régénération musculaire .....	211
Chapitre 3 : Rôle des ILCs dans la régénération.....	219
<b>Bibliographie.....</b>	<b>224</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>292</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

**AA** : Acides Aminés

**AREG** : Amphiréguline

**AAV1** : Adeno-Associated Virus 1

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ACACA** : Acetyl-CoA Carboxylase Alpha

**ATF4** : Activating Transcription Factor 4

**ACC1** : acétyl coenzyme A carboxylase 1

**ATGL** : Adipose Triglyceride Lipase

**ACL** : ATP Citrate Lyase

**ATP** : Adenosine TriPhosphate

**ADAMTS1** : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motif 1

**ANXA1** : Annexin A1

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**BACH1** : BTB domain CNC Homolog 1

**AF-1** : Activation Function 1

**BaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Baryum

**AGL** : Acides Gras Libres

**BAFF** : B-cell Activating Factor

**AKT** : Protein Kinase B

**BCAT2** : Branched Chain Amino-Acid Transaminase 2

**ALK** : Anaplastic Lymphoma Kinase

**BHLHE40** : Class E Basic Helix-Loop-Helix protein 40

**AMC** : Méthylcoumarine

**BIP** : Binding immunoglobulin protein

**Ang-1** : Angopoiétine-1

**Bmal1** : Brain and Muscle Arnt-like protein-1

**ANGPTL4** : Angiopietin-Like 4

**BMP** : Bone Morphogenetic Protein

**APLN** : Apelin

**BSA** : Albumine de sérum bovin

**APRIL** : A Proliferation-Inducing Ligand

**CARM1** : Coactivator associated Arginine Methyltransferase 1

<b>CAT</b> : Chloramphenicol Acetyl-Transferase	<b>C/EBP<math>\beta</math></b> : CCAAT/Enhancer Binding Protein Beta
<b>CCL2</b> : Chemokine (C-C motif) Ligand 2	<b>DAMP</b> : Damage Associated Molecular Pattern
<b>CCN2</b> : Cellular Communication Network Factor 2	<b>DBD</b> : DNA Binding Domain
<b>CCR2</b> : C-C Chemokine Receptor type 2	<b>DC</b> : Cellule Dendritique
<b>CDKN1A</b> : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	<b>DHPR</b> : Dihydropyridine Receptor
<b>CHILP</b> : Common Progenitor to all helper-like ILC	<b>DKK3</b> : Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 3
<b>CHIP</b> : Immunoprécipitation de la Chromatine	<b>DLL1</b> : Delta-Like 1
<b>CIITA</b> : Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator	<b>DMEM</b> : Milieu Eagle modifié de Dulbecco
<b>CKI<math>\epsilon</math></b> : Casein Kinase I $\epsilon$	<b>DRP1</b> : Dynamin-related protein 1
<b>CLOCK</b> : Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput	<b>E4BP4</b> : Adenovirus E4 Promoter Pinding Protein
<b>CLP</b> : Common Lymphoid Progenitors	<b>ECC</b> : Excitation Contraction Coupling
<b>CPLX1</b> : Complexine-1	<b>ECP</b> : protéine cationique
<b>CREB</b> : C-AMP Response Element-Binding protein	<b>EDU</b> : 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
<b>CRY</b> : Cryptochrome	<b>EGF</b> : Facteurs de Croissance Epithéliaux
<b>CSA</b> : Cross-Sectional Area	<b>eIF3-F</b> : Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F
<b>CSF1</b> : Colony Stimulating Factor 1	<b>eIF4E</b> : Eukaryotic translation Initiation Factor 4 <sup>E</sup>
<b>CTLA-4</b> : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	<b>EILP</b> : Early ILC Progenitors
<b>CxCL1</b> : C-X-C Motif Chemokine Ligand 1	<b>EP4</b> : Prostaglandin E Receptor 4

<b>EPO</b> : Erythropoïétine	<b>GDF3</b> : Growth Differentiation Factor 3
<b>ERK</b> : Extracellular signal-Regulated Kinase	<b>GDNF</b> : Glial cell-Derived Neurotrophic Factor
<b>ER<math>\alpha</math></b> : Estrogen Receptor $\alpha$	<b>GFP</b> : Green Fluorescent Protein
<b>FABP4</b> : Fatty Acid-Binding Protein 4	<b>GLP-1</b> : Glucagon-Like Peptide-1
<b>FAD</b> : Flavine Adénine Dinucleotide	<b>GLUT</b> : Glucose Transporter
<b>FAK</b> : Focal Adhesion Kinase	<b>GPR56</b> : G protein-coupled receptor 56
<b>FAO</b> : Fatty Acid Oxidation	<b>GR</b> : Récepteur aux Glucocorticoïdes
<b>FAP</b> : Fibro-Adipogenic Progenitor	<b>GSK3</b> : Glycogen Synthase Kinase 3
<b>FASN</b> : Fatty Acid Synthase	<b>GYS2</b> : Glycogen Synthase 2
<b>FBXL3</b> : F-box/LRR-repeat protein 3	<b>H&amp;E</b> : Hématoxyline et Eosine
<b>FFAR2</b> : Free Fatty Acid Receptor 2	<b>HAT</b> : Histone Acetyl-Transferase
<b>FGF</b> : Fibroblast Growth Factor	<b>HDAC</b> : Histone Déacétylase
<b>FoxO3</b> : Forkhead Box O3	<b>HDL</b> : High Density Lipoprotein
<b>FPR2</b> : Formyl Peptide Receptor 2	<b>HDM</b> : House Dust Mite
<b>G6Pase</b> : Glucose-6-Phosphatase	<b>HFD</b> : High-Fat Diet
<b>GADD45<math>\alpha</math></b> : Growth Arrest and DNA Damage-inducible 45 $\alpha$	<b>HGF</b> : Hepatocyte Growth Factor
<b>GC</b> : Glucocorticoïde	<b>HIF-1<math>\alpha</math></b> : Hypoxia-Inducible Factor 1- $\alpha$
<b>G-CSF</b> : Granulocyte Colony-Stimulating Factor	<b>HIV-1</b> : Human Immunodeficiency Virus 1

**HMGCoA** : Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase

**HMOX** : Heme Oxygénase 1

**HMT** : Histone Methyl-Transferase

**HNF-4** : Hepatocyte Nuclear Factor 4

**HRE** : Hypoxia-Response Elements

**HSL** : Hormone-Sensitive Lipase

**HSP90** : Heat Shock Protein 90

**HSPC** : Progéniteurs Hématopoïétiques

**ICAM-1** : InterCellular Adhesion Molecule-1

**ICOS** : Inducible T-cell COstimulator

**IFN $\gamma$**  : Interféron Gamma

**IGF-1** : Insulin-like Growth Factor 1

**IGFBP6** : Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 6

**I $\kappa$ B** : Inhibitor of nuclear factor Kappa B

**IL** : Interleukine

**ILC** : Innate Lymphoïd Cell

**INOS** : Inducible Nitric Oxide Synthase

**IRE1** : Inositol-Requiring Enzyme-1

**IRS1** : Insulin Receptor Substrate 1

**JAK** : Janus kinase

**KDM6A** : Lysine-specific demethylase 6A

**KLF15** : Kruppel Like Factor 15

**LBD** : Ligand Binding Domain

**LBX1** : Ladybird Homeobox 1

**LC3** : Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3

**LcoR** : Ligand dependant nuclear receptor CoRepressor

**LIF** : Leukaemia Inhibitory Factor

**LKB1** : Liver Kinase B1

**LMPP** : Lymphoid & Myeloid Primed Multipotent Progenitors

**LPL** : lipoprotéine Lipase

**LRH-1** : Liver Receptor Homolog 1

**LTi** : lymphoid tissue inducer

**MAC** : Membrane Attacking Complex

**MAFbx** : Muscle Atrophy F-box

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase

**M-CSF** : Macrophage Colony-Stimulating Factor

<b>MCU</b> : Mitochondrial Calcium Uniporter	<b>MYF5</b> : Myogenic Factor 5
<b>MEF2</b> : Myocyte Enhancer Factor-2	<b>MYOD1</b> : Myoblast Determination Protein 1
<b>Metrnl</b> : météorine-like	<b>MYOG</b> : Myogénine
<b>Mettl21e</b> : methyltransferase-like 21e	<b>nAChR</b> : Nicotinic Acethylcholine Receptor
<b>MHC</b> : Myosin Heavy Chain	<b>NAD<sup>+</sup></b> : Nicotinamide Adénine Dinucléotide <sup>+</sup>
<b>MIP-1</b> : Macrophage Inflammatory Protein 1	<b>NAFLD</b> : Non Alcoholic Fatty Liver Disease
<b>MKP1</b> : MAPK Phosphatase-1	<b>NAMPT</b> : Nicorinamide Phosphoribosyltransferase
<b>MMP</b> : Matrix Metalloproteinase	<b>NASH</b> : Non-Alcoholic SteatoHepatitis
<b>MNK1</b> : MAPK –interacting protein Kinase 1	<b>N-COR</b> : Nuclear Receptor CoRepressor
<b>MRF</b> : Myogenic Regulatory Factor	<b>NE</b> : Norépinéphrine
<b>mRNP</b> : messenger Ribonucleoprotein Granule	<b>NFATc2</b> : Nuclear Factor Of Activated T Cells 2
<b>mTOR</b> : Mammalian Target Of Rapamycin Kinase	<b>NFIL3</b> : Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated
<b>mTORC</b> : Mammalian Target Of Rapamycin Complex	<b>NFIX</b> : Nuclear Factor I X
<b>MUNC18-like</b> : Mammalian Uncoordinated- 18-like	<b>NF-Y</b> : Nuclear Factor-Ya
<b>MuRF1</b> : Muscle RING-Finger protein-1	<b>NF-κB</b> : Nuclear Factor-Kappa B
<b>MUSA1</b> : Muscle Ubiquitin ligase of SCF complex in Atrophy-1	<b>NGF</b> : Nerve Growth Factor
<b>MVD</b> : Mevalonate Diphosphate Decarboxylase	<b>NK</b> : Natural Killer
<b>MyBP</b> : Myosin Binding Protein	<b>NMU</b> : Neuromedin U

<b>NOD2</b> : Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2	<b>PHD</b> : Prolyl Hydroxylase Domain
<b>NRF2</b> : Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	<b>PITX</b> : Paired Like Homeodomain
<b>NURR1</b> : Nuclear Receptor Related 1 protein	<b>PKA</b> : Protéine Kinase A
<b>OGT</b> : O-GlcNac Transferase	<b>POSTN</b> : Périostine
<b>OPA1</b> : Optic atrophy type 1	<b>PPAR</b> : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
<b>OSM</b> : Oncostatin M	<b>PTPN11</b> : Tyrosine-Protein Phosphatase non-Receptor type 11
<b>PARP-1</b> : polyADP-Ribose Polymérase-1	<b>RAS</b> : Rat sarcoma virus
<b>Pax3</b> : Paired-box 3	<b>RB</b> : Retinoblastoma Protein
<b>PBS</b> : Tampon Phosphate Salin	<b>RBBP</b> : RB Binding Protein
<b>PCK1</b> : Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1	<b>RE</b> : Réticulum Endoplasmique
<b>PCNA</b> : Proliferating Cell Nuclear Antigen	<b>REDD1</b> : Regulated in development and DNA Damage Responses 1
<b>PDGF</b> : Platelet-Derived Growth Factor	<b>Rev-erba</b> : Reverse Strand of ERBa
<b>PDGFRα</b> : Platelet-Derived Growth Factor Receptor α	<b>Rheb</b> : Ras Homolog Enriched in Brain
<b>PECAM-1</b> : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1	<b>RhoA</b> : Ras homolog family member A
<b>PEPCK</b> : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase	<b>RIP140</b> : Receptor Interacting Protein 140
<b>PER</b> : Period	<b>RN</b> : Récepteur Nucléaire
<b>PERK</b> : Protein Kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase	<b>RORα</b> : Retinoid-related Orphan Receptor α
<b>PGC1α</b> : PPAR Gamma Coactivator 1-alpha	<b>ROS</b> : Espèces réactives de l'oxygène

<b>RTK</b> : Receptor Tyrosine Kinase	<b>STAT3</b> : Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
<b>RXR</b> : Retinoid X Receptor	<b>SVF</b> : Sérum de veau Foetal
<b>RYR</b> : Ryanodine Receptor	<b>TA</b> : Tibialis Anterior
<b>S1P</b> : Sphingosine 1-Phosphate	<b>T-cap</b> : Téléthonine
<b>S6K</b> : Ribosomal Kinase S6	<b>TFE3</b> : Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3
<b>SC</b> : Satellite Cell	<b>TFEB</b> : Transcription Factor EB
<b>SCF</b> : Stem cell Factor	<b>TGFβ</b> : Transforming Growth Factor β
<b>SERCA</b> : SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium Transport ATPase	<b>TIF-1</b> : Transcription Intermediary Factor 1
<b>SHP</b> : Small Heterodimer Partner	<b>TIM</b> : Timeless
<b>SIRT1</b> : Sirtuin 1	<b>TL1A</b> : TNF-like Ligand 1A
<b>Six1</b> : SIX Homeobox 1	<b>TLR</b> : Toll-Like Receptor
<b>SMART</b> : Specific of Muscle Atrophy and Regulated by Transcription	<b>TNFα</b> : Tumor Necrosis Factor α
<b>SMRT</b> : Silencer Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors	<b>TRAF6</b> : TNF Receptor-Associated Factor 6
<b>SNARE</b> : NSF-attachment Protein Receptor	<b>TRAIL</b> : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
<b>SR</b> : Réticulum Sarcoplasmique	<b>Trim32</b> : Tripartite Motif Containing 32
<b>SRB1</b> : Scavenger receptor class B member 1	<b>TSC2</b> : Tuberous Sclerosis Complex 2
<b>SREBP</b> : Sterol Regulatory Element-Binding Protein	<b>TSLP</b> : Thymic Stromal Lymphopoietin
<b>SRF</b> : Serum Response Factor	<b>TWEAK</b> : TNF-related weak inducer of apoptosis

**Twist-1** : Twist-related protein 1

**UBC** : Ubiquitin C

**UBR4** : Ubiquitin Protein Ligase E3

Component N-Recognin 4

**UCP2** : Uncoupling Protein 2

**ULK1** : Unc-51 Like Autophagy Activating

Kinase 1

**VCP** : Valosin-Containing Protein

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VGSC** : Voltage Gated Sodium Channel

**VIP** : Vasoactive Intestinal Peptide

**WISP1** : WNT1-inducible-Signaling

Pathway Protein 1

**WT** : Wild-type

**XPB1** : X-Box Binding Protein 1

**ZFP36** : Zinc Finger Protein 36

**ZT** : Zeitgeber Time



# **Introduction**

# 1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE

## 1.1 Généralités sur le muscle squelettique

Il existe 3 types de muscles chez les mammifères : le muscle cardiaque, le muscle squelettique et les muscles lisses qui ont chacun une physiologie et des fonctions différentes (Figure 1).

Le muscle cardiaque est le tissu principal du cœur et il lui permet de se contracter afin d'assurer une oxygénation et un maintien de toutes les cellules de l'organisme à travers la circulation sanguine. Les cardiomyocytes qui composent ce muscle cardiaque ont une apparence striée épaisse et creuse. De plus, ces cellules sont connectées entre elles par des disques intercalés qui vont permettre une transmission rapide de l'information électrique formant une unité durant la contraction musculaire. Ce qui différencie ce muscle des autres est que sa contraction est rythmique et surtout involontaire. En effet, le muscle cardiaque contient également des cellules de stimulateur cardiaque spécialisées qui vont permettre une contraction indépendamment d'une stimulation électrique.

Les cellules musculaires lisses sont également composées de fibres d'actine et de myosine comme les deux autres types de muscles mais celles-ci sont organisées en feuilles plutôt qu'en stries ce qui leur donne cette apparence de cellules lisses. Ces cellules sont intégrées dans la paroi d'un grand nombre d'organes tels que l'intestin, les poumons, l'organe reproducteur, les vaisseaux sanguins ainsi que la peau, et permettent la contraction et le mouvement de ces organes. De la même façon que les cardiomyocytes, la contraction des cellules musculaires lisses n'est pas volontaire et fait intervenir l'interaction entre le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et la calmoduline qui vont stimuler la phosphorylation de la chaîne de myosine<sup>1</sup>.

Enfin, le muscle squelettique est le muscle le plus abondant de l'organisme. Il représente 40% de la masse corporelle chez l'Humain et contient entre 50 à 75% de toutes les protéines de l'organisme. Ce muscle possède diverses fonctions. Tout d'abord, il participe au support des os afin de maintenir la posture chez les mammifères et de garantir le mouvement.

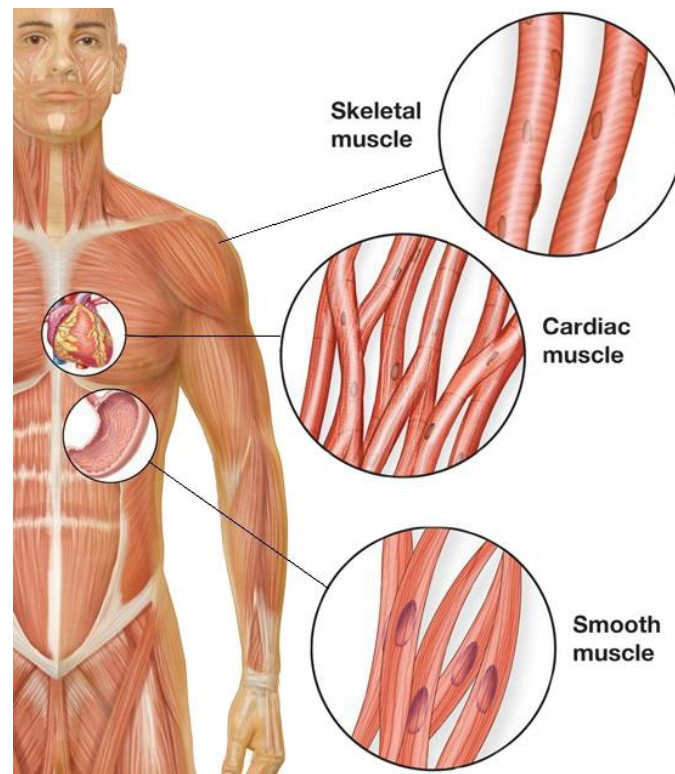


Figure 1 : Les différents types de fibres musculaires de l'organisme (Smooth Muscle Cells: Key Regulators in Cardiovascular Disease, [www.lifelinecelltech.com](http://www.lifelinecelltech.com)).

D'un point de vue métabolique, le muscle squelettique présente également des fonctions majeures au sein de l'organisme. Tout d'abord en tant que réservoir énergétique puisqu'il est responsable de la capture de plus de 80% du glucose postprandial et constitue une réserve de plusieurs autres substrats énergétiques indispensables à l'organisme comme les acides aminés et les carbohydrates<sup>2</sup>. Il permet également la production de chaleur afin de maintenir la température corporelle.

Ce tissu supporte également la respiration *via* le mouvement du diaphragme. Contrairement au muscle cardiaque et lisse, le muscle squelettique réagit uniquement de façon volontaire à travers une stimulation électrique des nerfs. Les fibres musculaires squelettiques sont des fibres de grandes tailles (entre 10 et 80mm de diamètre chez l'humain) et la plupart s'étendent sur la longueur du muscle entier.

## **1.2 Développement embryonnaire du muscle squelettique**

Les myofibres de tout l'organisme proviennent initialement des cellules progénitrices mésodermes, originaire du myotome. Ce myotome est issu de cellules du somite épithélial, lui-même formé à partir du mésoderme paraxial pré-somitique (Figure 2)<sup>3</sup>.

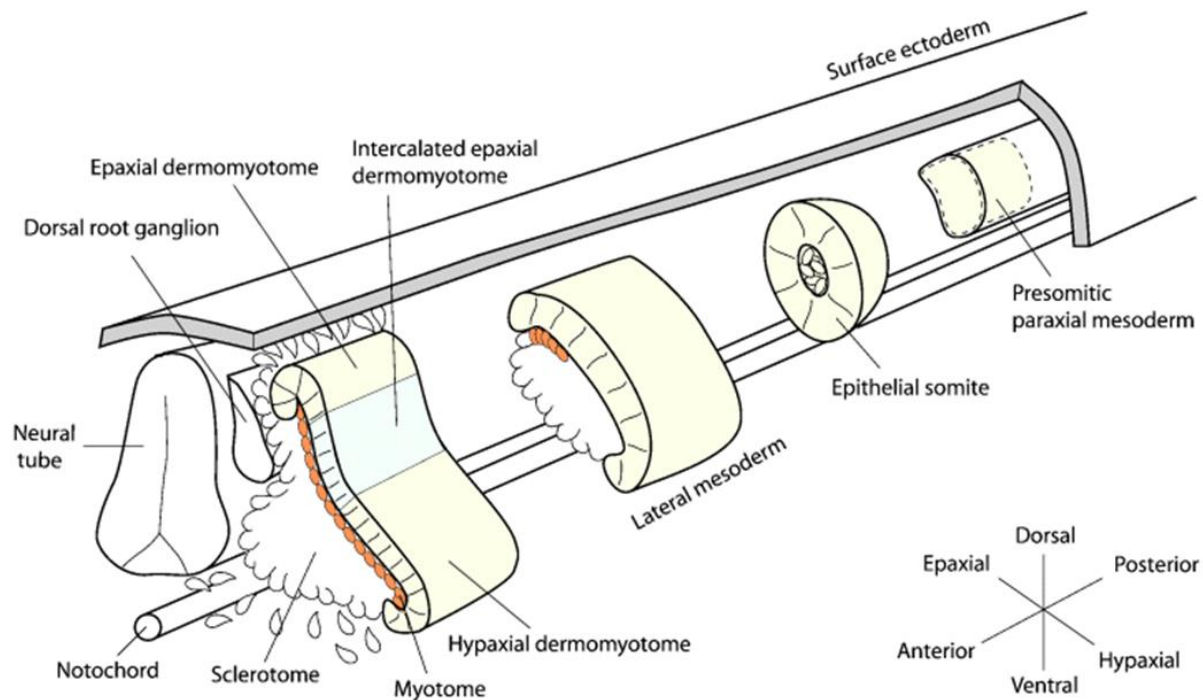


Figure 2 : Origine et développement du muscle squelettique durant l'embryogenèse (Buckingham et al., 2003).

Par la suite, la délimitation et la migration de ces progéniteurs myogéniques dépendent du facteur de transcription Paired-box 3 (Pax3). Précisément, ce facteur régule LBX1 (Ladybird Homeobox 1) et cMET ainsi que les facteurs SIX1 et SIX4 (SIX Homeobox) qui sont à l'origine de la différenciation myogénique de ces cellules progénitrices<sup>4-6</sup>. Après la migration de ces progéniteurs, la myogénèse débute avec l'expression des facteurs Myogenic Factor 5 (MYF5) et Myoblast Determination Protein 1 (MYOD1) pour permettre la prolifération. L'étape de différenciation se réalise ensuite avec une diminution de l'expression de MYF5 et une augmentation de deux autres facteurs myogéniques : la myogénine (MYOG) et le Myogenic Regulatory Factor 4 (MRF4). Cette différenciation permet la formation des myocytes qui vont ensuite fusionner pour former des myotubes matures. Durant ce processus, une partie de ces progéniteurs myogéniques demeure en état de quiescence afin d'assurer une réserve de cellules souches capables de reformer des fibres musculaires si celles-ci sont dégradées durant la vie de l'organisme<sup>7</sup>.

### 1.3 Structure du muscle squelettique

Un muscle est enveloppé par un tissu connectif appelé l'épimysium. En son sein, les fibres musculaires sont assemblées en faisceaux, eux aussi encerclés par un autre tissu : le pérymysium. Dans ces faisceaux musculaires, on retrouve les myofibres séparées par l'endomysium (Figure 3). Le muscle squelettique comporte également des capillaires sanguins

permettant l'apport de nutriments et d'oxygène aux cellules musculaires ainsi que des nerfs permettant la transmission de l'information du cerveau au muscle, déclenchant ainsi les contractions musculaires.

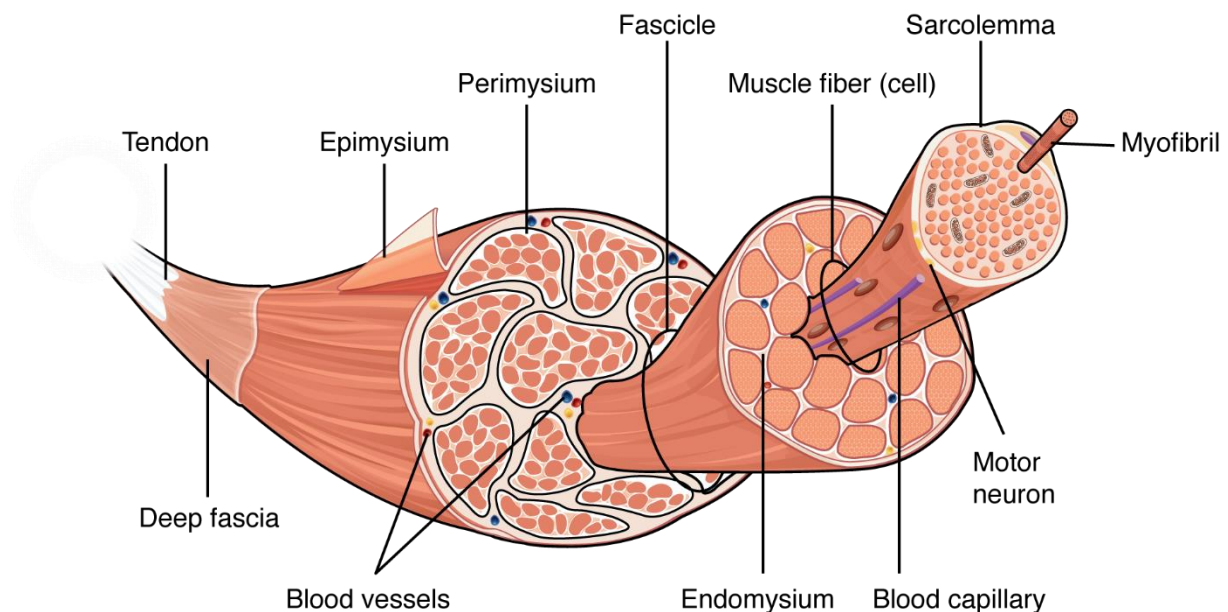


Figure 3 : Organisation du muscle squelettique (Anatomy & Physiology, Skeletal Muscle : <https://open.oregonstate.edu>).

La fibre musculaire ou myofibre est considérée comme l'unité cellulaire de la contraction, dû à sa caractéristique de pouvoir se contracter indépendamment des autres fibres. Les myofibres sont des cellules multinucléées et post-mitotiques. Les techniques transcriptomiques et d'imagerie développées ces dernières années ont permis de déterminer que chaque noyau présent dans les fibres musculaires contrôlait la synthèse protéique d'une zone spécifique de la fibre<sup>8-10</sup>. Ces régions appelées domaines nucléaires sont finement régulées. Il existe, par ailleurs, une coordination entre ces zones notamment pour la production de certaines protéines structurales. Cependant, ce n'est pas une généralité car certaines fibres « hybrides » peuvent présenter une disparité dans leur transcriptome, principalement dans l'expression des myosines<sup>10,11</sup>. En ne prenant pas en compte l'eau présente dans ces cellules, les myofibres sont composées à 80% de protéines et à 8% de sarcoplasme. Il est estimé que chaque fibre musculaire est constituée de centaines de myofibrilles contenant des milliards de myofilaments, formant ainsi le sarcomère. Le réticulum sarcoplasmique encercle la myofibrille afin de former un réseau appelé tubule-T (Figure 4). Le tubule-T est une invagination du sarcolemme qui a un rôle majeur dans la conduction du message nerveux et la contraction musculaire. Ce réseau est en contact direct avec l'extérieur de la cellule afin d'uniformiser la contraction. Le réticulum sarcoplasmique est quant à lui le lieu de stockage, de libération et de recapture du calcium qui permet l'activité des myofilaments. Ce calcium est stocké

précisément dans les citernes terminales, situées à proximité du système de tubule transverse. Par ailleurs, les deux citernes regroupées autour du tubule T forment la triade<sup>2</sup>. La proximité des mitochondries associées à ce système permet la production d'énergie nécessaire à la contraction musculaire (Figure 4).

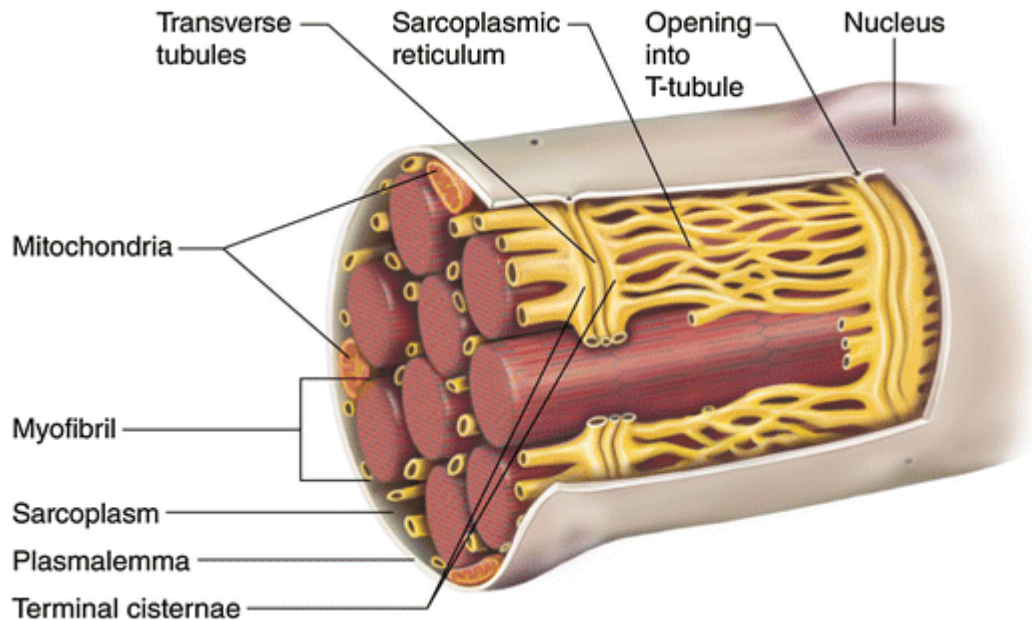


Figure 4 : Organisation du réticulum sarcoplasmique et des tubules transverse (Frontera et al., 2014).

## 1.4 La contraction musculaire

Les muscles squelettiques matures ont 3 composants majeurs pour permettre leur activité : la jonction neuro-musculaire permettant aux fibres musculaires de recevoir les influx nerveux, la machinerie impliquée dans la transduction de cette information, et le sarcomère qui est l'unité effectrice du muscle permettant la contraction musculaire.

### 1.4.1 La jonction neuro-musculaire

La jonction neuro-musculaire constitue l'échange synaptique rendant possible la transmission des impulsions électriques à partir du moto-neurone vers le muscle innervé. Cette jonction est constituée de 3 éléments majeurs : la région pré-synaptique, l'espace synaptique et enfin la région post-synaptique.

Mis à part la région qui va être directement en contact avec la fibre musculaire, les autres régions de la partie terminale du nerf vont être recouvertes de cellules de Schwann. Cette partie terminale du nerf va également contenir de nombreuses vésicules synaptiques permettant de stocker, de relâcher ou de capter le neurotransmetteur acétylcholine (ACh)<sup>12</sup>.



Les vésicules contenant ce neurotransmetteur vont ensuite être acheminées vers la partie terminale *via* un mécanisme de migration dépendant du calcium (Figure 5). Le transport des vésicules synaptiques se fait à l'aide de protéines solubles NSF-attachment protein receptor (SNARE) et de protéines SEC1/MUNC18-like (Mammalian Uncoordinated-18). La synaptogamine et la complexine (CPLX1) agissent également sur ce complexe pour permettre la fusion des vésicules et l'exocytose de l'ACh dans l'espace synaptique<sup>13-15</sup>.

Le sarcoplasme constituant la région post-synaptique est une zone permettant la capture des neurotransmetteurs provenant de l'espace synaptique. Cette zone est enrichie en mitochondries, en appareils de Golgi et en filaments intermédiaires afin de faciliter la transduction du signal. L'ACh va se fixer à cette zone *via* ses récepteurs, les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs), ce qui va créer une dépolarisation locale (Figure 5). Cette fixation va activer les canaux sodium (VGSCs ou Voltage Gated Sodium Channels) permettant la création d'un potentiel d'action à travers les fibres *via* les tubules transverses (ou tubules-T)<sup>16</sup>.

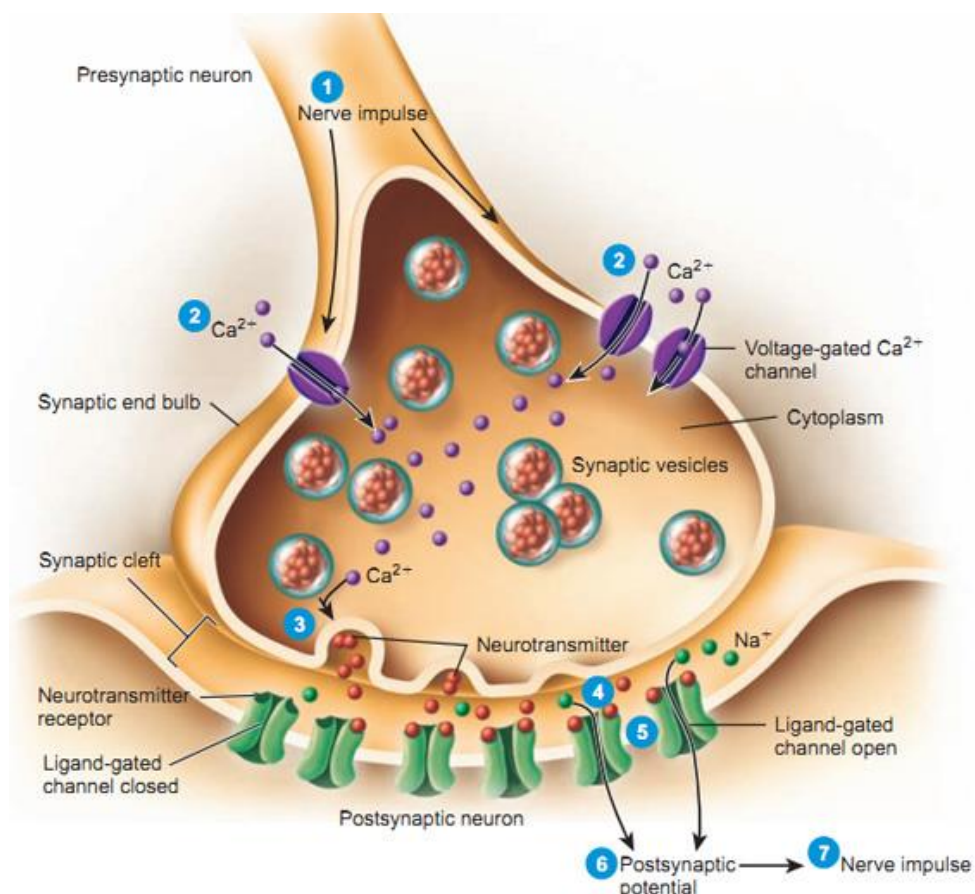


Figure 5 : Organisation de la jonction neuro-musculaire (Synaptic transmission by somatic motoneurons ; <https://antranik.org>).

#### 1.4.2 Interaction DHPR – RYR et libération de calcium dans le cytosol

La contraction du muscle cellulaire ou ECC (Excitation contraction coupling) se réalise avec la création du potentiel d'action au niveau du sarcoplasme. La contraction s'opère au sein de la triade composée du tubule-T entouré de deux réticulums sarcoplasmiques (SR). Le potentiel d'action dépolarise le récepteur dihydropyridine (DHPR) du tubule-T ce qui provoque la libération de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique *via* le récepteur RYR (Ryanodine Receptor)<sup>17</sup>. De par son importance dans la contraction musculaire, de nombreuses protéines vont graviter autour de cette jonction pour assurer son intégrité. Tout d'abord, la calséquestrine séquestre le calcium présent dans la lumière du SR et semble réguler directement les canaux RYRs<sup>18</sup>. La triadine et la junctine vont quant à elles permettre la jonction entre le récepteur RYR et la calséquestrine afin de réguler la libération du calcium<sup>19</sup>. Enfin, la calmoduline s'associe au canal calcique et régule son activité de façon dépendante de la concentration calcique cytosolique<sup>20</sup>. L'augmentation cytosolique de calcium induit un changement conformationnel de la troponine, induisant une cascade menant à la contraction musculaire.

#### 1.4.3 Stimulation du sarcomère

Le sarcomère constitue l'élément effectif de la contraction musculaire. Cette structure est composée de deux protéines du filament qui se succèdent : les filaments « fins » et les filaments « épais » représentant respectivement l'actine- $\alpha$  et la myosine. Il est estimé que ces deux protéines constituent environ 70% de la quantité totale de protéines au sein de la fibre. Ces protéines sont situées parallèlement à l'axe de la fibre et sont bordées par des zones appelées stries Z. La succession de ces différentes zones donne d'ailleurs cette forme « striée » au muscle squelettique. Au centre du sarcomère, on retrouve la zone H qui comprend des filaments fins avec en son centre, la zone M. Les filaments fins sont connectés ensemble latéralement par les disques Z tandis que la bande M connecte les filaments épais (Figure 6)<sup>21</sup>.



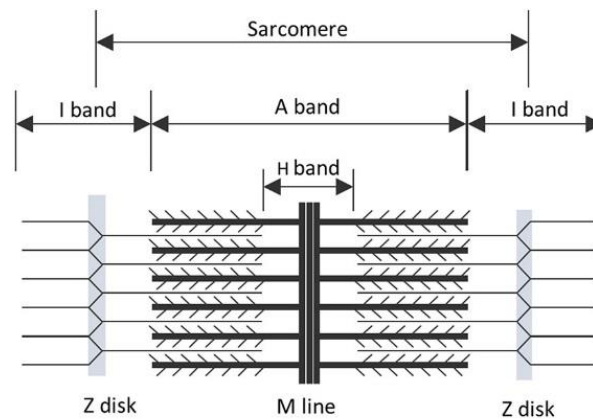


Figure 6 : Organisation du sarcomère (adapté de Mukund et al., 2019).

Durant une contraction musculaire, le changement de conformation de la troponine mène à une exposition des têtes de myosine. En effet, ces têtes de myosine possèdent un site de liaison aux filaments d'actine et un site de liaison à l'ATP (Adénosine Triphosphate). La contraction est donc rendue possible par la fixation de ces têtes sur l'actine et le glissement de ces dernières *via* l'utilisation d'ATP ce qui induit un glissement de ces deux filaments, résultant à une contraction musculaire. On retrouve plusieurs protéines associées à ce phénomène, dont les Myosin binding proteins C et H (MyBPs). Ces protéines participent à l'organisation de la myosine et régulent l'intensité de la contraction par le complexe actomyosine<sup>22</sup>. La titine, associée à la MyBP-C, est une protéine élastique de grande taille disposée sur toute la longueur du filament épais et permet d'harmoniser la force générée par la contraction<sup>23</sup>. D'autres protéines vont permettre la fixation entre la myosine et la titine comme la myomésine, l'obscurine et l'ankyrin-1. De plus, la créatine kinase présente au niveau de la bande M se lie à la myosine et apporte de l'ATP au système contractile<sup>24,25</sup>.

Les filaments fins sont composés de différentes isoformes d'actine. Comme pour le filament épais, le filament fin est associé à plusieurs enzymes permettant de stabiliser la structure et faciliter son activité. Les plus importantes sont la troponine et la tropomyosine. La troponine est constituée de plusieurs sous unités permettant sa fixation au filament d'actine mais également la fixation du calcium cytosolique, réaction qui est stabilisée par la tropomyosine. Lorsque le calcium est capté par ce complexe, il va agir sur le filament d'actine et permettre de révéler les sites de fixation de la myosine<sup>26</sup>. De façon similaire à la titine, la nébuline va servir de matrice au filament d'actine et à la tropomoduline, et permet d'amener une longueur optimale du filament fin<sup>27,28</sup>.

Une grande variété de protéines va permettre la fixation des différents filaments au disque Z. Tout d'abord, on retrouve la protéine CapZ qui permet l'attachement de l'actinine  $\alpha$ ,

responsable de la fixation de la titine du sarcomère adjacent *via* la protéine téléthonine (T-cap)<sup>29</sup>. La myopalladine fixe la nébuline à l'actinine  $\alpha$  pour consolider la liaison de la bande A au disque Z. La myopodine facilite la communication entre le noyau et le disque Z *via* la fixation à l'actinine  $\alpha$  et la filamine  $\gamma$ . Enfin la myozénine va également se lier à l'actinine  $\alpha$  et à la filamine  $\gamma$  et régule l'espacement latéral entre les filaments fins (Figure 7)<sup>7</sup>.

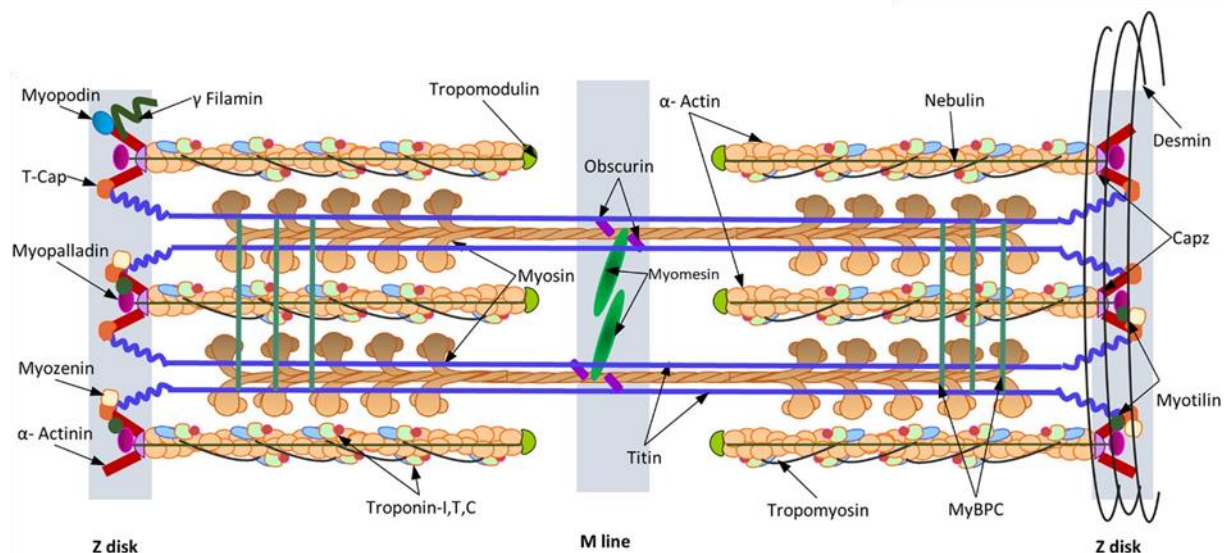


Figure 7 : Organisation des filaments d'actines et de myosine et protéines associées (adapté de Mukund et al., 2019).

Durant une contraction musculaire, le calcium libéré par le SR va venir se fixer sur la troponine et induire un changement de conformation responsable de la libération du site de fixation de la myosine à l'actine. Suite à cette fixation, on observe le phénomène dit de filaments glissants : la myosine fixe l'actine par sa structure en bras et fait glisser le filament fin. Les successions de ce phénomène *via* accrochage / décrochage (appelés cycle cross-bridge) permettent le raccourcissement du sarcomère et la contraction musculaire. Ce phénomène consomme de l'ATP qui est apporté par la créatine kinase, associée à la bande M.

Enfin, il est important de noter que les fibres musculaires sont composées de plusieurs types de myosines dont l'assemblage permet de générer des propriétés contractiles différentes. En effet, on distingue au sein du muscle squelettique adulte 4 types de myosines : la myosine (MyHC) 1, 2, 4 et 7. Cette hétérogénéité dans l'expression de ces différentes isoformes au sein d'une fibre musculaire lui confère une capacité contractile plus ou moins rapide. Dans ce contexte, on retrouve donc les fibres dites lentes exprimant la MyHC 7 (Type I), puis les fibres dites rapides exprimant la MyHC 2 (Type IIA), la MyHC 1 (Type IIX) et la MyHC 4 (Type IIB). Cette capacité contractile différente prend en compte plusieurs paramètres physiologiques comme la quantité d'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, la tension isométrique mais

également le contenu en mitochondries et la sensibilité au calcium<sup>30</sup>. La composition en MyHC au sein d'un muscle peut varier en fonction des sollicitations et participe ainsi à l'adaptation du muscle à l'exercice.

#### 1.4.4 Le relâchement musculaire

Dès que les muscles squelettiques ne sont plus stimulés par les motoneurones, le calcium cytosolique permettant la contraction musculaire se détache de la troponine pour être repompé par le SR. Ce repompage est permis grâce à la présence d'une pompe spécifique située à la membrane du SR appelé SERCA (SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium transport ATPase). Ce canal est associé à plusieurs protéines régulant son activité. La sarcolipine ainsi que le phospholamban vont réduire l'affinité de SERCA pour le calcium lorsque celui-ci est en faible concentration dans le cytosol. De plus, la sarcaluménine stabilise la protéine SERCA et la parvalbumine, protéine soluble du sarcoplasme, se fixe au calcium afin d'accélérer le phénomène de relaxation musculaire. L'ensemble de ce système permet de réguler au plus vite le niveau de calcium cytosolique tout en contrôlant l'activité des pompes SERCA pour maintenir un niveau de calcium cytosolique minimum<sup>31-33</sup>.

### 1.5 Régulation de la masse musculaire

La régulation de la masse musculaire représente un enjeu important pour l'organisme car une dérégulation de cette dernière influence le métabolisme global mais également d'autres paramètres tels que la locomotion, la respiration et la prise de repas. De par sa fonction, le muscle est constitué d'un stock dense de protéines et d'organites. De ce fait, une dérégulation de ces stocks va influencer de façon importante sa taille et sa fonction. La régulation de cette masse musculaire est assurée par une balance intra-musculaire existant entre la synthèse et la dégradation protéique. Cette balance peut être orientée vers une augmentation de la synthèse protéique, notamment durant l'exercice ou une stimulation hormonale, ce qui induit une augmentation du volume cellulaire. A l'inverse, une atrophie musculaire peut être observée suite à une augmentation de la dégradation protéique dans certaines pathologies telles que certains cancers, diverses infections, le développement d'un diabète ou encore une inactivité prolongée<sup>34</sup>. Il est cependant intéressant de noter que ces variations ne sont pas uniformes selon le type de fibres. En effet, de nombreuses études ont mis en évidence des réponses différentes selon les fibres lentes ou rapides. Par exemple, le soleus qui est composé essentiellement de fibres lentes est moins sensible à un jeûne que les muscles rapides, mais va s'atrophier plus rapidement en cas d'une immobilisation des membres inférieurs<sup>35</sup>. De plus, un même stimulus peut avoir des effets différents selon le

muscle touché. Une dénervation du diaphragme va par exemple induire une atrophie des fibres 2X et 2B sans impacter les fibres de type I alors que ce même protocole aura pour conséquence d'atrophier principalement les fibres de type I au sein du soleus<sup>36,37</sup>. Un second point important est que certains stimuli ne vont pas impacter la balance de la même façon. Il a été montré que la dénervation induit une augmentation de la dégradation protéique sans altérer la synthèse protéique. De façon similaire, une hypertrophie provoquée dans le soleus par l'injection d'une hormone de croissance promeut la synthèse protéique mais le système de dégradation protéique reste inchangé dans ce contexte<sup>38-40</sup>. Depuis ces différentes observations, différents mécanismes ont été mis en évidence permettant la régulation fine de cette balance et des différents acteurs intervenant dans ce système.

### 1.5.1 Régulation de l'hypertrophie musculaire

#### 1.5.1.1 La voie Insulin/IGF-1 – AKT – mTOR

La voie de l'insuline et de l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) représente le mécanisme majoritaire dans la régulation de la croissance musculaire. En effet, elle est présentée comme régulant la synthèse protéique mais également la dégradation protéique, la survie cellulaire, la prolifération, le stockage de glucose ainsi que la production d'énergie<sup>34</sup>. Ces molécules déclenchent un effet hypertrophique en se fixant sur leur récepteur à la membrane des fibres musculaires. Cela aura pour conséquence l'initiation d'une cascade de phosphorylation permettant d'activer la voie RAS-MAPK-ERK (Rat Sarcoma Virus – Mitogen-Activated Protein Kinase – Extracellular signal-Regulated Kinase) et la voie PI3K-AKT-mTOR (Phosphoinositide 3-Kinase – Protein Kinase B - Mammalian Target Of Rapamycin Kinase). Il a cependant été montré par des expériences de mutation de Ras que seule la voie PI3 kinase induit une hypertrophie<sup>41</sup>. Une autre étude corrobore ces conclusions en démontrant qu'une activation constante d'AKT promeut l'hypertrophie du muscle squelettique<sup>42</sup>. D'un point de vue mécanistique, la phosphorylation d'AKT permet l'inactivation de la protéine tuberous sclerosis complex 2 (TSC2). TSC2 est une protéine à activité GTPase qui inhibe l'action de la protéine Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain) lorsqu'elle est active. Son inactivation mène à la phosphorylation de mTOR (protein kinase B mammalian target of rapamycin) par Rheb en condition hypertrophique<sup>43,44</sup>. mTOR est considéré comme le régulateur majoritaire de la croissance musculaire. Une fois activée, cette protéine s'associe avec différents co-facteurs pour former 2 complexes distincts : le premier complexe appelé mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) en association avec le facteur Raptor, et mTORC2 en association avec Riptor. mTORC2 régule l'homéostasie du glucose et des lipides et n'est pas proprement

impliqué dans la régulation de la masse musculaire puisqu'une délétion de *Raptor* n'engendre pas d'atrophie musculaire<sup>45,46</sup>. mTORC1 est quant à lui impliqué dans la régulation de la synthèse protéique, de la synthèse des ribosomes et la biogenèse mitochondriale. La délétion spécifique de *mTOR* ou de *Raptor* au sein du muscle cause un phénotype similaire, à savoir une diminution de la croissance post-natale due à une réduction de la taille des fibres et la mise en place progressive d'un phénotype d'atrophie musculaire<sup>46</sup>. Cependant, une étude suggère que mTOR pourrait avoir un rôle sur la synthèse protéique indépendamment de son association avec Raptor puisque la délétion de ce dernier bloque l'hypertrophie mais n'impacte pas la synthèse protéique au sein du muscle<sup>47</sup>. De plus, les deux complexes formés par mTOR divergent également dans leur sensibilité pour la rapamycine. Seul le complexe mTORC1 est inhibé par la présence de cette molécule. Dans ce contexte, l'injection de rapamycine bloque la croissance musculaire en condition anabolique dans les fibres musculaires<sup>42</sup>. Les deux substrats majoritaires de ce complexe TSC2 sont la kinase ribosomale S6 (S6K) et l'eukaryote initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP1) qui sont tous les deux impliqués dans la traduction des protéines. La protéine S6K est la kinase ribosomale majoritaire chez les mammifères et elle favorise la traduction de protéines ribosomales ainsi que d'autres régulateurs de la traduction<sup>48,49</sup>. 4EBP1 est quant à lui un inhibiteur de l'eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) impliqué dans le recrutement des ARNm jusqu'aux ribosomes et dans l'initiation de leur traduction. Ce facteur favorise donc l'hypertrophie à travers la traduction de plusieurs facteurs impliqués dans la croissance musculaire<sup>50,51</sup>. Il est d'ailleurs intéressant de noter que la voie ERK a été décrite comme pouvant directement agir au niveau du facteur eIF4E par l'intermédiaire des MNK1 et 2 (MAPK –interacting protein kinase), ajoutant ainsi une nouvelle étape dans la régulation de ce facteur par des stimuli hypertrophiques<sup>52,53</sup>. D'autre part, mTOR induit la synthèse des ARNm *via* une activation des ARN polymérases I, II et III<sup>54</sup>. Enfin, l'activation de mTOR promeut des effets anti-cataboliques de par son action sur ULK1 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1), protéine impliquée dans l'autophagie.

Cette voie de signalisation AKT-mTOR est également sensible à la concentration en acide aminés branchés. Bien que le mécanisme reste obscur, des études utilisant des modèles délétés pour TSC1 tendent à prouver que la régulation de l'activité de mTOR par les acides aminés est due à une action de ces derniers sur le complexe TSC (Figure 8)<sup>55</sup>.

#### 1.5.1.2 La voie des $\beta$ -adrénergiques

La régulation de la masse musculaire est également influencée par les  $\beta$ -adrénergiques. En effet, une action de ces molécules a été mise en évidence dans le muscle

squelettique avec une action spécifique sur la voie AKT-mTOR. Pour preuve, l'administration d'un agoniste  $\beta$ 2-adrénergique, tel que le clenbutérol ou le formotérol, induit une hypertrophie musculaire associée à une augmentation de la phosphorylation d'AKT (Figure 8). A ce titre, il est intéressant de noter que cette action peut être bloquée par l'administration de rapamycine<sup>56</sup>. De plus, d'autres études ont montré que l'action de ces composés semblait passer par la voie Insulin/IGF-1 et non par la voie ERK1. Cela est illustré par l'abolition complète de l'effet des  $\beta$ -adrénergiques sur la croissance musculaire après une inhibition des récepteurs à l'IGF1 et des récepteurs à l'insuline ou encore de PI3K et AKT, à l'instar de l'inhibition de ERK1/2 qui n'a aucun effet dans ce contexte<sup>57</sup>.

#### 1.5.1.3 Autres régulateurs soutenant la croissance musculaire

La synthèse protéique engendrée par l'activation de la voie mTOR nécessite une grande quantité d'énergie pour fonctionner. On estime que cette synthèse est responsable de la consommation d'environ 30% du stock musculaire d'ATP. Dans ce contexte, la mitochondrie et le système intracellulaire de production d'énergie sont primordiaux pour l'anabolisme. En ce sens, le MCU (mitochondrial calcium uniporter), responsable de la capture du calcium par la mitochondrie, contrôle conjointement l'oxydation du glucose et la taille des fibres *via* une action sur le co-activateur transcriptionnel PGC1 $\alpha$ 4 (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha 4). Ce facteur permet par ailleurs l'expression d'IGF-1 à travers une augmentation de l'expression de GPR56 (G protein-coupled receptor 56)<sup>58,59</sup>. De manière intéressante, les muscles de type I et IIA présentent une augmentation de l'expression du facteur PGC1 $\alpha$  dans leurs cytoplasmes ce qui est corrélée à une meilleure résistance de ces fibres à l'atrophie musculaire par rapport aux autres types de fibres<sup>35</sup>. Un autre lien entre la mitochondrie et l'hypertrophie musculaire existe. En effet, l'action anabolique d'IGF-1 nécessite l'activité de l'ATP citrate lyase (ACL) qui est utilisée par la mitochondrie dans le cycle de Krebs. En présence d'IGF-1, ACL est phosphorylée par AKT ce qui permet une production d'ATP nécessaire au soutien de la machinerie anabolique (Figure 8)<sup>60</sup>.

Certaines ubiquitines ligases ont aussi un rôle critique dans le contrôle de la masse musculaire dont UBR4 (Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 4). Cette ligase a un rôle pro-anabolique en ubiquitylant le complexe HAT1-RBBP4-RBBP7 (Histone AcetylTransferase 1 - RB Binding Protein 4 - RB Binding Protein 7), le destinant à la dégradation. Ce complexe est décrit comme régulant l'acétylation des histones et l'expression des gènes impliqués dans la croissance musculaire<sup>61</sup>.

Une autre facette du métabolisme musculaire semble également jouer un rôle dans la masse musculaire. Des études ont montré que le type de substrat utilisé pour la production d'ATP

était important pour la croissance. En effet, l'altération de la composition en lipides utilisables par la mitochondrie à travers une dérégulation de l'expression de la périlipine 2 suffit à induire une atrophie musculaire. Ce phénomène semble indépendant de mTOR car un traitement à la rapamycine n'affecte pas ce phénotype chez les souris déficientes en périlipine 2<sup>62</sup>.

De façon similaire, les acides aminés branchés agissent sur l'activité de mTOR. En effet, il a été montré que ces acides aminés, et notamment la leucine, activent le complexe mTORC1 et promeuvent la synthèse protéique<sup>63</sup>. Il semblerait que cette action des acides aminés passe par 2 voies distinctes. Précisément, des études ont montré que les acides aminés agissaient sur mTOR *via* le complexe TSC1/2<sup>64,65</sup>. De surcroît, les acides aminés vont permettre l'activation de différentes GTPases RAG dans le muscle squelettique (RAG A-D) qui vont être responsables du recrutement du complexe mTORC1 au niveau du lysosome où il va être activé par la protéine Rheb (Figure 8)<sup>66</sup>.

Enfin, une étude récente a mis en lumière un rôle du zinc dans l'hypertrophie musculaire. En effet, une délétion de la métallothionéine 2, protéine fixatrice de zinc, permet la libération d'ions zinc et augmente significativement la croissance du muscle. Même si le mécanisme n'est pas élucidé, il semblerait que cette action passe par la voie AKT-mTOR<sup>67</sup>.

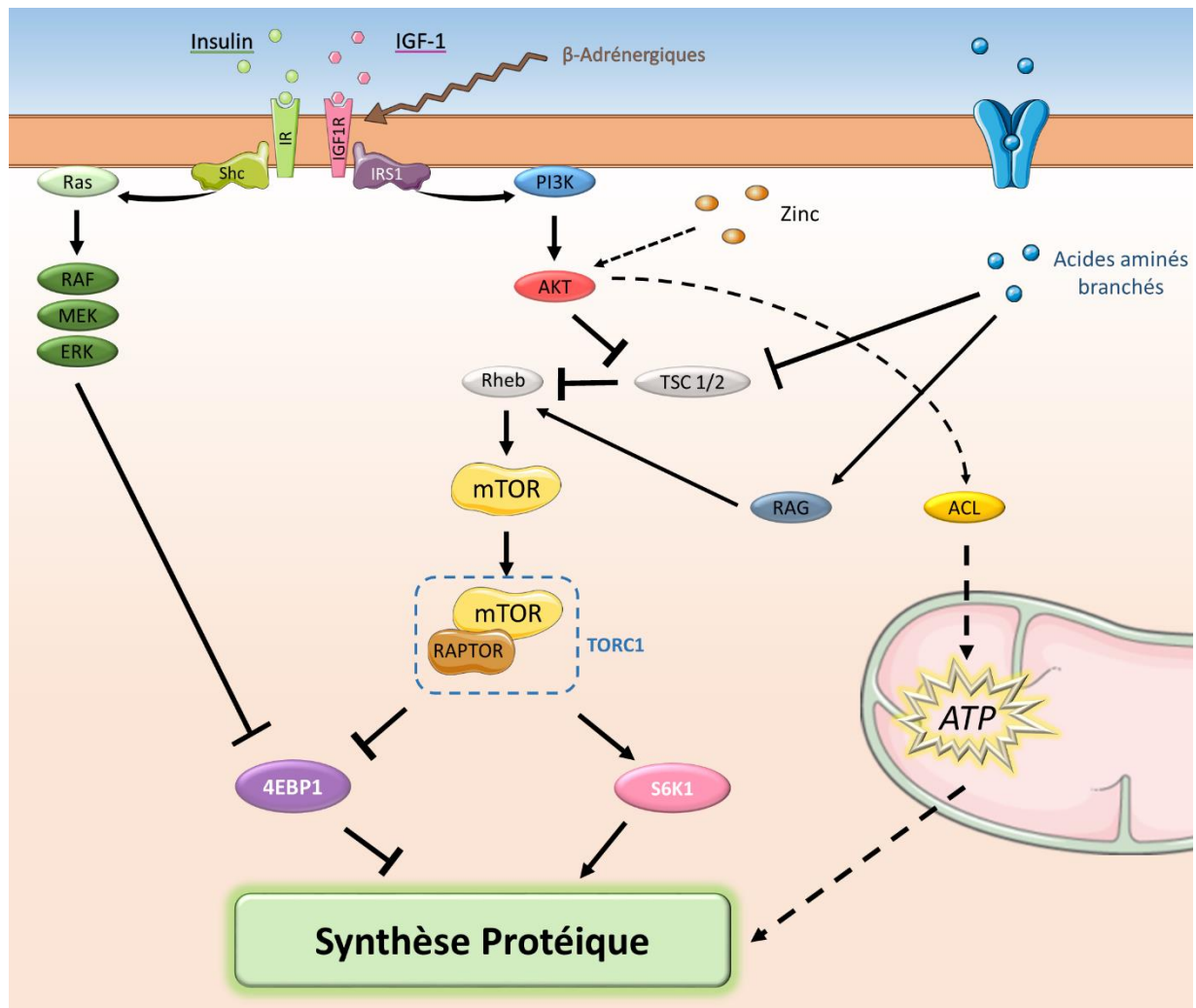


Figure 8 : Mécanismes régulant la synthèse protéique dans le muscle squelettique.

## 1.5.2 Régulation de l'atrophie musculaire

### 1.5.2.1 Le système du protéasome

Le dérèglement de la balance synthèse / dégradation protéique observé durant une phase d'atrophie peut être dû à une augmentation de l'activité du protéasome au sein de la fibre musculaire. Dans ce contexte, certaines ubiquitines ligases, enzymes permettant l'adressage de protéines au protéasome et leur dégradation, ont été identifiées comme acteurs principaux de l'atrophie musculaire. On appelle ces gènes des atrogènes. C'est le cas pour les 2 ligases que sont Atrogin-1 (aussi appelé MAFbx pour Muscle Atrophy F-box) et MuRF1 (muscle RING-finger protein-1) dont l'expression augmente significativement dans le muscle dans différentes conditions cataboliques et dont la délétion conjuguée prévient la perte de masse musculaire après dénervation<sup>68</sup>. L'inhibition de MuRF1 seule prévient la perte de la masse musculaire associée au vieillissement chez la souris et durant un traitement à la



dexaméthasone. Une autre étude a identifié que cette ligase est responsable de l'adressage de plusieurs protéines structurales du muscle telles que la myosine à chaîne lourde, la troponine I, l'actine ou la myosine à chaîne légère I et 2 vers le protéasome<sup>69-71</sup>. Les substrats de la protéine Atrogin-1 sont impliqués dans les processus de survie cellulaire et la synthèse protéique tels que eIF3-f (Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F)<sup>72</sup>. De façon similaire à MuRF1, atrogin-1 peut interagir avec certaines protéines sarcomériques telles que les myosines, les desmines mais également certains facteurs impliqués dans la glycolyse et des protéines mitochondriales<sup>73</sup>. En ce sens, la diminution de l'expression d'Atrogin-1 prévient l'atrophie lors d'un jeûne chez la souris (Figure 9)<sup>74</sup>. D'autres ubiquitine ligases ont été décrites comme participant à la régulation de l'atrophie dans le muscle comme Trim32 (Tripartite Motif Containing 32) et TRAF6 (TNF receptor-associated factor 6). Trim32 est également capable d'adresser certaines protéines du filament fin vers le protéasome<sup>75</sup>. TRAF6 est quant à lui critique dans l'atrophie musculaire en permettant l'activation de plusieurs régulateurs de la voie atrophique tels que l'AMPK (AMP-activated protein kinase), FoxO3 (Forkhead Box O3) et NF-κB (Nuclear Factor-Kappa B), comme en témoigne les souris délétées pour cette ligase qui développent une résistance à la perte de masse musculaire induite par des cancers, des dénervations et des privations de nourriture<sup>76</sup>. De plus, des études récentes ont également mis en lumière l'action de 2 nouvelles ligases : SMART (Specific of Muscle Atrophy and Regulated by Transcription) et MUSA1 (Muscle ubiquitin ligase of SCF complex in atrophy-1). Ces protéines sont augmentées en condition catabolique et leur inhibition par siRNA réduit fortement la sévérité de l'atrophie causée par dénervation<sup>77,78</sup>. Enfin, un autre acteur important de ce système est le complexe ATPase p97/ VCP (Valosin-Containing Protein). La fonction de ce complexe est d'extraire et de dégrader les protéines ubiquitinylées provenant de grandes structures du sarcomère comme les myofibrilles. Ce complexe est stimulé durant la dénervation et son activité est dépendante du type de fibre. En effet, l'activité de p97 peut être modulée par Mettl21e (methyltransferase-like 21e) et mettl21c. Des études de délétion de ces régulateurs montrent que Mettl21e affecte en priorité les fibres IIB alors que la délétion de *Mettl21c* affecte principalement les fibres I, pouvant expliquer en partie les réactions différentes des types de fibres à un stimulus<sup>79-81</sup>.

#### 1.5.2.2 Le système autophagie – lysosome

Le mécanisme d'autophagie est un système grandement impliqué dans le catabolisme intra-cellulaire. De ce fait, il n'est pas étonnant de retrouver certains atrogènes identifiés comme impliqués dans la reconnaissance et la fixation des membranes des autophagosomes. Certaines protéines sont chargées d'assurer la spécificité de ce système comme les protéines p62 et Bnip3 (BCL2 Interacting Protein 3). La fonction de ces protéines est de fixer

l'autophagosome *via* LC3 (Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3) avec les différents complexes à éliminer tels que les organites défectueux, les protéines endommagées ou encore les agrégats protéiques<sup>34</sup>. Tout comme le protéasome, l'autophagie est augmentée en condition d'atrophie musculaire déclenchée par un cancer, un sepsis, une privation alimentaire et une dénervation<sup>82</sup>. D'ailleurs une étude a montré que l'expression des protéines LC3 et Bnip3 était sous le contrôle de FoxO3<sup>60</sup>.

Les facteurs de transcription FoxOs sont considérés comme les régulateurs principaux des mécanismes impliqués dans la perte de masse musculaire en stimulant à la fois le système de dégradation protéique (atrogin-1 et MuRF1) et le système d'autophagie (Bnip3 et ULK1) (Figure 9)<sup>83,84</sup>. Ces facteurs sont notamment inhibés par la voie IGF-1/insuline-AKT. De plus, leur inhibition constante protège les muscles de l'atrophie dans des contextes comme le jeûne, l'immobilisation ou le diabète. De par leur importance dans l'homéostasie de la masse musculaire, l'activité de ces facteurs est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles<sup>34</sup>. Le contrôle fin de son activité passe également par une régulation *via* plusieurs stimuli comme le stress oxydatif ou la variation en nutriments et en énergie. Par exemple, le récepteur au glucose permet l'activation des facteurs FoxOs ce qui provoque une perte de masse musculaire tout comme la stimulation du récepteur des  $\beta$ -caténines *via* DKK3 (Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 3)<sup>85</sup>. Le stress énergétique va également conduire à une augmentation de l'activité autophagique par une phosphorylation par AMPK.

#### 1.5.2.3 La voie TGF $\beta$ /Myostatine – Activine – Smad

La voie du TGF $\beta$  est la seconde voie majeure d'induction d'une atrophie musculaire. Le TGF $\beta$ , comme la myostatine qui fait partie de la même famille de protéines, induit une perte de masse musculaire, alors que la délétion de la myostatine induit une hypertrophie chez ces souris<sup>86</sup>. La fixation de ces protéines aux récepteurs ActRIIA (Activin Receptor IIA) et IIB conjointement à l'activine va permettre le recrutement et l'activation dans le cytosol des récepteurs ALK4, 5 et 7 (Anaplastic lymphoma kinase). L'activation de ces protéines induit la phosphorylation et l'activation de Smad2/3 et la formation d'un complexe avec Smad4. Ce complexe va ensuite se transloquer dans le noyau pour assurer une activité transcriptionnelle (Figure 9). Bien que le détail de cette activité demeure obscure, certaines études suggèrent que le complexe Smad2/3-Smad4 régule l'activité de mTOR pour bloquer la synthèse protéique<sup>87,88</sup>. En ce sens, une étude montre que la délétion de *Smad2/3* suffit à induire une croissance du muscle et également qu'un traitement à la rapamycine inhibe l'effet hypertrophique du blocage des myostatines<sup>89</sup>.

Il est intéressant de noter qu'une autre voie de signalisation fait intervenir le facteur Smad4 : la voie des BMPs (Bone Morphogenetic Protein). Les BMPs 7, 13 et 14 vont se fixer à leur récepteur et permettre l'activation de Smad1/5/8 *via* le récepteur ALK2/3. Ces Smads vont, de la même façon que Smad2/3, former un hétérodimère avec Smad4 et agir au sein du noyau. Cependant, l'interaction entre ces différents facteurs de transcription vont avoir un effet antagoniste à la fixation de Smad 2/3 et smad4 puisque les BMPs ont un effet hypertrophique. En effet, cette voie de signalisation fait intervenir la voie AKT / mTOR afin de stimuler la sythèse protéique<sup>90</sup>. Enfin, d'autres facteurs (Smad 6 et 7) vont respectivement inhiber Smad5/8 et Smad2/3 afin de garantir une homéostasie musculaire<sup>91</sup>.

#### 1.5.2.4 La voie des glucocorticoïdes (GCs)

Dans le muscle squelettique, les GCs contribuent à la dégradation des protéines et inhibent leur synthèse par une action coordonnée sur plusieurs réseaux de gènes, ce qui favorise la mobilisation des acides aminés (AA) et leur utilisation par le foie pour la synthèse *de novo* du glucose<sup>92</sup>. Les GCs sont des hormones stéroïdiennes qui se lient au récepteur des glucocorticoïdes (GR), un facteur de transcription de la superfamille des récepteurs nucléaires. Après la liaison du ligand, le GR se transloque dans le noyau où il régule la transcription des gènes de manière positive (activation) ou négative (répression) par des mécanismes génomiques (liaison directe aux éléments de réponse du GR appelés GRE) et non génomiques (transrépression de la signalisation NFκB ou liaison du GR à d'autres facteurs de transcription). La répression transcriptionnelle par GR est généralement observée sur les gènes codant les protéines de la réponse à l'inflammation et conduit à des actions anti-inflammatoires bénéfiques, alors que la (trans)-activation médie plutôt des actions indésirables<sup>93</sup>.

Les GC synthétiques tels que la dexaméthasone sont utilisés pour le traitement des maladies inflammatoires et immunitaires. Bien que la réponse métabolique adaptative (mobilisation des AA pour la synthèse du glucose) alimente la réponse anti-inflammatoire et permette la résolution d'une infection aiguë, un traitement prolongé entraîne des effets secondaires indésirables majeurs et des comorbidités, notamment l'hyperglycémie et le développement d'un diabète de type 2, mais également la fonte musculaire<sup>93</sup>. Cette fonte induite par les GC se caractérise par une atrophie des fibres musculaires à contraction rapide ou de type II, avec une diminution de la taille des fibres ainsi que de leur teneur en protéines. Les GCs induisent l'atrophie musculaire en modulant à la fois la dégradation protéique mais également en bloquant la synthèse protéique *via* une réduction de la signalisation mTOR. En effet, l'activation des GCs induit la voie ubiquitine-protéasome en modulant l'expression des ligases

E3 ubiquitine MuRF1 et MAFbx/atrogin-1. Cette régulation se fait soit *via* fixation directe à l'ADN, soit par l'intermédiaire de KLF15 (Kruppel Like Factor 15) qui est un facteur de transcription impliqué dans plusieurs processus métaboliques mais qui régule également l'expression de FoxO1, Atrogin-1 et MuRF1<sup>71,94,95</sup>. Par ailleurs, les GCs stimulent également la protéolyse médiée par l'autophagie en augmentant l'expression de Bnip3, LC3 et de la cathepsine L (Figure 9). Concernant la signalisation mTOR, les GCs exercent une action anti-anabolique en induisant la transcription de Redd1 (regulated in development and DNA damage responses 1) et de KLF15. Ces deux gènes ont été décrits comme capable de bloquer l'activité de mTOR notamment en inhibant Rheb et en augmentant l'expression de BCAT2 (Branched Chain Amino-Acid Transaminase 2), une enzyme mitochondriale responsable de la dégradation des acides aminés branchés, ce qui a pour conséquence de réduire la synthèse protéique<sup>94,96</sup>. De plus, Redd1 va également agir sur l'activité du complexe TSC1/2, amenant à une altération de l'activité de mTOR<sup>97</sup>.

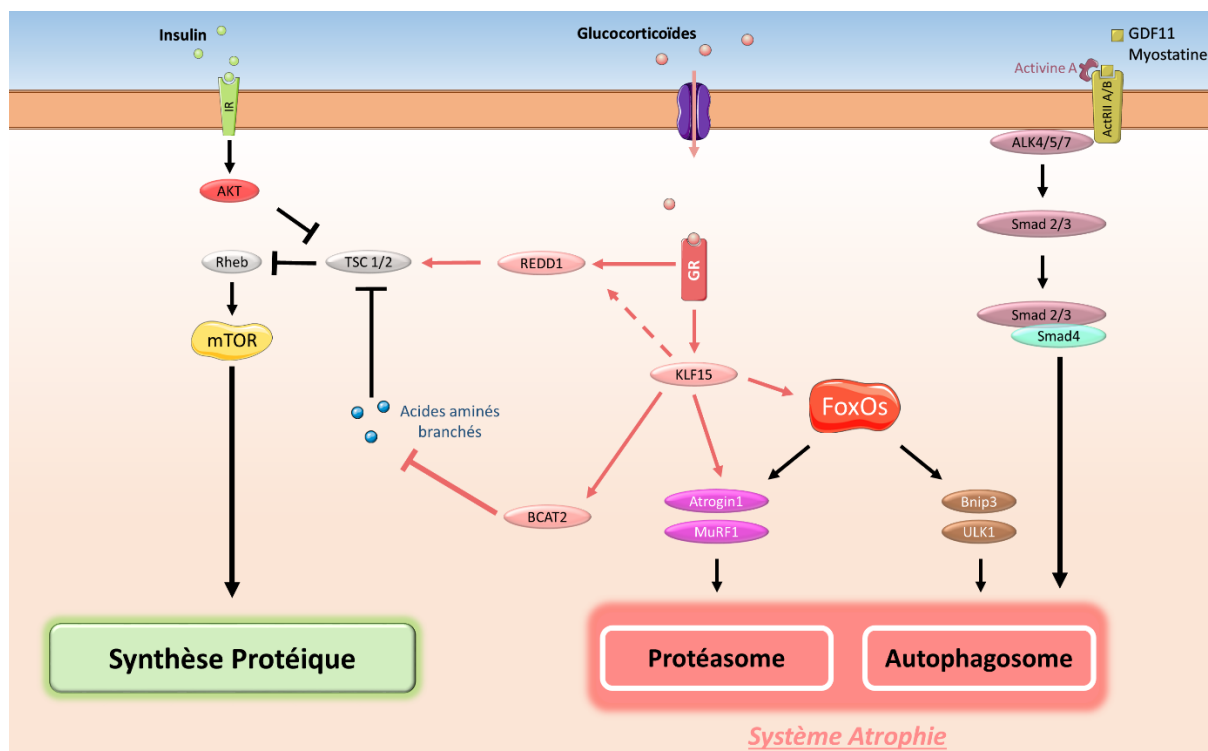


Figure 9 : Rôle des glucocorticoïdes et des myostatines sur l'atrophie musculaire.

#### 1.5.2.5 Le rôle des cytokines dans l'atrophie musculaire

Certaines cytokines inflammatoires telles que l'interleukine-6 (IL-6), le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) ou l'IL-1 ont été décrites comme ayant un rôle délétère sur le maintien de la masse musculaire. Cette action découle de différentes voies de signalisation. Premièrement, il a été montré que le TNF $\alpha$  et l'IL-6 pouvaient agir en activant la voie NF- $\kappa$ B. En condition

basale, NF- $\kappa$ B est séquestré dans le cytoplasme par la protéine I $\kappa$ B (Inhibitor of nuclear factor kappa B). En présence de ces cytokines, le complexe kinase de I $\kappa$ B (IKK) est activé et phosphoryle I $\kappa$ B, induisant sa dégradation par le protéasome. De ce fait, NF- $\kappa$ B se transloque dans le noyau et participe à l'expression d'atrogènes au sein de la fibre. L'activation de IKK aboutit également à l'inhibition de la voie à l'insuline *via* une action sur IRS1 (Insulin receptor substrate 1)<sup>34</sup>. De plus, la cytokine TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis) provenant de la même famille que le TNF peut activer la voie NF- $\kappa$ B *via* TRAF6. L'activation de TRAF6 va, indépendamment de NF- $\kappa$ B, promouvoir l'activité des FoxOs (Figure 10)<sup>98,99</sup>.

La cytokine IL-6 peut de surcroît induire l'atrophie *via* la voie STAT3 (Signal Transducer And Activator Of Transcription 3). En effet, la fixation de cette cytokine au récepteur IL-6 et à gp130 permet l'activation de STAT3 à travers l'activité de JAK (Janus kinase). STAT3 va ensuite avoir un rôle transcriptomique notamment sur Atrogin-1<sup>100</sup>.

#### 1.5.2.6 Le stress réticulaire

Les mécanismes impliqués face à un stress réticulaire ont été décrits comme régulant la masse musculaire. Cette régulation passe par l'activation du facteur de transcription ATF4 (Activating transcription factor 4) qui induit l'initiation du programme d'atrophie musculaire par la modulation transcriptionnelle de Gadd45 $\alpha$  (Growth arrest and DNA damage-inducible 45  $\alpha$ ) et p21. D'un point de vue mécanistique, Gadd45 $\alpha$  modifie la conformation de la chromatine afin de réprimer un ensemble de gènes impliqués dans l'anabolisme et la production d'énergie tout en permettant l'expression d'atrogènes<sup>101</sup>. Cependant, ATF4 n'est pas la seule protéine de la machinerie du stress réticulaire à réguler l'atrophie musculaire, la protéine chaperonne BIP (Binding immunoglobulin protein) module également cette voie. Lors d'un stress, cette protéine joue son rôle de chaperonne et se fixe sur les protéines mal conformées présentes dans le réticulum, permettant ainsi l'activation de la kinase PERK (protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase). PERK va ensuite activer par phosphorylation le facteur eIF2 $\alpha$  ce qui aura pour conséquence de réduire la synthèse protéique et l'assemblage des ribosomes *via* un contrôle transcriptionnel<sup>102</sup>. L'engagement de BIP durant le stress réticulaire permet également l'activation de IRE1 (Inositol-Requiring Enzyme-1), récepteur présent à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ce qui activera le facteur de transcription XBP1 (X-Box Binding Protein 1), responsable de l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le protéasome et l'autophagie (Figure 10)<sup>103</sup>.

### 1.5.2.7 Les dysfonctions mitochondriales

L'altération des mitochondries est à la fois une cause et une conséquence de l'atrophie musculaire. En effet, des problèmes dans la fusion et la fission des mitochondries sont observés dans de nombreuses études portant sur le catabolisme. Certaines études ont par ailleurs démontré que la délétion des protéines OPA1 (Optic atrophy type 1) ou DRP1 (Dynamin-related protein 1), impliquées respectivement dans la fusion et la fission mitochondriale, induisait une perte de masse musculaire. Cependant, la diminution de ces deux protéines ne semble pas agir de la même façon. Précisément, l'inhibition d'OPA1 conduit à la génération d'un stress oxydatif associé à une perte de masse musculaire, de l'inflammation et une sénescence précoce qui conduit à la mort de l'animal. La délétion de *DRP1* va quant à elle causer une altération de l'homéostasie calcique résultant en une diminution de la masse musculaire, sans pour autant mener à la mort de l'animal. Ces deux études suggèrent donc que, au-delà de la dérégulation de la respiration cellulaire, le réseau mitochondrial en lui-même impacte significativement la balance synthèse/dégradation protéique au sein des myofibres<sup>104,105</sup>.

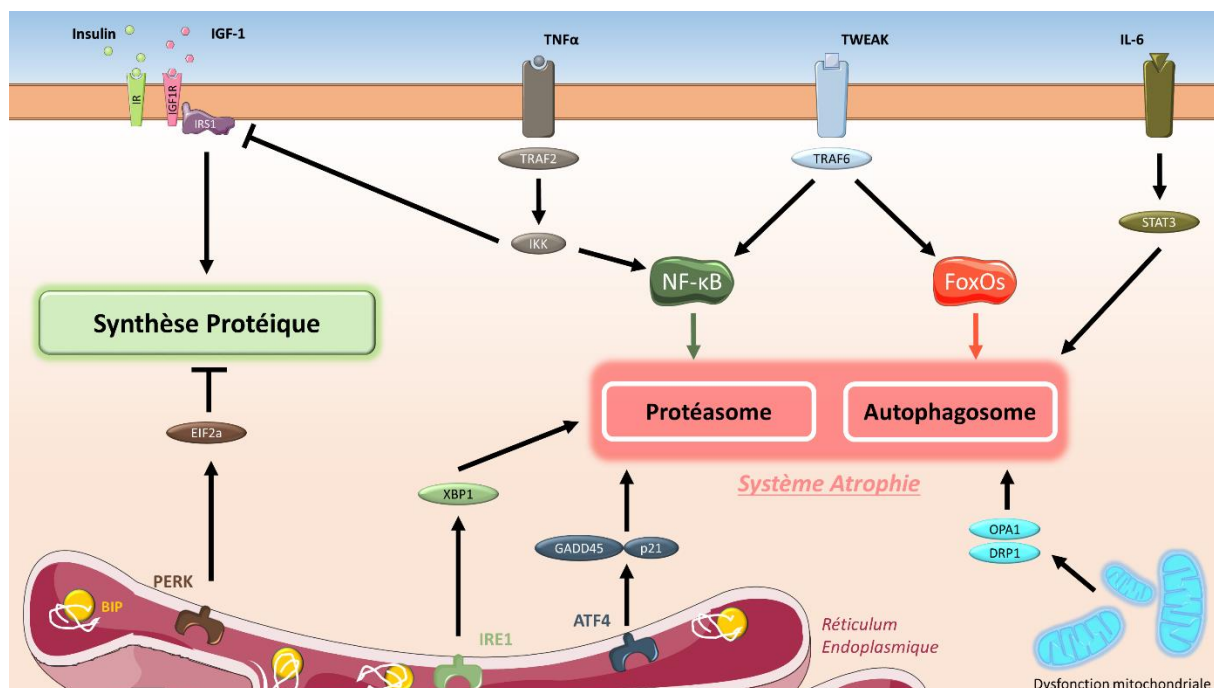


Figure 10 : Rôle des cytokines et du stress mitochondrial et réticulaire sur l'atrophie musculaire.

### 1.5.2.8 Implication d'autres cellules du muscle squelettique dans la régulation de sa masse

Les cellules souches musculaires localisées sous la lame basale des fibres peuvent également influencer la masse des myofibres. En effet, l'activation de la voie NF-κB ou de la voie TGFβ (Transforming Growth Factor β) dans ces cellules mène à une atrophie musculaire.

Concernant la voie TGF $\beta$ , une étude a montré qu'elle induit l'expression de Twist-1 (Twist-related protein 1) ce qui, à terme, provoque une sécrétion de myostatine par ces cellules agissant directement au niveau de la membrane des fibres musculaires<sup>106,107</sup>.

Les progéniteurs fibro-adipogéniques (FAPs) peuvent également jouer un rôle. Il a été montré qu'une dénervation induisait une sécrétion anormale d'IL-6 par ces cellules. Cette interleukine avait dans ce contexte un effet autocrine et paracrine sur les fibres musculaires en activant la voie STAT3 résultant en une atrophie du muscle squelettique<sup>108</sup>.

## 2. REGENERATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE

### 2.1 La cellule souche musculaire

La particularité du muscle squelettique est que les fibres musculaires sont post-mitotiques, ce qui signifie que ces fibres sont dans l'incapacité de se diviser une fois différenciées. Cependant, le muscle squelettique possède une incroyable aptitude à se régénérer suite à des dommages causés par un exercice intensif, une blessure ou une myopathie. Cette particularité a été mise en évidence il y a plus d'un siècle<sup>109</sup>. Le mécanisme exact de cette capacité régénérative a longtemps été controversé, avec l'hypothèse soit d'une fusion de cellules mononucléées soit d'une fragmentation des fibres musculaires blessées. En 1961, les travaux d'Alexander Mauro font état de la présence de cellules mononucléées sous la lame basale des fibres musculaires qu'il appelle les cellules satellites (SC)<sup>110</sup>. Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence que ces SCs étaient des acteurs majeurs de la régénération musculaire bien que d'autres types cellulaires puissent avoir un potentiel myogénique incluant les cellules endothéliales ou encore les péricytes *in vitro*<sup>111,112</sup>. Néanmoins, l'absolue nécessité de la présence de SCs dans le processus de régénération a été démontrée lors d'expériences de délétion de ces cellules engendrant une abolition complète du processus de réparation<sup>113</sup>. Les SCs sont présentes dans le muscle sain à l'état de quiescence et représentent entre 2,5-6% des noyaux de la fibre musculaire. Ces cellules quiescentes sont caractérisées par l'expression du facteur myogénique Pax7. Il est intéressant de noter que certaines de ces cellules co-expriment également le facteur Pax3 et des travaux récents ont montré que ces cellules Pax7<sup>+</sup> Pax3<sup>+</sup> étaient moins sensibles à un stress cellulaire notamment après une radiation<sup>114,115</sup>. Cet état de quiescence des SCs en condition basale est assuré par un environnement spécifique appelé niche permettant une communication entre les SCs, les vaisseaux sanguins, les nerfs, les cellules interstitielles et la fibre musculaire<sup>116,117</sup>.

### 2.1.1 La quiescence des cellules souches musculaires

La condition de quiescence des SCs est un état caractérisé par un métabolisme ralenti et une absence d'activité mitotique<sup>118</sup>. Cette quiescence est assurée par l'activation de plusieurs voies de signalisation et principalement la voie NOTCH. Cette voie inhibe l'activation de ces cellules de plusieurs façons. Tout d'abord, elle induit la transcription de miR708 qui inhibe la prolifération et la mobilité des cellules souches. Elle régule également le cycle cellulaire en induisant l'expression de KLF7<sup>119,120</sup>. De surcroît, la fixation entre la membrane de la fibre musculaire et la cellule satellite promeut également cette voie *via* la liaison de Delta-Like 1 et 4 (DLL1/4) à Notch 1 et 3 mais aussi la fixation de Wnt4 à RhoA (Ras homolog family member A)<sup>121,122</sup>. De leur côté, les myofibres expriment mind bomb 1 qui stimule l'activation de la voie NOTCH<sup>123</sup>. Le collagène V produit par la SC est sous le contrôle de la voie NOTCH et permet de maintenir la quiescence *via* le récepteur de la calcitonine<sup>124</sup>.

La fixation des cellules myogéniques à la lame basale joue également un rôle prépondérant dans l'état de ces cellules. Effectivement, la matrice extra-cellulaire (MEC) séquestre, *via* le perlecan, différents facteurs de croissance susceptibles d'induire l'activation des SCs telles que le FGF (Fibroblast Growth Factor), le HGF (Hepatocyte Growth Factor), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le TGF- $\beta$ 1. Cette séquestration est rendue possible par la sécrétion de syndecan 3 et 4, par les cellules souches, qui stabilisent la fixation du perlecan avec ces facteurs de croissance (Figure 11)<sup>125,126</sup>. Dans ce contexte, d'autres systèmes cellulaires sont mis en place afin d'éviter l'activation des SCs tels que l'atténuation de la voie ERK normalement activée par le FGF, la présence de l'inhibiteur de la voie RTK (Receptor Tyrosine Kinase) sprouty 1 ou encore la présence de IGFBP6 (insulin-like growth factor-binding protein 6), un inhibiteur de l'IGF2<sup>127,128</sup>. Une séquestration intra-cellulaire est également mise en œuvre dans ce processus. Ainsi, les transcrits de Myf5, de MyoD et miRNA-31 vont être isolés dans le cytoplasme dans une structure appelé « messenger ribonucleoprotein granule » (mRNP) afin d'éviter leur traduction. Ce système est contrôlé par les facteurs eIF2a, ZFP36L1/2 (Zinc Finger Protein 36) et STAUFEN-1 (Figure 11)<sup>129–131</sup>. D'autre part, le protéasome semble jouer également un rôle dans l'état d'activation des cellules myogéniques en dégradant certains facteurs et notamment MyoD afin de maintenir leur quiescence. En ce sens, Kitajima et al. ont montré que la perturbation du système protéasome, suite à une délétion d'un composant de ce dernier (RPT3), induit une perte progressive du pool de SCs qui conduit à des défauts de régénération<sup>132</sup>. Enfin, les miRNAs semblent jouer un rôle majeur dans la myogénèse et dans le contrôle de la quiescence des cellules souches musculaires. En effet, une étude montre que 351 miRNAs sont exprimés de façon différentiel



entre des SCs quiescentes et activées<sup>133</sup>. Certains de ces miRNAs ont des rôles spécifiques dans la répression de gènes relatifs au cycle cellulaire comme le miR-489, le miR-195 ou encore le miR-497<sup>134</sup>.

Il est important de noter que depuis 2017, Machado et al. ont redéfini la notion de quiescence dans les cellules souches. Précisément, des études transcriptomiques ont mis en évidence que l'isolation des cellules souches à partir du muscle suffisait à induire leur activation. Ainsi, au cours de cette étude ils ont démontré qu'une fixation préalable du muscle avant de procéder à l'isolement des cellules souches permettait de véritablement analyser un transcriptôme de ces cellules fidèles à leur niveau de quiescence *in vivo*. Cette découverte a permis d'établir une analyse des SCs quiescentes plus proche que celles réalisées au préalable<sup>135</sup>.

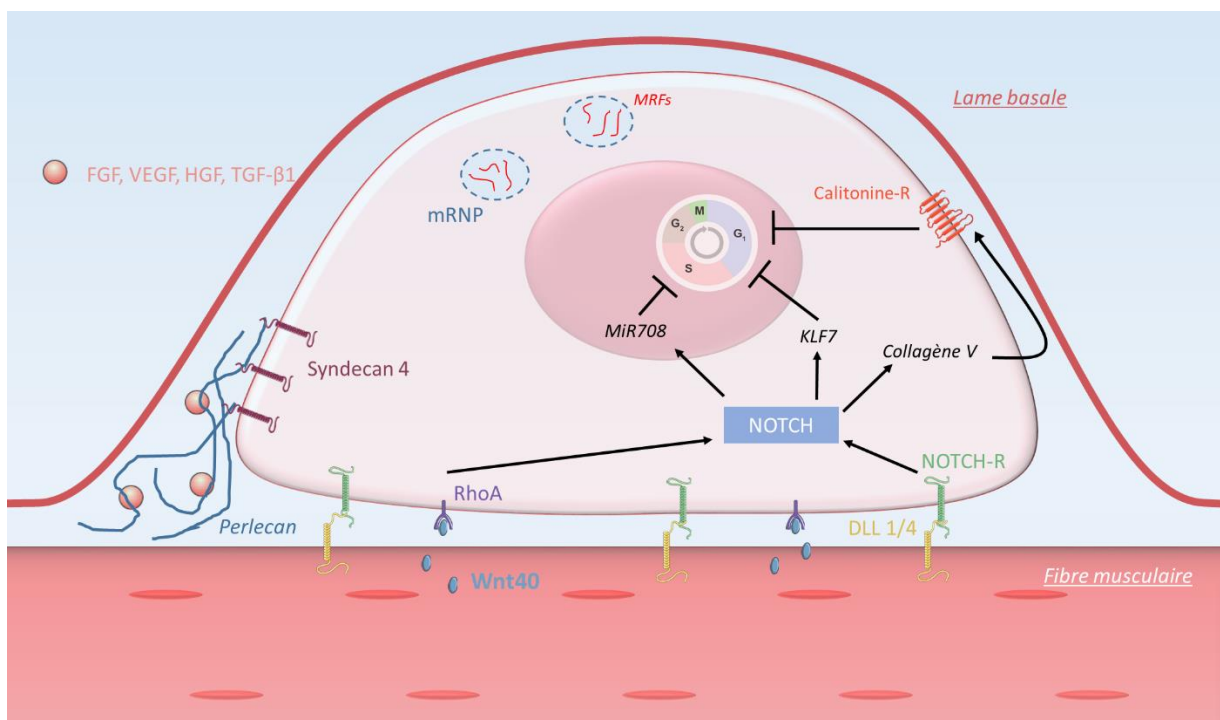


Figure 11 : Mécanismes régissant la quiescence des cellules souches musculaires.

### 2.1.2 L'activation et la prolifération des cellules souches musculaires

En réponse à une blessure musculaire ou lors de myopathies, les cellules souches musculaires vont s'activer en raison de la destruction de leur niche et en réponse à différents stimuli<sup>136</sup>. La dégradation des jonctions de la SC avec la fibre musculaire et la lame basale induit tout d'abord une diminution de l'expression de NOTCH<sup>137</sup>. Les voies MAPK et ERK sont également activées au sein de la SC par les différents facteurs HGF, FGF2 suite à une blessure musculaire et fait intervenir notamment PTPN11 (Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11) dans la transduction du signal<sup>138,139</sup>. Une étude d'imagerie intra-vitale a

montré que ces cellules activées migraient ensuite vers la lame basale des fibres musculaires dégradées appelés « ghost fibers » afin de proliférer<sup>140</sup>. La division cellulaire s'opère *via* un phénomène de division dit asymétrique, où chacune des cellules filles possède un rôle prédéterminé. En effet, selon l'expression de certains facteurs myogéniques, la cellule va soit retourner en quiescence afin de renouveler le pool de SCs soit demeurer active et continuer de proliférer pour reformer des fibres musculaires. La cellule fille activée exprimera le facteur myogénique Myf5 contrairement à la cellule destinée à un retour en quiescence<sup>141</sup>. Plusieurs facteurs sont impliqués dans cette division asymétrique. Tout d'abord, la protéine CARM1 (Coactivator associated Arginine Methyltransferase 1) qui participe à la division cellulaire en méthylant Pax7 ce qui aura pour conséquence d'activer la transcription de Myf5 dans la cellule fille<sup>142</sup>. Le récepteur CDO ainsi que la voie de signalisation p38 $\alpha$ / $\beta$ , activée par le TNF $\alpha$ , régule également l'activation et la division des cellules myogéniques *via* une régulation directe de Pax7 (par le complexe Polycomb) et du cycle cellulaire. Cette voie de signalisation est localisée uniquement dans une des cellules filles permettant la division asymétrique<sup>143–146</sup>. De façon similaire à la quiescence, des miRNAs jouent également un rôle dans la prolifération des SCs, notamment le miR-221, miR-222 et miR-133. MiR-221 et miR-222. Ils répriment l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 mais également des facteurs myogéniques p27 et MyoG. Le miR-133 promeut quant à lui la prolifération cellulaire en réprimant le Serum Response Factor (SRF) qui est impliqué dans la différenciation des myoblastes<sup>147–149</sup>. De surcroît, la voie JAK1/STAT1 est activée dans la SC activée et prévient une différenciation précoce des myoblastes. Cette régulation est possible *via* une inhibition de l'expression de MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2), un facteur de transcription impliqué dans les premières étapes de la différenciation myogénique<sup>150</sup>. Enfin, d'élégantes expériences ont mis en évidence que la SC destinée à renouveler le pool de SCs quiescente conserve l'ADN mère afin de se préserver d'éventuelles mutations dues à la réplication de l'ADN et ainsi maintenir son information génétique intacte<sup>141,151</sup>.

### 2.1.3 La différenciation et la fusion des cellules souches musculaires

La différenciation et la fusion des myoblastes constituent la dernière étape de la myogénèse durant une blessure musculaire. Le facteur myogénique MyoD joue un rôle clef dans ces étapes. Tout d'abord ce facteur facilite cette transition en induisant l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p57. Il permet de surcroît l'expression du facteur myogénique principal de l'étape de différenciation : la myogénine (MyoG)<sup>152,153</sup>. MyoG initialise véritablement la différenciation en activant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la contraction musculaire tels que la myosine à chaîne lourde, l' $\alpha$ -actinine, la créatine

kinase, la troponine ou encore les canaux calciques voltage-dépendant<sup>154</sup>. Le facteur MRF4 va, de même, être activé durant la différenciation et activer des gènes nécessaires à la fonction de la fibre mature<sup>155</sup>. Il a également été montré que la famille des MEF2 était largement impliquée dans la différenciation. Précisément, ce facteur est capable d'induire l'expression de MRF tels que MyoD et MyoG, mais également de participer à la différenciation myogénique. Une délétion de différents gènes de la famille des MEF2 a pour conséquence d'altérer la différenciation des SCs et la régénération musculaire<sup>156,157</sup>. Durant cette étape, un changement s'opère dans les voies de signalisation impliquées dans la myogénèse. La voie NOTCH est réprimée au profit de la voie Wnt, permettant la transition d'une cellule en prolifération vers une cellule en différenciation. Cette transition est médiée par la protéine GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3)<sup>158</sup>. La voie MAPK p38 $\alpha$  favorise également la différenciation en réprimant la voie JNK et en favorisant l'expression de MyoD, de MEF2A et MEF2C ainsi que des gènes spécifiques du muscle squelettique<sup>146,159,160</sup>. Des voies de signalisation sensibles au calcium sont également en jeu dans ce processus. En effet, une augmentation intracellulaire de calcium induit une activation des voies de la calcineurine et de calcium/calmodulin-dépendant protein kinase (CaMK). Ces 2 voies permettent l'expression de MEF2 et de la myogénine, favorisant ainsi la différenciation myogénique<sup>161–163</sup>. Enfin, certains miRNAs sont impliqués dans ce processus comme le miR-1, miR-133 ; miR-206 et le miR-486. Ils inhibent la transcription de Pax7 et augmentent ainsi l'activité de MyoD<sup>148,164,165</sup>.

La fusion des myocytes est un phénomène qui reste relativement peu étudié chez les mammifères. Les études sur le sujet ayant plutôt été réalisées chez la drosophile. Cependant, il a été mis en évidence que différentes protéines comme la Nephrine, la FAK (Focal adhesion kinase), la M-cadherin, la N-cadherin et l'intégrine  $\beta$ 1 régissent l'adhésion et la fusion de ces cellules chez la souris<sup>166,167</sup>. La protéine Myomaker a également été identifiée comme un régulateur de la fusion des myocytes. Cette protéine membranaire est régulée par les MRF MyoD et MyoG et organise le cytosquelette d'actine afin de permettre la fusion<sup>168</sup>. Elle a donc un rôle essentiel dans ce processus car une déplétion de cette dernière induit une mort périnatale chez la souris, due à une absence de fibres multinucléées. De plus, la délétion spécifique de cette protéine dans les cellules souches musculaires altère sévèrement la régénération musculaire<sup>169</sup>. Depuis 2017, une équipe a montré qu'une autre protéine, nommée Minion, possède un rôle similaire à Myomaker sur la fusion des myocytes. De la même manière, les myoblastes déplétés en Minion présentent une nette diminution de leur capacité à fusionner pour former des myofibres<sup>170</sup>.

L'intégrine- $\beta$ 1 et la protéine FilaminC sont également impliquées dans ce processus même si leur fonction exacte dans ce processus reste à définir. La délétion de ces protéines conduit à

un phénotype similaire, à savoir une altération de la fusion durant la myogénèse<sup>171,172</sup>. Enfin, le facteur NFATc2 (Nuclear Factor Of Activated T Cells 2), activé par le calcium, régule l'expression de l'IL-4 qui semble importante pour ce processus. Précisément, une délétion globale de l'IL-4 affecte les myoblastes et mène à des myofibres de tailles inférieures présentant moins de noyaux. Cette interleukine semble donc être utilisée comme molécule chimioattractante pour les myoblastes afin de former de nouvelles myofibres<sup>173</sup>.

#### 2.1.4 Le métabolisme des cellules myogéniques

Des modifications dans le métabolisme des SCs sont associées aux différentes étapes d'activation, de prolifération et de différenciation, permettant une réponse énergétique adaptée aux conditions environnementales auxquelles sont soumises ces cellules. Dans cette optique, les cellules satellites quiescentes ne font pas de catabolisme afin de préserver leur fonction dans le temps. Une étude montre d'ailleurs que cela permet à ces cellules de perdurer jusqu'à 30 jours après la mort de l'organisme chez l'humain<sup>174</sup>. Les cellules quiescentes dépendent du métabolisme oxydatif (OXPHOS) en utilisant notamment les acides gras comme substrat (Fatty Acid Oxidation ou FAO). Ce métabolisme permet la production d'une grande quantité d'énergie pour un faible nombre de substrat et est adapté à la dormance des SCs en condition physiologique (Figure 12). Il est donc associé à une expression élevée des gènes relatifs au transport des acides gras à la mitochondrie ainsi que des gènes relatifs à la  $\beta$ -oxydation. Le métabolisme FAO a également une fonction épigénétique en maintenant un niveau élevé de Nicotinamide Adénine Dinucléotide<sup>+</sup> ou  $NAD^+$ , menant à la déacétylation de l'histone H4 Lysine 6 par la Sirtuin1 (SIRT1). Cette déacétylation a pour conséquence de réprimer les gènes myogéniques tels que Myf5 ou MyoD<sup>175</sup>. Une équipe a d'ailleurs mis en évidence que l'inhibition de ce métabolisme dans les SCs induit une différenciation prématurée des cellules aboutissant à des problèmes de régénération *in vivo*<sup>176</sup>. De façon similaire, le métabolisme FAO associé à une faible glycolyse réduit le niveau d'acetyl-CoA dans le cytoplasme de la cellule ce qui aura pour conséquence de diminuer l'acétylation des histones associés à l'initiation du programme myogénique<sup>177</sup>. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) semblent également jouer un rôle dans ce maintien en quiescence. Effectivement, le niveau métabolique faible des SCs évite la formation de ces espèces. Ainsi, la déplétion spécifique de UCP2 (Uncoupling Protein 2) va favoriser l'accumulation de ROS au sein de la cellule et conduit à une différenciation cellulaire prématurée<sup>178–180</sup>.

L'activation et la prolifération des cellules souches musculaires en condition pathologique ou de blessure induit chez ces cellules un changement de métabolisme, qui va basculer vers de la glycolyse anaérobie (ou effet Warburg). Ceci engendre une diminution de l'expression des

gènes associés au métabolisme oxydatif et au métabolisme des acides gras durant les premières heures de l'activation de ces cellules (Figure 12)<sup>137</sup>. L'inhibition pharmacologique ou génétique de ce métabolisme cause une diminution de la capacité proliférative des SCs ainsi qu'une altération de leur capacité à retourner en quiescence. A l'inverse, la stimulation de la glycolyse anaérobie *via* une surexpression de la lactate deshydrogenase A favorise l'expansion des SCs<sup>181</sup>. Ce métabolisme anaérobie conduit ainsi à la production de carbone en grande quantité suite à l'utilisation du glucose permettant la disponibilité en substrats nécessaires à la synthèse des protéines, des lipides et des nucléotides, tous nécessaires à la division de ces cellules<sup>182</sup>.

Enfin, la différenciation des myoblastes en myotubes s'accompagne à nouveau d'une transition métabolique avec une augmentation du métabolisme oxydatif associée à une expression accrue des gènes relatifs à la biogénèse mitochondriale, de la respiration et de l'oxydation des acides gras. Ce changement métabolique provoque une production massive de ROS par la mitochondrie qui ont un rôle dans la différenciation de ces cellules. Ces ROS engendrent une augmentation de l'expression des gènes antioxydants PITX2 et 3 (Paired Like Homeodomain). Par conséquent, la délétion de ces gènes conduit à une différenciation précoce des myoblastes et à un retard de régénération (Figure 12)<sup>180</sup>.

L'ensemble de ces données démontre la grande flexibilité métabolique des cellules souches musculaires durant les différents stades d'activation/différenciation. Ces modifications métaboliques permettent l'apport d'énergie et des substrats nécessaires à leur fonctionnement tout en ayant une action transcriptomique et/ou épigénétique sur le destin de ces cellules.

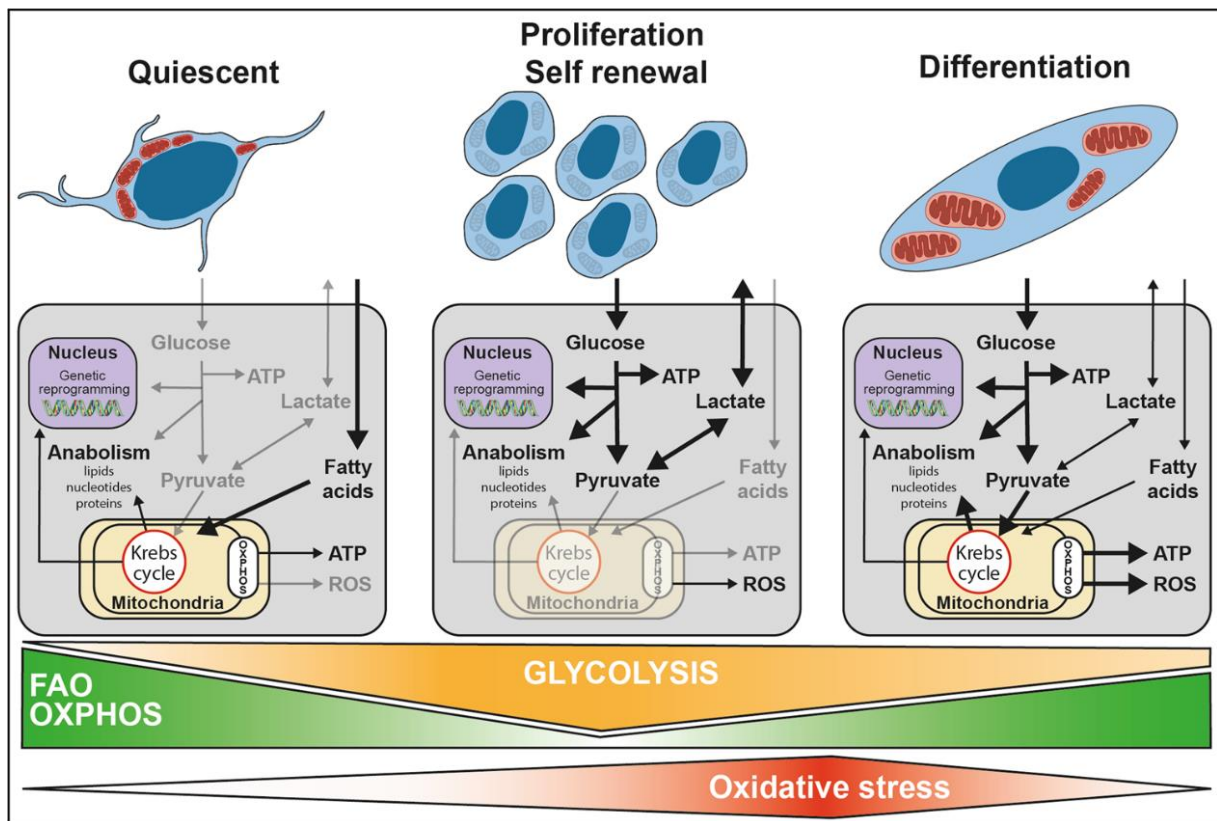


Figure 12 : Adaptation métabolique des cellules souches musculaires durant la régénération (Relaix F. et al., 2021).

## 2.2 L'inflammation dans la régénération musculaire

Bien que l'activité de la cellule satellite soit primordiale au processus de régénération, le système immunitaire tient un rôle essentiel dans l'élimination des débris nécrotiques, dans l'instauration d'un environnement propice aux différents stades d'activation de la cellule satellite, ainsi qu'aux autres cellules participant à l'homéostasie musculaire. La magnitude à laquelle le système immunitaire réagit dépend de deux facteurs : la sévérité de la blessure musculaire et la vascularisation du muscle touché<sup>183</sup>.

### 2.2.1 Initiation de l'inflammation

Bien que la majorité des leucocytes présents durant une blessure musculaire proviennent d'un recrutement à partir du sang, on retrouve de nombreux leucocytes résidents dans le muscle. En effet, il est estimé que le nombre de leucocytes dans un muscle sain est compris entre 500 et 2000 par  $\text{mm}^3$  de muscle chez la souris. Ils sont principalement composés de monocytes et de macrophages, mais on retrouve également des lymphocytes T CD8 et T CD4 régulateurs ainsi que des neutrophiles et des éosinophiles<sup>184–186</sup>.

Lors d'une blessure, les macrophages résidents s'activent et permettent le recrutement des neutrophiles en sécrétant du CCL2 (Chemokine (C-C motif) Ligand 2) et du CxCL1 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 1)<sup>187,188</sup>. Les mastocytes résidents vont représenter la première source de TNF $\alpha$ , d'IL-1 et d'histamine. En outre, ces cytokines stimulent la production d'IL-6 et de CxCL8 par les cellules endothéliales, permettant le recrutement des différentes cellules immunitaires tels que les neutrophiles et les monocytes au niveau du site de blessure<sup>189-191</sup>. Le recrutement des monocytes est assuré par la libération de CCL2 par les lymphocytes T CD8 résidents. En ce sens, une étude montre que la délétion de ces lymphocytes aboutit à une diminution de la sécrétion de CCL2 dans le muscle et une perturbation du recrutement des leucocytes (Figure 13)<sup>192</sup>.

Cependant, la présence de leucocytes résidents n'est pas la seule composante permettant l'attraction des leucocytes à partir du sang. En effet, la blessure musculaire engendre un saignement dû à la destruction des vaisseaux sanguins qui enclenche une coagulation et un hématome à l'origine du recrutement et de l'activation des cellules immunitaires. Par exemple, des molécules appelées anaphylatoxines sont relâchées dans les tissus avoisinants le site de blessure et activent les mastocytes. Enfin, des protéines musculaires intracellulaires appelées DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern) sont libérées dans le milieu extracellulaire suite à la blessure, et activent également les leucocytes résidents<sup>193</sup>.

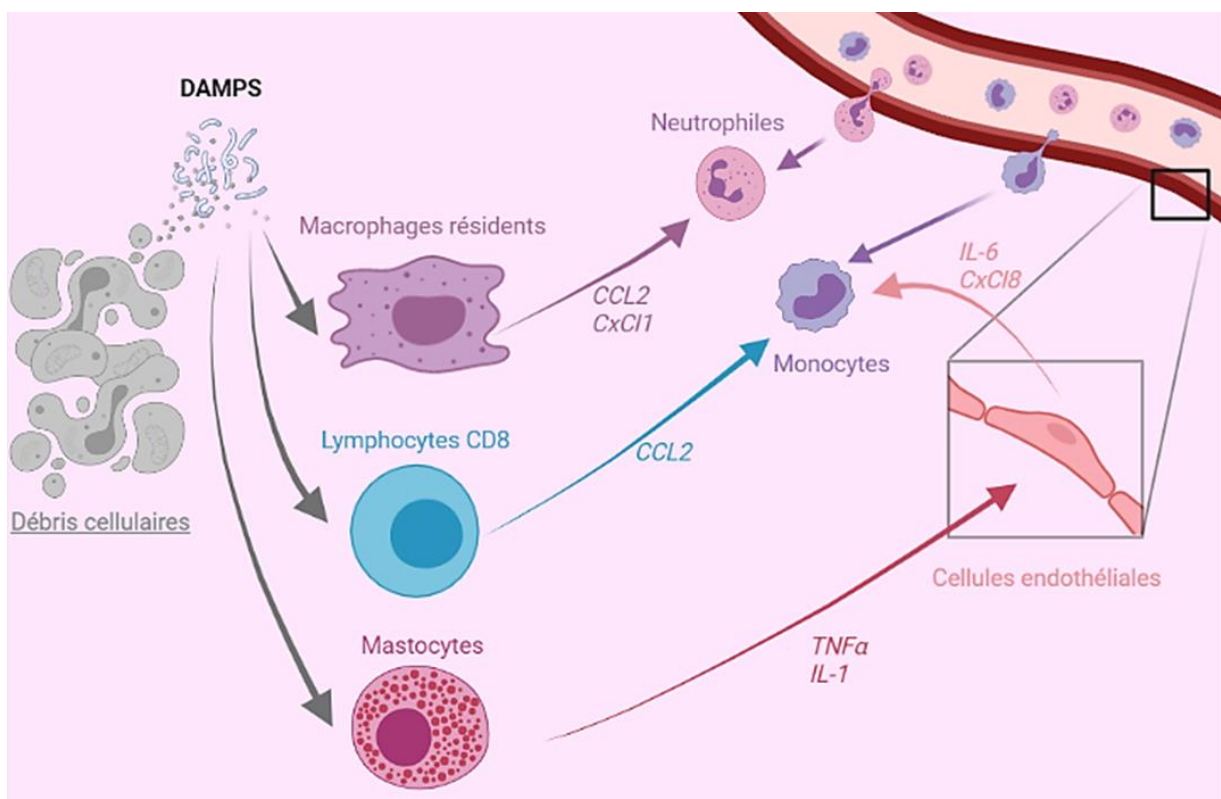


Figure 13 : Mécanismes initiant l'inflammation durant la régénération.

### 2.2.2 Inflammation précoce

Les neutrophiles sont parmi les premières cellules immunitaires à être recrutées au sein du muscle blessé puisqu'elles apparaissent dès la première heure post-blessure. C'est la population immunitaire la plus abondante 24 heures après la blessure et elle peut persister dans le muscle durant 1 semaine<sup>194,195</sup>. Lorsqu'ils sont recrutés, les neutrophiles participent activement à la dégradation des débris musculaires et sécrètent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires tels que le TNF $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-8<sup>196</sup>. L'annexin A1, le MIP-1 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein 1) et le CCL2 vont aussi être produites par ces cellules et soutenir le recrutement des monocytes et l'activité des macrophages (Figure 14)<sup>197,198</sup>. Les neutrophiles produisent des protéases et des ROS qui participent à la dégradation des débris cellulaires<sup>199</sup>. De plus, une étude a montré que ces cellules favorisent la réparation des nerfs musculaires lésés durant la blessure, notamment en dégradant la myéline afin de faciliter leur régénération<sup>200</sup>. Dans le contexte d'une blessure musculaire aiguë, la déplétion en neutrophile induit un défaut de régénération important, caractérisé par une persistance des zones nécrosées ainsi qu'une diminution de l'aire des fibres régénérées<sup>201</sup>.

Le rôle des éosinophiles durant la régénération musculaire fait, à l'heure actuelle, l'objet de moins d'investigation, bien que l'infiltration importante de ces cellules soit associée à certaines myopathies<sup>202</sup>. L'infiltration et le rôle de ces cellules lors d'une blessure aiguë a été mis en évidence en 2013. Cette étude montre que les éosinophiles infiltrent le muscle entre 24 et 48 heures après la blessure et qu'une délétion de cette population conduit à un défaut de régénération 8 jours après la blessure<sup>203</sup>. Ces cellules semblent être recrutées au site de blessure *via* une augmentation de la sécrétion d'interleukine 33, 13 et de CCL5. Bien que l'IL-4 sécrétée par ces éosinophiles permette la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire, il semblerait que leur rôle majeur réside dans leur action sur les fibro-adipogenic progenitors (FAPs)<sup>204</sup>. En effet, l'IL-4 sécrétée par les éosinophiles permet d'inhiber la différenciation de ces cellules en adipocyte et promeut leur différenciation en fibroblastes. Ces fibroblastes soutiennent le processus de régénération musculaire en participant à la dégradation des débris cellulaires (voir partie 2.2.2)<sup>203</sup>.



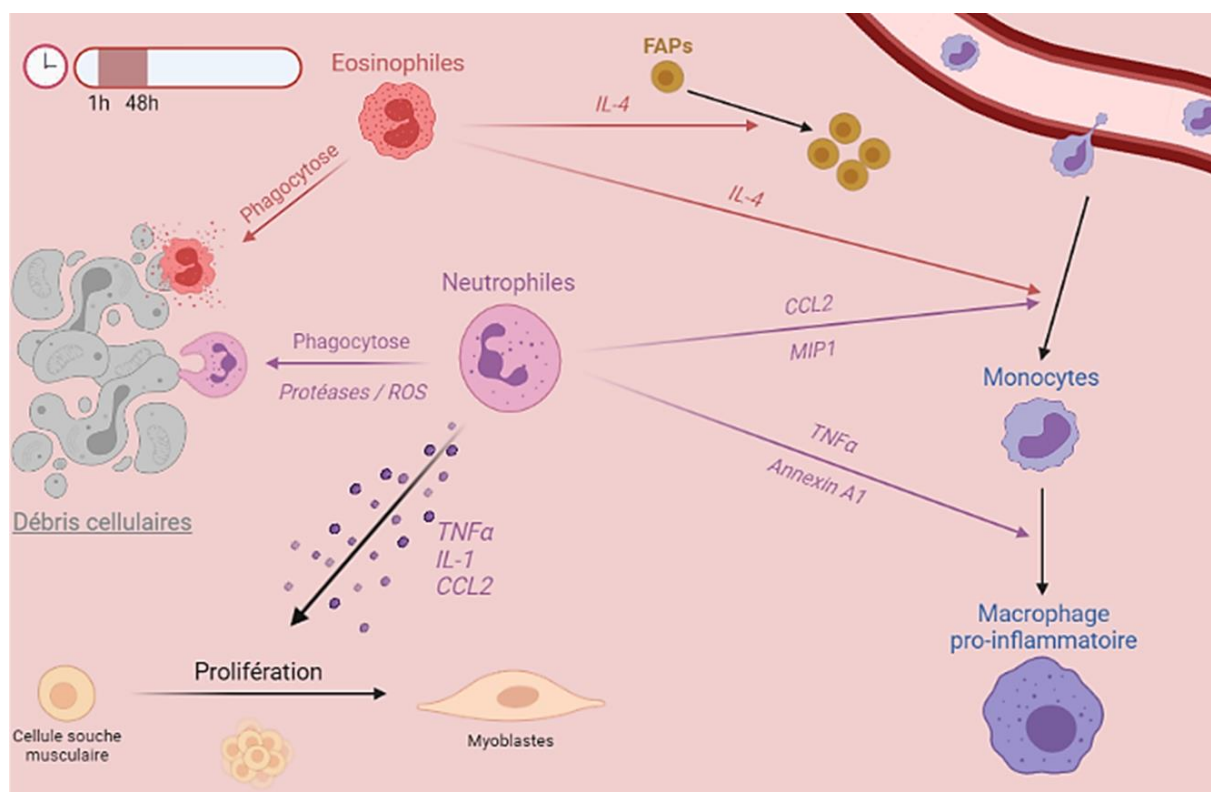


Figure 14 : Inflammation précoce durant la régénération musculaire.

### 2.2.3 Les macrophages et leur polarisation durant la régénération musculaire

Les neutrophiles comme les éosinophiles participent également au recrutement des monocytes dans le muscle environ 24 heures après la blessure. Ce recrutement se fait *via* la production de protéines chimioattractantes telles que le CCL2, l'IL-4 et l'IL-17<sup>205</sup>. Les lymphocytes T CD8 résidents favorisent également ce recrutement en stimulant la sécrétion de CCL2 par les macrophages résidents<sup>192</sup>. Dans cet environnement inflammatoire riche en IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ , les monocytes se différencient rapidement en macrophages pro-inflammatoires Ly6C<sup>High</sup>, participant à la phagocytose des débris cellulaires et sécrétant de nombreuses cytokines telles que le TNF $\alpha$ , l'IL-6, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12, l'ADAMTS1, Leukaemia Inhibitor factor (LIF), le G-CSF, la prostaglandine E<sub>2</sub>, la nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT), l'Inos et l'IFN $\gamma$  (Interféron Gamma)<sup>206–208</sup>. Des chimiokines ayant des propriétés myogéniques sont également produites par ces cellules comme le CCL2, le CxCL1 et le CxCL2 (Figure 15). L'ensemble de ces molécules amplifie l'environnement pro-inflammatoire au niveau du site de blessure et soutient les étapes de prolifération des SCs, de même que l'activité d'autres cellules indispensables au processus de régénération<sup>209</sup>. Des études histologiques démontrent que les macrophages pro-inflammatoires agissent principalement entre 2 et 4 jours après la blessure<sup>210</sup>. Durant cette période, une modification de l'environnement inflammatoire va progressivement s'instaurer. En effet, un environnement anti-inflammatoire se met en place pour soutenir les étapes suivantes de différenciation et de fusion des

myoblastes. Ce changement est majoritairement dû à la polarisation des macrophages pro-inflammatoires en macrophages anti-inflammatoires.

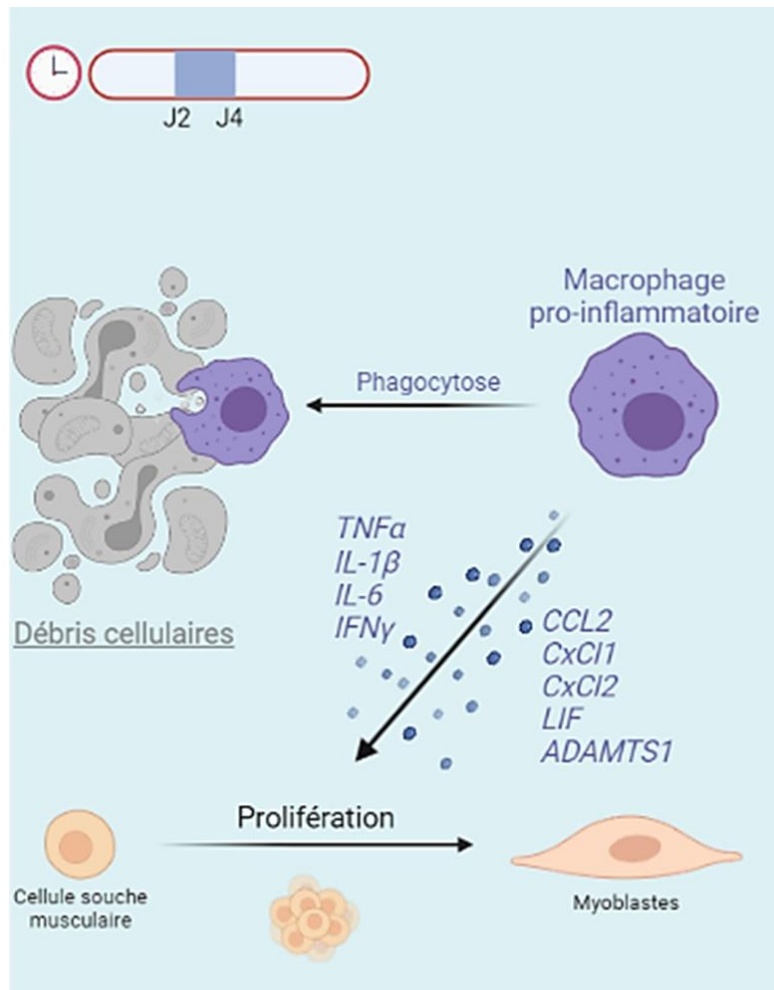


Figure 15 : Rôle des macrophages pro-inflammatoires durant la régénération musculaire.

La polarisation des macrophages est essentielle dans le processus de régénération et s'opère grâce à plusieurs facteurs<sup>211</sup>. Tout d'abord, Tonkin et al. ont montré que la production d'IGF1, durant les premières étapes de la régénération musculaire, est impliquée dans cette polarisation. En effet, la délétion de ce facteur de croissance dans les cellules myéloïdes, conduit à un défaut de régénération causé par une forte réduction du nombre de macrophages anti-inflammatoires et à la persistance de macrophages pro-inflammatoires jusqu'à 10 jours post-blessure<sup>212</sup>. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas démontrés, cela indique que les macrophages influencent directement leur polarisation *via* une stimulation autocrine d'IGF-1 (Figure 16). De plus, la voie p38, déjà mentionnée dans la régénération musculaire par son action sur la myogénèse, a également une action sur le système immunitaire. Cette voie de signalisation est régulée par la MAPK phosphatase-1 (MKP1) et elle contrôle la transition macrophages pro/anti-inflammatoires dans le muscle squelettique<sup>213</sup>.

Depuis de nombreuses années, il a été montré que la phagocytose, réalisée par les macrophages durant la régénération, dirige ces cellules vers un profil anti-inflammatoire<sup>206,214</sup>. Cependant, le mécanisme moléculaire sous-jacent à cette régulation demeurait inconnu. Or, une étude de 2019 cible le récepteur Scavenger receptor class B member 1 (SRB1), impliqué dans la reconnaissance des lipoprotéines et des cellules apoptotiques<sup>215,216</sup>, comme un acteur important de ce phénomène. Cette étude met en lumière que SRB1 est exprimé exclusivement par les macrophages au cours de la régénération et que son expression augmente rapidement, atteignant un pic dès 1 jours post-blessure. L'inactivation de ce récepteur engendre, par ailleurs, un défaut de régénération sévère caractérisé par une diminution significative de la taille des fibres régénérées, associée à une réduction de la différenciation des cellules myogéniques. De plus, les cellules myéloïdes déficientes pour le gène *SRB1* présentent une altération de leur capacité de phagocytose, aboutissant à une accumulation de macrophages pro-inflammatoires au sein du muscle<sup>217</sup>.

La polarisation des macrophages est également régulée par certains facteurs de transcriptions tels que C/EBP $\beta$ , STAT3, NFIX (Nuclear Factor I X) et BACH1<sup>211</sup>. Le CCAAT/ Enhancer Binding Protein Beta (C/EBP $\beta$ ) est le premier facteur de transcription mis en évidence en tant que régulateur de cette transition dans le muscle. C/EBP $\beta$  active de façon directe l'expression de l'IL-10, de l'IL-13ra et de l'arginase1, régulant ainsi le phénotype anti-inflammatoire des macrophages. La délétion de ce facteur mène à un défaut de régénération et au développement d'une fibrose<sup>218</sup>. De façon antagoniste, le répresseur transcriptionnel BTB domain CNC homolog 1 (BACH1) est exclusivement exprimé dans les macrophages pro-inflammatoires et inhibe l'expression de gènes « anti-inflammatoires » tels que l'IL-10, PPAR  $\delta$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) et GDF3 (Growth Differentiation Factor 3). Il réprime également des gènes impliqués dans la polarisation vers un phénotype anti-inflammatoire tels que IGF-1 ou C/EBP $\beta$ <sup>219</sup>. La météorine-like (Metrnl) est une hormone, produite par les macrophages lors de la régénération, qui a un effet autocrine sur ces cellules. Cette hormone active la voie STAT3 qui induit une augmentation de l'expression des gènes de l'*Il-10* et l'*Arg1*, ainsi qu'une diminution de l'expression du *Tnfa*, de l'*Il-1 $\beta$*  et de *Nos2*. Cette voie de signalisation est donc un mécanisme autocrine essentiel dans ce phénomène de polarisation<sup>220</sup>. Le récepteur nucléaire Nfix, initialement décrit dans les cellules souches musculaire comme un facteur de différenciation, régule également le changement inflammatoire des macrophages<sup>221</sup>. Il est exprimé uniquement dans les macrophages après phagocytose et favorise l'expression des gènes relatifs au phénotype anti-inflammatoire, bien que son mécanisme d'action précis ne soit pas encore connu<sup>222</sup>.

Les changements métaboliques opérés par les macrophages durant leur polarisation sont également indispensables à ce processus. Initialement, les macrophages pro-inflammatoires présentent un métabolisme glycolytique qui évolue vers un métabolisme oxydatif, avec une activation du cycle de Krebs, au moment de leur polarisation<sup>223</sup>. Mounier et al. ont montré que ce changement métabolique est régulé par la sous-unité catalytique  $\alpha 1$  de l'AMPK. L'AMPK est un régulateur énergétique cellulaire majeur sensible aux variations de concentrations d'ADP, d'ATP et d'AMP dans le cytoplasme<sup>224</sup>. Cette équipe a mis en évidence que l'activation de l'AMPK $\alpha 1$  dans les macrophages pro-inflammatoires, consécutive à la phagocytose des neutrophiles et des débris cellulaires, permet l'initiation des changements métaboliques nécessaires à la polarisation de ces cellules<sup>214,225</sup>. Dans ce contexte, la délétion de cette sous-unité catalytique empêche la mise en place du phénotype anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*, et est associée à un défaut de régénération. Ces macrophages déficients pour *AMPK $\alpha 1$*  sont incapables de réaliser la transition vers un métabolisme oxydatif. Le mécanisme moléculaire expliquant cette régulation n'est pas totalement compris, cependant, des études de 2009 ont mis en évidence une régulation indirecte de SIRT1 par l'AMPK *via* une augmentation du NAD<sup>+</sup> cellulaire. La déacétylase SIRT1 est décrite dans les macrophages comme un activateur de la transcription du gène IL-10, suggérant que le rôle de l'AMPK $\alpha 1$  pourrait être dépendant de SIRT1 (Figure 16)<sup>226,227</sup>. Le même laboratoire a récemment mis en lumière un nouveau facteur participant à ces régulations métaboliques en identifiant l'Annexine A1 (ANXA1)<sup>198</sup>. Cette protéine est rapidement exprimée durant la régénération musculaire par les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires. Or, la délétion de cette dernière entraîne un défaut de régénération, associée à une dysfonction de la différenciation/fusion des cellules souches musculaires. Par ailleurs, l'ANXA1 induit l'activation de l'AMPK au sein des macrophages *in vitro* *via* le récepteur FPR2 (Formyl Peptide Receptor 2), permettant ainsi leur polarisation vers un phénotype résolutif<sup>198</sup>.

La polarisation des macrophages est facilitée par la sécrétion de différentes cytokines tels que l'IL-13, l'IL-10 ou encore l'IL-4<sup>193</sup>. Ce changement phénotypique participe à modifier l'environnement inflammatoire du muscle blessé afin de stimuler la réparation des tissus *via* la différenciation et la fusion des myoblastes (Figure 16).

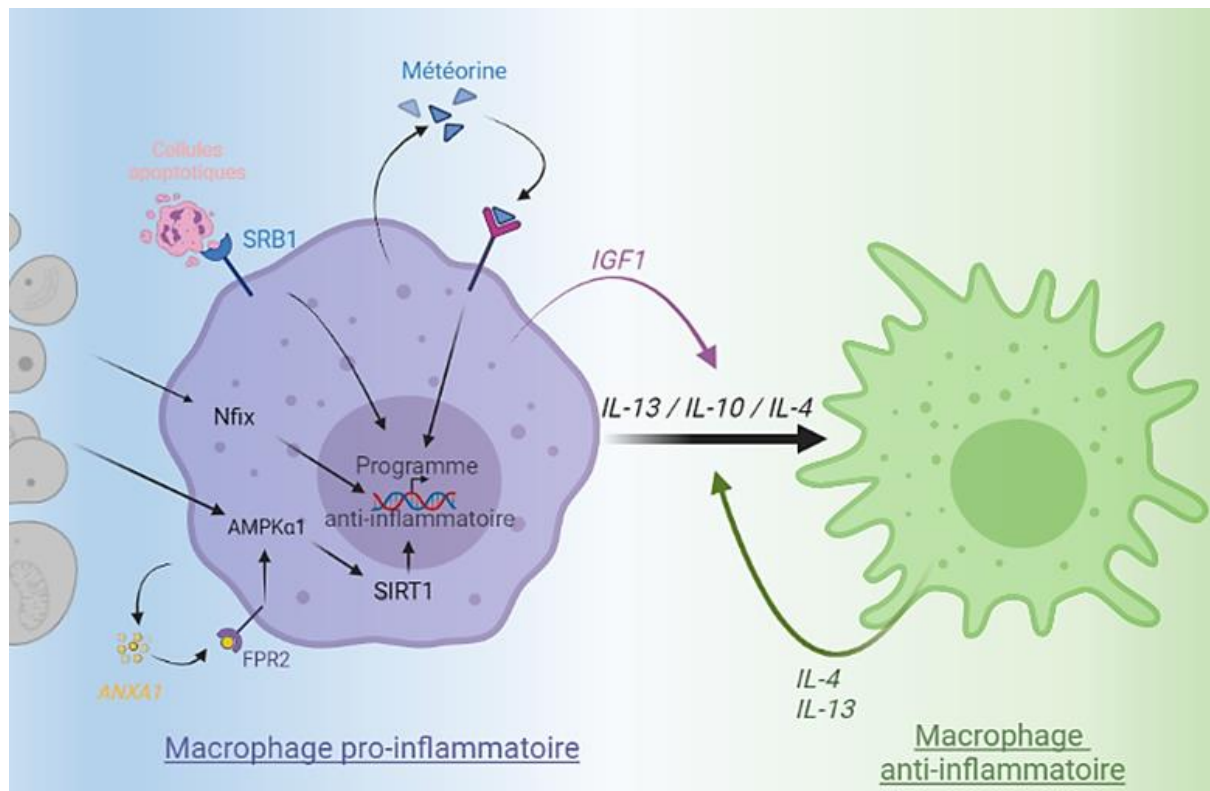


Figure 16 : Mécanismes favorisant la polarisation des macrophages pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire.

La proportion de macrophages anti-inflammatoires est maximale entre 4 et 6 jours après la blessure et initie la mise en place d'un environnement anti-inflammatoire. Cette environnement se fait *via* la sécrétion de différents messagers tels que l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, le TGF $\beta$ , l'IGF-1, le GDF3 et la prostaglandine 15 $\Delta$ -PGJ2<sup>228-230</sup>. Il est important de noter que, contrairement à d'autres tissus, ces macrophages anti-inflammatoires semblent provenir principalement de la polarisation des macrophages pro-inflammatoires et ne sont pas recrutés en amont *via* la circulation sanguine<sup>206</sup>. Cependant, une étude montre que ces macrophages Ly6C<sup>Low</sup>, à l'instar des macrophages pro-inflammatoires (Ly6C<sup>High</sup>), sont capables de proliférer durant la régénération musculaire (entre 2 et 4 jours après la blessure), *via* l'expression de M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor)<sup>223</sup>. Cette expansion leur permet d'être actifs entre 4 et 8 jours après la blessure afin de soutenir les dernières étapes de la myogénèse. Durant cette période, la sécrétion des différents messagers favorise la différenciation/fusion des myoblastes, la réduction du niveau de ROS au sein du muscle, et induit l'apoptose des neutrophiles<sup>231</sup>. De surcroît, ces cellules restructurent le muscle squelettique en produisant un grand nombre de composant de la MEC tels que la fibrilline-1, la décorine, la périostine, le lumican, l'osteonectine et le biglycan (Figure 17)<sup>223</sup>.

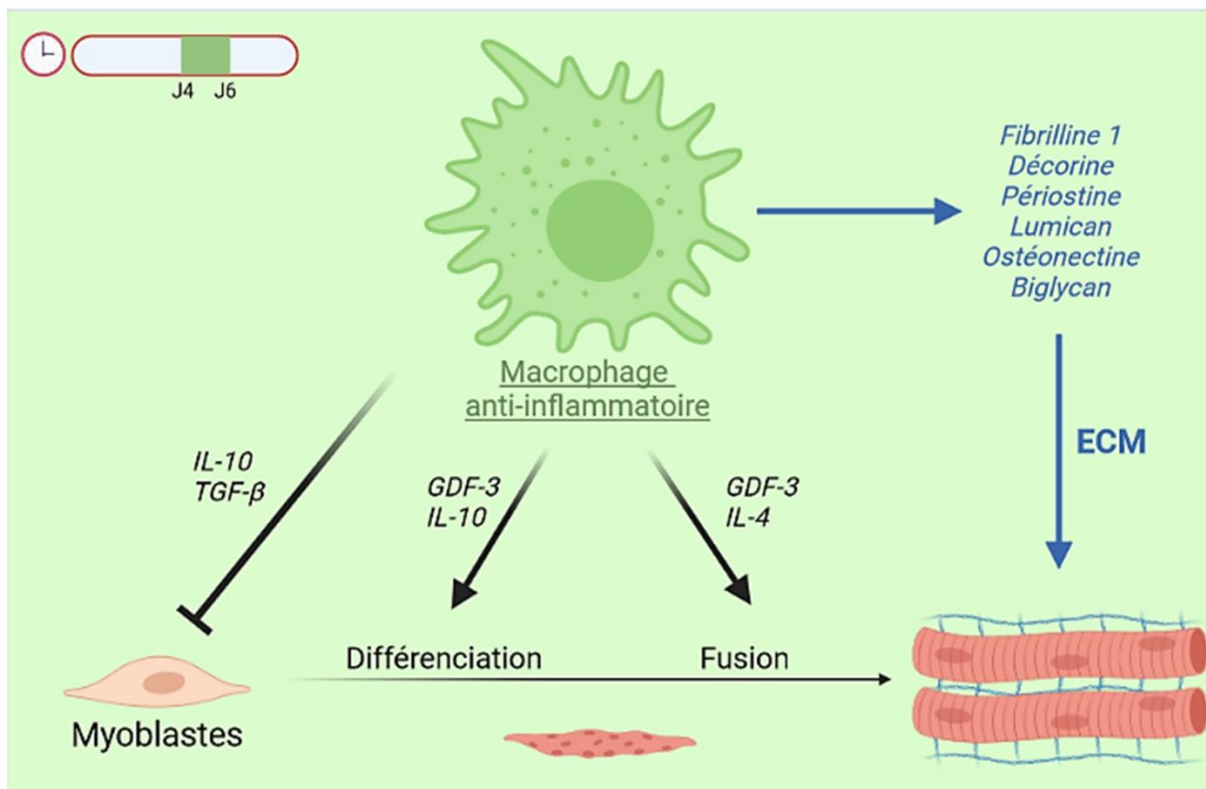


Figure 17 : Rôle des macrophages anti-inflammatoires dans la réparation du muscle squelettique.

#### 2.2.4 L'implication des lymphocytes mTregs dans la régénération musculaire

De façon complémentaire, le muscle squelettique connaît un recrutement important de lymphocytes T régulateurs (mTregs), responsables également de la mise en place de cet environnement pro-résolutif. De façon intéressante, des analyses transcriptomiques mettent en évidence un phénotype spécifique de ces mTregs dans ce contexte, les distinguant des autres lymphocytes T régulateurs présents dans les autres tissus, notamment par leur profil cytokinique<sup>232</sup>. Le recrutement de ces cellules est initié 4 jours après la blessure, en réponse à la sécrétion de CCL2 par les autres acteurs de la régénération<sup>232</sup>. La production d'IL-33, principalement par les FAPs, permet l'activation et la prolifération des mTregs au sein du muscle. Il a d'ailleurs été montré que l'altération de l'axe IL-33 – mTregs au cours du vieillissement conduit à des défauts de régénération musculaire<sup>233</sup>. Ces cellules sécrètent des facteurs essentiels à ce processus tels que l'IL-10, de l'IL-4, de l'IL-13, de l'amphiréguline (AREG) ainsi que du PDGF (Platelet-derived growth factor)<sup>232,234</sup>. La plupart de ces molécules facilitent l'émergence des macrophages pro-résolutifs au niveau du site de blessure. Ainsi, une délétion des mTregs conduit à une altération de la capacité régénérative du muscle, associée à une perturbation de la polarisation des macrophages<sup>235</sup>. De plus, les facteurs de croissance et les cytokines sécrétés par les mTregs influencent la différenciation et la fusion des

myoblastes (Figure 18). Par conséquent, l'absence de ces cellules perturbe l'expression des facteurs de transcription myogéniques, associée à un prolongement de l'environnement inflammatoire dans le muscle<sup>232</sup>. Le niveau de mTregs dans le muscle revient à un niveau basal entre 7 et 10 jours après la blessure<sup>236</sup>. Outre leur action sur la myogénèse, ces cellules immunes influencent le développement de la fibrose. Bien que le mécanisme ne soit pas totalement élucidé, deux études, faites chez des modèles de souris myopathes (mdx), montrent que la délétion des mTregs favorise le développement de fibrose *via* l'augmentation du niveau de TGFβ intra-musculaire. L'hypothèse abordée par les auteurs serait une régulation de la production de TGFβ par l'amphiréguline<sup>185,237</sup>. Enfin, une étude menée par Burzyn et al. souligne un nouveau rôle de ces lymphocytes dans le processus de régénération musculaire : la notion de lymphocytes mémoires. Cette fonction a été démontrée dans d'autres tissus, et elle permet la mise en place d'une mémoire immunitaire vis à vis de peptides microbiens ou viraux. Concernant la régénération musculaire, l'auteur suggère que, durant la première blessure, les mTregs acquièrent une mémoire vis à vis des peptides provenant du muscle nécrosé. Cette sensibilisation leur permet une réactivité plus importante au cours d'une seconde blessure<sup>232</sup>. Cette théorie place ainsi les mTregs au centre d'un processus de surveillance des muscles blessés mais nécessite, cependant, d'être alimentée par de nouvelles études.



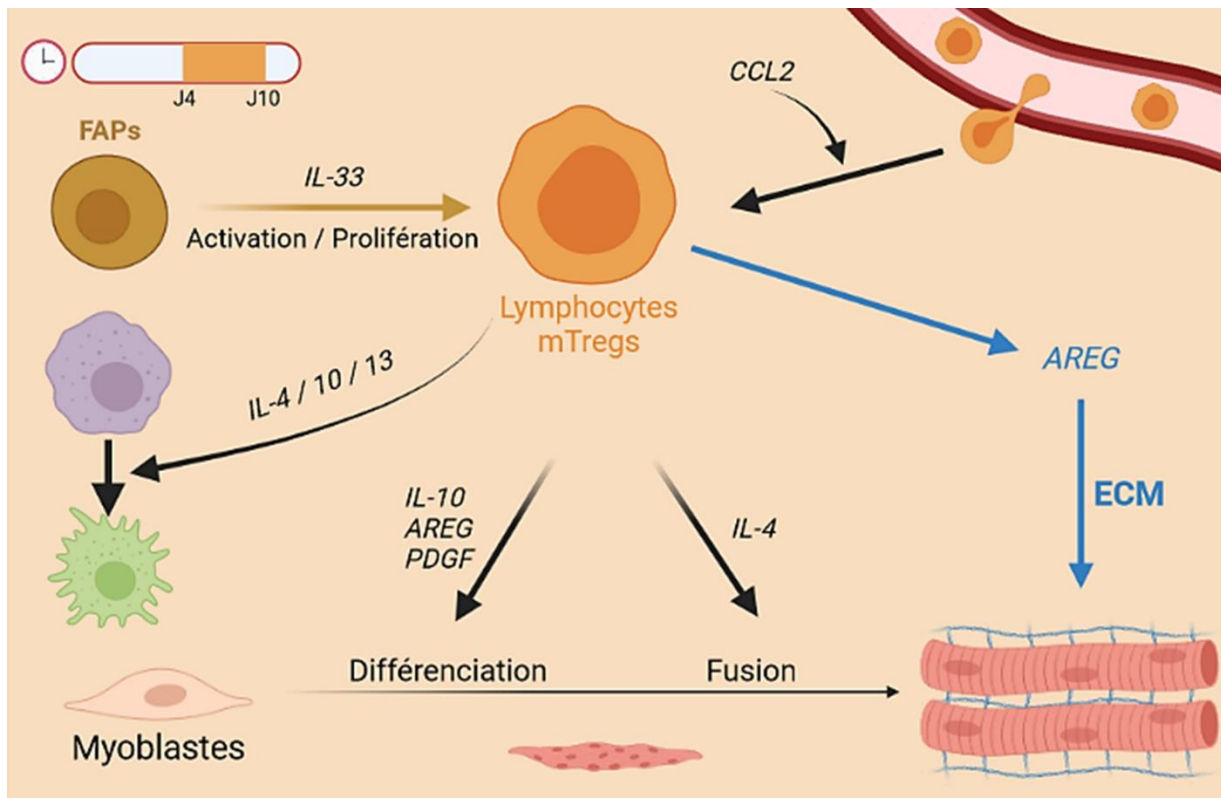


Figure 18 : Rôle des lymphocytes mTregs dans la régénération du muscle squelettique.

### 2.3 Les progéniteurs fibro-adipogéniques

Les principaux constituants du tissu conjonctif, présent dans le muscle squelettique, sont la MEC et les cellules stromales qui restructurent continuellement le microenvironnement musculaire afin d'assurer le bon fonctionnement de ce tissu<sup>238</sup>. Parmi ces cellules stromales, nous retrouvons les FAPs. Ces progéniteurs peuvent se différencier en plusieurs types cellulaires, principalement en fibroblastes et en adipocytes, mais également en chondrocytes et en ostéocytes<sup>239</sup>. Les différentes cellules dérivant des FAPs participent activement à l'homéostasie musculaire, ainsi qu'à sa réparation, via la sécrétion de différents facteurs de croissance tels que l'IGF1, le TGF- $\beta$ , la follistatine, le CCN2 (Cellular Communication Network Factor 2), les WNTs (1 et 3a), les PDGF ou encore différentes interleukines (ILs). Les FAPs produisent également d'autres protéines impliquées dans la formation de la MEC telles que différents types de collagène, des protéoglycanes, des intégrines, des laminines et des fibronectines (Figure 19)<sup>240</sup>.

Le rôle des FAPs dans le maintien de l'intégrité musculaire a largement été décrit ces dernières années. En effet, des souris déficientes en FAPs présentent une forte diminution de la masse musculaire (environ 30-40%), aboutissant à une perte de force de ce tissu sur le long terme par rapport à des souris contrôles<sup>241,242</sup>. Ce phénotype s'explique par une induction de



l'atrophie chez ces souris, due à une augmentation significative de MuRF1 et d'Atrogin1. De plus, une désorganisation de la MEC est observée chez ces souris, due à une diminution de la quantité de laminines et de follistatines, perturbant ainsi la communication entre les fibres<sup>241</sup>.

L'implication des FAPs a également été démontrée dans le processus de régénération musculaire. En effet, une proportion significative des fibroblastes activés, des adipocytes ou des ostéocytes proviennent de ces progéniteurs après un traumatisme musculaire. Ainsi il n'est pas surprenant d'observer une accumulation de fibrose et une infiltration d'adipocytes, au cours de différentes myopathies ou dans des protocoles de blessures répétées<sup>243</sup>. L'implication principale des FAPs dans ces pathologies est essentiellement liée au développement d'une fibrose. Or, la fibrose « physiologique », qui se forme pendant le processus de régénération lors d'une première blessure, est indispensable à la restructuration du muscle. Durant des blessures répétées ou des myopathies, ce phénomène est dérégulé et conduit à une fibrose non transitoire. A terme, ces dépôts fibreux remplacent les fibres musculaires et induisent une faiblesse musculaire permanente<sup>244,245</sup>. L'action des FAPs demeure néanmoins indispensable à un processus intègre de régénération. En témoigne cette étude, menée par Wosczyzna et al., qui démontre que la déplétion de ces cellules conduit à un défaut de régénération, illustré par un nombre limité de cellules souches et des fibres régénérées de plus petite tailles chez les souris déficientes en FAPs<sup>246</sup>. Les FAPs proliféraient rapidement afin d'atteindre leur zénith entre le 2<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour de régénération, avec un retour à un niveau basal entre 14 et 21 jours après la blessure<sup>247,248</sup>. Durant leur pic, les FAPs ont un rôle important sur l'expansion et le développement des cellules souches musculaires. En effet, ils participent à leur prolifération, leur différenciation, ainsi qu'à leur retour à l'état quiescent, *via* la production de follistatine, de WISP1 (WNT1-inducible-Signaling Pathway Protein 1), d'IL-6 et d'IGF1<sup>203,247</sup>. Des composants de la MEC produits par les FAPs peuvent également interagir avec les cellules souches tels que le collagène IV qui régule leur quiescence chez la souris<sup>249</sup>. La différenciation et la croissance des myotubes sont régulées par la protéine BMP3B ainsi que par l'IL-10, produite par les FAPs, qui stimule l'hypertrophie de ces cellules<sup>242</sup>. Les FAPs sont également impliqués dans le recrutement des cellules immunitaires sur le site de blessure. Ils vont notamment sécréter diverses cytokines telles que le CCL2, le CCL3, le CCL5, le CCL7, le CCL11, le CxCL2, le CxCL14, le CX3CI1 et le CSF1 (Colony Stimulating Factor 1). Ces différents messagers sont impliqués dans le recrutement des neutrophiles, des éosinophiles et des monocytes, ainsi que dans la polarisation des monocytes en macrophages (Figure 19)<sup>250,251</sup>. Elles sécrètent également de l'IL-33, nécessaire au recrutement des mTregs et des ILC2 (Innate Lymphoid Cells 2) au sein du muscle<sup>252</sup>. Bien qu'indispensables à la régénération musculaire, la quantité de ces cellules

doit être finement régulée afin d'éviter les phénomènes délétères décrits précédemment<sup>253</sup>. La régulation et la polarisation des FAPs sont principalement médiées par le système immunitaire. En effet, l'IL-4, sécrétée principalement par les éosinophiles, stimule la prolifération de ces cellules, tout en inhibant leur différenciation en adipocytes<sup>254</sup>. Cette prolifération, nécessaire à la fonction de ces cellules, est cependant rapidement réduite par le TNF $\alpha$ . Cette cytokine, sécrétée par les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires, active le programme apoptotique des FAPs afin de maintenir une proportion non délétère de ces cellules au sein du muscle blessé<sup>194,255</sup>. Pour illustrer ce processus, une étude fait état d'une accumulation importante de FAPs, due à une déplétion des monocytes chez des souris déficientes en *ccr2*. Cette accumulation causant un défaut de régénération, couplé à une accumulation d'adipocytes et de dépôts fibreux<sup>253</sup>. Cependant, une persistance des FAPs dans le muscle squelettique peut survenir *via* l'action du TGF- $\beta$ , sécrété par les macrophages anti-inflammatoires. Ce facteur de croissance, à l'inverse du TNF $\alpha$ , active le programme anti-apoptotique chez les FAPS, et favorise la sécrétion de composants de la MEC, de même que leur différenciation en myofibroblastes<sup>248,256</sup>. Cela a également été démontré *ex vivo* chez l'humain, avec une polarisation des FAPs en myofibroblastes lorsqu'ils sont mis en contact avec du milieu conditionné provenant de macrophages anti-inflammatoires<sup>204</sup>. Ainsi, la balance TNF $\alpha$  / TGF- $\beta$  est essentielle et une dérégulation de cette balance peut mener aux phénotypes délétères énoncés précédemment, comme dans le cas des myopathies. Par ailleurs, les cellules souches musculaires, ainsi que les myotubes, sont également capables d'influencer la destinée des FAPs. Bien que les intermédiaires demeurent inconnus, il a été montré que les cellules myogéniques peuvent contrôler le potentiel adipogénique des FAPs, afin d'éviter une accumulation d'adipocytes au sein du muscle. Il est intéressant de noter que cette régulation se réduit avec le vieillissement, de même que dans certaines myopathies<sup>257,258</sup>.

Enfin, les FAPs sont impliqués dans la vascularisation du muscle squelettique lors de la régénération musculaire. Plusieurs études mettent en évidence la présence de ces cellules à proximité des vaisseaux sanguins<sup>247,251</sup>. De plus, la déplétion des FAPs induit une désorganisation des vaisseaux sanguins musculaires suite à une blessure par ischémie<sup>259</sup>. Plusieurs travaux semblent d'ailleurs indiquer que la production d'angiopoïétines et de VEGF par les FAPs permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Figure 19)<sup>260,261</sup>. A l'inverse, l'état des vaisseaux sanguins, ainsi que la disponibilité en oxygène, régulent le destin des FAPs. Ainsi, une hypoxie musculaire stimule la prolifération de ces cellules progénitrices, tout en diminuant leur différenciation en adipocytes<sup>262</sup>.

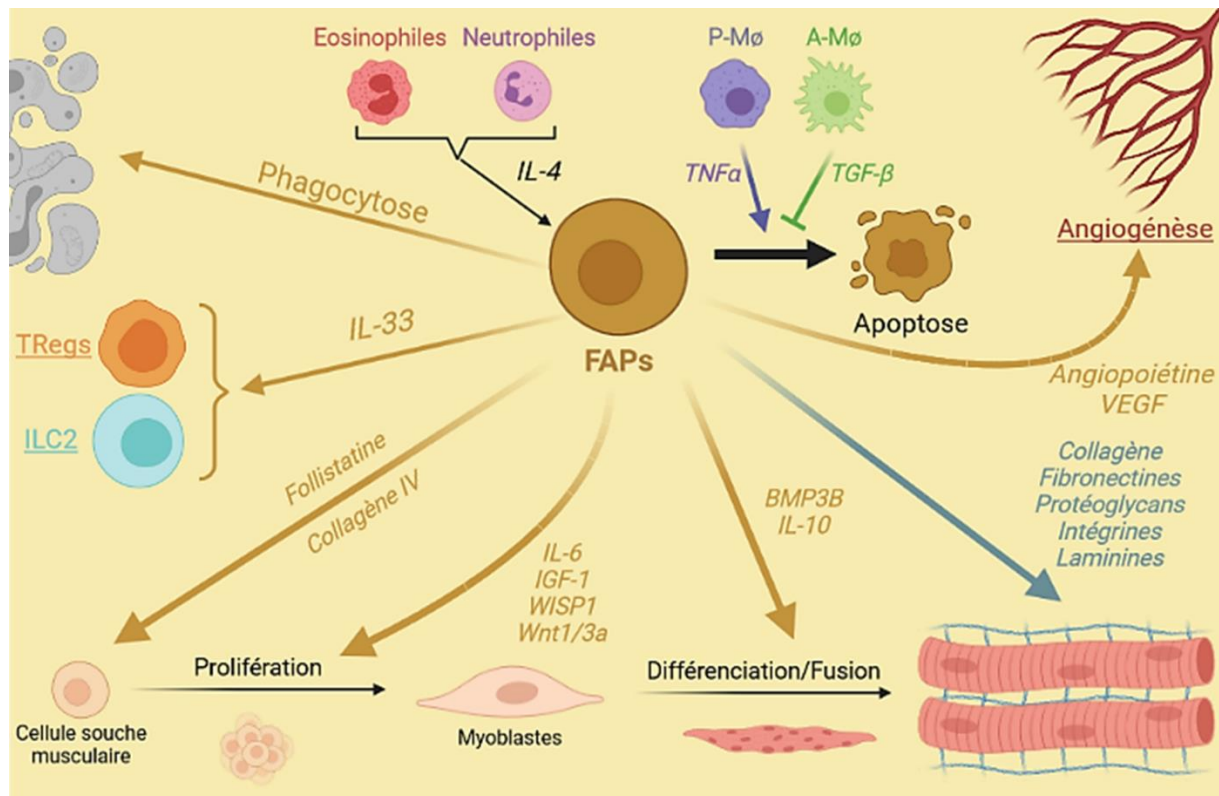


Figure 19 : Implication des progéniteurs fibro-adipogéniques dans la régénération et le maintien du muscle squelettique.

*P-Mφ* : Macrophages pro-inflammatoires ; *A-Mφ* : Macrophages anti-inflammatoires

## 2.4 L'angiogénèse et l'hypoxie durant la régénération musculaire

### 2.4.1 Le rôle des cellules endothéliales dans la myogénèse

Le muscle squelettique est l'un des tissus les plus vascularisés de l'organisme. Le rôle de cette microcirculation est d'apporter les différents substrats énergétiques aux fibres musculaires, afin de permettre leur contraction. C'est pourquoi on retrouve une grande quantité de capillaires en périphérie des fibres musculaires (entre 5 et 10 artéioles localisées entre 3 et 4 fibres adjacentes)<sup>263</sup>. Il est intéressant de noter que le nombre d'artéioles adjacentes aux fibres dépend du type de fibre. En effet, plus de capillaires sont associés aux fibres de type I qu'aux fibres de type II chez l'humain<sup>264,265</sup>. De plus, la microvascularisation permet d'apporter l'oxygène au muscle. La plasticité de cette vascularisation est mise en évidence dans différentes études démontrant une expansion des artéioles, présentes dans le muscle, suite à l'hypoxie ou l'exercice physique. cela permet un apport d'oxygène optimal, nécessaire au fonctionnement des fibres musculaires<sup>266,267</sup>. Sur un plan mécanistique, il a été

montré que cette plasticité était médiée par l'augmentation de VEGF, de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) et d'IL-8 au sein du muscle<sup>268-270</sup>.

En condition physiologique, les cellules endothéliales, composant les vaisseaux sanguins, sont juxtaposées aux SCs quiescentes. Ces cellules, ainsi que les cellules péri-endothéliales comme les cellules musculaires lisses et les cellules fibroblastiques, participent à la mise en place de la niche des SCs et maintiennent leur quiescence. Cette régulation se fait notamment par la production d'angopoiétine-1 (ang-1) et de DLL4 qui vont agir sur la voie Notch afin de garantir la quiescence des SCs (Figure 20)<sup>260,271,272</sup>.

Durant la régénération, la réparation des vaisseaux sanguins, dégradés par la blessure, est indispensable au bon déroulement du processus de régénération<sup>273</sup>. Ainsi, la formation des fibres musculaires et des capillaires se fait de façon concomitante après une blessure<sup>274</sup>. Les cellules endothéliales vont soutenir les différentes étapes de la myogénèse *via* la sécrétion de plusieurs facteurs tels que l'IGF-1, le HGF, le bFGF, le PDGF-BB, l'ang-1 et le VEGF<sup>275,276</sup>. Le VEGF joue un rôle essentiel dans les processus de myogénèse et d'angiogénèse durant le processus de régénération. En effet, la déplétion de cette protéine induit des altérations du nombre et de la densité des capillaires dans le muscle en condition physiologique<sup>277</sup>. Par ailleurs, le VEGF favorise la prolifération et la différenciation des cellules souches musculaires mais aussi l'hypertrophie des myotubes. Cette action se fait notamment *via* l'activation du facteur myogénique MyoD<sup>271,278</sup>. Ce facteur de croissance est sécrété, conjointement par les cellules endothéliales et les cellules myogéniques en différenciation, durant la régénération<sup>279</sup>. Il protège les myoblastes de l'apoptose durant les premières phases de régénération et il n'est donc pas étonnant de constater que le niveau de VEGF reste élevé durant toute la phase de régénération, pour revenir à un niveau basal 21 jours après la blessure lorsque les densités des myofibres et des capillaires sont revenues à la normale<sup>280</sup>. Les cellules endothéliales sécrètent également certaines cytokines, agissant sur la prolifération des myoblastes, comme l'IL-6, l'IL-8 et le TNF $\alpha$  (Figure 20)<sup>276</sup>. Durant la régénération, beaucoup de facteurs vont également favoriser l'angiogénèse, comme les angopoiétines 1 et 2, le FGF, le Nerve Growth Factor (NGF) et le CCL2 qui sont fortement exprimés durant les premières phases de la régénération<sup>281</sup>. Le FGF sécrété par les cellules myogéniques favorise l'angiogénèse. En effet, il a été mis en évidence que des injections de FGF-2 améliorent le processus de régénération associé à une augmentation du nombre de capillaires dans le muscle<sup>282,283</sup>. Le NGF participe également à l'angiogénèse en protégeant les cellules endothéliales de l'apoptose<sup>284</sup>. Par ailleurs, la  $\beta$ -caténine promeut la prolifération des cellules endothéliales, durant la régénération, *via* une augmentation de la sécrétion de VEGF par les cellules myogéniques<sup>285</sup>. Enfin, une étude récente a montré que les macrophages participent conjointement au

processus de myogénèse et d'angiogénèse *in vivo* et *in vitro*. Cette étude, réalisée au moyen de cultures 3D, met en évidence que la communication entre ces 3 types cellulaires se fait *via* 3 effecteurs : l'apelin (APLN), l'oncostatin M (OSM) et la periostine (POSTN). Par conséquent, le blocage de ces 3 effecteurs induit un défaut de régénération *in vivo*, associé à une altération du processus myogénique ainsi qu'une réduction de l'angiogénèse. Les macrophages anti-inflammatoires participent à cette communication principalement par la sécrétion d'oncostatin M qui stimule la myogénèse et l'angiogénèse<sup>286</sup>.

Ces différents travaux mettent en lumière le rôle primordial du processus angiogénique au cours de la régénération musculaire. Dans ce contexte, il n'est donc pas surprenant d'observer des dysfonctions de ce processus dans le cadre de myopathies. Par exemple, deux tiers des capillaires présents dans le muscle présentent des altérations phénotypiques chez des patients dystrophiques par rapport à des sujets sains<sup>287</sup>. Il a également été démontré que la présence de fibrose, chez les patients atteints de myopathies, conduit à une augmentation de la distance séparant les capillaires des fibres musculaires, diminuant leur approvisionnement en énergie et en oxygène<sup>288</sup>. On constate également une dérégulation de la sécrétion de plusieurs facteur pro-angiogéniques comme bFGF, CCL2, NGF et CxCL12 au cours de ces pathologies<sup>279,289</sup>. Par conséquent, les cellules endothéliales, provenant de souris *mdx*, présentent une altération de leurs propriétés angiogéniques, à savoir une diminution de leur capacité de migration, de prolifération, une augmentation de l'apoptose et une capacité réduite à favoriser la prolifération des myoblastes *in vitro*. Réciproquement, les myoblastes présentent une diminution de leur capacité à induire l'angiogénèse *in vitro*, corrélée avec une diminution de l'expression de HIF-1 $\alpha$  et VEGF<sup>290,291</sup>.

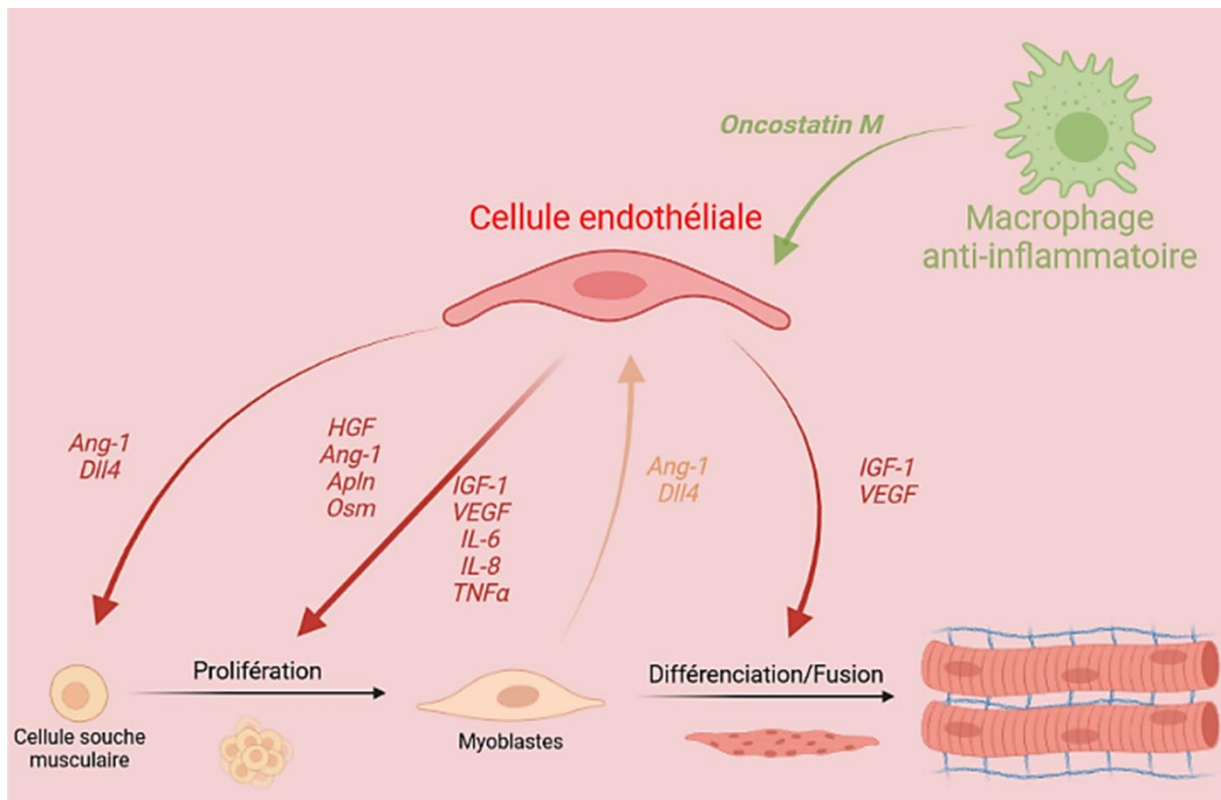


Figure 20 : Rôle des cellules endothéliales dans la régénération musculaire.

#### 2.4.2 L'hypoxie au sein du muscle blessé

En condition physiologique, l'hypoxie participe à l'adaptation à l'altitude et à l'exercice, mais aussi à la myogénèse durant le développement embryonnaire<sup>292,293</sup>. Durant une blessure musculaire, au-delà de l'activation des cellules endothéliales et des cellules péri-endothéliales, la dégradation des capillaires induit une hypoxie essentielle à l'activation des cellules souches musculaires. En effet, il a été mis en évidence qu'un environnement hypoxique stimule la prolifération de myoblastes primaires humains et murins, de même qu'au sein de la lignée C2C12<sup>294-296</sup>. Cette régulation par l'hypoxie se fait *via* l'érythropoïétine (EPO) qui active l'expression de MyoD et Myf5. Cette hormone permet le recrutement des cellules souches au niveau du site de blessure et induit leur prolifération<sup>297</sup>. L'expression de MyoD et de MyoG est également régulée par une autre protéine sensible à l'hypoxie : l'Hème Oxygénase 1 (HMOX1)<sup>298,299</sup>. La faible concentration en oxygène, au moment de la blessure musculaire, affecte également 2 voies de signalisation très importantes au sein des SCs : la voie NOTCH et la voie WNT<sup>300,301</sup>. L'hypoxie active la voie NOTCH, inhibant la différenciation myogénique et favorisant la prolifération des cellules souches. La voie WNT, quant à elle, stimule l'expansion des cellules souches tout en diminuant leur capacité de différenciation<sup>302,303</sup>. Le faible niveau d'oxygène active conjointement le cycle cellulaire en permettant l'inhibition de

CDKN1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) et RB (Retinoblastoma Protein). Précisément, CDKN1A régule le cycle cellulaire en bloquant le complexe cyclin / CDK et RB est nécessaire à établir un statut post-mitotique aux myofibres. L'inhibition de ces deux facteurs favorise la prolifération des myoblastes en inhibant leur capacité à se différencier<sup>304,305</sup>. Cette différenciation est également entravée en condition hypoxique par une inhibition de la voie I3K – AKT – mTOR1<sup>306</sup>. Il a été montré que les miRNA jouaient également un rôle dans ce contexte. L'expression de VEGF durant l'hypoxie active miR210 qui a pour fonction de protéger les myoblastes de l'apoptose durant les premières phases de la régénération musculaire<sup>307</sup>. Des régulations épigénétiques ont également été mises en lumière dans ce contexte. Plus précisément, une hypoxie induit une méthylation des histones H3K27, ce qui aura pour conséquence de réprimer la transcription de MyoG, bloquant ainsi la différenciation des myoblastes. Cette régulation est due à l'inactivation de l'histone demethylase KDM6A (Lysine-specific demethylase 6A) durant l'hypoxie<sup>308</sup>.

Enfin, l'hypoxie agit *via* le facteur HIF-1 $\alpha$ <sup>309</sup>. Ce facteur de transcription est sous le contrôle des Prolyl hydroxylase domain containing enzyme (PHD1, PHD2, PHD3), qui sont des senseurs naturels du niveau d'oxygène présent dans les cellules. En présence d'oxygène, ces enzymes ubiquitinylent HIF-1 $\alpha$ , menant à sa dégradation par le protéasome<sup>310</sup>. En condition d'hypoxie, la Heat Shock Protein 90 (HSP90) stabilise HIF-1 $\alpha$  et prévient sa dégradation, lui permettant de se transloquer dans le noyau, de former un hétérodimère avec sa sous-unité  $\beta$ . Ce complexe se lie aux Hypoxia-Response elements (HRE) et permet la transcription de ses gènes cibles tels que VEGF, EPO et HMOX1<sup>311,312</sup>. L'activation de HIF-1 $\alpha$  induit, de surcroît, l'expression de BHLHE40 (Class E basic helix-loop-helix protein 40) qui réprime la différenciation des cellules souches musculaires en inhibant la transcription de MyoG<sup>313</sup>. Cette action de HIF-1 $\alpha$ , sur le blocage de la différenciation des cellules myogéniques, a été mise en lumière par Yang et al. Ces auteurs démontrent que la délétion de *HIF-1 $\alpha$*  et *HIF-2 $\alpha$* , dans les SCs (Pax7<sup>Cre/+</sup>), réduit la capacité de ces cellules à retourner en quiescence, tout en augmentant leur capacité à se différencier<sup>314</sup>.

L'ensemble de ces données souligne le rôle majeur de l'hypoxie, engendrée par la blessure musculaire, sur l'activation et la prolifération des cellules souches musculaires. La faible disponibilité en oxygène, présente au sein du site de blessure (<1 % oxygène), permet de soutenir les premiers stades de la myogénèse tout en inhibant les phases de différenciation de ces cellules. Néanmoins, à des stades plus tardifs, la synthèse de nouveaux vaisseaux sanguins permet le retour à un niveau normal d'oxygène dans le muscle (entre 2 et 10% d'oxygène) et favorise la différenciation et la finalisation de la myogénèse. Cette hypoxie est donc bénéfique au processus global de régénération tant qu'elle est transitoire. Si celle-ci se

maintient, des effets délétères sont observés comme l'induction de l'apoptose au sein des myoblastes et des fibres nouvellement synthétisées<sup>309</sup>.

## **2.5 La communication entre les cellules immunitaires et les différents acteurs de la régénération musculaire**

En plus de leur activité de phagocytose, permettant l'élimination des débris engendrés par la blessure, les cellules immunitaires sécrètent de nombreuses cytokines et médiateurs qui sont essentiels à la communication inter-cellulaire lors de la régénération musculaire. Ces cytokines et médiateurs permettent d'orchestrer le processus de régénération pour que celui-ci soit optimal au niveau spacio-temporel.

### **2.5.1 Les cytokines favorisant la prolifération des cellules myogéniques**

Une cytokine très importante dans ce processus est l'IFN $\gamma$  qui apparaît 24 heures après la blessure et est concomitante avec l'apparition des neutrophiles et des macrophages sur le site de blessure. Cette cytokine régule directement le destin myogénique des SCs, en induisant leur activation *via* l'expression de MyoD. Précisément, l'IFN $\gamma$  active la voie CIITA (Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator) au sein des myoblastes, permettant l'expression de MyoD et la prolifération de ces cellules tout en inhibant la différenciation et l'expression de MyoG<sup>315,316</sup>. Il est important de noter que l'IFN $\gamma$  possède également une action autocrine sur les macrophages, garantissant un maintien de leur phénotype pro-inflammatoire (Figure 21)<sup>317</sup>.

Le TNF $\alpha$  est aussi une cytokine pro-inflammatoire agissant sur la prolifération des SCs. D'une part, cette cytokine active la voie NF- $\kappa$ B qui inhibe leur différenciation et augmente leur prolifération. Cette action se fait notamment *via* une augmentation de la cycline D1, impliquée dans le cycle cellulaire<sup>318,319</sup>. L'activation de la voie NF- $\kappa$ B, par le TNF $\alpha$ , induit une inhibition de p38, conduisant à une diminution de l'expression de la myogénine et de la formation des myotubes<sup>320</sup>. Une étude démontre que le TNF $\alpha$  favorise également la migration des myoblastes *in vitro* en agissant comme un chimioattractant<sup>321</sup>. Ce phénomène suggère que cette cytokine, sécrétée par les neutrophiles et les macrophages pro-inflammatoires, permet le recrutement des SCs au niveau du site de blessure durant les premières étapes de la régénération musculaire. Par ailleurs, le TNF $\alpha$  induit l'activation et la prolifération des SCs en inhibant l'expression de Pax7 et de NOTCH1<sup>145</sup>. Cette action épigénétique sur NOTCH1 permet de lever l'inhibition de ce facteur sur les gènes MyoD, MyoG et MEF2C et ainsi garantir l'activation des cellules (Figure 21)<sup>322</sup>.



L'IL-6 promeut, conjointement avec le  $\text{TNF}\alpha$ , la prolifération des myoblastes. En atteste les expériences menées sur des souris délétées pour cette cytokine qui présentent une diminution de l'infiltration des monocytes et macrophages au sein du muscle blessé. Ces modèles présentent également une perte de masse des myofibres associée à une augmentation de la fibrose au sein du tissu<sup>323</sup>. De plus, l'IL-6 stimule l'expression de Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) par les macrophages, impliqués dans la prolifération des myoblastes et dans la protection de ces cellules face à l'apoptose<sup>324,325</sup>. Bien que le mécanisme d'action ne soit pas connu, deux études montrent que l'IL-6 induit une diminution de l'expression de MyoG mais pas de MyoD ce qui maintient un état de prolifération au profit d'une induction de la différenciation et de la fusion des myoblastes<sup>326,327</sup>.

L'ADAMTS1 (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motif 1) est une metalloprotéinase, sécrétée par les macrophages pro-inflammatoires, dont l'activité est comparable à celle du  $\text{TNF}\alpha$ . Elle interagit avec NOTCH1 afin de réduire son action inhibitrice sur l'expression des gènes myogéniques MyoD, MyoG et MEF2C<sup>328</sup>.

Tout comme ADAMTS1, la Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) est une cytokine sécrétée par ces mêmes macrophages, agissant sur la prolifération des myoblastes *via* la voie de signalisation JAK2-STAT3<sup>329</sup>. LIF peut également être directement produit par les myoblastes en réponse à une stimulation par le  $\text{TNF}\alpha$ . Précisément, le  $\text{TNF}\alpha$  active la voie JNK1, conduisant à la production de LIF et le maintien de la prolifération de ces myoblastes par un effet autocrine<sup>330</sup>.

L'insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) est un facteur de croissance qui a un effet plus controversé. En effet, il est sécrété par une multitude de cellules dans le contexte de la régénération musculaire, que ce soit par les macrophages anti-inflammatoires, les cellules musculaires elles-mêmes ou encore les FAPs<sup>212,331,332</sup>. *In vitro*, cette hormone favorise la prolifération et la différenciation des myoblastes. *In vivo*, elle permet d'activer la prolifération des SCs et d'augmenter la masse des myofibres<sup>333,334</sup>. D'un point de vue moléculaire, l'IGF-1 agit directement sur le cycle cellulaire *via* une activation de la voie PI3K/Akt, mais aussi sur la voie des MAP kinases<sup>335,336</sup>. D'autres études ont, quant à elles, misent en évidence que cette protéine favorise la synthèse protéique au sein des myoblastes durant la différenciation. Cependant, il semblerait que cette action soit bloquée, durant les premières phases de la régénération musculaire, par la sécrétion de l'IL-1 $\beta$ . En effet, la cytokine IL-1 $\beta$  perturbe l'activation du récepteur de IGF-1 au niveau des myoblastes afin de les maintenir en prolifération durant les premiers jours post-blessure<sup>337</sup>. Enfin, ce facteur de croissance joue également un rôle dans la polarisation des macrophages pro-inflammatoires en macrophages

anti-inflammatoires. Ainsi, une délétion de cette hormone induit un défaut de régénération du muscle associé à un défaut de polarisation des macrophages<sup>212</sup>.

Outre les cytokines, les protéines chimioattractantes (ou chimiokines) ont également un rôle essentiel sur la myogénèse. Initialement décrite comme des protéines permettant le recrutement de différentes cellules immunitaires, il a été montré récemment qu'elles impactent directement le destin des cellules satellites. C'est le cas pour CCL2 (ou MCP-1) qui stimule la prolifération des myoblastes *in vitro* et *in vivo*. L'action de cette protéine se fait *via* la fixation à son récepteur CCR2 (C-C Chemokine Receptor type 2), présent sur les myoblastes en prolifération, qui induit la phosphorylation de MyoD *via* la voie MAPKp38 $\delta$ / $\gamma$ , tout en réprimant l'expression de MyoG. Il est intéressant de noter que ces cellules myogéniques, au moment de se différencier, vont réduire l'expression du récepteur CCR2 afin de bloquer cette stimulation de la prolifération et permettre les dernières étapes de la myogénèse. Cette diminution de CCR2 est altérée durant le vieillissement, aboutissant à des problèmes de différenciation et de fusion des myoblastes (Figure 21)<sup>338</sup>.

Des études font mention d'une fonction similaire des chimiokines CxCL1 et CxCL2. En effet, une étude a mis en évidence une capacité de ces chimiokines à inhiber la différenciation des C2C12 en culture, résultant en des fibres appauvries en noyaux. De surcroît, des expériences sur le rôle de CxCL1 *in vivo*, réalisées en injectant cette chimiokine intra-musculairement conjointement à la blessure musculaire, mettent en évidence une diminution de la taille des fibres régénérées chez ces souris par rapport aux souris contrôles 7 jours après blessure. De façon complémentaire, ils ont également montré que, en absence de blessure musculaire, l'injection de CxCL1 induit une augmentation de près de 50% du nombre de cellules souches dans le muscle. Ces données suggèrent une capacité de cette chimiokine à induire l'expansion de ces cellules tout en inhibant leur capacité à se différencier<sup>339</sup>. Une seconde étude publiée en 2018 détaille l'action de CxCL1 qui induit la prolifération des SCs *via* une inhibition de la voie NOTCH<sup>339</sup>.

Concernant l'implication de l'IL-12 dans ce processus, seule une étude de 2015 fait mention de son rôle dans la mise en place de la différenciation des myoblastes. En effet, la surexpression de l'IL-12 dans les lignées C2C12 favorise significativement leur différenciation. Un effet miroir est observé, à savoir, une diminution de leur capacité à former des myotubes lorsque l'expression du gène de cette interleukine est abolie<sup>340</sup>.

La prostaglandine E<sub>2</sub>, sécrétée par les macrophages pro-inflammatoires, est également une protéine cruciale pour le développement des myoblastes. Bien que le mécanisme d'action précis demeure non élucidé, il a été mis en évidence que la prostaglandine agit sur la prolifération des myoblastes *via* le récepteur EP4 (Prostaglandin E Receptor 4) et le facteur

NURR1 (Nuclear Receptor Related 1 protein). En témoigne ces expériences de délétion du récepteur EP4 qui supprime totalement l'effet de la prostaglandine sur les myoblastes *in vitro*. De plus, l'injection de prostaglandine E<sub>2</sub> stimule la régénération musculaire *in vivo*<sup>207</sup>.

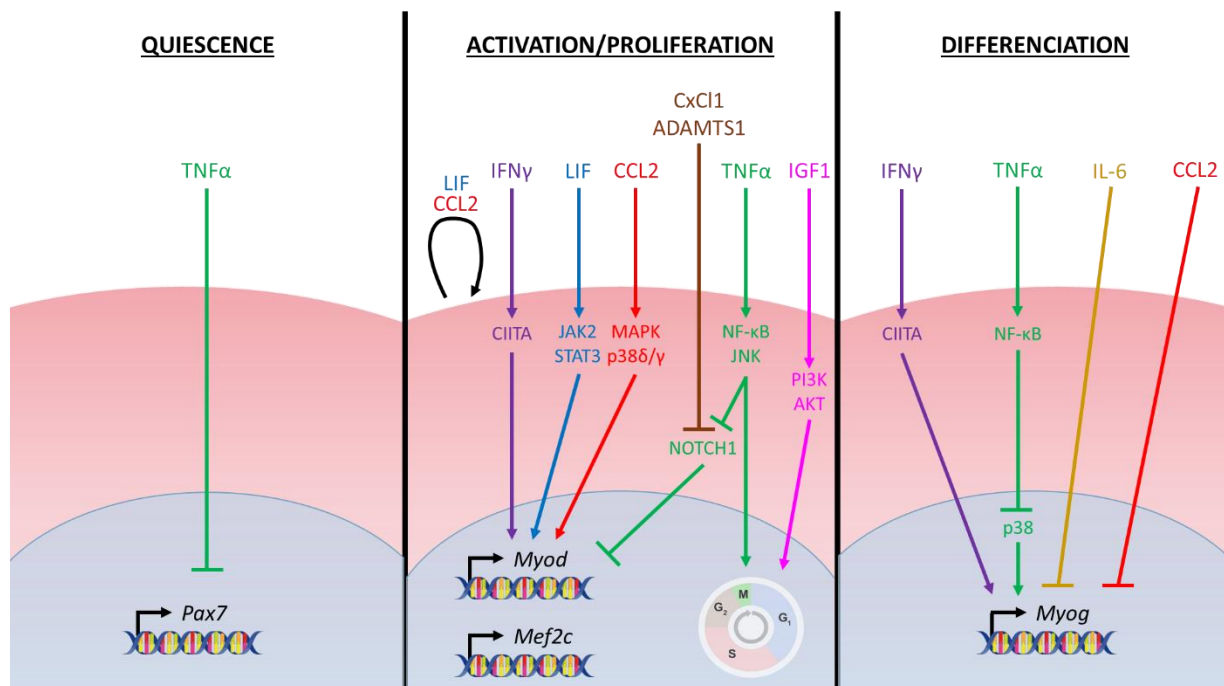


Figure 21 : rôle des cytokines pro-inflammatoires dans le destin myogénique.

### 2.5.2 Les cytokines et facteurs de croissance favorisant la différenciation et la fusion des myoblastes

L'IL-4 est un messager important du processus de régénération musculaire. Cette interleukine est exprimée par les éosinophiles et les macrophages anti-inflammatoires mais il est important de souligner que les cellules musculaires, elles-mêmes, sécrètent de l'IL-4 et expriment son récepteur<sup>173</sup>. Bien que cette cytokine soit sécrétée durant les stades précoces et tardifs de la régénération musculaire, son rôle au sein de la myogénèse a été décrit comme favorisant la différenciation, la fusion et la croissance des myoblastes<sup>341</sup>

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par les macrophages pro-résolutifs et les mTregs. Etant intégré à l'environnement anti-inflammatoire du muscle squelettique à partir du 4<sup>ème</sup> jour après la blessure, cette cytokine favorise la différenciation des myoblastes au profit de leur prolifération afin de former de nouvelles fibres<sup>210</sup>. Dans le même temps, cette cytokine contre-carre l'action des cytokines pro-inflammatoires, tels que le  $TNF\alpha$ , en prévenant la phosphorylation de la protéine JNK. Cette action a pour conséquence d'orienter les myoblastes vers une étape de différenciation et de croissance, au lieu de maintenir leur prolifération<sup>342</sup>. Cependant, les myoblastes ne sont pas les seules cibles de l'IL-10. En effet,

cette cytokine agit également sur les mésoangioblastes qui sont des cellules souches associées aux vaisseaux sanguins et qui participent à la régénération musculaire. En effet, les études de bosurgi et al. montrent que l'IL-10 stimule la différenciation de ces cellules vers un destin myogénique. Afin de démontrer ce rôle, cette équipe a transplanté des mésoangioblastes dans des souris délétées pour le récepteur à l'IL-10 (IL-10R) et mis en évidence que la délétion de ce récepteur réduit, de façon importante, la différenciation de ces cellules vers un profil myogénique lors de la régénération musculaire<sup>343</sup>.

Le TGF- $\beta$  est un facteur fortement impliqué dans le processus de régénération musculaire. Il a tout d'abord une action sur la prolifération des myoblastes en activant la voie SMAD3, qui interfère avec la protéine MyoD, et perturbe ainsi sa dimérisation et son action<sup>344</sup>. TGF- $\beta$  favorise également la dégradation de cette protéine au sein des myoblastes. De surcroît, ce facteur de croissance stimule la prolifération en augmentant le transport de la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) vers le noyau, permettant son activité au sein du cycle cellulaire<sup>345-347</sup>. Par ailleurs TGF- $\beta$  est considéré comme l'un des principaux facteurs favorisant la mise en place de la MEC. Cette particularité est due à sa capacité à induire l'expression des gènes relatifs à la production de la MEC tels que le collagène et la fibronectine. Cependant, le TGF- $\beta$  contrôle ce processus en stimulant l'expression des protéases dégradant cette matrice comme les matrix metalloproteinases (MMPs)<sup>348</sup>. La dérégulation de ce système pouvant entraîner une fibrose dans le muscle régénéré, il est hautement régulé par 2 cytokines : l'IGF-1 et l'IFN $\gamma$  qui inhibent la signalisation du TGF- $\beta$  dans les fibroblastes<sup>349,350</sup>.

Le facteur de croissance GDF3, qui fait partie de la famille des TGF, stimule la différenciation et la fusion des myoblastes. Bien que son mécanisme d'action demeure inconnu, une étude montre que GDF3 favorise *in vitro* les dernières étapes de la myogénèse<sup>219</sup>.

Enfin, l'amphiréguline (AREG) est un facteur de croissance de la famille des facteurs de croissance épithéliaux (EGF)<sup>351</sup>. Ce facteur est exprimé par les mTregs entre 4 et 7 jours après la blessure<sup>232</sup>. L'AREG favorise la différenciation des myoblastes *in vitro* et *in vivo* par l'activation de son récepteur : le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du destin myogénique par l'AREG ne sont, à ce jour, pas encore élucidés.

En plus des médiateurs qui viennent d'être décrits, il a également été montré que les macrophages pouvaient communiquer de façon directe avec les cellules souches musculaires. Ce contact prévient l'apoptose des cellules souches *via* des molécules d'adhésion telles que

ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) et PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule-1)<sup>352</sup>.

### 3. L'HORLOGE CIRCADIENTE

Notre organisme est soumis à des variations rythmes cycliques liés à la disposition de notre système solaire. Les rythmes circadiens sont des cycles biochimiques, physiologiques et comportementaux qui oscillent sur une période d'environ 24 heures pour s'aligner sur le cycle lumière/obscurité dû à la rotation de la terre autour de son axe. Ces rythmes endogènes sont générés par l'horloge biologique qui est un système ancestral présent dans tous les organismes, des cyanobactéries à l'homme, leur permettant d'anticiper des changements environnementaux prévisibles tels que l'alternance jour/nuit<sup>353–355</sup>. Cette horloge coordonne l'apport alimentaire et leur dégradation, la régulation de la température corporelle, la sécrétion hormonale et de nombreux autres processus physiologiques, avec une périodicité de « environ un jour » (en latin « Circa », autour ; « Diem », jour). En effet, les processus physiologiques sont régulés temporellement par le rythme circadien à tous les niveaux, de l'organisme entier aux cellules individuelles. L'une des caractéristiques majeures de cette horloge circadienne est que son activité est endogène ce qui permet de maintenir un rythme circadien en l'absence de repères temporels externes tel que l'alternance jour/nuit. Cette découverte a d'ailleurs été mise en évidence au début des années 60 par les expériences « hors du temps » du spéléologue Michel Siffre (1962) et de Nathaniel Kleitman (1959). Ces expériences ainsi que d'autres études ont ainsi permis de mettre en évidence que la durée intrinsèque de l'horloge circadienne n'était pas de 24 heures précisément. En effet, chez l'homme, le rythme intrinsèque de l'horloge biologique est estimé à 24 heures et 11 minutes<sup>356</sup>. Par conséquent, l'horloge doit être entraînée quotidiennement par des facteurs externes pour s'ajuster à 24 heures. Chez les mammifères, le principal indicateur de temps environnemental est la lumière détectée par les cellules ganglionnaires de la rétine contenant de la mélanopsine. L'information lumineuse est alors transférée à l'horloge centrale, située dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus. Cette structure, d'environ 20000 neurones, est le siège de la synchronisation globale de notre organisme. Cette horloge centrale synchronise à son tour les horloges périphériques de l'organisme *via* le système nerveux sympathique et parasympathique mais aussi *via* des signaux hormonaux tels que la corticostérone et la mélatonine.

Il est intéressant de noter que la synchronisation de l'horloge centrale par la lumière est plus complexe qu'il n'y paraît. En effet, cette synchronisation se fait sous plusieurs conditions. Tout

d'abord l'influence de la lumière sur l'horloge dépend principalement de l'intensité lumineuse ainsi que de la durée d'exposition<sup>357</sup>. De façon étonnante, il suffit de quelques secondes d'exposition à la lumière et d'une intensité lumineuse ne dépassant pas les quelques lux pour influencer des paramètres corporels contrôlés par l'horloge biologique tels que la sécrétion de mélatonine, la fréquence cardiaque ou la température corporelle chez l'Homme<sup>358</sup>. La nature de l'excitation lumineuse a également son importance dans cette synchronisation et dépend notamment du spectre de cette lumière. Des études effectuées au début des années 2000 montrent qu'une lumière monochromatique bleue (ayant une longueur d'onde de 480nm) a un effet maximal sur la synchronisation de l'horloge. Il est montré que cette caractéristique est dû aux cellules rétinienne ganglionnaires à mélanopsine, particulièrement sensibles à cette longueur d'onde<sup>359,360</sup>.

Enfin, l'heure à laquelle l'organisme est soumis à une exposition lumineuse a également son importance. Elle aura pour effet, soit de retarder l'horloge circadienne (exposition lumineuse entre 17h et 5h), soit d'avancer cette dernière (exposition lumineuse entre 5h et 17h)<sup>361</sup>. De plus, d'autres facteurs tels que l'activité physique et la prise alimentaire sont également des signaux de synchronisation puissants pour les horloges périphériques. Ils permettent un stockage et une dépense d'énergie optimaux. Ainsi, l'ensemble de ces régulations permet chaque jour à l'organisme d'anticiper au mieux la majorité des processus physiologiques indispensables à son bon fonctionnement.

La composante moléculaire de cette horloge a été mise en évidence pour la première fois en 1971. Cette étude portant sur la drosophile a montré que des mutations portées par un même gène engendraient une perte de rythmicité locomotrice de ces drosophiles mutées. Ces travaux sont repris quelques années plus tard par Michael Rosbash, Michael Young et Jeff Hall, désireux de séquencer ce gène et d'étudier le rôle de cette protéine. Ils démontrent que ce gène transcrit la protéine période (PER) dont la concentration cytoplasmique subit des variations diurnales (concentration nocturne plus élevée que durant la journée)<sup>362</sup>. Ce n'est qu'en 1994 qu'un second acteur de l'horloge biologique est découvert avec la protéine Timeless (TIM)<sup>363</sup>. Cette découverte décrit une boucle d'autorégulation transcriptionnelle par ces deux protéines. Depuis, le mécanisme moléculaire de l'horloge circadienne a été approfondi et étendu à la plupart des organismes vivants.

### **3.1 Composition de l'horloge circadienne**

Chez les mammifères, l'horloge biologique est composée de 2 boucles d'autorégulation transcriptionnelle avec, en son centre, l'hétérodimère de facteur de transcription composé de BMAL1 (Brain and Muscle Arnt-like protein-1) et CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles

Protein Kaput). Cet hétérodimère va se fixer sur le promoteur de ses gènes d'intérêt grâce aux séquences « E-box ». Cela va initier la transcription des gènes *Per* et *Cry* (Cryptochrome). Une fois traduites, ces protéines vont s'associer et être transloquées dans le noyau pour inhiber l'activité transcriptionnelle de *Bmal1* et *Clock*. Cette inhibition est régulée par la phosphorylation de PER et CRY par l'AMPK et CKIε (Casein Kinase Iε), amenant à leur dégradation dans le noyau. Rev-erba (Reverse Strand of ERBa) et RORα (Retinoid-related Orphan Receptor α) composent la deuxième boucle de régulation de l'horloge circadienne. En effet, ces deux récepteurs nucléaires sont des cibles transcriptionnelles de BMAL1 et vont respectivement réprimer et activer sa transcription (Figure 22).

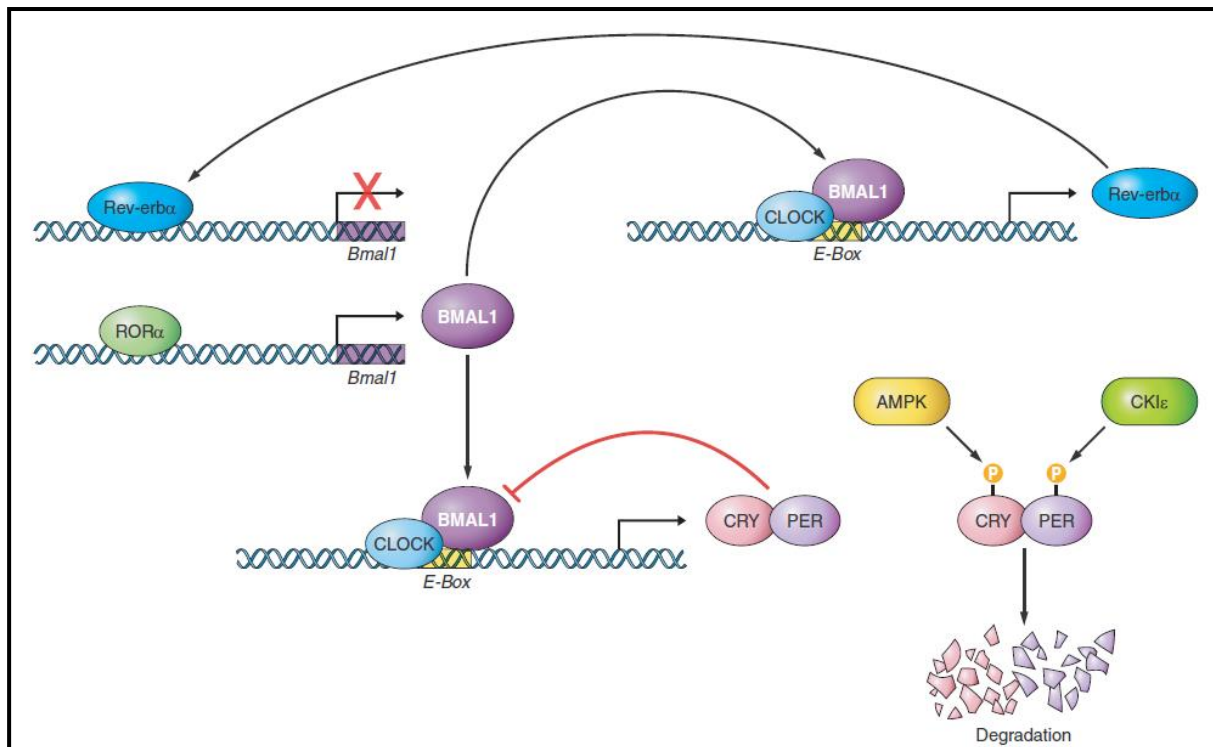


Figure 22 : Boucles de régulation de l'horloge circadienne<sup>364</sup>.

L'alternance d'expression et d'activité de ces différents facteurs permet d'imposer à toutes les cellules une rythmicité au cours de la journée. Celle-ci s'explique par le fait que les différents acteurs de l'horloge régulent le transcriptôme des différents tissus de notre organisme (entre 3 et 16% selon les organes)<sup>365</sup>.

Des études récentes ont mis en évidence que l'instauration d'un rythme n'est pas uniquement dû à une régulation transcriptomique des différents acteurs de l'horloge puisque l'acétylôme, le protéôme, le phosphoprotéome ainsi que le métabolôme sont également soumis à des variations circadiennes<sup>366,367</sup>. L'ensemble de ces données démontre la robustesse et l'importance de ce système au sein des organismes vivants.

## 3.2 Les récepteurs nucléaires Rev-erba et RORα

### 3.2.1 Les récepteurs nucléaires

#### 3.2.1.1 Structure d'un récepteur nucléaire (RN)

Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription dont l'activité est inducible par un ligand. Ces ligands sont généralement des hormones stéroïdiennes tels que l'œstrogène ou la progestérone, mais peuvent également être des lipides solubles comme l'acide rétinoïque ou les oxystérols<sup>368</sup>. La grande majorité des RNs présentent une organisation commune comprenant 5 domaines distincts (Figure 23). Le premier domaine est nommé A/B et est situé en position N-terminale. Cette fraction est variable en taille et en séquence selon les différents récepteurs nucléaires. Ce domaine contient notamment la région AF-1 (Activation Function 1) qui communique avec des protéines co-régulatrices de façon indépendante du ligand<sup>369</sup>. De par la richesse de ses co-régulateurs et de sa localisation dans des types cellulaires spécifiques, ce domaine permet également d'adapter l'activité du récepteur nucléaire en fonction des besoins de la cellule ou du tissu.

La seconde zone est le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD) qui présente une structure très conservée parmi les RNs. En effet, celle-ci présente deux motifs en doigt de zinc dont la structure est stabilisée par la présence de 8 cystéines permettant la capture de 2 ions de zinc<sup>370</sup>. Grâce à la conformation de ces deux hélices, une structure dite tertiaire, composée d'hélices alpha, est observée. Ces hélices sont responsables de l'interaction du récepteur avec le grand sillon de l'ADN. Ce domaine à l'ADN comporte également une sous-région appelée boîte distale (D-box) qui permet la dimérisation du récepteur<sup>371</sup>.

Le domaine D (appelé également région charnière) est la région qui permet de connecter le domaine de liaison à l'ADN à celui du domaine de liaison au ligand. Il permet également la fixation de certains co-répresseurs tels que N-Cor (Nuclear Receptor CoRepressor) et confère une certaine flexibilité au récepteur pour faciliter sa fixation aux éléments de réponse<sup>372,373</sup>.

Le domaine E est le domaine de liaison au ligand ou (Ligand Binding Domain ou LBD). Ce domaine de grande taille présente une structure très conservée parmi les récepteurs nucléaires. Cette structure, comportant 11 hélices  $\alpha$  et 4 feuillets  $\beta$ , permet la formation d'une poche hydrophobe favorisant la fixation des différents ligands<sup>374</sup>. La 12<sup>ème</sup> hélice compose le deuxième domaine d'activation (AF-2) qui est dépendant du ligand. En effet, la fixation du



ligand à ce domaine engendre un repliement de l'hélice, offrant l'espace nécessaire au recrutement des co-activateurs. A l'inverse, la fixation d'un antagoniste du récepteur inhibe ce repliement, empêchant donc le recrutement des co-activateurs<sup>375</sup>.

Enfin, le domaine F, situé dans la zone C-terminale de la protéine, est la section la plus variable de la structure des récepteurs nucléaires et certains récepteurs en sont dépourvus. La fonction de ce domaine demeure encore aujourd'hui obscure mais certaines études ont mis en lumière un rôle de régulateur de l'activité transcriptionnelle pour les récepteurs Er $\alpha$  (Estrogen Receptor  $\alpha$ ) ou encore HNF-4 $\alpha$  (Hepatocyte Nuclear Factor 4)<sup>376,377</sup>.



Figure 23 : Structure d'un récepteur nucléaire (adapté de Grimaldi et al. 2015)<sup>378</sup>.

### 3.2.1.2 Classification et mécanisme d'action

Les différents RNs sont divisés en 4 groupes selon leur mécanisme d'action. Le premier groupe de RN contenant, par exemple, le récepteur aux stéroïdes est présent dans le cytoplasme à l'état inactif par une protéine chaperonne. Lorsque ce dernier se lie à son ligand, la protéine chaperonne facilite la translocation du RN dans le noyau afin de lui permettre d'assurer son action transcriptionnelle en se liant en homodimère au niveau des éléments de réponse des promoteurs<sup>379,380</sup>. Les RN de type 2 sont, quant à eux, directement localisés dans le noyau mais, en absence de ligand, sont maintenus inactifs *via* la fixation de co-répresseurs. Après fixation du ligand, ces co-répresseurs sont remplacés par des co-activateurs permettant la formation d'un hétérodimère du RN avec RXR (Retinoid X Receptor) afin de promouvoir la transcription de ses gènes cibles<sup>381</sup>. Les récepteurs de type 3 et 4 présentent un mécanisme d'action similaire au type 2 à l'exception qu'ils se fixent respectivement en homodimère ou en monomère aux éléments de réponse des promoteurs (Figure 24)<sup>382</sup>.

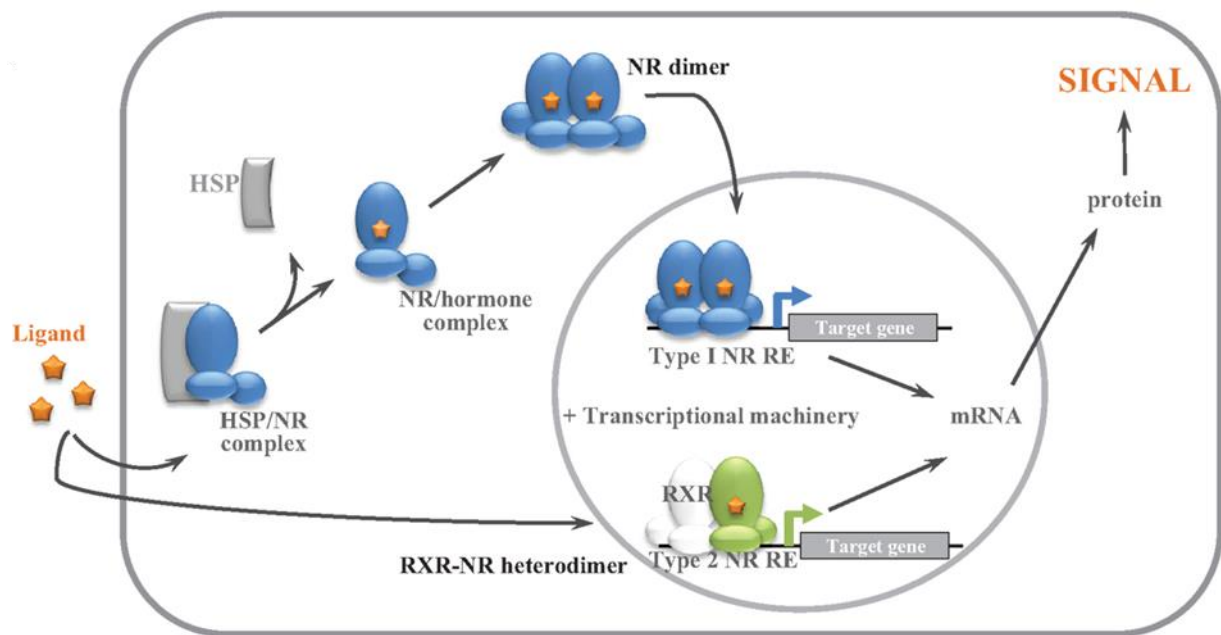


Figure 24 : Mode d'action des différents récepteurs nucléaires.

Selon le récepteur nucléaire, son activité sur la transcription de ses gènes cibles sera soit activatrice soit inhibitrice et se liera soit à des co-répresseurs soit à des co-activateurs de natures différentes.

Les co-répresseurs peuvent être dissociés en 2 classes. Il existe des co-répresseurs qui répriment l'activité transcriptionnelle des RNs en absence de ligand comme c'est le cas pour les RNs de classe 2, 3 et 4. Ces répresseurs sont les protéines NCoR et SMRT (Silencer Mediator of Retinoid and Thyroid Receptors). Lors de l'activation des RN par leur ligand, ces protéines sont remplacées par des co-activateurs<sup>373</sup>. La seconde classe de co-répresseurs concerne des protéines dépendantes d'une activation par un ligand tels que LcoR (Ligand dependant nuclear receptor CoRepressor), RIP140 (Receptor Interacting Protein 140) ou encore TIF-1 (Transcription Intermediary Factor 1)<sup>383</sup>. Certains cofacteurs s'associent à ces protéines comme HDAC (Histone Déacétylase) dont la fonction est de compacter la chromatine par déacétylation des histones afin de réprimer la transcription des gènes cibles.

A l'inverse, les co-activateurs interagissent avec les RNs afin d'induire la transcription de leurs gènes cibles. Après la fixation du ligand, un complexe activateur est formé *via* la fixation d'enzymes modifiant la chromatine tels que l'histone acetyl-transferase (HAT) ou l'histone methyl-transferase (HMT). Ces enzymes permettent la modification des histones, l'ouverture de la chromatine et le recrutement de la machinerie de transcription comme l'ARN polymérase ||<sup>384,385</sup>.

### 3.2.2 Le récepteur nucléaire ROR $\alpha$

#### 3.2.2.1 Isoformes et ligands des RORs

Le RN ROR est présent dans l'organisme sous 3 isoformes : ROR $\alpha$  (NR1F1), ROR $\beta$  (NR1F2) ou ROR $\gamma$  (NR1F3)<sup>386</sup>. Les récepteurs RORs présentent une structure classique contenant un domaine N-terminal, un DBD, un LBD et une région charnière<sup>387</sup>. Les différentes isoformes de ROR résultent d'un épissage alternatif<sup>388,389</sup>. Concernant ROR $\alpha$ , 4 isoformes différentes ont été identifiées chez l'humain et 2 chez la souris. Ces isoformes sont exprimées par différents types cellulaires et contrôlent l'expression de différents gènes. Les RORs se fixent en monomère sur les régions promotrices au niveau d'un site RevRE (RGGTCA) précédé d'une séquence riche en A et T<sup>390</sup>. Le domaine de liaison à l'ADN est par ailleurs fortement conservé entre les différentes isoformes de ROR puisqu'il présente environ 90% d'homologie entre ROR $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>387</sup>. Les ligands naturels des RORs sont le cholestérol, les sulfates d cholestérol et les oxystérols. Ils se fixent au niveau du LBD pour stimuler l'action des RORs sur leurs gènes cibles<sup>391,392</sup>. A l'heure actuelle, il existe peu de données sur des modifications post-traductionnelles de ROR. On sait toutefois que PKA (Protéine Kinase A) et ERK2 peuvent phosphoryler l'isoforme ROR $\alpha$ 4 afin de réguler son activité transcriptionnelle<sup>393,394</sup>. Il a également été montré que la sumoylation de ROR $\alpha$  augmente son activité<sup>395</sup>.

#### 3.2.2.2 ROR $\alpha$ , régulateur métabolique

Le rôle métabolique de ROR $\alpha$  a été démontré dans de nombreux contextes physiopathologiques. Les mutations dans le gène *Rora* chez l'humain sont associées au développement de l'obésité, du diabète de type 2 et des maladies hépatiques comme la NASH (Non-Alcoholic SteatoHepatitis)<sup>396–398</sup>. En outre, de nombreuses études mettent en lumière un rôle de ROR $\alpha$  sur la régulation du métabolisme des lipides, notamment *via* une régulation de l'apolipoprotéine C-III chez l'humain et chez la souris<sup>399</sup>. Il a également été montré *in vivo* chez la souris que la néoglucogénèse hépatique, intervenant en réponse à un jeûne, est sous le contrôle de ce récepteur qui régule l'expression de l'enzyme glucose-6-phosphatase (G6Pase)<sup>400</sup>. ROR $\alpha$  est également impliqué dans le métabolisme du cholestérol notamment en activant la transcription de l'apolipoprotéine A-I, un composant majeur des HDL (High Density Lipoprotein), particule permettant le transport du cholestérol de la périphérie jusqu'au foie (Figure 25). Dans un contexte similaire, la délétion spécifique de *ROR $\alpha$*  dans les hépatocytes dérégule la voie PPAR $\gamma$  et conduit à une augmentation du métabolisme des lipides ainsi qu'une augmentation du taux de glucose hépatique en réponse à un régime riche en graisses, menant à une stéatose hépatique, une obésité et une insulino-résistance des

souris délétés pour ROR $\alpha$ <sup>401</sup>. Par ailleurs, le développement de la stéatose hépatique sévère chez ces souris pourrait être attribué à une dysfonction mitochondriale<sup>402</sup>. De plus, des études montrent que ROR $\alpha$  régule les niveaux intra-cellulaires de cholestérol, diminuant ainsi les concentrations plasmatiques ce qui aurait un effet bénéfique sur le développement de maladies cardiovasculaires<sup>403,404</sup>.

D'autres travaux ont décrit un rôle métabolique de ROR $\alpha$  dans un modèle controversé. En effet, une mutation naturelle du gène ROR $\alpha$  a été identifiée en 1962 chez la souris faisant état de dysfonctions neurologiques importantes. Ces souris, appelées souris *Staggerer*, présentent une ataxie sévère associée à des problèmes moteurs ainsi que des tremblements intenses. Quelques années plus tard, une équipe a démontré que ce phénotype résulte d'une mutation naturelle du gène *Rora* au niveau du LBD, générant une protéine tronquée<sup>405,406</sup>. Outre l'implication de ROR $\alpha$  au niveau du développement neuronal, ce modèle a également été l'objet de nombreuses études métaboliques. Mamontova et al. ont mis en évidence une altération du métabolisme des lipides chez ces souris, caractérisée par une diminution des concentrations plasmatiques de HDL qui favorise le développement de l'athérosclérose suite à un régime riche en cholestérol<sup>407</sup>. Par ailleurs, ces souris présentent également une augmentation de la thermogénèse au sein du tissu adipeux brun. Les résultats de cette étude ont depuis, été consolidés par d'autres travaux qui démontrent une régulation directe de ROR $\alpha$  sur la transcription de gènes impliqués dans le processus de thermogénèse comme *Ucp1*, *Pgc-1 $\alpha$*  ou encore *Ppara* dans le tissu adipeux blanc inguinal et périgonadal (Figure 25)<sup>408,409</sup>. Cependant, les données obtenues sur les souris *staggerer* nécessiteraient d'être confirmées au vu du phénotype particulier de ces souris et des conséquences métaboliques indirectes que ce modèle pourrait avoir dans les contextes étudiés.

### 3.2.2.3 ROR $\alpha$ , un régulateur immunitaire

Les premières études démontrant une régulation de ROR $\alpha$  sur des composants de l'inflammation ont également été réalisées sur des souris *staggerer*. Ces souris présentent un développement limité du thymus, une diminution de la masse de la rate ainsi qu'un gonflement des ganglions lymphatiques<sup>410</sup>. Un retard dans la génération des lymphocytes T suppresseurs après un challenge ainsi qu'une sensibilité accrue au LPS est également observé chez ces souris. Cette sensibilité se traduit par une augmentation de l'activation des macrophages associée à une production plus importante des cytokines IL-1 et TNF $\alpha$ <sup>411</sup>. Une comparaison de ce modèle à des souris déplétées en lymphocytes B et T (Rag-2<sup>-/-</sup>) a permis de démontrer que ce RN est indirectement lié au développement des lymphocytes B et T et à leur capacité à produire certaines cytokines comme l'IFN $\gamma$  (Figure 25)<sup>412</sup>. ROR $\alpha$  a également un rôle important

dans les poumons où il régule la réponse  $T_H2$  mais également l'infiltration de neutrophiles, d'éosinophiles ou encore de lymphocytes au niveau des bronches<sup>413</sup>. Ce récepteur agit également sur les cellules myéloïdes et notamment les monocytes en réponse à une infection virale où il inhibe la voie NF- $\kappa$ B afin de contrôler la réponse immunitaire de ces cellules face à l'infection<sup>414</sup>. Enfin, ROR agit sur la capacité des cellules endothéliales intestinales à détecter les différents pathogènes *via* la régulation des récepteurs NOD2 (Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2) et Toll-like receptor<sup>415</sup>.

Les différentes isoformes de ROR sont également impliqués dans le développement de certaines populations immunitaires. En effet, ROR $\alpha$  est indispensable au développement des ILC2 chez la souris<sup>416</sup>. Les isoformes ROR $\alpha$  et ROR $\gamma$  sont au centre de la différenciation des lymphocytes  $T_H17$ . ROR $\alpha$  régule également les lymphocytes helper folliculaires et est impliqué dans la survie de certains lymphocytes B mémoires<sup>417,418,419</sup>.

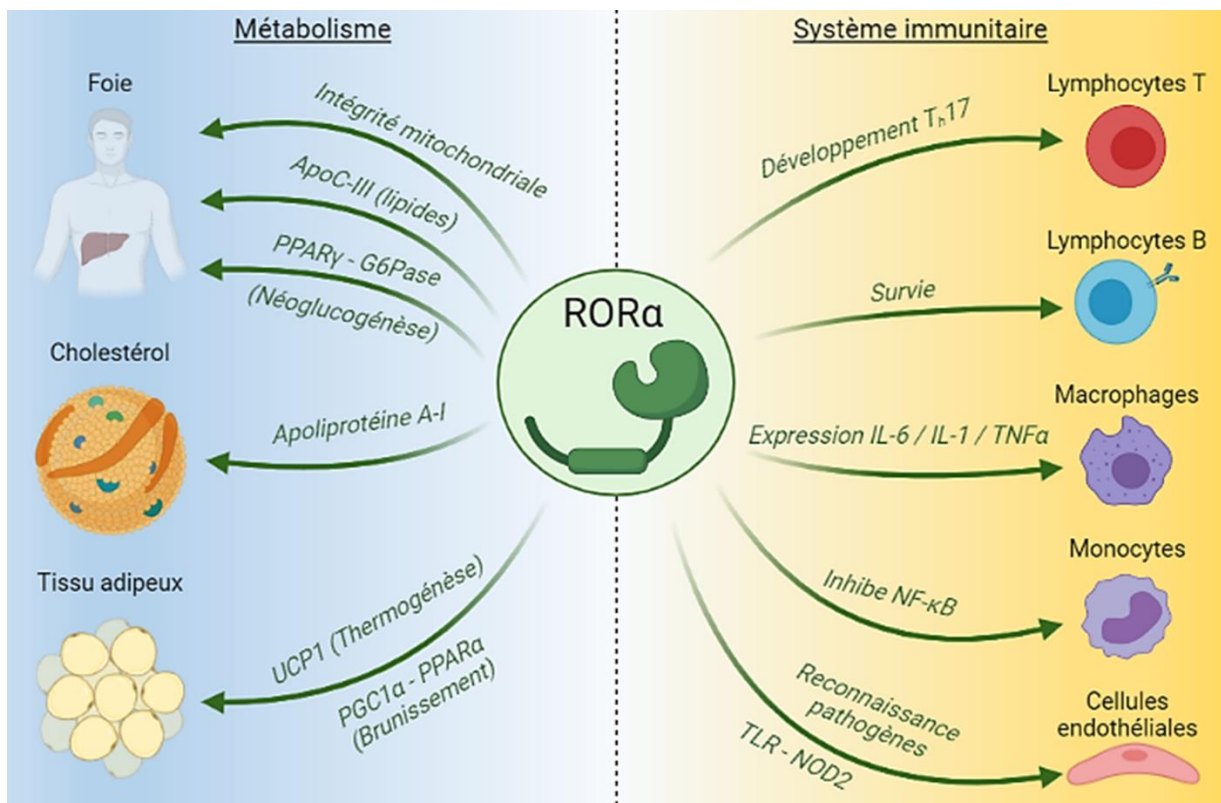


Figure 25 : Rôle de ROR $\alpha$  dans le métabolisme et l'immunité.

### 3.2.3 Le récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$

#### 3.2.3.1 Structure et particularités de Rev-erb $\alpha$

Le récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  ou nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1 (NR1D1) a été découvert en 1989 par l'équipe de Mitchell Lazar<sup>420</sup>. La particularité de Rev-erb $\alpha$  est d'être un répresseur de la transcription. En effet, ce RN ne possède pas d'hélice 12 au niveau de son LBD correspondant à la section AF2 sur un RN classique. Cette particularité l'empêche de recruter des co-activateurs et n'est donc pas en capacité d'induire la transcription de ses gènes cibles. Rev-erb $\alpha$  fixe uniquement des co-répresseurs, tels que NCoR, RIP ou HDAC3, qui induisent une densification de la chromatine, empêchant ainsi l'accès du complexe de transcription<sup>421</sup>. Rev-erb $\alpha$  est également capable de se fixer au promoteur de ses gènes cibles en monomère ou en homodimère à la condition que les deux séquences RevRE soient espacées de 2 nucléotides et qu'une région riche en A/T soit à proximité<sup>422</sup>.

De manière intéressante, ce récepteur est capable d'assurer son activité transcriptionnelle de façon indirecte sans interagir directement avec les séquences d'ADN. En effet, des travaux récents ont montré que Rev-erb $\alpha$  peut se lier à d'autres facteurs de transcription tels que HNF6 dans le foie ou NF-Y (Nuclear Factor-Ya) dans le muscle afin de réprimer l'expression des gènes<sup>423,424</sup>. Il est également capable d'assurer une fonction non transcriptionnelle en interagissant avec d'autres partenaires comme l'OGT (O-GlcNac Transferase)<sup>425</sup>.

Longtemps considéré comme un récepteur nucléaire orphelin (dépourvu de ligand naturel pouvant moduler son activité), il a finalement été découvert que l'activité de Rev-erb $\alpha$  était sensible à la présence de l'hème<sup>426</sup>. D'abord identifié chez la drosophile, cette interaction entre l'hème et les Rev-erbs ( $\alpha$  et  $\beta$ ), permet la stabilisation de leur structure protéique et l'augmentation du recrutement de NCoR<sup>427</sup>. L'hème est composé d'un ion Fer capable de lier une molécule de monoxyde d'azote ou de monoxyde de carbone qui diminue la fixation et l'activité des co-répresseurs NCoR et RIP140<sup>428</sup>. Une étude élégante a par ailleurs montré que ce mécanisme est responsable de l'expression de VCAM1 dans les cellules endothéliales, favorisant ainsi leur migration<sup>429</sup>.

Plusieurs laboratoires ont mis au point des ligands synthétiques de ce RN tels que le GSK4112 ou le SR9009, capable d'augmenter l'activité répressive des Rev-erbs ( $\alpha$  et  $\beta$ ). Ces ligands ont été utilisés dans de nombreuses études portant sur les adipocytes, les hépatocytes ou le muscle. L'utilisation de cet agoniste permet d'augmenter la biogenèse mitochondriale, la capacité oxydative du muscle ainsi que l'endurance des souris traitées<sup>430-433</sup>. Cependant, des effets de l'agoniste SR9009 indépendants de l'action des Rev-erbs ont été mis en évidence. En

effet l'utilisation d'un modèle murin déficient pour les récepteurs *Rev-erb*  $\alpha$  et  $\beta$  a démontré un effet du SR9009 sur la prolifération et le métabolisme de différents types cellulaires, mettant en évidence les limites de l'utilisation de ce ligand synthétique<sup>434</sup>. A l'inverse, le SR8278 et le GSK1362 sont des antagonistes des Rev-erbs et altèrent l'interaction entre le LBD des récepteurs et les co-répresseurs NCOR1 et SMRT2 (Nuclear Receptor Co-repressor 2). Ces antagonistes ont notamment été utilisés dans des études ciblées sur les macrophages et les cellules épithéliales<sup>435</sup>.

### 3.2.3.2 La régulation du métabolisme par Rev-erb $\alpha$

Rev-erb $\alpha$  joue un rôle majeur dans la régulation métabolique de nombreux organes comme le pancréas, le foie, le tissu adipeux ou le muscle squelettique<sup>436</sup>.

Dans le pancréas, l'expression de Rev-erb $\alpha$  est régulée par la concentration de glucose. Cette régulation métabolique est assurée par la voie AMPK/SIRT1. Dans ce contexte, Rev-erb $\alpha$  induit la sécrétion du glucagon par les cellules  $\alpha$  pancréatiques<sup>437</sup>. Dans le foie, ce RN a été décrit comme un régulateur essentiel du métabolisme des lipides et des lipoprotéines. En effet, Rev-erb $\alpha$  réprime la transcription de gènes impliqués dans la lipogénèse tels que *Fasn* (Fatty Acid Synthase) et *Acaca* (Acetyl-CoA Carboxylase Alpha) en régulant notamment la voie Srebp1c (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins)<sup>438</sup>. De plus, Rev-erb $\alpha$  est impliqué dans la synthèse et la dégradation du cholestérol dans le foie. Il réprime directement ou indirectement l'expression d'enzymes clés de la synthèse du cholestérol comme HMGCR (Hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase), MVD (Mevalonate Diphosphate Decarboxylase) et HMGCoA<sup>439</sup>. Cependant, il favorise également sa dégradation en permettant l'expression de l'enzyme Cyp7A1, responsable de la synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol, en levant l'inhibition des facteurs SHP (Small Heterodimer Partner), LRH-1 (Liver Receptor Homolog 1) et NFIL3 (Nuclear Factor Interleukin 3 Regulated)<sup>440,441</sup>. De façon intéressante, Rev-erb $\alpha$  joue également un rôle dans le métabolisme des lipoprotéines, comme ROR $\alpha$ , mais son action est ciblée sur les lipoprotéines riches en triglycérides (VLDL). Rev-erb $\alpha$  inhibe l'expression du gène de l'ApoC III, enzyme inhibant le catabolisme des VLDL (Figure 26)<sup>442</sup>. Rev-erb $\alpha$  agit également sur la synthèse du glucose *de novo* dans le foie. Dans les cellules HepG2, l'activation de Rev-erb $\alpha$  par l'hème amplifie la répression de gènes relatifs à la gluconéogénèse tels que PEPCK (PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase) et G6Pase<sup>443</sup>.

Au sein des adipocytes, Rev-erb $\alpha$  joue également un rôle important. Des études ont montré qu'il participe à la différenciation adipocytaire. Précisément, sa surexpression mène à une augmentation du stockage des lipides couplé à une augmentation de marqueurs de

l'adipogénèse comme PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  et FABP4 (Fatty Acid-Binding Protein 4) dans des lignées adipocytaires *in vitro*<sup>444</sup>. Depuis, d'autres études ont affiné cette observation et montrent que Rev-erb $\alpha$  joue un rôle dans la différenciation précoce des adipocytes mais qu'il est ensuite dégradé pour assurer une différenciation complète (Figure 26). Cette dégradation est due à l'augmentation du taux d'hème dans ces adipocytes<sup>432,445</sup>. Récemment, un modèle de délétion de *Rev-erba* spécifiquement dans les adipocytes montre que ce récepteur joue un rôle crucial dans la protection de ce tissu face aux désordres métaboliques induit par un régime riche en graisses. En effet, les auteurs montrent que, en condition basale, l'action de Rev-erb $\alpha$  est limitée à la régulation des gènes de l'horloge et du collagène. Or, suite à un régime riche en graisses, la délétion de *Rev-erba* engendre une obésité plus importante par rapport aux souris contrôles sous HFD (High-Fat Diet). De plus, l'environnement pathologique, amené par le régime, semble induire un démasquage de plusieurs sites de liaison de Rev-erb $\alpha$ , sur des promoteurs de gènes impliqués principalement dans le métabolisme des lipides et de la mitochondrie. Ces données semblent indiquer que Rev-erb $\alpha$ , en condition d'obésité, régule le métabolisme des adipocytes afin de prévenir le développement de complications métaboliques<sup>446</sup>.

Rev-erb $\alpha$  est également au centre de l'homéostasie des fibres musculaires. Tout d'abord, Rev-erb $\alpha$  a été décrit comme un inhibiteur de la myogénèse notamment en réprimant des gènes impliqués dans la prolifération de ces cellules *via* p21Cup1/Waf1 mais également en interagissant directement avec le facteur myogénique MyoD dans la lignée C2C12<sup>447,448</sup>. Cependant, des travaux récents ont mis en évidence une nouvelle fonction de Rev-erb $\alpha$  sur la myogénèse. Welch et al. ont montré que Rev-erb $\alpha$  favorise la prolifération des myoblastes *in vivo* en réprimant certains facteurs myogéniques comme MyoD, Myf5, Mhc1 (Myosin Heavy Chain 1) et Mhc2b. Cette régulation est d'autant plus intéressante qu'elle se fait de façon indirecte *via* une association par « tethering » de Rev-erb $\alpha$  avec le facteur NF-Y<sup>424</sup>. Par ailleurs, au sein des fibres musculaires matures, Rev-erb $\alpha$  est indispensable à l'activité oxydative du muscle squelettique. En effet, notre laboratoire a montré que la délétion constitutive de *Rev-erba* engendre une diminution de la biogénèse mitochondriale *via* une régulation de la voie LKB1 (Liver Kinase B1) – AMPK – SIRT1 – PPARGC-1 $\alpha$ . De plus, cette délétion active également le processus d'autophagie *via* une régulation directe des gènes *Park2* (Parkin), *Ulk1*, *Bnip3*, *Beclin*, *Atg5* et *Ctsl* (Cathepsin L). L'ensemble de ces régulations conduit à une diminution du contenu en mitochondries ainsi qu'une altération de leur fonction au sein du muscle squelettique. Ainsi, les souris *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>*, présentent une diminution de leur capacité d'endurance. A l'inverse, un traitement par l'agoniste SR9009 permet d'augmenter la capacité oxydative et l'endurance chez des souris contrôles<sup>433</sup>.



### 3.2.3.3 La régulation de l'immunité par Rev-erba

De nombreuses études, réalisées dans différents contextes physiopathologiques, ont permis d'établir un lien entre le RN Rev-erba et l'immunité. Dans les poumons, Rev-erba régule la réponse inflammatoire suite à une injection par aérosols de LPS. En effet, la transplantation de moelle osseuse de souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> chez des souris contrôles, avant un challenge au LPS, induit une augmentation du nombre de neutrophiles dans le sang chez ces souris. A l'inverse, l'activation de Rev-erba par un ligand synthétique, dans ce contexte, permet de limiter la réponse inflammatoire des cellules épithéliales et myéloïdes, en agissant sur l'expression des gènes *Cxcl5*, *Cxcl1*, *Cxcl2*<sup>435</sup>. Dans cette même étude, les auteurs montrent que l'activation d'une réponse inflammatoire par le TNFα, le LPS ou l'IL-1β va, à l'inverse, induire la dégradation de Rev-erba via l'activation de la p38 MAP kinase. Ce RN joue également un rôle important au sein des macrophages. Chez l'humain, Rev-erba réprime l'induction de l'expression de *CCL2* et *TLR4* par un agoniste de LXR dans des macrophages primaires<sup>449</sup>. Une autre étude plus récente a montré que Rev-erba réprime plusieurs voies de signalisation impliquées dans la réponse à un dommage tissulaire comme la voie Toll-Like Receptor *TLR4*/*NF-κB*, la voie *TGFβ*/*Smad* (associée au processus de fibrose) et la voie *Nrf2* (impliqué dans le stress oxydatif)<sup>450</sup>. De plus, Rev-erba semble avoir un rôle prépondérant dans la polarisation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire dans un contexte d'athérosclérose (Figure 26)<sup>451</sup>.

Par ailleurs, notre laboratoire a montré en 2018 que le RN Rev-erba régule négativement l'inflammasome *NLRP3* en se fixant directement sur le promoteur de *NLRP3* et d'IL-1β au sein des macrophages. Dans cette étude, nous avons montré que l'activation pharmacologique des Rev-erbs par le SR9009 réduit la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 par les macrophages<sup>452</sup>.

Rev-erba module également le recrutement des monocytes/macrophages au sein des tissus en inhibant l'expression de l'IL-6 et *CCL2* dans les macrophages péritonéaux et les macrophages en culture<sup>453,454</sup>. L'adhésion physique de ces cellules aux cellules endothéliales est également modulée par Rev-erba qui influence l'expression de *Vcam1* et de l'intégrine β1<sup>454</sup>.

Outre les macrophages, il a été décrit que ce récepteur intervient dans le développement et la polarisation des lymphocytes *T<sub>H</sub>17*. De façon intéressante, cette régulation influence l'expression de *RORγδ* par une inhibition du facteur de transcription *E4BP4* (adenovirus *E4* promoter binding protein) dans ces cellules (Figure 26)<sup>455</sup>.

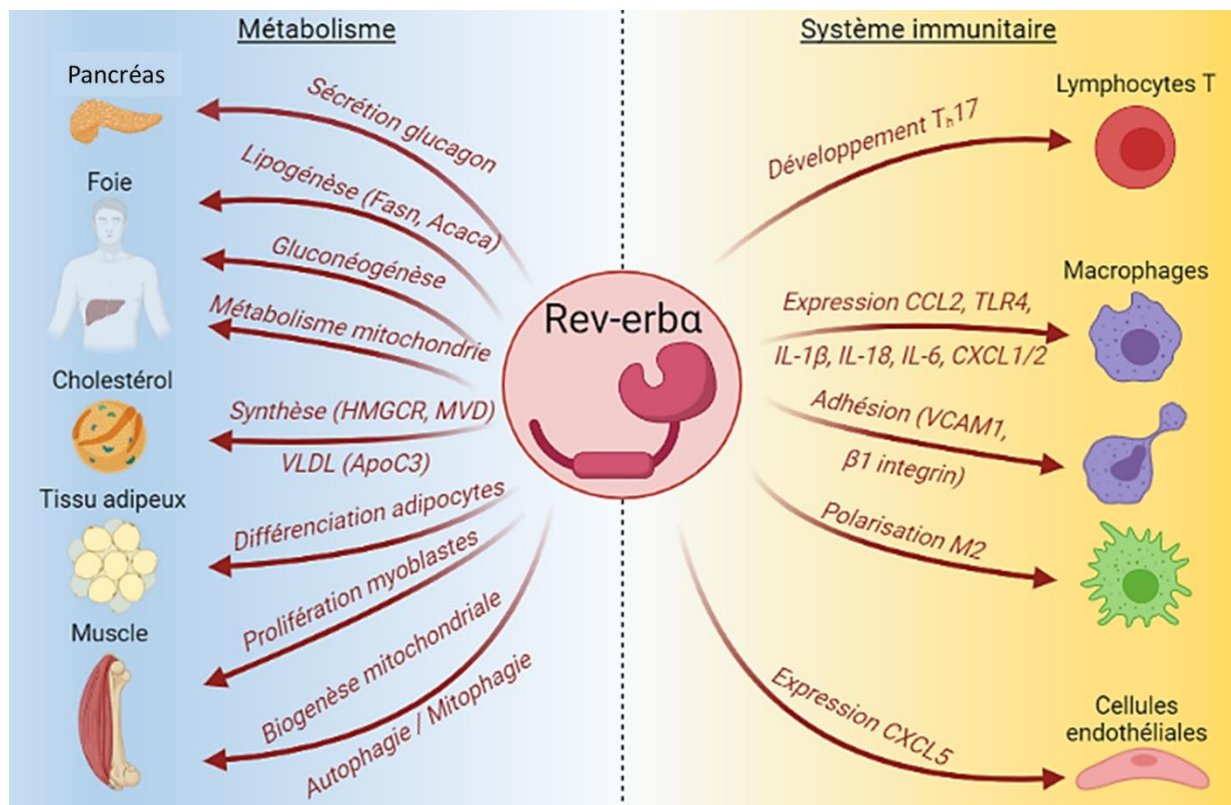


Figure 26 : Rôle de Rev-erb $\alpha$  dans le métabolisme et l'immunité.

### 3.3 L'horloge circadienne et le métabolisme

#### 3.3.1 Interaction entre l'horloge circadienne et le métabolisme

Bien que la lumière permette la synchronisation de l'horloge centrale, la prise de nourriture ainsi que le statut énergétique sont des signaux synchronisateurs importants des horloges périphériques. Chez la souris, la consommation de nourriture coïncide avec le début de la phase active dans 80% des cas<sup>456</sup>. Dans une situation normale où la prise alimentaire est concomitante à la phase d'activité, les horloges périphériques sont en résonance, voire même renforcées par, l'horloge centrale. A l'inverse, si la prise des repas se fait en dehors de la période normale d'activité, les horloges périphériques sont entraînées par la prise de nourriture, alors que l'horloge centrale reste synchronisée avec le cycle jour/nuit. Ceci crée une dissonance entre les horloges. Ainsi, il a été montré que des souris nourries exclusivement pendant leur phase de repos, présentent un déphasage progressif des horloges périphériques qui s'ajustent sur la nouvelle période d'alimentation, alors que l'horloge centrale reste synchronisée sur l'alternance jour/nuit<sup>457,458</sup>. De manière intéressante, toutes les horloges périphériques ne se comportent pas de la même manière en réponse à l'alimentation. Cela suggère que les horloges périphériques peuvent répondre à des signaux temporels dominants

distincts, pouvant être liés à leur fonction tissulaire. En effet, l'accès à l'alimentation en période d'inactivité exerce un découplage important des horloges du foie et du tissu adipeux blanc (WAT), alors que d'autres tissus, comme le rein et le cœur, ne sont que partiellement déphasés<sup>459</sup>. Ce « désalignement circadien » est courant dans les pays industrialisés où l'exposition à la lumière artificielle et/ou le travail de nuit conduisent à un décalage entre les rythmes circadiens endogènes et les cycles environnementaux (jour/nuit ; activité/repos) contribuant ainsi à un dérèglement métabolique.

La synchronisation de l'horloge par l'alimentation nécessite que l'horloge biologique puisse détecter les nutriments et les métabolites. Les signaux métaboliques, dont l'état redox, sont communiqués à l'horloge *via* les modifications post-traductionnelles des protéines de l'horloge moléculaire. Le rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , qui reflète le statut énergétique, est étroitement associé au cycle alimentation / jeûne. Il a été démontré que CLOCK et BMAL1 régulent directement la transcription du gène de la nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) codant pour l'enzyme limitante de la voie de synthèse du NAD, ce qui entraîne une oscillation circadienne du niveau intra-cellulaire de  $\text{NAD}^+$ <sup>460–464</sup>. Ainsi, la déacétylase SIRT1 et la polyADP-ribose polymérase-1 (PARP-1), qui utilisent le  $\text{NAD}^+$  comme cofacteur vont, en retour, réguler de manière circadienne l'activité transcriptionnelle de Bmal1, de Clock et de Per2<sup>465–467</sup>. De plus, il a été décrit que SIRT1 contrecarre l'activité histone acétyltransférase de Clock. En interagissant physiquement avec Clock, SIRT1 module le niveau d'acétylation des cibles de Clock, reliant ainsi le statut métabolique aux modifications de la chromatine (Figure27)<sup>467</sup>.

L'AMPK, un autre senseur métabolique clé qui détecte le rapport AMP/ATP, interagit également avec les composants de l'horloge. D'une part, la composition des sous-unités de l'AMPK, sa localisation subcellulaire ainsi que la phosphorylation de ses substrats, Raptor et acétyl coenzyme A carboxylase 1 (ACC1), présentent des oscillations circadiennes dans le foie chez la souris<sup>468</sup>. D'autre part, l'activation de l'AMPK en période de jeûne ou d'exercice induit la phosphorylation des protéines PER et CRY, conduisant à leur dégradation par le protéasome<sup>468–470</sup>.

L'horloge est également sensible à d'autres senseurs métaboliques tels que la flavine adénine dinucléotide (FAD). Précisément, le taux de FAD dans le noyau détermine la stabilité de la protéine CRY en entrant en compétition avec l'ubiquitine ligase FBXL3 (F-box/LRR-repeat protein 3)<sup>471</sup>. Le monoxyde de carbone lie également le métabolisme à l'horloge circadienne. La formation du monoxyde de carbone dans l'organisme, par la dégradation de l'hème, est cyclique et celle-ci maintient les rythmes circadiens des organes périphériques en perturbant transitoirement la liaison du complexe Bmal1/Clock avec ses gènes cibles. En conséquence, une perturbation du cycle de formation du monoxyde de carbone induit une

perturbation de l'horloge hépatique et altère le métabolisme du glucose (Figure 27)<sup>472</sup>. De même, les facteurs de transcription TFEB (Transcription Factor EB) et TFE3 (Transcription Factor Binding To IGDM Enhancer 3) sont sensibles à l'apport de nutriments et relient l'horloge à la mitophagie et au métabolisme en régulant directement l'expression de Rev-erba<sup>473</sup>. Les protéines de l'horloge peuvent également être modifiées par, ou modifier la, O-GlcNacylation comme c'est le cas respectivement de PER et Rev-erba. Enfin, l'insuline contrôle l'abondance des protéines PER et entraîne ainsi l'horloge en phase post-prandiale<sup>474</sup>.

La plupart des métabolites tels que le glucose, les lipides et les acides aminés présentent des variations circadiennes dans le sang et les tissus, et peuvent donc également contribuer à la bonne synchronisation des différentes horloges périphériques<sup>475-478</sup>. L'expression des transporteurs de glucose, tels que GLUT4 (Glucose Transporter) et GLUT2 qui sont respectivement responsables de l'absorption du glucose par les muscles et le foie, sont également contrôlées par l'horloge, permettant ainsi une communication optimale entre les métabolites et leurs transporteurs (Figure 27)<sup>479,480</sup>.

Ainsi, il a été montré que la tolérance au glucose est différente selon le moment de la journée chez l'Homme, avec une meilleure tolérance le matin que le soir<sup>481</sup>. Une illustration de ce lien entre rythmes circadiens et métabolisme est le fait qu'une dérégulation de l'horloge engendre une prévalence du développement de maladies métaboliques. Par exemple, les travailleurs postés ont un risque plus élevé de développer un diabète de type 2, et ce risque augmente de façon proportionnelle au nombre de nuits de travail effectuées par mois<sup>482</sup>. De plus, une privation chronique de sommeil chez des volontaires sains engendre une diminution de la tolérance au glucose associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline des organes périphériques<sup>483,484</sup>.

En conclusion, la détection des nutriments par les horloges périphériques est essentielle pour décrypter l'état énergétique de la cellule. Cela permet de coordonner les programmes transcriptionnels et métaboliques afin d'anticiper la mise en place des voies métaboliques nécessaires à l'assimilation des nutriments ou, au contraire, au jeûne.

L'activité physique ainsi que la consommation d'oxygène sont également des modulateurs de l'horloge. Chez la souris, la disponibilité en oxygène a été montrée comme permettant la synchronisation des horloges<sup>485</sup>. Ce lien est réciproque puisque la réponse de l'organisme à l'hypoxie varie selon le moment de la journée et selon l'organe ciblé<sup>486</sup>.

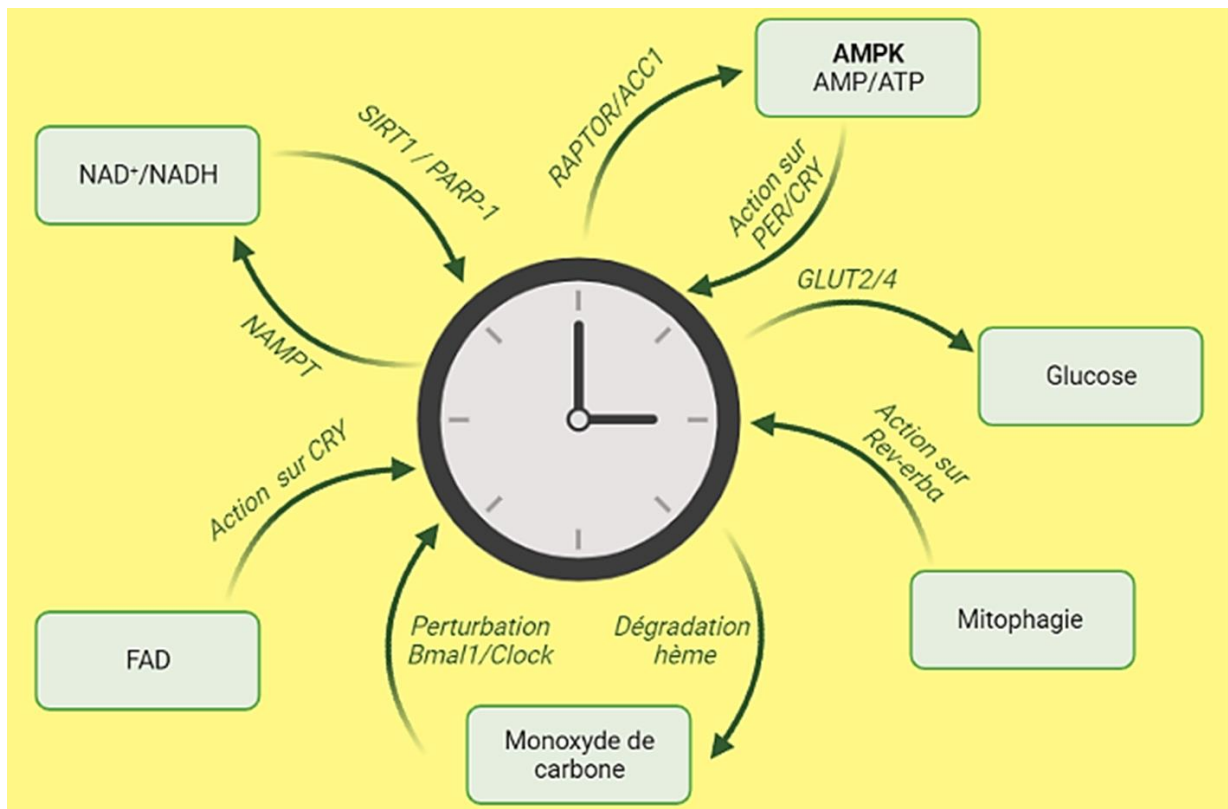


Figure 27 : Interactions entre l'horloge circadienne et le métabolisme.

### 3.3.2 Contrôle du métabolisme par l'horloge biologique

L'horloge permet une synchronisation fine des différents organes métaboliques afin d'optimiser et d'anticiper les phases de prise alimentaire. D'un point de vue global, il a été montré que cette horloge régule directement la sensation de satiété à travers son action sur les neurones AgRP et la réponse transcriptionnelle à la leptine<sup>487</sup>. Par exemple, les périodes d'activité métabolique des tissus périphériques comme le muscle squelettique et le tissu adipeux durant la phase active sont corrélées à l'excrétion du glucose par le foie durant cette période<sup>480</sup>. A l'inverse, durant la phase active, la sécrétion circadienne de l'insuline et du glucagon par les îlots de Langerhans ainsi que du GLP1 (Glucagon-Like Peptide-1) par les cellules L de l'intestin vont maintenir l'homéostasie glucidique de l'organisme<sup>488,489</sup>

#### 3.3.2.1 Contrôle du métabolisme glucidique par l'horloge biologique

Les effets délétères d'une dérégulation de l'horloge biologique sur le métabolisme ont été largement étudiés dans les modèles animaux. Turek et al. ont montré que les souris mutantes *Clock* présentent de profondes perturbations métaboliques, notamment une hyperglycémie et une hypo-insulinémie<sup>490</sup>. En conséquence, les souris mutantes *Clock* et

déficiantes en *Bmal1* présentent une néoglucogénèse défectueuse ainsi qu'une sensibilité à l'insuline altérée. Ce phénotype est associé à une perte d'oscillations circadiennes de l'activité hépatique de la PEPCK chez les souris mutantes *Clock*<sup>491</sup>. L'action de Cry dans la néoglucogénèse a également été décrite. CRY agit sur la voie de signalisation du glucagon en inhibant séquentiellement l'accumulation d'AMP cyclique dans les hépatocytes, l'activité de CREB et l'expression de PCK1 (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1), une enzyme indispensable à la néoglucogénèse (Figure 28)<sup>492,493</sup>. Ainsi, la surexpression de Cry spécifiquement dans le foie de souris db/db diminue la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline. Cet effet est le résultat de la répression de la phosphorylation de CREB (C-AMP Response Element-binding protein) par la PKA dont l'activité est modulée par le glucagon et l'expression des gènes de la néoglucogénèse pendant le jeûne<sup>494</sup>. L'horloge régule également la glycogénèse dans le foie *via* un contrôle circadien de l'expression de la glycogène phosphorylase, de la glycogène synthase 2 (GYS2) et de la glycogène synthase kinase 3<sup>495-497</sup>. Enfin, le rôle général de l'horloge sur le métabolisme hépatique peut s'expliquer par un contrôle de l'horloge et de la prise de nourriture sur l'activité ribosomale. En effet, on observe une forte différence dans la taille des hépatocytes et leur contenu moléculaire en fonction du moment de la journée. Ce phénotype s'explique par des variations circadiennes dans l'assemblage des ribosomes ainsi que dans la maturation des ARN ribosomaux<sup>498</sup>.

Le pancréas joue également un rôle essentiel dans le métabolisme du glucose *via* la production d'insuline et de glucagon. En plus du contrôle *via* les cycles d'alimentation et de jeûne, la production d'hormones pancréatiques est également contrôlée par une horloge biologique intrinsèque au pancréas. En effet, les îlots pancréatiques présentent des oscillations circadiennes de l'expression du gène de l'horloge<sup>499</sup>. La délétion de *Bmal1* ou l'utilisation d'un siRNA de clock dans des îlots pancréatiques humains ou murins induisent une diminution de la sécrétion d'insuline, engendrant un phénotype diabétique<sup>499,500</sup>. A l'inverse, une surexpression spécifique de *Bmal1* dans les cellules  $\beta$  pancréatiques permet d'améliorer la sécrétion d'insuline stimulée par un bolus de glucose et l'intolérance au glucose induite par une alimentation riche en graisses<sup>501</sup>. De manière intéressante, le traitement *in vitro* de souris et d'îlots humains avec de la nobilétine, un agoniste de ROR, protège des effets métaboliques délétères induits par une alimentation riche en graisses de manière dépendante de l'horloge, en augmentant la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose<sup>501,502</sup>. D'un point de vue mécanistique, il a été élégamment démontré que *Bmal1* et *Clock* contrôlent l'expression des gènes impliqués dans l'exocytose de l'insuline par la régulation de l'épissage alternatif des ARNm<sup>499</sup>.

### 3.3.2.2 Contrôle du métabolisme lipidique par l'horloge biologique

Des études ont montré que la proportion des différentes espèces de lipides dans le foie oscillait durant la journée chez la souris. Ces oscillations sont modulées par l'horloge intrinsèque du foie mais également par l'heure de la prise de nourriture. Afin d'illustrer ce phénomène, des analyses lipidomiques chez des souris délétées pour les gènes *Per 1* et *2* ou en inversant le cycle de nourriture (durant la phase inactive de la souris) ont été effectuées. Ces deux conditions provoquent une forte altération de la proportion des lipides, notamment des triglycérides, comparés à des souris contrôles<sup>503</sup>. De plus, les souris mutantes *Clock*  $\Delta 19$  ainsi que les souris déficientes spécifiquement pour *Rev-erba* et  $\beta$  dans le foie développent une stéatose hépatique associée à un niveau élevé de triglycérides plasmatiques<sup>490,504,505</sup>. Une élévation des triglycérides sériques est également observée en absence de *Rev-erba* uniquement<sup>399</sup>. D'un point de vue mécanistique, des études utilisant un modèle de souris exprimant un mutant de *Rev-erba* déficient pour ce domaine de liaison à l'ADN, ont montré que *Rev-erba* régule les gènes liés au métabolisme lipidique dans le foie *via* une fixation à HNF6 (Figure 28)<sup>423,506</sup>. Au contraire, une étude récente a mis en évidence que la délétion spécifique de *Rev-erba* dans les hépatocytes n'a un impact sur le métabolisme lipidique que lors d'un défi métabolique tel que l'obésité ou une alimentation dans la mauvaise fenêtre temporelle<sup>507</sup>.

Le tissu adipeux est un organe clé dans la régulation du stockage et du métabolisme des lipides. *Bmal1* et *Clock* régulent les variations diurnes des niveaux plasmatiques d'acides gras libres (AGL) et de glycérol *via* un contrôle direct de l'expression d'enzymes clés de la lipolyse que sont *Atgl* (Adipose Triglyceride Lipase) et *Hsl* (Hormone-Sensitive Lipase)<sup>508</sup>. Les souris déficientes pour *Rev-erba* présentent également des altérations du métabolisme des lipides dans le foie et les muscles squelettiques, associées à une masse de tissu adipeux plus importante que les souris contrôles en condition normale et une plus grande susceptibilité à développer de l'obésité lors d'un régime riche en graisses (Figure 28)<sup>509</sup>. De même, la délétion de *Bmal1* spécifiquement dans le tissu adipeux induit une modification de l'expression des gènes de l'horloge ainsi qu'une rythmicité alimentaire altérée, favorisant l'obésité. Il est intéressant de noter que la modification des rythmes alimentaires chez ces souris résulte d'une libération plus faible d'acides gras polyinsaturés par les adipocytes, qui contrôlent directement le comportement alimentaire en régulant l'expression des neuropeptides hypothalamiques<sup>510</sup>. PPAR $\gamma$ , un facteur de transcription essentiel dans la fonction du tissu adipeux est également sous le contrôle de l'horloge et notamment des composants PER 2 et 3<sup>511</sup>. Comme dans les autres tissus métaboliques, la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux est sous le contrôle des composants de l'horloge circadienne<sup>512</sup>. Dans le tissu adipeux brun, la thermogénèse est finement régulée par *Rev-erba*. afin de maintenir la température corporelle de l'animal, ce RN

réprime l'expression d'UCP1 et augmente les oscillations circadiennes des gènes contrôlant la lipogénèse *de novo* durant une exposition prolongée au froid<sup>513</sup>. Dans ce tissu, les captations du glucose et des acides gras oscillent en raison de variations circadiennes de l'expression des récepteurs de ces métabolites à la surface du tissu. De plus, des variations circadiennes de l'expression de la lipoprotéine Lipase (LPL), enzyme permettant l'hydrolyse des triglycérides en acides gras, ainsi qu'un inhibiteur de cette enzyme : l'angiopoietin-like 4 (Angptl4), ont été mises en évidence<sup>514,515</sup>.

L'intestin est également un organe métabolique majeur puisqu'il permet l'incorporation des nutriments dans l'organisme. L'absorption ainsi que le transfert des lipides dans l'intestin sont circadiens en raison de l'expression temporelle de la Nocturnine (Ccrn4l)<sup>516,517</sup>. D'autre part, la protéine GLP-1 est une incrétine extrêmement importante pour la régulation du taux de glucose sanguin en augmentant la sécrétion glucose-dépendante de l'insuline par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Cette incrétine est sécrétée de façon circadienne par les cellules L de l'intestin. En effet, les souris délétées pour *Bmal1* présentent une diminution de la sécrétion de GLP-1 par ces cellules (Figure 28)<sup>489,518</sup>.

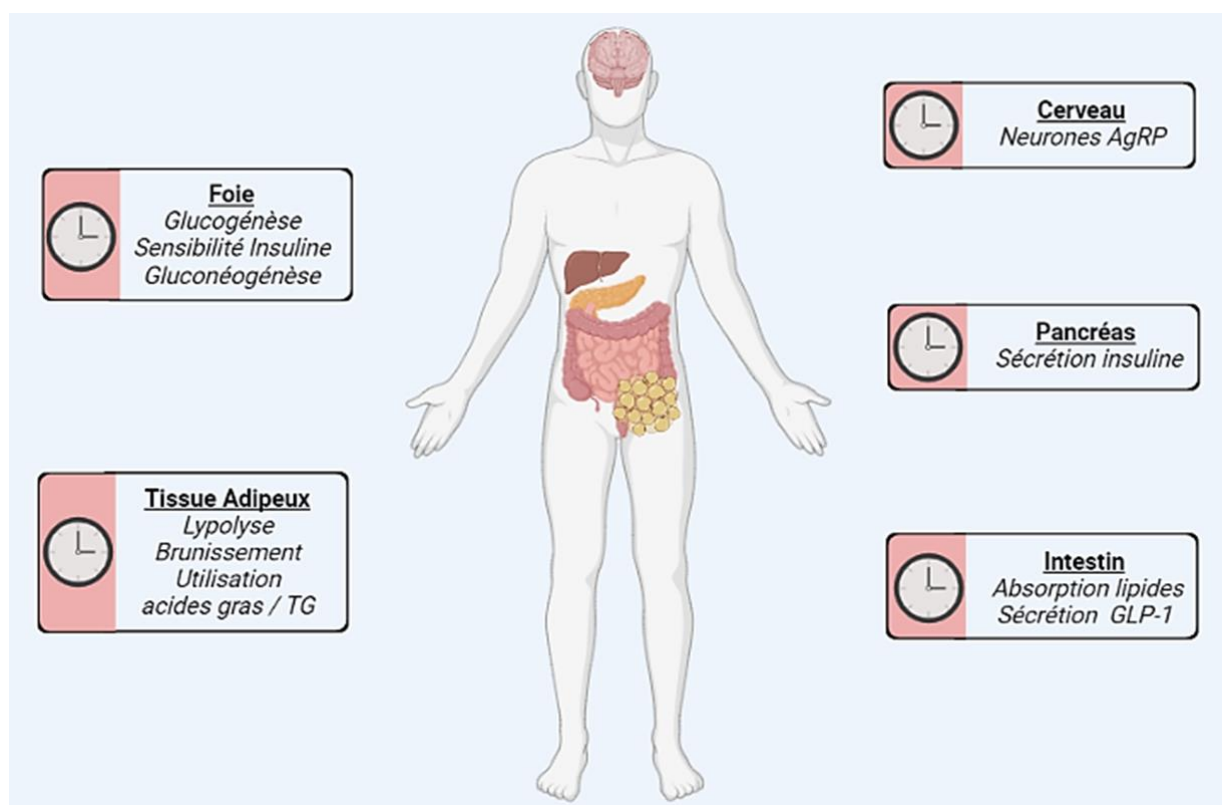


Figure 28 : Influence de l'horloge biologique sur le métabolisme global.



### 3.3.2.3 Chronothérapies associés au métabolisme

Les nombreuses études mettant en lumière le rôle essentiel des rythmes circadiens au sein du métabolisme ont permis de mettre en place les premières chronothérapies. Ainsi, une étude clinique a montré qu'une thérapie lumineuse appliquée le matin augmente la sensibilité à l'insuline chez des patients atteints de diabète de type 2<sup>519</sup>. Une seconde étude a mis en évidence une réponse circadienne suite à l'administration de la metformine, molécule couramment utilisée dans le traitement du diabète de type 2. Cette réponse est régulée par des variations de sensibilité à l'AMPK selon le moment de la journée<sup>520</sup>. De même, l'utilisation de différents agonistes des Rev-erbs et de CRY permettent d'améliorer la dépense énergétique chez les souris en modifiant le métabolisme du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique<sup>431,521</sup>. Enfin, outre l'aspect thérapeutique apporté par une meilleure compréhension du lien entre horloge circadienne et métabolisme, il semble clair aujourd'hui qu'une modification de nos habitudes alimentaires actuelles permettrait de diminuer l'expansion des maladies métaboliques. De nombreuses études indiquent que l'heure à laquelle nous prenons nos repas a une incidence très importante sur notre métabolisme. Par exemple, la prise de repas durant les 10 premières heures d'éveil au lieu des 10 dernières heures permet de prévenir l'évolution de désordres métaboliques<sup>522</sup>. Des études récentes menées par l'équipe de S. Panda ont mis en évidence qu'un jeûne de 16h suffit à diminuer de façon significative le poids de patients obèses<sup>523</sup>.

Pour conclure, les récentes découvertes sur les liens étroits entre l'horloge circadienne et le métabolisme permettent d'ouvrir des perspectives très intéressantes que ce soit *via* le développement de nouveaux traitements pharmacologiques ciblant les différents acteurs de l'horloge circadienne ou simplement en adoptant des habitudes alimentaires plus en accord avec notre horloge interne afin de limiter le développement de maladies métaboliques.

## 3.4 Contrôle de la fonction musculaire par l'horloge biologique

La première étude démontrant l'existence de rythmes circadiens au sein du muscle squelettique a été réalisée en 1986 et a mis en évidence des modifications circadiennes de la synthèse protéique chez le rat<sup>524</sup>. En 1998, les recherches de Zylka et al. ont démontré des variations circadiennes dans la transcription des gènes *Per1* et *Per2*<sup>525</sup>. Depuis, de nombreuses études ont décrit la présence d'une horloge intrinsèque au muscle squelettique, plaçant ce tissu comme la plus grande horloge périphérique de l'organisme. Cette horloge, présente chez la souris et chez l'humain, régule l'expression circadienne de 430 gènes communs aux 2 espèces<sup>365,526,527</sup>. Il est intéressant de noter que le nombre de gènes ayant

une expression circadienne varie selon la nature du muscle avec 1359 gènes au sein du muscle lent contre 684 pour le muscle mixte<sup>479</sup>.

#### 3.4.1 L'horloge circadienne dans le développement et l'homéostasie du muscle squelettique

Les dérégulations génétiques de l'horloge circadienne impactent la masse et la fonction du muscle. En effet, les souris déficientes pour *Bmal1* présentent une diminution significative de la force musculaire reliée à une désorganisation des myofilaments et du sarcomère<sup>528</sup>. Ce phénotype est retrouvé chez des souris déficientes pour le gène *Clock* et *Per2* mais également dans des myotubes humains invalidés pour le gène *Clock* par un siRNA<sup>527,529–531</sup>. Cette action de l'horloge sur le maintien de la masse musculaire est d'autant plus importante dans un contexte de sarcopénie. Chez des souris de 40 semaines, la délétion de *Bmal1* induit une diminution de près de 50% de la masse musculaire, s'accompagnant d'une durée de vie raccourcie<sup>532</sup>. Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence le rôle de Rev-erba dans le contrôle de la masse musculaire notamment dans la prévention d'une atrophie musculaire induite par des glucocorticoïdes (détaillé dans la partie résultats)<sup>533</sup>. De plus, la délétion de *Rev-erba* entraîne des perturbations dans la synthèse des myosines à chaînes lourdes au sein des fibres de type I (Figure 29)<sup>534</sup>.

La fonction de l'horloge circadienne dans le maintien de la structure du muscle squelettique peut également s'exercer au cours du développement du muscle. En effet, la désorganisation structurelle observée dans les muscles délétés pour *Bmal1* présentent des similarités avec la structure des muscles de souris déficientes pour le facteur *MyoD*<sup>528</sup>. MyoD est un régulateur myogénique essentiel au développement musculaire tout comme la myogénine. Or, il a été montré que l'expression de ces deux facteurs oscille avec un pic d'expression observé durant la phase active des souris<sup>535</sup>. Ces variations sont dues à une régulation directe de l'expression du gène *MyoD* par le complexe Bmal1/CLOCK<sup>528</sup>. Une étude récente a démontré que le facteur MyoD se fixe sur le promoteur de Bmal1 et déclenche sa transcription au sein du muscle squelettique<sup>536</sup>. Cette boucle de régulation entre les gènes de l'horloge et ce facteur myogénique permet d'instaurer un rythme circadien robuste au sein de ce tissu (Figure 29). MyoD ainsi que MyoG sont également régulés par Rev-erba et Rev-erbβ comme cela a été montré dans des lignées cellulaires C2C12<sup>448,528</sup>. De plus, l'horloge, *via* Bmal1, agit sur la myogénèse en activant certains composants de la voie Wnt, essentielle dans l'activité des cellules souches musculaires<sup>537,538</sup>. Cette régulation a été mise en évidence dans un contexte de blessure musculaire où les souris déficientes pour *Bmal1* présentent une altération

significative de leur capacité de régénération dû à une réduction de la capacité proliférative des cellules souches musculaires.

Enfin, des études montrent que Rev-erba/ $\beta$  sont des facteurs essentiels de la myogénèse. Fortement exprimé durant la phase proliférative de la lignée C2C12, leurs expressions diminuent durant la différenciation, levant ainsi l'inhibition sur l'inhibiteur du cycle cellulaire p21<sup>Cip1/Waf1</sup> et sur le MRF MyoG<sup>447</sup> (Figure 29). A l'heure actuelle, aucune étude n'a démontré une régulation par l'horloge circadienne des autres facteurs myogéniques tels que Myf5 ou Mrf4. Toutefois, dans d'autres modèles tels que le zébrafish ou le cheval, l'homologue de mrf4 oscille durant les mêmes phases que Bmal1 et clock<sup>539,540</sup>.

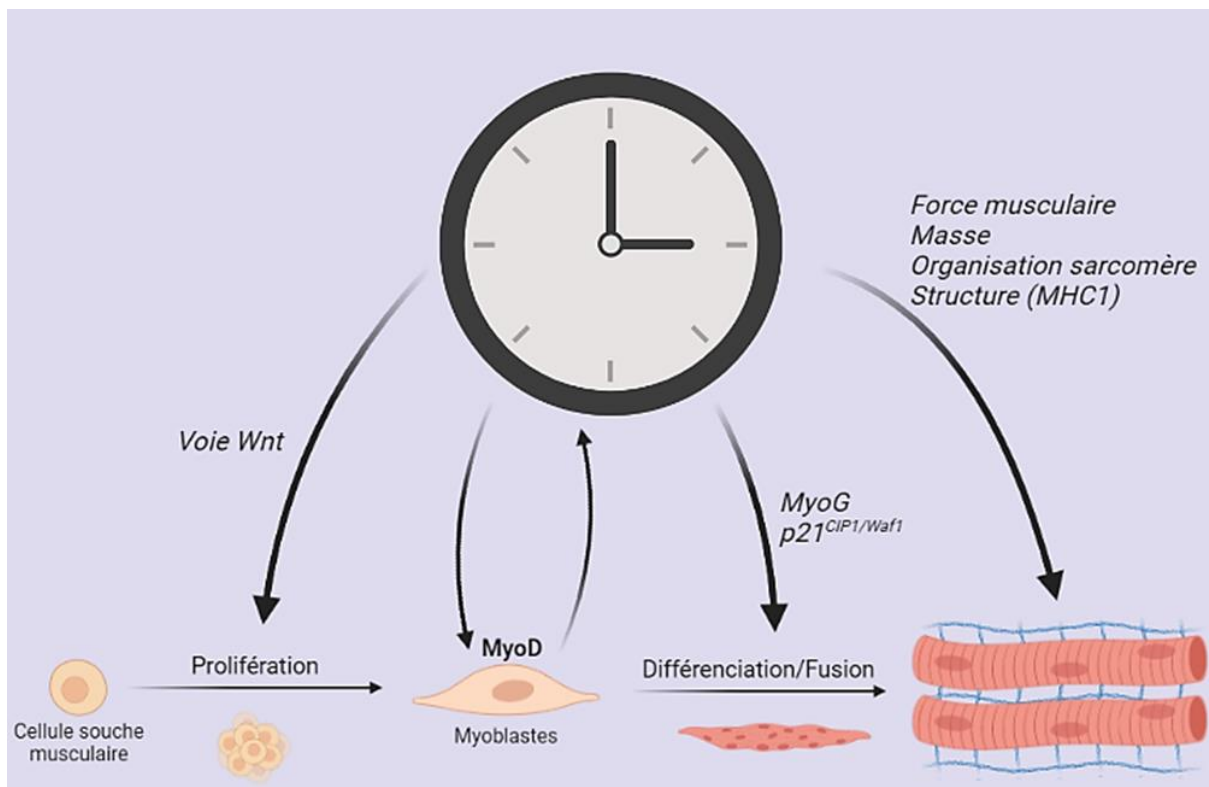


Figure 29 : Rôle de l'horloge circadienne dans le développement et l'homéostasie musculaire.

### 3.4.2 L'horloge circadienne dans la fonction du muscle squelettique

Le muscle présente également des propriétés métaboliques majeures de par sa capacité à capter le glucose postprandial (environ 80%) et sa forte sensibilité à l'insuline. Afin d'assurer ses fonctions locomotrices et métaboliques, il est le tissu qui consomme le plus d'énergie dans l'organisme. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la plupart des propriétés métaboliques du muscle squelettique sont soumises à des variations circadiennes.

Ainsi, en début de phase active chez l'humain, le muscle favorise l'oxydation des carbohydrates alors que les lipides sont oxydés durant la période inactive<sup>541</sup>. Ces ajustements métaboliques visent à adapter la disponibilité des différents métabolites à l'énergie nécessaire au fonctionnement du muscle squelettique selon le moment de la journée. C'est pourquoi on observe, durant la phase active, une augmentation des gènes relatifs à la contraction musculaire et à l'activité mitochondriale afin de préparer les différents muscles à une activité plus importante (Figure 30)<sup>542</sup>.

De façon intéressante, l'horloge du muscle squelettique est sensible au signal synchronisateur de l'horloge centrale, mais également à la prise de nourriture<sup>543-545</sup>. Précisément, une meilleure tolérance au glucose ainsi qu'une sensibilité à l'insuline augmentée est observée le matin chez l'humain<sup>546</sup>. Cela s'explique notamment par la régulation circadienne de l'expression du gène du transporteur au glucose GLUT4 par le complexe Bmal1/Clock mais également par l'expression circadienne des enzymes du métabolisme du glucose tels que l'Hexokinase 2 et la pyruvate deshydrogénase (Figure 30)<sup>365,479,542,547</sup>. Plusieurs études utilisant des modèles génétiques de dérégulation de l'horloge circadienne dans le muscle squelettique (déficient pour *Bmal1* et *Clock*) montrent une perturbation de la voie de l'insuline, de la captation de glucose ou encore des voies impliquées dans le transport et le stockage des lipides<sup>365,529,530</sup>. Cela est également mis en évidence dans des études cliniques où un décalage horaire de 12 heures durant 3,5 jours modifie l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des acides gras ainsi que les paramètres métaboliques du muscle squelettique. Les individus soumis à un décalage horaire présentent une hausse du taux de glucose plasmatique, d'acides gras libres ainsi que le développement d'une insulino-résistance du muscle squelettique<sup>548</sup>. Des données similaires ont pu être observées dans une étude de privation de sommeil où les patients affichent un niveau de glucose postprandial plus important ainsi que des dérégulations du métabolisme des acides gras au sein du muscle<sup>549</sup>.

Les phénotypes observés chez les souris présentant une altération de l'horloge s'expliquent également par un contrôle sur l'activité mitochondriale. La capacité de la mitochondrie à produire de l'énergie nécessaire au fonctionnement de ce tissu ainsi que son implication dans son métabolisme la place comme un composant central. Notre équipe a montré que la mitochondrie est sous le contrôle de l'horloge et, plus précisément, de Rev-erba qui favorise la biogenèse et la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique à travers une action sur la voie LKB1-AMPK-SIRT1-PGC-1 $\alpha$ <sup>433</sup>. Cela a également été montré avec d'autres modèles de délétions des gènes de l'horloge comme *Bmal1* ou *Clock* qui présentent des altérations du contenu et de l'activité mitochondriale au sein des fibres musculaires (Figure 30)<sup>528</sup>.

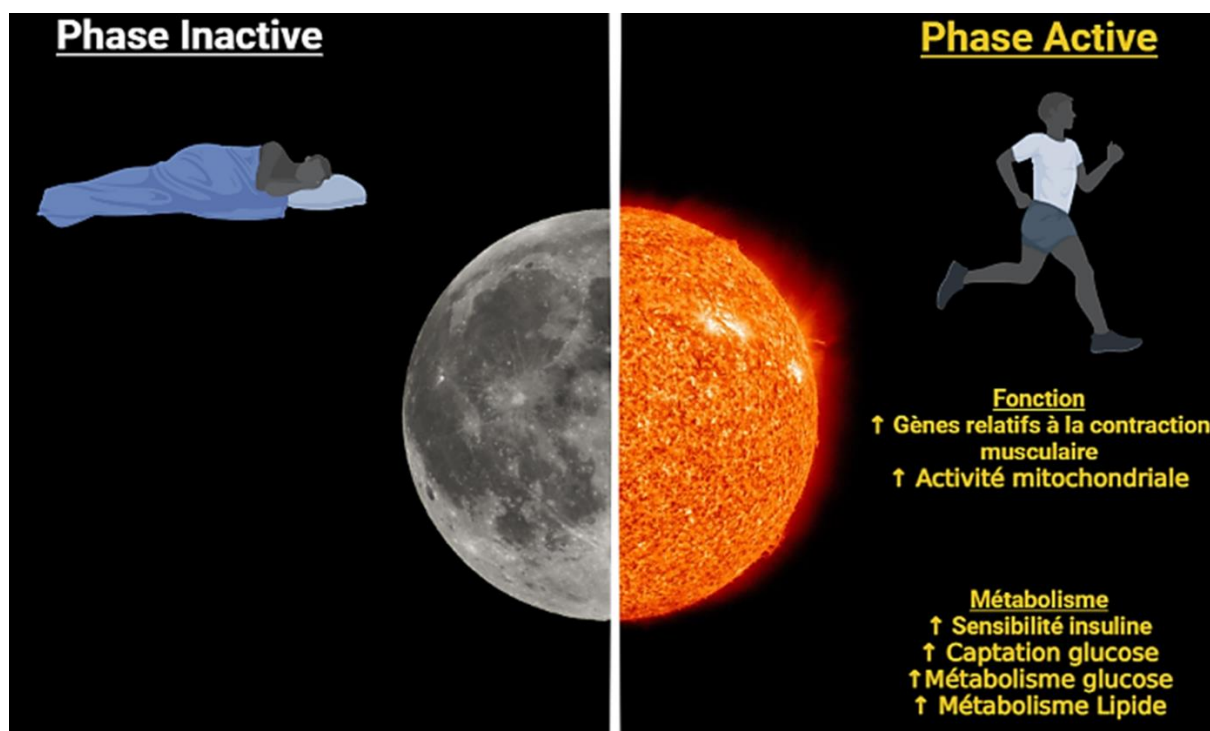


Figure 30 : Rôle de l'horloge circadienne dans la préparation du muscle squelettique.

### 3.4.3 L'horloge circadienne durant l'exercice

L'ensemble des régulations évoquées précédemment prépare donc le muscle squelettique à assurer ses fonctions durant la phase active de l'organisme. Cela se traduit par exemple par une capacité à l'exercice optimale entre 16h et 18h chez l'Homme avec une diminution significative de la consommation d'oxygène, de la fréquence cardiaque et du taux de glucose sanguin comparé à un exercice pratiqué le matin<sup>550,551</sup>. Des études similaires ont montré que chez des chevaux pratiquant des courses journalières à heure fixe, l'expression d'UCP3 atteint son zénith juste avant l'heure de l'exercice. L'expression de ce gène vise à anticiper une réponse anti-oxydante à la production de ROS qui survient durant l'exercice<sup>552</sup>.

Une des caractéristiques de l'horloge du muscle squelettique est sa capacité à se synchroniser *via* l'exercice physique. En effet, des études récentes démontrent une régulation de l'expression des gènes de l'horloge par l'exercice physique<sup>553,554</sup>. Ainsi, chez l'homme, la pratique d'une activité physique induit l'augmentation de l'expression des gènes *Bmal1*, *Per2* et *Cry1* dans la jambe soumise à un exercice par rapport à la jambe latérale contrôle<sup>553</sup>. Chez la souris, l'exercice pratiqué durant la phase inactive a pour conséquence d'avancer le rythme circadien<sup>555-557</sup>. Cette synchronisation pourrait être dépendante de l'augmentation du taux de glucocorticoïdes synthétisés durant l'exercice. En effet, le taux de glucocorticoïdes dans la sang double après un exercice par rapport au taux présent chez des souris contrôles<sup>558-560</sup>.

Toutefois, les fonctions synchronisatrices de cette hormone sur les horloges périphériques sont encore inconnues.

Ces données apportent de nouvelles perspectives thérapeutiques concernant les maladies métaboliques tels que le diabète de type 2. En effet, chez ces patients, la pratique d'une activité sportive est essentielle. De plus, la pratique d'une activité physique l'après-midi plutôt que le matin améliore de façon significative la glycémie des patients atteints d'un diabète de type 2<sup>561</sup>. Ces notions sont importantes et doivent être prises en considération dans l'administration de traitements provoquant une atrophie musculaire. Nakao et al. ont montré que l'administration de dexaméthasone induit une atrophie plus conséquente lorsqu'elle est injectée durant la phase inactive (ZT1) plutôt que durant la phase active (ZT13) où l'injection coïncide avec le pic endogène de corticoïde<sup>562</sup>.

Une étude parue en 2017 met en lumière le rôle surprenant de l'horloge circadienne musculaire dans la régulation du sommeil. De nombreuses équipes ont montré une dérégulation des phases de sommeil dans les modèles d'altération de l'horloge comme chez les souris délétées de façon globale pour *Bmal1*. De façon intéressante, elle a montré, à l'aide d'un modèle de délétion de *Bmal1* uniquement dans le muscle squelettique, que l'horloge circadienne du muscle est responsable de la dérégulation du sommeil observée dans les modèles de délétion globale. De plus, la surexpression de *Bmal1*, exclusivement dans le muscle, permet de réduire le temps de récupération des souris suite à une privation de sommeil<sup>563</sup>.

### 3.5 L'horloge circadienne et l'immunité

Depuis plusieurs années, le lien étroit existant entre l'horloge biologique et l'immunité a été mis en évidence. En 1960, une étude relate une réponse différente à un pathogène selon le moment de la journée. Elle mentionne un taux de survie maximum des souris face à une endotoxine de *E.coli* en milieu de phase active<sup>564</sup>. Depuis, de nombreuses études ont décrit le rôle de l'horloge circadienne au sein de l'immunité chez les mammifères, mais aussi chez les plantes et la drosophile<sup>565,566</sup>. Aujourd'hui, la présence d'une horloge intrinsèque a été découverte dans la plupart des cellules immunitaires notamment les cellules Natural Killer (NK) mais aussi les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes, les éosinophiles. Cette horloge est également présente au sein de l'immunité adaptative en agissant dans la lignée lymphoïde (B et T)<sup>567</sup>. Enfin, il a été décrit dernièrement que l'horloge avait également un impact dans une lignée de cellule immunitaire plus récemment découverte que sont, les cellules lymphoïdes innées (ILCs)<sup>568</sup>.

L'horloge circadienne est capable de réguler l'immunité de plusieurs façons. En effet, elle régule le trafic leucocytaire dans le sang notamment en agissant sur la libération des cellules immunes à partir de la moelle osseuse et sur leur recrutement au sein des différents organes. De plus, l'horloge intrinsèque des cellules immunitaires va également impacter la fonction de ces leucocytes, en particulier la sécrétion de cytokines.

### 3.5.1 La régulation circadienne du trafic leucocytaire

Des variations circadiennes dans la circulation de la plupart des populations de leucocytes à travers le sang ont été mises en évidence ces dernières années. Cette régulation permet l'infiltration des leucocytes au sein des tissus (foie, poumons, muscles squelettiques, rate, ganglions) au moment de la journée au cours duquel ces tissus ont le plus de risque de subir une infection ou un désordre métabolique. Dans ce sens, on observe que la plupart des leucocytes présentent une infiltration plus élevée dans les tissus au début de la phase active des organismes (en début de journée chez l'Homme et en début de nuit chez la souris). A l'inverse, le zénith de la quantité de leucocytes dans le sang apparaît en milieu de phase inactive. Ce recrutement temporel a notamment été démontré pour les cellules NK, les éosinophiles, les monocytes, les mastocytes, les neutrophiles et les lymphocytes CD4 et B<sup>569,570</sup>.

Des découvertes récentes mettent en lumière une régulation complexe de ce phénomène faisant intervenir une multitude de cellules, que ce soit des progéniteurs hématopoïétiques, des cellules structurales comme les cellules endothéliales mais également des cellules immunitaires. Cette régulation est due à l'expression circadienne de leur récepteur influençant leur recrutement à travers les tissus métaboliques<sup>571</sup>.

#### 3.5.1.1 Développement et migration des cellules de la moelle osseuse à partir des progéniteurs hématopoïétiques

Cette oscillation de leucocytes dans le sang s'explique par la libération des cellules immunitaires matures comme les neutrophiles et les monocytes ainsi que les progéniteurs hématopoïétiques (HSPC) à partir de la moelle osseuse en début de phase inactive chez la souris. La libération de ces cellules est médiée par l'expression de CXCL12 qui est régulée par la sécrétion circadienne de noradrénaline par le système nerveux sympathique dans la moelle. Cette hormone adrénergique agit au niveau des cellules mésenchymateuses qui forme la niche hématopoïétique afin de diminuer l'expression de CXCL12<sup>572</sup>. De plus, une étude récente a démontré que la différenciation et le maintien des progéniteurs hématopoïétiques sont également soumis à un contrôle circadien. En effet, en début de journée (phase inactive

chez la souris), on observe une augmentation du niveau de norepinephrine (NE) et de TNF $\alpha$ . Cette augmentation aura pour conséquence d'induire la différenciation des HSPCs. Ce phénomène se fait *via* l'augmentation du niveau de ROS intracellulaire, décrit comme initiant cette différenciation<sup>573</sup>. Parallèlement, la NE et le TNF $\alpha$  vont augmenter la perméabilité de la paroi vasculaire, favorisant ainsi la libération des leucocytes à partir de la moelle vers la circulation sanguine durant la journée. A l'inverse, on observe une augmentation de mélatonine en début de nuit (phase active chez la souris) destinée à réduire la capacité de différenciation de ces progéniteurs, par l'intermédiaire des macrophages Cox-2/ $\alpha$ SMA sensibles à cette hormone, et qui limitent le niveau de ROS au sein des HSPCs (Figure 31)<sup>574</sup>.

De plus, il est intéressant de noter que le système du complément est également impliqué dans ce phénomène. Précisément, la voie du complément C5 subit des oscillations circadiennes qui influencent la sortie des HSPCs de la moelle vers la circulation sanguine en agissant notamment sur la concentration sanguine en protéine sphingosine-1 phosphate (S1P) (Figure 31). En ce sens, la délétion d'une protéine du complément C5 chez la souris engendre une perte de rythmicité dans le recrutement des HSPCs après une transplantation sanguine de ces cellules, mettant ainsi en évidence l'importance de ce système au sein de l'immunosurveillance de l'organisme<sup>575,576</sup>.

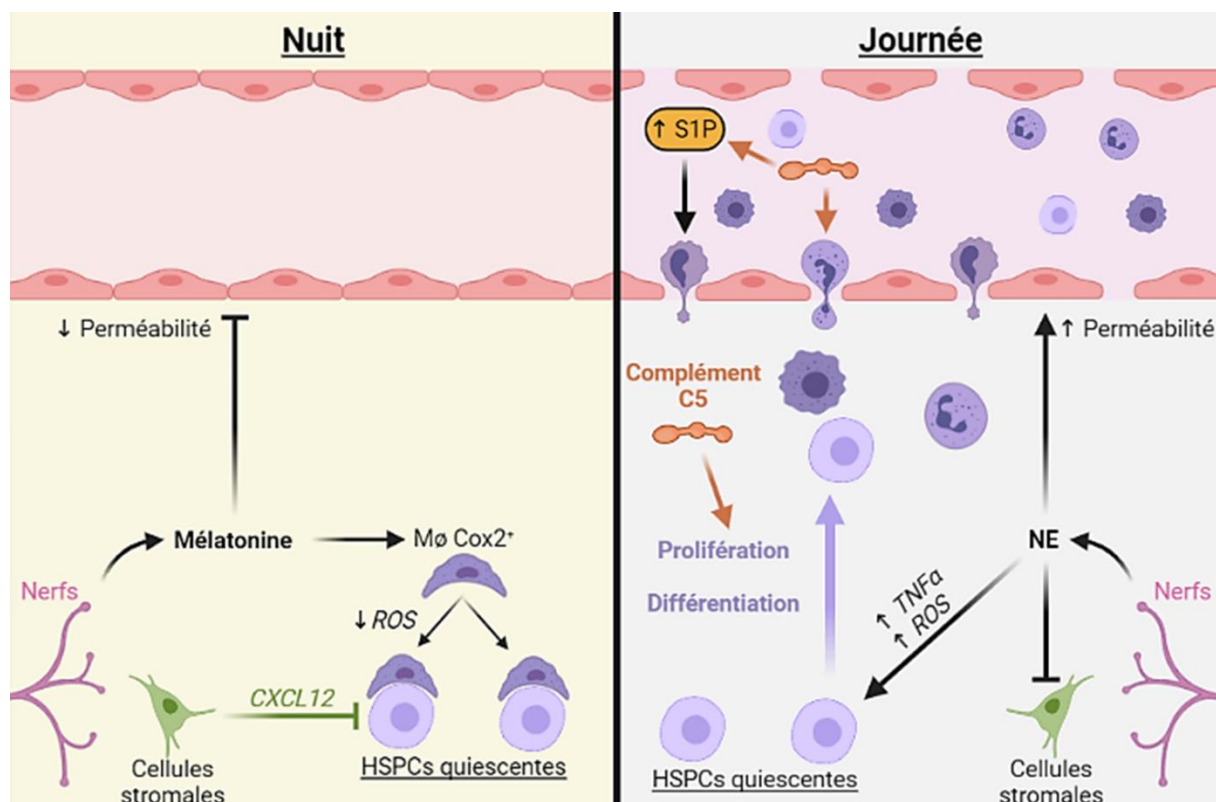


Figure 31 : Régulation circadienne du développement et de la sortie des progéniteurs hématopoïétiques chez la souris.



### 3.5.1.2 Recrutement des leucocytes au sein des tissus

A l'inverse, le recrutement des leucocytes circulant dans les différents organes se produit au début de la phase active de l'organisme. Par exemple, on retrouve l'infiltration maximum des monocytes au niveau du cœur et du muscle squelettique à ZT13 chez la souris<sup>577</sup>. Cette infiltration circadienne vise à anticiper les moments où le risque d'infection est le plus élevé. Cela facilite le renouvellement des différentes populations immunitaires dans les tissus afin de maintenir une immuno-surveillance optimale de l'organisme.

Ces oscillations dans l'infiltrat leucocytaire sont dues à une régulation différentielle de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, qui assurent la diapédèse des leucocytes dans ces vaisseaux mais également la transmigration vers les différents organes. La plupart des protéines intervenant dans ce phénomène telles que les protéines VCAM-1, ICAM-1, la sélectine P et E exprimées dans les cellules endothéliales sont régulées de manière circadienne. Il est par ailleurs intéressant de noter que ces protéines ne sont pas régulées de façon ubiquitaire et qu'il existe une spécificité de régulation en fonction de l'organe cible (Figure 32). En effet, pour le recrutement des monocytes dans le muscle, seule l'expression de la protéine ICAM-1 sera régulée de manière circadienne<sup>578</sup>. A l'inverse, le recrutement des leucocytes dans la rate fera intervenir une régulation circadienne de la sélectine L et VCAM-1<sup>579</sup>. De façon complémentaire, les protéines se fixant à ces différents récepteurs endothéliaux oscillent également pendant la journée. Nous allons ainsi observer une rythmicité d'expression de la protéine CD49d qui permet la fixation des neutrophiles et des lymphocytes (B et T) au récepteur VCAM-1<sup>580</sup>. Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine de ce phénomène d'expression différentielle sont encore inconnus. Cependant, nous observons chez les souris délétées de façon globale pour *Bmal1* une perte de rythmicité de la circulation des HSPCs dans le sang mais également de la migration leucocytaire au sein des tissus et organes. Précisément, une étude a montré que la protéine Clock se fixe grâce à une séquence E-Box au promoteur de ICAM-1 afin de réguler son expression au sein des cellules endothéliales<sup>581</sup>. L'ensemble de ces données souligne le rôle essentiel de l'horloge dans le recrutement leucocytaire<sup>578</sup>.

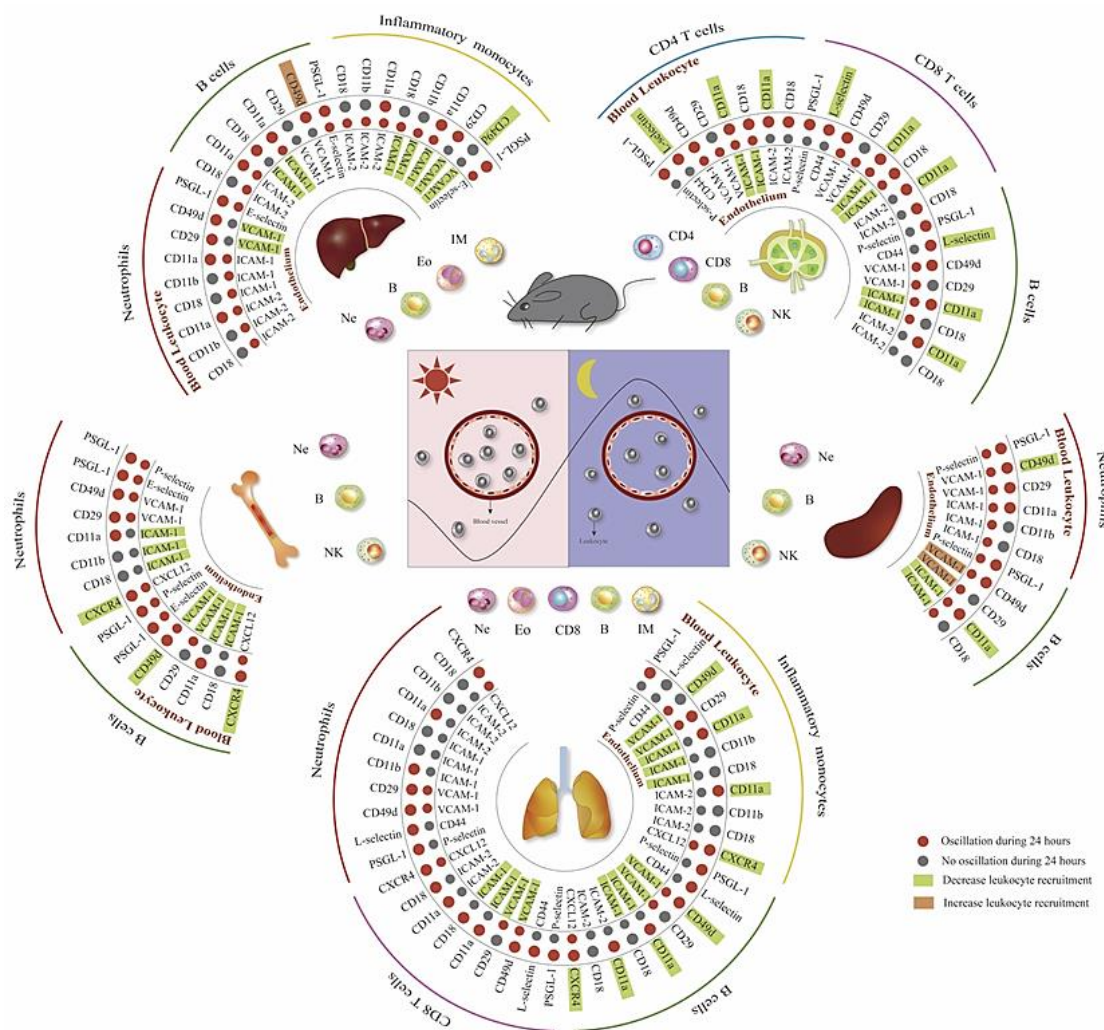


Figure 32 : Régulation circadienne du recrutement leucocytaire dans les différents tissus métaboliques (adaptée de Yuan et al., 2020)<sup>577</sup>.

### 3.5.2 Contrôle circadien des protéines chimioattractantes et des signaux inflammatoires

En plus, des variations circadiennes de l'expression des protéines intervenant dans la fixation et le recrutement des cellules immunes dans les tissus, bon nombre d'autres messagers intervenant dans le chimiotactisme des leucocytes à partir du sang sont également contrôlés par l'horloge.

Pour les neutrophiles, au-delà de la libération circadienne de ces cellules à partir de la moelle via l'axe CXCL12-CXCR4 (C-X-C motif Chemokine Receptor 4), le recrutement de ces derniers dans les tissus dépend également d'une multitude d'autres messagers<sup>582,583</sup>. Parmi lesquels on retrouve la chimiokine CXCL5 qui est impliquée dans le recrutement des neutrophiles dans les poumons suite à une infection bactérienne ou à une stimulation par du LPS. Cette chimiokine est sécrétée par les cellules épithéliales pulmonaires (Clara cells) et est régulée par l'horloge centrale et les niveaux de glucocorticoïdes, comme en témoigne la

perte d'oscillation de l'expression de CXCL5 suite à une adrénalectomie (Figure 33)<sup>584</sup>. Une étude récente a mis en évidence une régulation inédite de l'horloge dans les neutrophiles en introduisant la notion de « timer » chez ces cellules. Lorsque le neutrophile quitte la moelle osseuse, un vieillissement programmé régulé par l'action de Bmal1 sur le gène *Cxcl2*, permet une action autocrine sur le récepteur CXCR2. Cette dernière déclenche la sénescence des neutrophiles, favorisant ainsi une réponse inflammatoire effective et une limitation des accidents vasculaires<sup>570</sup>.

La circulation des éosinophiles est également soumise à des variations circadiennes dans le sang chez l'Homme<sup>585</sup>. Ces oscillations sont également visibles au sein des poumons avec un pic du nombre d'éosinophiles le matin chez l'Homme<sup>586</sup>. Cependant, ce recrutement a principalement été étudié dans les intestins. En effet, une étude de 1999 place l'éotaxine comme une chimiokine majeure dans le recrutement circadien des éosinophiles au sein du tractus gastro-intestinal<sup>587</sup>. Une étude plus récente décrit les ILC2 comme cellules immunitaires intervenant en tant qu'intermédiaire dans le recrutement des éosinophiles dans l'intestin. Cette étude relie la prise alimentaire aux oscillations de recrutement des éosinophiles. Précisément, l'apport de nourriture induit la production du peptide vasoactif intestinal (VIP) qui engendre la production circadienne d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC2, entraînant le recrutement circadien des éosinophiles<sup>588</sup>.

Le recrutement des monocytes semble être contrôlé en grande partie par l'expression circadienne de CXCR4 à la surface des cellules, permettant de contrôler à la fois la sortie de la moelle comme l'entrée dans le foie et les poumons chez la souris<sup>579,589</sup>. En parallèle, les monocytes peuvent être recrutés *via* l'axe CCL2-CCR2 notamment au niveau des artères (Figure 33)<sup>590</sup>. Dans ce contexte, il n'est pas étonnant d'observer une perte de la rythmicité de recrutement des monocytes en condition inflammatoire lorsque l'horloge est altérée dans ces cellules<sup>591</sup>.

Concernant les lymphocytes B et T, on observe également une rythmicité circadienne de leur trafic durant la journée. En effet, ces lymphocytes sont plus représentés dans le sang durant la nuit chez l'humain, avant de rejoindre les différents tissus lors du début de la phase active<sup>592,593</sup>. Pick et al. ont par ailleurs montré qu'un raccourcissement de la photopériode stimule le nombre de lymphocytes B dans le sang. A l'inverse, un rallongement de cette photopériode augmente de façon significative le nombre de cellules T activées<sup>580</sup>. Une autre étude, menée chez l'Homme, a relié ce phénomène au niveau de cortisol dans le sang qui augmente le matin, induisant l'expression du récepteur CXCR4 sur les cellules T ce qui permet leur infiltration dans les tissus. De plus, les auteurs ont démontré que le blocage de la sécrétion

de cortisol permettait de prévenir l'augmentation de l'expression de CXCR4 dans ces cellules ce qui a pour conséquence d'abolir ce recrutement dans les tissus le matin<sup>594,595</sup>.

Chez la souris, on observe à l'inverse une augmentation du nombre de lymphocytes T CD4, CD8 et B dans la circulation à ZT5 ainsi qu'une augmentation de ces cellules dans les ganglions lymphatiques à ZT13 (début de phase active de la souris). Cela est due au contrôle de l'expression du récepteur CCR7 par l'acteur de l'horloge *Bmal1*<sup>596</sup>. En effet, la délétion de *CCR7* induit une perte de rythmicité du recrutement des lymphocytes au niveau des ganglions. Or, la délétion de *Bmal1* induit le même phénotype en altérant l'expression circadienne de CCR7 dans les cellules T et B<sup>596</sup>.

De façon intéressante, Shimba et al. ont montré que le recrutement circadien des lymphocytes T au sein des ganglions lymphatiques est également médié par les glucocorticoïdes dont les variations journalières vont induire l'expression circadienne du récepteur à l'IL-7 dans ces cellules. Ce récepteur est à l'origine de l'expression de CXCR4, responsable du recrutement des lymphocytes au sein des ganglions lymphatiques. Cela conduit à une meilleure réponse des lymphocytes T suite à une immunisation par l'ovalbumine, induisant une augmentation plus importante de ces cellules au sein des ganglions lorsque l'antigène est injecté à ZT16 plutôt qu'à ZT4<sup>597</sup>. Cette étude est d'ailleurs à mettre en perspective avec le recrutement des cellules dendritiques, au sein des ganglions, qui suit une cinétique similaire à celui des lymphocytes afin d'optimiser l'activation du système adaptatif par ces cellules présentatrice d'antigène (Figure 33)<sup>596,598</sup>.

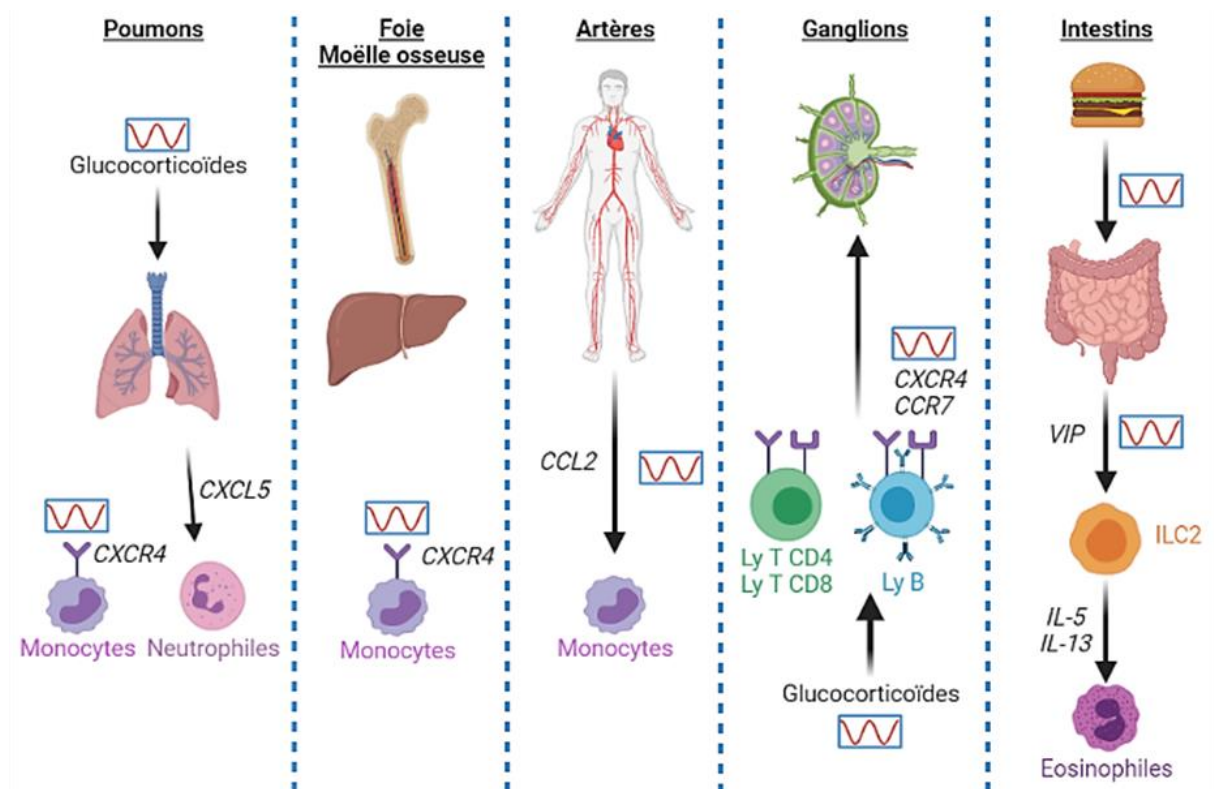


Figure 33 : Rythmicité circadienne des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'organisme.

### 3.5.3 L'horloge circadienne régule la fonction des cellules immunitaires

L'horloge circadienne ne régule pas uniquement le trafic leucocytaire dans l'organisme mais également leurs fonctions cellulaires. Cette régulation implique plusieurs processus. Tout d'abord il a été montré que, durant la phase active, les différentes cellules immunitaires présentent une meilleure capacité de détection des pathogènes *via* une augmentation du nombre de récepteurs Toll-like (TLR) 1 à 9 à leur surface (à l'exception du TLR5)<sup>598–600</sup>. Cela se traduit par une réponse immunitaire plus efficace en phase active en réponse au LPS (ligand de TLR4), avec une augmentation significative de la concentration plasmatique d'IL-6, IL-12, CCL5, CXCL1 et CCL2 par rapport aux concentrations observées en phase inactive (Figure 34). Ces mécanismes sont dépendants des composants moléculaires de l'horloge, comme en atteste la perte d'oscillation de la sécrétion de ces cytokines dans des modèles de souris délétées pour *Bmal1* ou *Rev-erba* spécifiquement dans les macrophages<sup>453</sup>. De plus, les cellules immunes comme les macrophages et les neutrophiles ont une capacité de phagocytose et de cytotoxicité plus importante durant la phase active<sup>601,602</sup>. Cette capacité semble être médiée directement par *Bmal1* au sein des macrophages et par la régulation circadienne de l'expression de RhoA, un régulateur du cytosquelette<sup>603</sup>. Cette capacité de phagocytose majorée pourrait également s'expliquer par la dynamique des mitochondries au

sein de ces populations immunitaires. En effet, une étude *in vitro*, réalisée sur des macrophages murins péritonéaux synchronisés, montre que la fusion des mitochondries régit par l'horloge est nécessaire pour la réalisation de la phagocytose. Cette donnée amène un nouveau lien entre horloge circadienne, métabolisme et immunité<sup>604</sup>. De façon intéressante, certaines cellules immunitaires comme les macrophages et les cellules NK possèdent des récepteurs à certaines hormones tels que le récepteur à la mélatonine et le récepteur au  $\beta$ -adrénergiques. Cette caractéristique conduit à une régulation circadienne de leur fonction indépendamment de leur horloge intrinsèque, notamment sur leur capacité de phagocytose et de libération de certaines cytokines comme le TNF $\alpha$  (Figure 34)<sup>602,605</sup>.

De surcroît, des études humaines menées dans un contexte allergique mettent en évidence que l'horloge impacte la fonction des éosinophiles et des mastocytes. Ces analyses ont montré un contrôle de l'horloge sur la sécrétion des médiateurs par ces cellules, comme pour la protéine cationique (ECP) chez les éosinophiles ou l'histamine et les leucotriènes chez les mastocytes<sup>606,607</sup>.

D'un point de vue moléculaire, les interactions transcriptionnelles entre les composants de l'horloge et les différents effecteurs de la fonction immunitaire ont été largement étudiées. Par exemple, le promoteur du récepteur TLR9 est directement sous le contrôle du complexe Bmal1/Clock<sup>454</sup>. Bmal1 contrôle également l'expression de la cytokine IL-1 $\beta$  dans les macrophages *via* l'activation de la voie NRF2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2)<sup>608</sup>. Les facteurs Cry1 et Cry2 régulent l'expression de l'IL-6, de CXCL1 et de INOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) *via* une régulation de la voie NF- $\kappa$ B dans les macrophages issus de la moelle et dans les fibroblastes<sup>609</sup>. Rev-erba a également été décrit comme un régulateur direct de l'expression de CCL2 au sein des macrophages et son activation pharmacologique entraîne la suppression de l'induction de l'expression de CCL2 en réponse au LPS<sup>454</sup>. La capacité des cellules NK à sécréter de l'IFN $\gamma$ , de la perforine et de la granzyme B est également sous le contrôle de l'acteur circadien Per1<sup>610</sup>. Dans la lignée lymphoïde, les ILC2 semblent sensibles à l'horloge centrale *via* la connection de ces cellules avec le médiateur nerveux neuromedin U. En effet, ce médiateur semble rythmer la capacité effectrice de ces cellules dans l'intestin, assurant ainsi une réactivité optimale face à une infection parasitaire<sup>611</sup>. Une approche similaire a été explorée au sein des ILC3 où la production de VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) suite à la prise alimentaire régule directement la fonction des ILC3 en réprimant l'expression de l'IL-22<sup>612</sup>.

L'horloge intrinsèque des cellules dendritiques (DCs) a également été décrite comme jouant un rôle majeur dans la protection de l'organisme face aux parasites. En effet, Hopwood et al.

ont montré que Bmal1 est responsable de la réponse circadienne des DCs au parasite *Trichuris muris*. Précisément, Bmal1 régule la capacité de ces cellules à polariser les cellules T en sécrétant de l'IL-12 en réponse à ce parasite<sup>613</sup>.

Les rythmes circadiens contrôlent également la capacité de réponse des lymphocytes B. En effet, des études portant sur l'injection intradermal d'un antigène soluble ont démontré une production plus importante d'anticorps par ces cellules lorsque l'antigène est injecté à ZT5 plutôt qu'à ZT17 (Figure 34)<sup>614</sup>.

Une étude très récente a apporté un nouvel intermédiaire dans ce contrôle circadien de l'immunité : le microbiote. Cette étude a montré une fixation circadienne des bactéries filamenteuses segmentées, avec notamment une fixation maximale en début de phase active chez la souris. Cela induit en réaction une sécrétion de peptides antimicrobiens plus importante par les cellules épithéliales intestinales. Précisément, cette action du microbiote fait intervenir les cellules myéloïdes et les ILC3 ce qui permet une résistance accrue à une infection au *Salmonelle* durant la phase active de l'animal<sup>615</sup>.

Enfin, le système du complément qui est impliqué dans la défense innée et adaptative semble également sous le contrôle des rythmes circadiens. Ce système permet, en outre, d'assurer une immunosurveillance de l'organisme mais aussi de faciliter les réponses immunitaires en reconnaissant une multitude de molécules comme les anticorps agrégés, certains antigènes ou encore l'ADN et l'ARN de cellules apoptotiques. L'initialisation de ce système favorise donc l'activation du système innée et la lyse des cellules apoptotiques ou des pathogènes, mais également la stimulation du système adaptatif avec notamment la production d'anticorps et la polarisation des lymphocytes T. Chez l'humain, certaines protéines impliquées dans ce système présentent également des variations circadiennes d'expression dans le sang, notamment la MAC (Membrane Attacking Complex)<sup>616</sup>. D'un point de vue moléculaire, les études portant sur la régulation transcriptomique des composants du complément par les acteurs de l'horloge demeurent réduites. Cependant, un modèle murin de double délétion de *Cry1* et *2* fait état d'une augmentation significative du composant C3, induisant une activation de ce système chez ces souris<sup>617</sup>. Une autre étude s'intéressant à la délétion de *Cry* a mis en évidence une diminution du composant C1q, démontrant à nouveau l'action de l'horloge sur l'expression des composants du système du complément<sup>453</sup>.

Il est pertinent de noter que la relation entre l'horloge circadienne et l'immunité n'est pas unilatérale. En effet, l'inflammation va également réguler l'horloge circadienne. D'un point de vue physiologique, une inflammation chronique réduit l'activité locomotrice des souris. Une application continue de TNF $\alpha$  chez des souris pendant 3 jours induit une diminution de l'activité et une augmentation de la phase de repos, témoignant ainsi d'une perturbation de l'horloge



circadienne<sup>618</sup>. Au niveau moléculaire, les conséquences d'une inflammation sur les gènes de l'horloge sont nombreuses. Une injection de LPS va par exemple induire une diminution de l'expression de *Bmal1* tandis qu'une infection à la salmonelle affecte l'expression de *Per2* dans les macrophages<sup>619,620</sup>. Dans d'autres cellules, l'injection de  $TNF\alpha$  va diminuer l'expression de *Per1* dans les fibroblastes alors qu'une inflammation induite par de l' $IFN\alpha$  altère l'expression de *Bmal1* et *Clock* au sein des hépatocytes<sup>618,621</sup>. Une dernière étude fait mention de la dégradation de *Rev-erba/b* dans des cellules épithéliales bronchiques humaines en réponse à une stimulation par de l' $IL-1\beta$  ou du  $TNF\alpha$ <sup>435</sup>. L'ensemble de ces études montrent toutefois que la perturbation de l'horloge par une inflammation chronique est temporaire, avec une perturbation maximum de 3 jours. Néanmoins, les cellules immunes gardent leur capacité à demeurer synchroniser avec le rythme circadien de l'organisme en cas d'inflammation prolongée<sup>622</sup>.

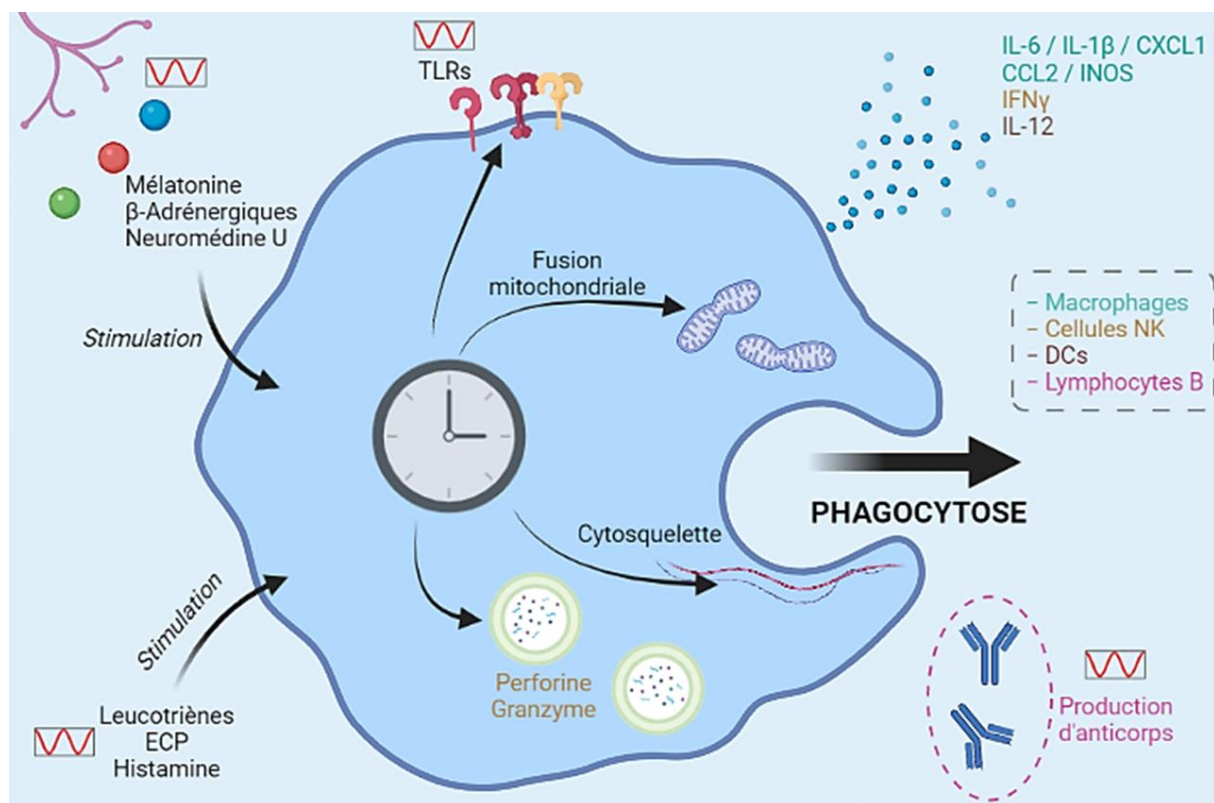


Figure 34 : L'horloge biologique conditionne la fonction des différentes cellules immunitaires.

### 3.5.4 Chronothérapies visant les cellules immunes

L'étude des rythmes circadiens ces dernières années a permis de mettre en évidence son rôle central dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme. Une étude de 2014 montre d'ailleurs que 56 médicaments sur les 100 plus vendus dans le monde cible directement ou



indirectement des produits de l'horloge circadienne<sup>365</sup>. Dans cette optique, la mise en place de chronothérapies ou l'utilisation de molécules visant à moduler l'horloge circadienne semble extrêmement intéressante, notamment au sein de l'immunité. En effet, le recrutement circadien des différentes populations immunes peut être restreint à un temps particulier de la journée afin d'optimiser l'effet escompté. Dans cette optique, l'étude de Winter et al. démontre que l'administration d'un antagoniste de CCR2 au début de la phase d'infiltration des cellules myéloïdes au niveau de la macrovascularisation (ZT17) réduit l'infiltration de ces cellules et en conséquences, la surface des plaques d'athérosclérose diminue par rapport à des souris contrôles. Cette étude est d'autant plus intéressante qu'elle ne modifie pas le recrutement leucocytaire au niveau de la microvascularisation<sup>590</sup>. Une étude similaire a montré que le traitement avec un inhibiteur de CXCR2 réduit non seulement le recrutement des neutrophiles mais aussi le nombre d'infarctus du myocarde<sup>623</sup>. De plus, le traitement avec un agoniste de Rev-erba limite l'inflammation en agissant sur la voie NLRP3 des macrophages et diminue ainsi le taux de mortalité de 70% dans des modèles murins présentant une hépatite fulminante<sup>452</sup>.

Enfin une étude clinique impliquant un traitement composé d'anticorps neutralisants anti IL-5 chez des patients asthmatiques a également incorporé une donnée circadienne. Etant donné que la concentration de cette interleukine est plus élevée le matin chez l'homme, cette étude a privilégié l'administration d'anticorps neutralisant au zénith de la concentration sanguine d'IL-5, permettant ainsi une réduction significative du nombre d'éosinophiles dans le sang mais aussi de l'intensité des symptômes allergiques chez ces patients comparé au groupe placebo<sup>586,624</sup>. L'ensemble de ces études démontrent l'importance de la composante temporelle dans le traitement de certaines pathologies inflammatoires et initie de nouvelles études cliniques.

Cette approche peut également être rapportée à la défense de l'organisme contre les pathogènes. En effet, des données de 2019 montrent que le ciblage de l'activité des protéines Rev-erba et Bmal1 notamment par des agonistes, peuvent avoir des effets bénéfiques sur la protection contre certains virus comme l'hépatite C, certains flavivirus ou encore le virus HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus 1)<sup>625,626</sup>.

Enfin, le contexte actuel de pandémie par le SARS-CoV-2 met en lumière l'émergence de la chronothérapie comme une solution fiable afin de mieux contrôler cette situation. Dans une étude récente, une équipe a mis en évidence que, sur les 332 protéines humaines susceptibles de réagir avec le virus SARS-CoV-2, 30% d'entre elles présentaient une expression circadienne. Dans ce contexte, des études supplémentaires pourraient apporter une donnée de temporalité précieuse dans la défense de l'organisme par rapport à ce virus, que ce soit en

déterminant le moment de la journée au cours duquel nous sommes le plus sensible à cette infection ou en précisant une fenêtre d'action optimale pour l'administration des différents traitements proposés pour combattre le SARS-CoV-2<sup>627</sup>.

## 4. LES CELLULES LYMPHOÏDES INNEES (ILCS)

Pendant longtemps, la caractérisation de l'immunité chez les mammifères était triviale avec d'une part, l'immunité innée qui participe à une défense rapide de l'organisme face à un pathogène *via* leur dégradation et la mise en place d'un environnement inflammatoire et d'autre part l'immunité adaptative qui apporte une réponse spécifique *via* l'activation des lymphocytes B et T. Bien que plus tardive, cette réponse a pour objectif de répondre plus efficacement à un pathogène ciblé. En 1986, il a été décrit 2 sous familles de lymphocytes CD4 permettant d'apporter une réponse différente : les lymphocytes T helper amenant une réponse T<sub>h</sub>1 avec la production d'IFN $\gamma$  mais aussi les lymphocytes T<sub>h</sub>2 produisant de l'IL-4 et de l'IL-5<sup>628</sup>. En 2005, une troisième sous famille a été découverte avec les lymphocytes T<sub>h</sub>17 capable de produire de l'IL-17<sup>629</sup>. Depuis, d'autre sous familles ont été découvertes permettant d'approfondir les connaissances sur le système immunitaire adaptatif.

En 2009, des premiers travaux mettent en lumière une nouvelle population immunitaire n'appartenant ni aux lymphocytes B ni aux lymphocytes T mais capable de présenter une réponse cytokinique similaire aux lymphocytes T<sub>h</sub>2 et T<sub>h</sub>17<sup>630,631</sup>. Ce n'est qu'en 2013 qu'une première classification de ces cellules immunitaire innées est établie<sup>632</sup>. Cette nomenclature décompose cette nouvelle famille en 5 branches : les cellules Natural-Killer (NK), les ILC1 caractérisées par une réponse T<sub>H</sub>1, les ILC2 par une réponse T<sub>H</sub>2, les ILC3 par une réponse T<sub>H</sub>17 et enfin les lymphoid tissue inducer (LTi) cells. Bien que les cellules NK et les cellules LTi aient été découvertes avant les ILCs, différentes études ont démontré qu'elles provenaient de la même cellule progénitrice.

### 4.1 Origine et développement des ILCs

Le développement de la lignée ILC débute par la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellule progénitrice multipotente lymphoïde ou myéloïdes (LMPP ou Lymphoid & Myeloid Primed Multipotent Progenitors). Ces LMPPs s'engagent ensuite dans le développement lymphoïde en donnant des CLP (Common Lymphoid Progenitors)<sup>633</sup>. Ce progéniteur est commun à tous les lymphocytes B, T et aux ILCs. Ces progéniteurs vont

ensuite s'orienter vers un phénotype de précurseurs d'ILCs appelés EILP (Early ILC Progenitors) capables de se différencier en ILCs mais également en cellules NK et cellules dendritiques<sup>634,635</sup>. A ce stade, les progéniteurs donnant des ILCs sont appelés CHILPs (Common Progenitor to all helper-like ILCs) et se divisent en 2 sous-types : les CHILPs GATA3<sup>Low</sup> PLZF<sup>-</sup> se différenciant en progéniteurs des LT $\alpha$ i et les CHILPs GATA3<sup>+</sup> PLZF<sup>+</sup> appelés ILCPs) capables de générer les 3 types d'ILCs (Figure 35)<sup>636</sup>. Suite à différents stimuli et à l'implication de différents facteurs de transcription, ces progéniteurs vont se différencier en ILC 1, 2 et 3. Le développement des ILC1 nécessite une stimulation par l'IL-15 et l'expression du facteur de transcription T-bet pour assurer sa polarisation. Les ILCs 2 et 3 nécessitent une stimulation à l'IL-7. Dans le cas des ILC2, les facteurs ROR $\alpha$  et GATA-3 sont impliqués dans leur différenciation alors que ROR $\gamma$ t est décrit comme favorisant la polarisation en ILC3<sup>637</sup>. A noter qu'un progéniteur intermédiaire appelé ILC2P a été identifié concernant les ILC2 dans la moelle osseuse (Figure 35)<sup>638,639</sup>. ROR $\alpha$  semble particulièrement important dans le processus de différenciation en ILC2 puisqu'une délétion de ce récepteur nucléaire engendre une perte complète des progéniteurs ILC2P ainsi que l'ensemble des ILC2 matures<sup>416</sup>.

Les premières étapes du développement immunitaire de ces populations se déroulent principalement dans le foie foetal puis, les progéniteurs communs des ILCs migrent vers d'autres tissus comme la rate, la moelle osseuse, les intestins, les poumons durant la période néo-natale<sup>637</sup>. Ces progéniteurs demeurent d'ailleurs dans ces tissus périphériques puisque l'on retrouve chez une souris adulte des progéniteurs (EILPs et ILCPs) dans les poumons et les intestins<sup>640,641</sup>. La plupart des ILCs matures se développent durant la période néo-natale et possèdent une longue durée de vie. Cependant, les progéniteurs présents dans les tissus peuvent s'activer suite à des stimuli et permettre une prolifération locale comme cela a été montré dans les poumons où une expansion d'ILC2 est observée suite à une infection par un helminthe<sup>642</sup>.

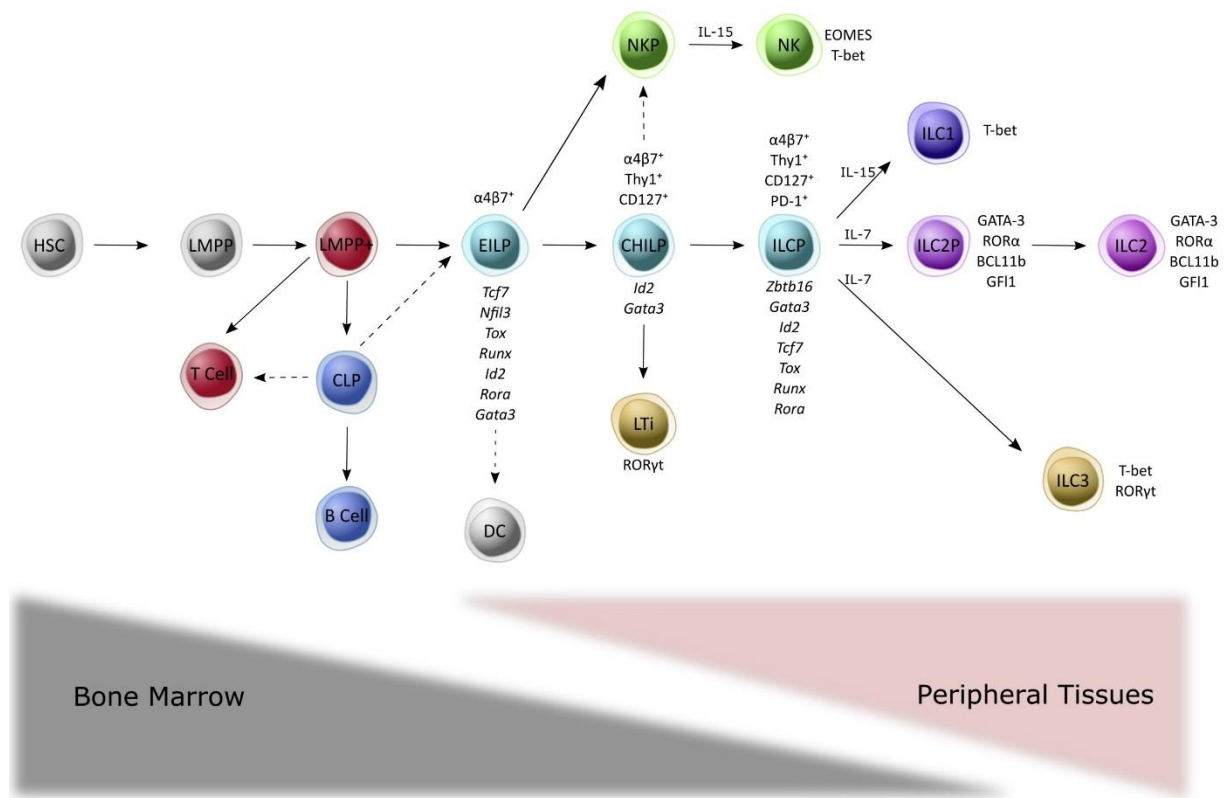


Figure 35 : Développement des ILCs (Ghaedi et al., 2021).

## 4.2 Les différents types d'ILCs

La classification des ILCs rassemble donc les ILC1, 2 et 3 mais aussi les cellules NK ainsi que les cellules LTi au vu de leur développement commun et de certaines propriétés immunitaires semblables. Il a été montré que l'ensemble des 5 membres de cette famille est principalement impliqué dans l'homéostasie et l'immunosurveillance des organes en contact direct avec l'environnement extérieur tels que les poumons, les intestins et la peau.

### 4.2.1 Les cellules Natural Killer

Les cellules NK dérivent des mêmes progéniteurs que les ILCs 1, 2, 3 et nécessitent le facteur Eomes pour leur polarisation<sup>643</sup>. Ces cellules participent à l'immunosurveillance de l'organisme. L'action majoritaire de ces dernières au sein des tissus est d'éliminer les cellules infectées, stressées ou cancéreuses par un mécanisme de cytotoxicité. En effet, la cellule NK va, *via* une réorganisation de son cytosquelette, former une synapse qui rentre en contact avec la cellule cible afin de libérer de la perforine et du granzyme. La perforine est une enzyme qui permet la fragmentation de la membrane plasmique de la cellule cible alors que la granzyme est une protéase qui induit l'apoptose en clivant notamment la caspase 3, initiant le programme apoptotique. Si cette fonction semble représenter une des fonctions principales

des cellules NK, elles sont également capables de sécréter de l'IFN $\gamma$ . Cette cytokine permet d'activer la fonction antimicrobienne des macrophages avoisinants mais également de favoriser la présentation des antigènes par ces mêmes macrophages, déclenchant donc l'immunité adaptative (Figure 36).

Contrairement aux lymphocytes T, cette immunosurveillance n'est pas médiée par une reconnaissance spécifique d'un antigène mais plutôt par une reconnaissance ciblée sur les molécules du soi altérées dans les cellules infectées ou cancéreuses ou encore l'absence de molécule du soi par exemple en absence du marqueur MHC I<sup>644</sup>. La reconnaissance de ce marqueur se fait *via* le récepteur Ly49 présent sur les cellules NK chez la souris et l'absence de MHC I va induire la lyse de cette cellule (Figure 36). Ces cellules sont également capables de fixer les fractions constantes des anticorps *via* leur récepteur CD16, amenant une action cytotoxique ciblée sur des antigènes reconnus par le système adaptatif. Par ailleurs, les cellules transformées, stressées ou cancéreuses peuvent être reconnues par les récepteurs NKp30, NKp44 et NKG2D présents sur les cellules NK<sup>645</sup>. Leur capacité cytotoxique peut de surcroît être activée *via* la stimulation par différentes cytokines comme l'IFN $\gamma$ , l'IL-12, l'IL-15, l'IL-27 ou encore le TGF- $\beta$ . La plupart de ces cytokines peuvent être sécrétées par les cellules dendritiques permettant l'activation des NK<sup>646</sup>. Enfin, il a été montré que les glucocorticoïdes pouvaient également réguler l'activité des NK et notamment la production d'IFN $\gamma$  *via* une action sur leur récepteur Nr3c1.

A la différence de certaines populations d'ILCs, les cellules NK sont capables de migrer dans le sang jusqu'aux structures lymphoïdes grâce à l'expression du marqueur CD62L<sup>647</sup>.

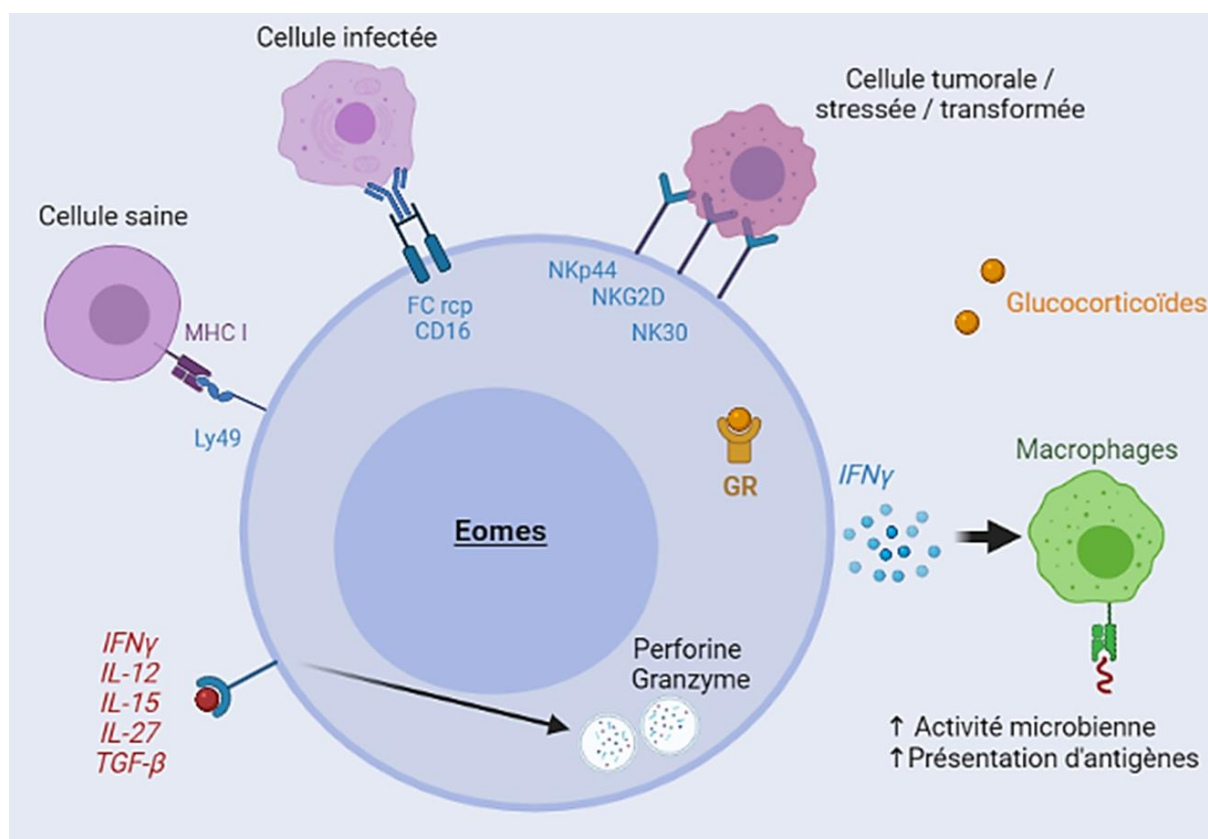


Figure 36 : Les cellules Natural-Killer.

#### 4.2.2 Les ILCs 1

Depuis 2009 et la découverte des ILCs, de nombreuses études ont mis en évidence la présence d'ILC1 au sein du foie, de la lamina propria de l'intestin, de l'épithélium, du tissu adipeux ou encore de l'utérus<sup>645</sup>. Pendant longtemps, les ILC1 ont été associées aux cellules NK puisqu'elles partagent une fonction similaire ainsi que des marqueurs communs comme NK1.1, NKp46 et NKG2D<sup>643</sup>. A l'instar des cellules NK, la capacité de cytotoxicité des ILC1 est plus réduite. Elles peuvent tout de même initier l'apoptose de certaines cellules grâce à la sécrétion de  $TNF\alpha$  et de TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand) permettant l'activation de la voie FAS et de certaines caspases<sup>648</sup> (Figure 37). Les ILC1 peuvent être activées de plusieurs façons notamment *via* la sécrétion d'IL-12 par les DCs qui conduit à la production d'IFN $\gamma$ . Par ailleurs, une étude récente a montré qu'une activation physique des ILC1 était possible. Précisément, les ILC1 peuvent interagir avec les hépatocytes et produire de l'IFN $\gamma$ . Cette sécrétion d'IFN $\gamma$  est possible *via* le relargage d'ATP et d'IL-7 par les hépatocytes<sup>649,650</sup>.

La fonction de ces cellules a été décrite principalement dans la protection des muqueuses face à divers pathogènes comme des parasites (*Toxoplasma gondii*), des virus (Murine Cytomegalovirus) ou dans certaines pathologies comme le sepsis. De surcroît, l'IFN $\gamma$  sécrété

par les ILC1 participe également à la polarisation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire, favorisant l'insulino-résistance dans le tissu adipeux<sup>651</sup>.

Enfin, il a récemment été montré que cette classe d'ILC était capable d'adopter un phénotype mémoire en réponse à un challenge. En effet, les ILC1 hépatiques peuvent réagir à l'haptène d'un antigène et conduire à une réponse immunitaire adaptée sans faire intervenir les lymphocytes T. Un phénotype similaire a par ailleurs été découvert dans un contexte d'infection au virus influenza ou au HIV-1 chez l'humain<sup>652,653</sup>. Une migration des ILC1 entre le foie et les ganglions lymphatiques, *via* l'expression de CXCR3 et CXCR6, semble indispensable au maintien de cette fonction.

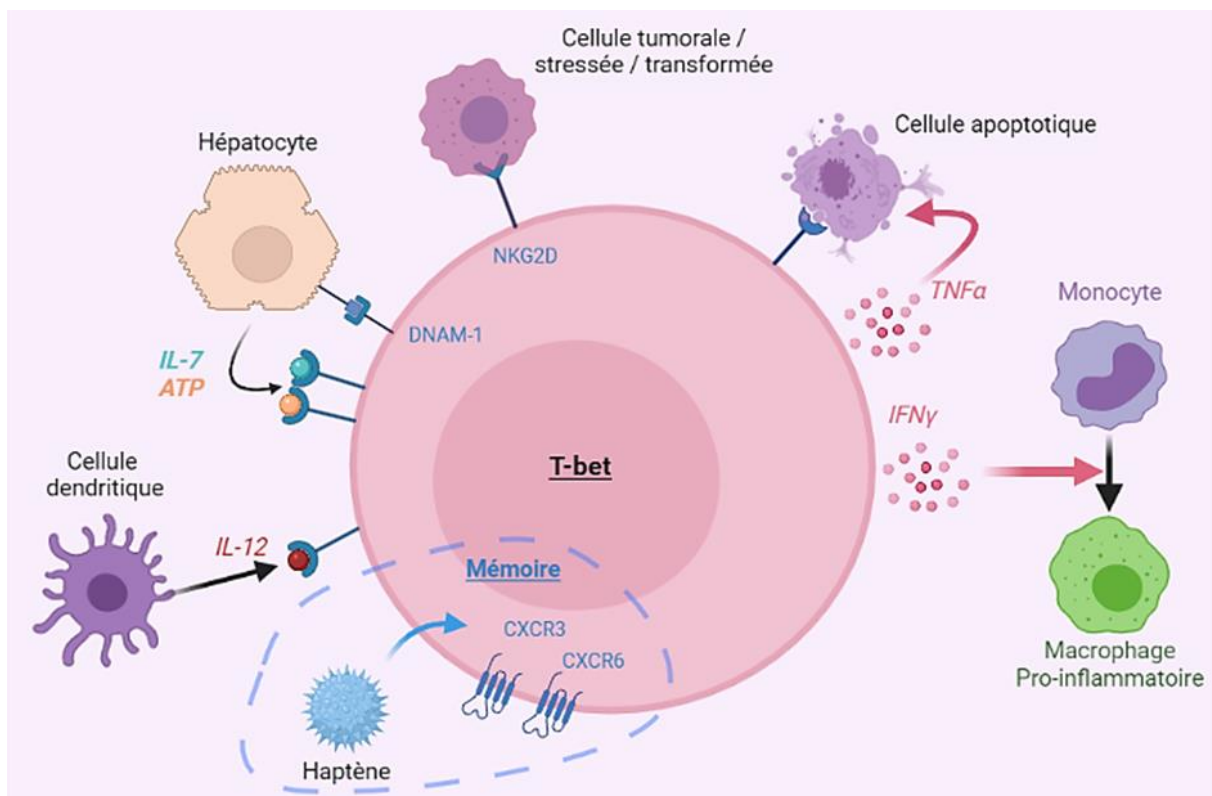


Figure 37 : Les ILC1.

#### 4.2.3 Les ILC2

A l'instar des ILC1 et des cellules NK qui présentent une réponse cytokinique de type  $T_H1$ , les ILC2 répondent à un stimulus par une réponse  $T_H2$ , principalement *via* la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et AREG<sup>654,655</sup>. Cette population d'ILC est largement répandue dans l'organisme puisqu'on en trouve dans l'intestin, les poumons, la peau, le tissu adipeux, le foie, le pancréas et le cœur<sup>656</sup>. De par leur fonction de sentinelle au sein des tissus muqueux, l'activation de cette population immunitaire est modulée par de nombreux facteurs solubles tels que des cytokines, des alarmines, des facteurs neuronaux et des hormones. Parmi ces

facteurs, les alarmines IL-33, IL-25 et TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin) semblent être les activateurs majeurs de ces cellules. En effet, il a été décrit que les cellules stromales présentes dans les poumons, le tissu adipeux et les intestins produisent de l'IL-33 ainsi que du TSLP permettant l'activation de ces cellules<sup>657-659</sup>. En outre, une détérioration de la barrière épithéliale des poumons va induire une production d'IL-25 par les cellules épithéliales capable d'activer elle aussi les ILC2<sup>660</sup>. Cependant, la stimulation par ces alarmines n'est pas suffisante pour induire leur activation et une co-stimulation par d'autres facteurs tels que l'IL-2, l'IL-7, le TGF $\beta$  ou encore le TNF-like Ligand 1A (TL1A) est nécessaire (Figure 38)<sup>645,661,662</sup>. De façon intéressante, les différentes alarmines (IL-25, IL-33 et TSLP) permettent l'activation des ILC2 en régulant l'activité de GATA3, qui est considéré comme un des régulateurs principaux de cette population immunitaire. En effet, ce facteur de transcription se fixe aux promoteurs des gènes de l'IL-5 et de l'IL-13 ainsi que des gènes impliqués dans la prolifération de ces cellules<sup>663-665</sup>. Le neuropeptide NMU a également été décrit comme un co-activateur des ILC2 avec certains médiateurs lipidiques comme LTP4<sup>666,667</sup>. Enfin, il est intéressant de noter qu'une communication complexe entre les lymphocytes T et les ILC2 a été décrite dans certains contextes. Ainsi, au cours d'un traitement intranasal à l'allergène HDM (House Dust Mite), l'activation des ILC2 nécessite ces lymphocytes T. Précisément, une altération de ces lymphocytes inhibe la réponse inflammatoire T<sub>H</sub>2 des ILC2 dans ce contexte<sup>668</sup>. Enfin, ces cellules sont de surcroît sensibles aux hormones et notamment aux hormones sexuelles. En effet, il a été montré que les mâles possèdent moins d'ILC2 et que cette particularité s'explique par le taux d'androgène dans l'organisme. Plus précisément, le précurseur de la testostérone agit sur les ILC2 et réduit l'expression de l'IL-5, de l'IL-13 et également de ROR $\alpha$  chez la souris, réduisant ainsi la fonction et la polarisation de ces cellules<sup>669</sup>. A l'inverse, les hormones féminines comme la progestérone et le 17 $\beta$ -estradiol augmentent significativement l'expression de GATA3, un régulateur clef des ILC2 (Figure 38)<sup>670</sup>.

La réponse T<sub>H</sub>2 médiée par les ILC2 possède plusieurs fonctions au sein des tissus. Ainsi, la sécrétion d'IL-5 favorise le recrutement et l'activation des éosinophiles dans le tissu adipeux<sup>671</sup>. Dans ce même contexte, cette interleukine agit directement sur les adipocytes en favorisant le brunissement du tissu adipeux blanc notamment *via* l'expression d'UCP1<sup>672,673</sup>. L'IL-4 est, quant à elle, impliquée dans la différenciation des lymphocytes T<sub>H</sub>2 afin de coordonner leur réponse immunitaire suite à la rencontre d'un pathogène<sup>674</sup>. Il est par ailleurs intéressant de souligner que cette régulation des lymphocytes T<sub>H</sub>2 par les ILC2 se fait également *via* l'interaction ICOS (Inducible T-cell COStimulator)-ICOS-L et OX40-OX40L<sup>675,676</sup>. L'IL-13 a un rôle plus large et favorise la contractibilité des muscles lisses ainsi que la stimulation des cellules calciformes, conduisant à une production majorée de mucus protecteur face aux pathogènes dans l'intestin et dans les voies respiratoires<sup>677</sup>. De plus, cette cytokine induit



indirectement la prolifération des lymphocytes T<sub>H</sub>2 *via* la stimulation et la migration de certaines DCs vers les ganglions lymphatiques<sup>678</sup>. Enfin, l'interleukine-9 est impliquée dans l'accumulation des mastocytes dans les poumons et stimule l'hyperplasie des cellules calciformes<sup>679</sup>. Par ailleurs, un rôle des ILCs sur les cellules dendritiques a également été décrit dans le pancréas où l'activation des cellules dendritiques (DCs) par les ILC2 permet la sécrétion d'acide rétinoïque. Cet acide aura pour fonction de stimuler la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ <sup>680</sup>.

Bien que la fonction des ILC2 soit également décrite dans un contexte de réponse à un pathogène comme l'expulsion de parasites, son rôle principal semble plus lié à la réparation tissulaire. En effet, l'IL-4 et l'IL-13 permettent la polarisation des macrophages en un phénotype alternatif favorisant ainsi la réparation de la peau<sup>681</sup>. Outre cette fonction indirecte, ces cellules influencent de façon directe la prolifération et la survie des cellules épithéliales dans le poumon et la peau *via* la sécrétion du facteur de croissance AREG (Figure 38)<sup>682</sup>.

Il a également été décrit que, suite à une infection au virus influenza, les ILC2 peuvent également produire certains composants de la matrice extra-cellulaire afin de participer au remodelage des tissus<sup>683</sup>.

Enfin, dans l'intestin et dans les poumons, il a été montré que les ILC2 étaient stimulés directement par un neurotransmetteur : la neuromédine U. En effet, ce transmetteur sécrété par les cellules nerveuses cholinergiques agit sur les ILC2 *via* leur récepteur NMUR1. Précisément, la NMU favorise la phosphorylation de ERK1/2 et favorise la production de cytokines dans ces cellules notamment IL-5, IL-9, IL-13 et AREG<sup>611,684</sup>.

#### 4.2.3.1 Les ILC2 mémoires

Durant de nombreuses années, on pensait que l'acquisition d'une mémoire immunitaire était réservée au système adaptatif *via* l'implication des lymphocytes T et B et leur interaction avec des antigènes spécifiques. Or, il a été mis en évidence que d'autres types cellulaires, comme les cellules NK étaient, elles aussi, capables d'acquérir un phénotype similaire<sup>685</sup>. En 2016, Martinez-Gonzalez et al. ont mis en évidence que les ILC2 peuvent acquérir une mémoire immunitaire. En effet, suite à une première stimulation à l'IL-33 et l'IL-25, cette population acquiert ce phénotype mémoire lui permettant d'amener une réponse plus forte lors de la deuxième stimulation. De surcroît, ce phénotype semble durable puisque les auteurs ont montré qu'il était retrouvé plus de 160 jours après la première stimulation<sup>686</sup>. Précisément, ces cellules présentent une expansion accélérée et une réponse cytokinique supérieure à celle

des ILC2 conventionnels. Cette réponse accélérée est due au stockage intracellulaire d'IL-5 et d'IL-13 (Figure 38). De plus, ces cellules forment un pool capable de se maintenir dans le tissu sur la durée. Une de leur caractéristique particulière l'augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-25 leur permettant d'être activées uniquement *via* l'interaction avec cette alarmine sans aucune nécessité de co-stimulateurs.

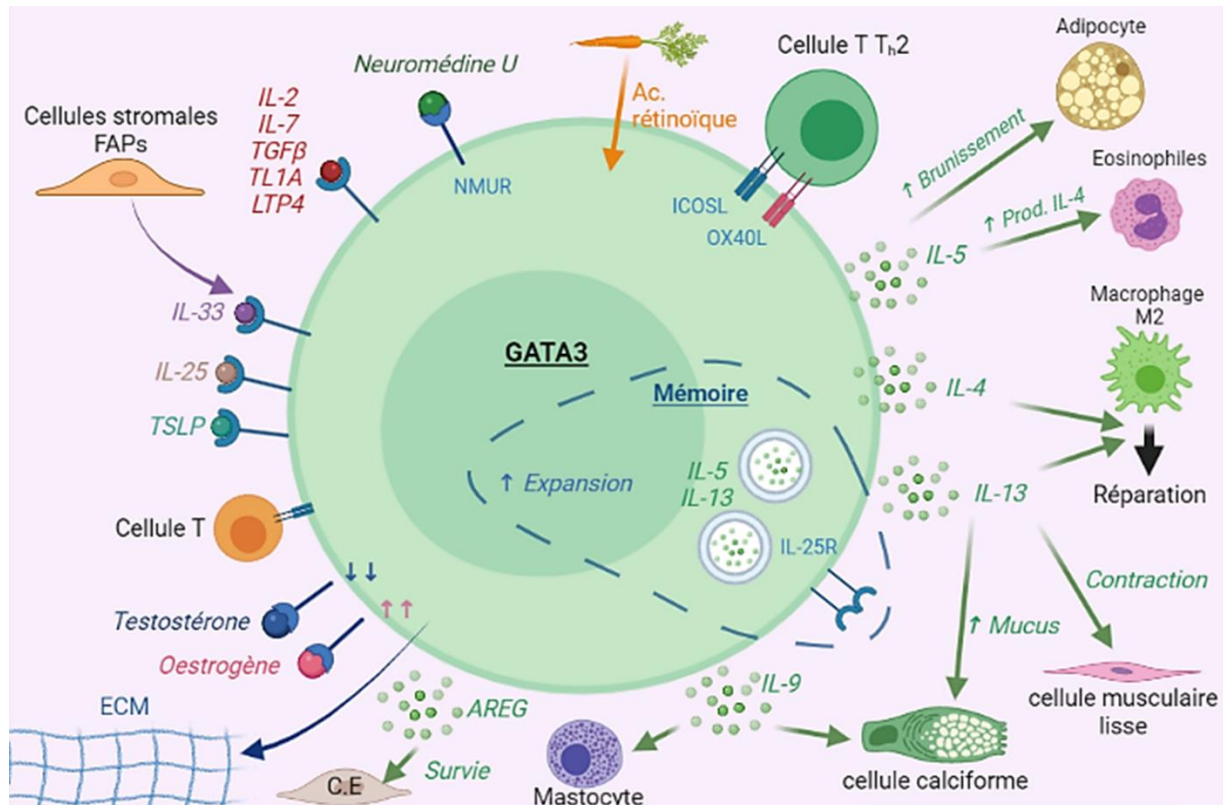


Figure 38 : Les ILC2.

#### 4.2.3.2 Les ILC2 régulateurs

En 2016, une équipe a identifié une population immunitaire, distincte des lymphocytes B et T, capable de produire de grandes quantités d'interleukine-10. Quelques années plus tard, une autre étude a confirmé ces travaux et a identifié les ILC2, introduisant la notion d'ILC2 régulateurs<sup>687,688</sup>. Ces cellules présentent une réponse à l'IL-33 similaire aux ILC2 conventionnels mais persistent durablement dans le tissu après un challenge et répondent plus fortement à une seconde stimulation. Ce phénotype, comparable aux lymphocytes mémoires, est cependant associé à une capacité accrue à recruter des éosinophiles. Aussi, une étude plus récente faite chez l'humain démontre que cette population immunitaire exprime du CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4) et du CD25, deux marqueurs initialement observés chez les lymphocytes T régulateurs en réponse à une stimulation à

l'acide rétinoïque<sup>689</sup>. Dans cette étude, leur fonction immunosuppressive est mise en évidence par leur capacité à diminuer l'activation des lymphocytes T.

#### 4.2.4 Les ILC3

Les ILC3 présentent une réponse  $T_H17$  en réponse à différents stimuli. Bien que cette population soit présente dans d'autres tissus comme les poumons ou la peau, il semblerait que son action soit majoritairement localisée au niveau de l'intestin<sup>690</sup>. Comme les autres ILCs précédemment détaillées, les ILC3 sont sensibles à une grande variété de molécules telles que les cytokines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-7, IL-23, TL1A, TSLP mais également au facteur de croissance SCF (Stem cell Factor). Ces différents facteurs peuvent être sécrétés par les cellules myéloïdes, les cellules T, les cellules épithéliales ainsi que les cellules stromales (Figure 39)<sup>691</sup>. Dans le cas des cellules myéloïdes et des cellules épithéliales, la stimulation des ILC3 engendre une production importante d'IL-22<sup>692,693</sup>. De la même façon que les ILC2, les ILC3 sont également sensibles aux acides rétinoïques contenus dans certains végétaux (carottes, brocolis) facilitant leur migration et leur activation. Il a par ailleurs été démontré que la suppression de cette stimulation diminue drastiquement la production d'IL-22 par ces cellules et induit la mort des souris suite à une infection par la bactérie *citrobacter rodentium*<sup>694</sup>. De surcroît, les acides gras à chaîne courte ainsi que le prostaglandin E2 activent les ILC3 *via* les récepteurs FFAR2 (Free Fatty Acid Receptor 2) et EP4 respectivement<sup>695,696</sup>.

Les ILC3 peuvent être divisées en 2 sous-catégories dépendantes de l'expression de CCR6. Les ILC3 CCR6<sup>+</sup> partagent une grande similarité avec les cellules LT $\alpha$ . En effet, elles sont localisées principalement dans les cryptopatches de la paroi intestinale où elles interagissent avec les cellules myéloïdes *via* l'axe LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 / récepteur LT $\beta$  initiant la réponse des ILCs par la production d'IL-22. De plus, ces cellules interagissent également avec les terminaisons nerveuses présentes dans ce tissu *via* les cellules gliales qui stimulent les ILC3 en sécrétant du GDNF (Glial cell-Derived Neurotrophic Factor) se fixant au récepteur Ret (Figure 39)<sup>697,698</sup>. Enfin, il semblerait que la production d'IL-22 dans les ILC3 CCR6<sup>+</sup> soit plus importante que dans les ILC3 CCR6<sup>-</sup><sup>699</sup>.

De par leur localisation dans les intestins, les ILC3 ont majoritairement une action sur l'homéostasie et la réparation des cellules épithéliales tapissant la paroi intestinale. En effet, le récepteur à l'IL-22 est principalement exprimé par les cellules épithéliales, comme les cellules de Paneth, les cellules souches intestinales ou encore les entérocytes<sup>700</sup>. La sécrétion d'IL-22 par les ILC3 induit la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth pour combattre une infection bactérienne. Cette cytokine agit également au niveau des entérocytes où elle favorise les jonctions entre cellules afin de garantir l'intégrité de la barrière

intestinale. Enfin, au sein des cellules souches intestinales, elle module le stress notamment suite à des irradiations ou des métabolites toxiques<sup>701</sup>. Dans son ensemble, l'IL-22 régule la capacité proliférative de ces cellules pour assurer une réparation efficace de l'intestin, justifiant leur dénomination de cellules sentinelles<sup>702</sup>. Ces cellules sont capables dans ce contexte de promouvoir l'activation des cellules myéloïdes intestinales en sécrétant du GM-CSF. Cette cytokine favorise le recrutement des neutrophiles en cas de dommages de la paroi intestinale et l'activation des lymphocytes T régulateurs<sup>703,704</sup>. Enfin, il est important de noter que l'interleukine-17A peut être également sécrétée par ces cellules et principalement par les ILC3 CCR6<sup>+</sup>. Cette cytokine va avoir des fonctions similaires aux autres cytokines sécrétées par les ILC3 et induire la sécrétion de chimiokines par les cellules épithéliales et endothéliales, mais également de recruter directement les neutrophiles. De plus, l'IL-17 contrôle l'intégrité de la barrière intestinale en régulant les jonctions inter-cellulaires dans ce contexte (Figure 39)<sup>705,706</sup>.

Enfin, des études récentes ont mis en évidence un contrôle circadien de l'activité des ILC3 au sein de l'intestin. En effet, Wang et al. ont montré que les souris délétées pour les acteurs de l'horloge *Bmal1* et *Rev-erba* présentaient une diminution conséquente d'ILC3 au sein de l'intestin et que la production d'interleukine par les ILC3 restantes était elle aussi modifiée<sup>707</sup>. Une seconde équipe a démontré que la régulation circadienne de ces cellules était contrôlée par la prise de nourriture durant la journée. Précisément, un peptide nommé Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) est sécrété durant la prise de nourriture par l'épithélium intestinale, stimulant la production d'IL-22 par les ILC3 *via* la fixation au récepteur VIPR2<sup>708</sup>.

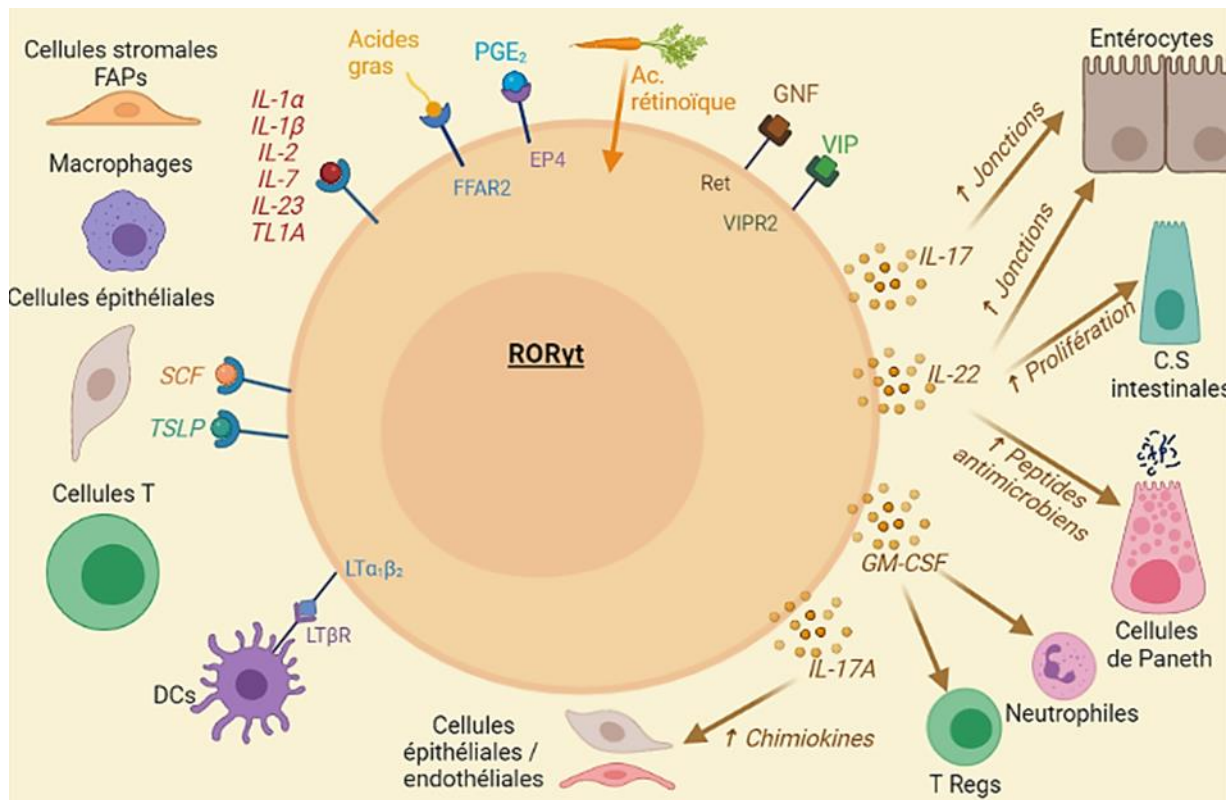


Figure 39 : Les ILC3.

#### 4.2.5 Les cellules LTi

Les cellules LTi dérivent d'un progéniteur commun aux ILCs classiques. Cependant, et à l'inverse des autres membres de la famille des ILCs, cette population a été décrite non pas dans l'homéostasie tissulaire mais plutôt dans la participation à la formation de tissus, et plus précisément dans les structures lymphoïdes secondaires comme les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer<sup>709</sup>. En effet, il a été montré que l'absence de ces cellules induit une désorganisation conséquente de ces structures<sup>710</sup>. A l'âge adulte, les cellules LTi ont principalement été décrites pour leur capacité à activer et stimuler les lymphocytes B et T. En effet, ces cellules peuvent présenter un antigène aux lymphocytes CD4 *via* leur MHC II<sup>711</sup>. Elles permettent également la survie des lymphocytes CD4 mémoires en libérant les molécules de survie OX40L et CD30L<sup>712</sup>. De plus, la libération des molécules BAFF (B-cell activating factor), CD40L, DLL1 et APRIL (A Proliferation-Inducing Ligand) par ces cellules stimule la production d'anticorps par les cellules B<sup>704</sup>. Au niveau de l'intestin, les cellules LTi sécrètent du TNFα et du LTα1β2 responsable de la production de chimiokines par les cellules intestinales, responsables du recrutement des lymphocytes B et des DCs<sup>713</sup>. Enfin, ces cellules semblent partager la même réponse cytokinique que les ILC3 à savoir la production d'IL-22 et d'IL-17 et, de ce fait, jouer le même rôle de maintenance de la barrière intestinale<sup>714</sup>. Cependant, il semble important de noter que les récentes découvertes concernant les ILC3

ont mis en lumière de nombreuses différences entre ces dernières et les cellules LT $\alpha$ i remettant en cause certaines caractéristiques ayant pu être attribuées spécifiquement aux cellules LT $\alpha$ i. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'éclaircir les fonctions distinctes de ces deux populations.

### 4.3 Plasticité des ILCs

Une autre caractéristique commune à ces cellules immunitaires est leur incroyable capacité à modifier leur phénotype afin d'assurer une réponse adéquate dans un contexte particulier. Pour illustrer cela, des études de séquençage d'ARN ont identifié pas moins de 15 sous populations d'ILCs différentes<sup>715</sup>. Cette étude met en lumière certains clusters partageant des similarités entre les ILC1 et 2 mais aussi des clusters intermédiaires entre les ILC2 et 3.

#### 4.3.1 Plasticité ILC1 – ILC3

La capacité des ILC3 à se différencier en un phénotype similaire aux ILC1 est parmi la plus documentée et notamment au sein de l'intestin<sup>716,717</sup>. En effet, une sous population d'ILC3 peut exprimer le récepteur NKp46 uniquement présent sur les ILC1 et les cellules NK. L'expression de ce récepteur est par ailleurs la conséquence d'une augmentation de l'expression du facteur T-bet et de l'activation de la voie NOTCH dans ces cellules<sup>699,718</sup>. De par son phénotype hybride, cette cellule nommée « ex-ILC3 » présente la capacité de sécréter des cytokines T $_H$ 1 comme l'IFN $\gamma$  et des cytokines T $_H$ 17 comme l'IL-22. Cependant, il semblerait que leur production d'IL-17 ne soit plus possible<sup>699</sup>. De plus, dans certains contextes, elles peuvent définitivement se différencier en ILC1 en réprimant totalement l'expression du facteur ROR $\gamma$ t. Des analyses *in vitro* de cellules humaines montrent d'ailleurs que cette polarisation peut être induite *via* une stimulation à l'IL-12<sup>719</sup>. Dans cette même étude, il est montré que la polarisation inverse est également possible en stimulant avec de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-23.

#### 4.3.2 Plasticité ILC1 – Cellules NK

Bien que ces deux types cellulaires proviennent de précurseurs différents, une conversion entre ces deux types cellulaires est possible. En effet, les cellules NK ont démontré une capacité à adopter un phénotype comparable à celui des ILC1 en réponse au TGF- $\beta$ . En effet, après cette stimulation, les cellules NK réduisent fortement leur capacité cytotoxique. Il semblerait d'ailleurs que cette polarisation soit due à la diminution du facteur Smad4<sup>720</sup>. Cette conversion a d'ailleurs été observée chez la souris dans un contexte de NAFLD (Non Alcoholic Fatty Liver Disease) ou après une infection au parasite *toxoplasma gondii*<sup>721,722</sup>.

Enfin, il semble intéressant de noter qu'une conversion des ILC3 vers un phénotype proche des NK ait été observée chez l'homme. Précisément, la stimulation des ILC3 par de l'IL-12 et de l'IL-15 conduit à l'expression de l'Eomes et de T-bet par ces cellules<sup>723</sup>. Cependant, les mécanismes régissant cette polarisation demeurent obscurs.

#### 4.3.3 Plasticité ILC2 – ILC1

Cette plasticité des ILC2 aussi appelé ILC2 de type 1 a été décrit *in vivo* chez la souris suite à une infection au virus influenza<sup>724</sup>. En temps normal, le régulateur principal GATA3 limite cette plasticité notamment en se liant aux éléments régulateurs du gène de l'IFN $\gamma$ . Cependant, une co-stimulation d'IL-12 et d'IL-1 $\beta$  des ILC2 *in vitro* permet cette polarisation *via* une diminution de l'expression du facteur GATA3<sup>725</sup>. De façon intéressante, une stimulation à l'IL-1 $\beta$  est nécessaire à l'expression du récepteur à l'IL-12 par ces cellules ainsi qu'à la sécrétion d'IFN $\gamma$ <sup>726,727</sup>. A l'inverse, la stimulation des ILC2 par de l'IL-4 bloque cette transition *via* la voie STAT6 et permet l'augmentation de l'expression de GATA3<sup>728</sup>. Enfin, ces "ex-ILCs 2" ne peuvent plus produire d'IL-5 mais demeurent capables de produire de l'IL-13 de façon concomitante à la production d'IFN $\gamma$ <sup>729</sup>.

#### 4.3.4 Plasticité ILC2 – ILC3

Des études *in vitro* ont mis en évidence une capacité des ILC2 à produire des cytokines de type T<sub>h</sub>17 en présence de certains facteurs comme l'IL-25, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 mais aussi TGF $\beta$ <sup>730</sup>. Ce phénotype appelé « ILC2 inflammatoire » a été décrit *in vivo* en particulier dans les poumons et dans les intestins<sup>731,732</sup>. Ces ILC2 maintiennent une production similaire d'IL-13 et d'IL-5 aux ILC2 conventionnels mais augmentent leur production d'IL-4<sup>733</sup>. De plus, elles expriment le facteur ROR $\gamma$ t ce qui s'accompagne d'une production d'IL-17. Ces mêmes études suggèrent que la transition vers un phénotype plus inflammatoire est médiée par le facteur c-kit<sup>734,735</sup>. Enfin, une étude fait état d'une capacité de ces cellules à migrer dans l'organisme à partir du sang. Précisément, Huang et al. ont identifié cette population comme capable de migrer entre les différents organes en faisant intervenir le récepteur S1P (Sphingosine 1-Phosphate)<sup>736</sup>.

Bien que la population d'ILC ait été découverte très récemment par la communauté scientifique, les études portant sur ces cellules lors des 10 dernières années ont permis de mettre en lumière un rôle indispensable de ces dernières sur la surveillance tissulaire et la protection contre les pathogènes. De plus, leur formidable capacité d'adaptation à leur

environnement en s'orientant vers un phénotype répondant au mieux aux besoins du tissu place définitivement cette famille immunitaire au premier plan dans la coordination des réponses immunitaires innées et adaptatives ainsi que dans l'homéostasie des différents organes de l'organisme.



## 5. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Ma thèse porte sur l'étude du rôle de l'horloge circadienne dans le maintien de l'homéostasie du muscle squelettique. L'horloge circadienne a été décrite comme jouant un rôle majeur au sein du muscle squelettique, régulant de nombreux paramètres comme sa structure, sa fonction et son métabolisme. Spécifiquement, le composant de l'horloge *Rev-erba* est important dans cette régulation, en influençant sa capacité oxydative, sa biogenèse mitochondriale ainsi que sa capacité autophagique<sup>433</sup>. Dans cette étude, notre équipe a montré que la délétion de *Rev-erba* modifiait significativement l'endurance musculaire des souris. Ma thèse s'inscrit donc dans la continuité de ces études en m'intéressant plus largement au rôle de l'horloge biologique dans le maintien de l'homéostasie du muscle squelettique.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'impact de la modulation du récepteur nucléaire *Rev-erba* sur la taille des fibres musculaires *in vivo* et *in vitro* grâce à des souris délétées de façon globale pour *Rev-erba* et une lignée de myoblaste murins surexprimant de façon constitutive *Rev-erba*. De plus, nous avons analysé les conséquences d'une activation pharmacologique de ce composant de l'horloge *in vivo* à l'aide d'un ligand synthétique (SR9009) suite à un traitement à la dexaméthasone, un glucocorticoïde connu pour engendrer une atrophie musculaire<sup>94,95,97</sup>.

Nous avons ensuite entrepris d'étudier le rôle global de l'horloge circadienne au cours du processus de régénération musculaire. Le muscle est un tissu post-mitotique et le maintien de son intégrité suite à une blessure est dépendante de l'activité des cellules souches musculaires ainsi que du processus inflammatoire. De nombreuses études font état d'une régulation circadienne de différents processus de réparation tissulaire. Par exemple, il a été montré que la régénération de la peau suite à une blessure était 60% plus rapide lorsque celle-ci survient durant la phase active de l'animal<sup>737</sup>. Au sein du muscle, de nombreux articles font état d'une régulation de la myogénèse par plusieurs acteurs de l'horloge tels que *Bmal1*, *Clock* et *Rev-erba*<sup>448,528,738</sup>. Un autre article publié récemment démontre l'implication des gènes de l'horloge *Per1* et *Per2* dans ce processus et met en avant un impact de l'heure de la blessure sur le compartiment myogénique<sup>739</sup>. Or, la composante inflammatoire détient également un rôle primordial dans le processus global de régénération, de par sa capacité de dégradation des débris cellulaires engendrés par la blessure mais également *via* son rôle de support de la myogénèse à travers la sécrétion de nombreuses cytokines et facteur de croissance. Il est aujourd'hui largement démontré que l'horloge biologique régule un grand nombre de paramètres immunitaires tels que la circulation des leucocytes dans l'organisme, leur infiltration au sein des différents tissus mais également leur fonction intrinsèque<sup>740-742</sup>. Ainsi,

au cours de ma thèse nous avons étudié plus particulièrement le rôle de l'horloge au sein des cellules immunitaires dans un contexte de régénération musculaire. Pour cela, nous avons utilisé différents modèles d'altérations environnementales (Jet-lag, lumière constante) ou génétiques (délétion ou surexpression de Rev-erba et RORα) de l'horloge.

Parallèlement à cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle des cellules lymphoïdes innées au cours de ce processus de régénération. En effet, ces cellules sont largement étudiées au sein de plusieurs tissus métaboliques comme les poumons, le tissu adipeux ou les intestins mais leur implication au sein du muscle squelettique n'a été que très peu décrite. En effet, un unique article publié cette année fait mention des ILC2 dans le cadre d'un modèle murin de myopathie. Le rôle des cellules immunitaires diffère largement entre un contexte de muscle sain et un contexte pathologique, il nous semblait donc intéressant d'étudier ces cellules dans un contexte de blessure aiguë du muscle squelettique. De surcroît, les ILC2 partagent avec les lymphocytes mTregs une réponse cytokinique à l'IL-33 comparable. Or, les différentes études réalisées sur le rôle des mTregs dans le processus de régénération musculaire n'ont jusqu'ici pas pris en compte la contribution des ILCs au phénotype observé, ce qui implique qu'une partie des effets attribués aux mTreg pourraient être médiés par les ILC2. Ainsi, dans un premier temps, nous avons entrepris d'analyser la cinétique de recrutement des différents types d'ILCs au sein de la régénération musculaire. Puis, nous avons utilisé un modèle murin de déplétion en ILC2 afin de déterminer la fonction de ces cellules au cours de ce processus.

## **Matériel et Méthodes**

# 1. MODELES ET EXPERIMENTATION ANIMALE

L'ensemble des expériences décrites ci-dessous ont été validées par le comité d'éthique du Haut-de-France en accord avec la directive européenne sur la protection et le bien-être des animaux en laboratoire. Sauf indication spécifique, l'ensemble des animaux présentés dans ce manuscrit ont été élevés dans un environnement dépourvu d'agent pathogène en condition standard (12h jour / 12h nuit) avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

## 1.1 Etude de la masse musculaire chez des souris

Dans cette étude, nous avons utilisé des souris déficientes pour le gène *Rev-erba* ainsi que leurs contrôles. Ce modèle génétique a été créé par Bjorn Vennström<sup>743</sup>. La délétion du gène *Rev-erba* dans cette construction génétique est rendue possible par l'insertion d'une cassette  $\beta$ -geo remplaçant en partie l'exon 2 ainsi qu'une délétion de l'exon 3, 4, 5 et d'une partie de l'exon 6. Ce modèle créé dans le fond génétique C57BL/6J a ensuite été croisé avec des souris de fond génétique SV129 durant 8 générations. L'élevage et la production de souris contrôles ou délétées pour *Rev-erba* est assuré par un croisement entre souris hétérozygotes.

Pour l'étude de la masse musculaire, des souris déficientes en *Rev-erba* (*Rev-erba*<sup>-/-</sup>) âgées de 7 à 12 semaines et leurs contrôles provenant des mêmes portées (*Rev-erba*<sup>+/+</sup>) ont été étudiées. Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale. Les muscles squelettiques (Gastrocnémiens, Quadriceps, Tibialis Anterior (TA) et Soleus) ont été pesés et congelés.

### 1.1.1 Induction d'une atrophie musculaire

Pour induire l'atrophie des muscles squelettiques, des souris Wild-type (WT) âgées de 7-8 semaines ont reçu une injection intrapéritonéale de dexaméthasone à 10 mg/kg/jour ou du véhicule (éthanol) pendant 3 jours consécutifs à 9 heures du matin. Chaque jour, la moitié des souris traitées à la dexaméthasone ont également reçu deux injections de l'agoniste *Rev-erb* SR9009 à 100 mg/kg à 17h30 le jour précédent et 30 min avant l'injection de dexaméthasone. Les muscles du quadriceps ont été prélevés et pesés.

### 1.1.2 Surexpression *in vivo* de *Rev-erba* chez des souris WT

Pour induire la surexpression de *Rev-erba*, la séquence codante de *Nr1d1* a été introduite dans un vecteur AAV1 (Penn Vector Core, Université de Pennsylvanie) et  $3 \times 10^{11}$

copies du génome ont été injectées par voie intramusculaire dans les muscles TA et gastrocnémiens de souris de type sauvage, comme décrit dans une publication de notre équipe en 2013<sup>433</sup>. Le membre controlatéral a été injecté avec un AAV témoin. Six semaines plus tard, les souris ont été sacrifiées et les muscles ont été congelés et conservés jusqu'à l'extraction de l'ARNm.

## 1.2 Modèles génétiques associés à l'étude de l'horloge circadienne dans la régénération musculaire

### 1.2.1 Souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup>

Le modèle présenté ici est le même que celui présenté en 1.1. Ces souris ainsi que leurs contrôles ont subi une blessure musculaire afin d'étudier l'impact de la délétion globale de *Rev-erba* sur le processus de régénération.

### 1.2.2 Souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> ; *Rev-erbaDBD*<sup>fl/fl</sup>

Les souris *Rev-erbaDBD*<sup>fl/fl</sup> ont été obtenues auprès de l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France) et caractérisées dans une publication<sup>506</sup>. Les souris *Rev-erbaDBD*<sup>fl/fl</sup> ont été croisées avec des souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> du laboratoire Jackson afin d'obtenir une invalidation du domaine de liaison à l'ADN du récepteur *Rev-erba* uniquement dans les lignées myéloïdes. Les souris *LysM*<sup>+/+</sup> ; *Rev-erbaDBD*<sup>fl/fl</sup> également obtenues par ce croisement sont utilisées comme contrôle.

### 1.2.3 Souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> ; *Rora*<sup>fl/fl</sup>

De façon similaire, des souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> avec des souris *Rora*<sup>fl/fl</sup>, générées au laboratoire et décrites dans cet article<sup>744</sup>, ont été croisées afin d'invalider le gène *RORα* uniquement dans les cellules myéloïdes. Les souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> ; *Rora*<sup>+/+</sup> sont utilisées comme contrôles.

### 1.2.4 Souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> ; *TG(Rev-erba)*<sup>F/FI</sup>

Les souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> ; *TG(Rev-erba)*<sup>fl/fl</sup> ont été obtenues en croisant les souris *LysM*<sup>Cre/+</sup> avec une construction de souris transgéniques pour *Rev-erba* élaborée au laboratoire. Ces souris ont été obtenues dans un fond C57BL/6J par injection dans l'oocyte. Plus précisément, cette construction se présente comme illustré ci-dessous. On retrouve le promoteur

synthétique pCAG, le gène de la chloramphenicol acetyl-transférase (CAT) floxé puis le gène de *Rev-erba* suivi du gène de la GFP. Après excision du gène CAT par la Cré recombinase, nous obtenons l'expression de *Rev-erba* dans les cellules myéloïdes et l'expression de la GFP.

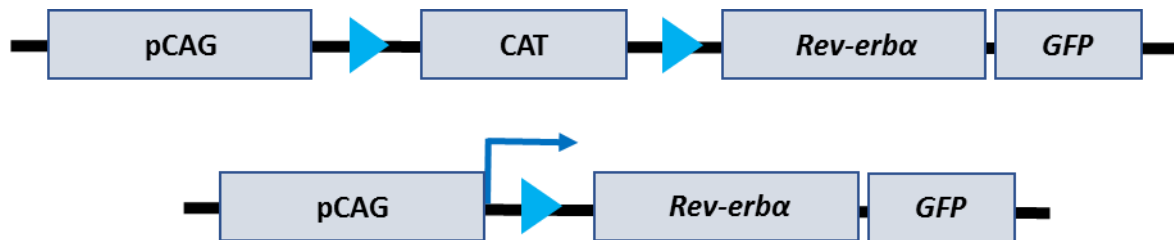


Figure 40 : Construction des souris *Tg(Rev-erba)<sup>fl/fl</sup>*

### 1.3 Protocoles d'altération de l'horloge environnementale

#### 1.3.1 Souris WT blessées à différents temps de la journée

Des souris C57BL/6J de 8 semaines placées en condition standard de lumière (12h/12h) et nourries *ad libitum* ont été blessées au *Zeitgeber time* (ZT) 6 et ZT18. Ces heures correspondent dans notre animalerie à 13h pour ZT6 et 1h pour ZT18. La récupération des tissus après la blessure a été également opérée à ZT6 et ZT18 afin de conserver les mêmes durées de blessure. Les muscles sont récupérés à 7 et 21 jours après la blessure. Un TA est collecté pour les analyses histologiques, 1 TA est utilisé pour les analyses transcriptomiques de même que pour un muscle quadriceps utilisé en RT-qPCR comme contrôle d'un muscle non blessé.

#### 1.3.2 Souris WT soumises à un « jetlag »

Des souris C57BL/6J de 7 semaines ont été soumises à un « jetlag » de 8 semaines. Durant cette période, le « jetlag » consistant à un décalage de 12 heures de la mise en place de la lumière. Ce décalage était avancé ou reculé une semaine sur deux afin d'optimiser l'altération environnementale de l'horloge. Au moment de la blessure musculaire, cette altération environnementale a été stoppée afin d'observer les conséquences de ce « jetlag » sur la régénération du muscle squelettique. Les muscles sont récupérés à 7 et 21 jours après la blessure. Un TA est collecté pour les analyses histologiques, 1 TA est utilisé pour les analyses transcriptomiques de même que pour un muscle quadriceps utilisé en RT-qPCR comme contrôle d'un muscle non blessé.

### 1.3.3 Souris WT soumises à une lumière constante

Des souris C57BL/6J de 8 semaines ont été placées en lumière constante (24heures) durant 3 semaines. A la fin de la première semaine, les souris ont été blessées et les tissus récupérés 7 et 16 jours après cette blessure.

## 1.4 **Modèle génétique associée à l'étude du rôle des ILC2 dans la régénération musculaire**

Des souris mâles C57BL/6J de type sauvage (WT) âgées de 8 semaines ont été utilisées pour l'étude de la cinétique des ILCs durant la régénération musculaire.

Les souris déficientes en ILC2 ont été obtenues en croisant des souris *Rora<sup>fl/fl</sup>*, déjà existantes dans notre laboratoire et des souris *IL7<sup>Cre/+</sup>*, obtenues auprès du Dr Hans-Reimer Rodewald (Heidelberg). Ce modèle de souris *IL7<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>fl/fl</sup>* a été largement utilisé<sup>676</sup>. Les souris *IL7<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>fl/fl</sup>* issues des mêmes portées ont été utilisés comme contrôles.

## 1.5 **Protocole de blessure du TA**

Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine, de xylazine et de solution saline dans les proportions suivantes : 100mg/kg de kétamine, 10mg/kg de xylazine, 120µl de solution saline, pour un dosage de 150µl par souris qui est injecté par voie intrapéritonéale, à l'aide de seringues à insuline de 0,3 ml. Leurs membres postérieurs ont été rasés, puis désinfectés à l'éthanol avant l'injection de Chlorure de Baryum ( $BaCl_2$ ) dans le tibialis antérieur (TA). Le  $BaCl_2$  a été préparé à 0,8% dans de l'eau. 50µl de cette solution ont été injectés dans chaque TA.

## 2. **MODELES CELLULAIRES**

### 2.1 **Isolement et culture de myoblastes murins primaires**

TA, gastrocnémien, soleus, quadriceps, diaphragme, triceps et pectoraux ont été prélevés sur des souris déficientes en *Rev-erba* âgées de 7-8 semaines (*Rev-erba<sup>-/-</sup>*) et sur leurs contrôles WT (*Rev-erba<sup>+/+</sup>*) et digérés dans du milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM ; 4,5 g/L D Glucose ; Gibco) F12 avec de la Collagénase D (0,15 U/mg) et de la Dispase II (0,8 U/mg) pendant 30 minutes à 37 °C. Les muscles digérés sont ensuite filtrés avec un filtre cellulaire 40µm et les précurseurs myogéniques sont isolés à l'aide de kits de

sélection négative et positive (130104268 et 130104268, Miltenyi Biotec). Les myoblastes primaires ont été remis en suspension dans du DMEM/F-12 avec 20% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% de gentamycine, 1 mL d'Ultroser G et 5 ng/mL de FGFb et ensemencés dans des plaques recouvertes de gélatine à 0,1%. Après 3 jours, la différenciation a été induite par l'ajout d'un milieu F-12/DMEM (1:1) complété par 5 % de sérum de cheval pendant 7 jours.

## **2.2 Traitements *in vitro* sur lignée cellulaire C2C12**

Des lignées cellulaires C2C12 surexprimant de manière constitutive *Rev-erba* (REV-ERB- $\alpha$ ) et des lignées de contrôle (pBabe)<sup>433</sup> ont été cultivées dans un milieu DMEM avec 1% de gentamycine et 10% de SVF. A 80% de confluence, la différenciation myogénique a été induite par l'ajout de 2% de sérum de cheval pendant 3 jours. Après 5 jours de différenciation, les cellules ont été traitées avec de la dexaméthasone (20  $\mu$ M) ou un véhicule (éthanol), et du SR9009 (10  $\mu$ M) comme indiqué pendant 3 jours<sup>433</sup>. Pour l'analyse de l'expression des gènes liés à l'atrophie, les C2C12 ont été traités avec de la dexaméthasone (1  $\mu$ M) pendant 2 jours avec ou sans SR9009 (10  $\mu$ M). Pour l'analyse de la translocation nucléaire de FoxOs, les C2C12 ont été traitées avec de la dexaméthasone à 1  $\mu$ M ou le véhicule avec ou sans SR9009 (10  $\mu$ M) pendant une nuit.

## **3. DIGESTION DES MUSCLE ET MARQUAGES POUR LA CYTOMETRIE EN FLUX**

Après avoir sacrifié les souris (uniquement des mâles pour ces expériences), les TA sont pesés puis mis dans 2ml de milieu F12, à 4°C pour le transport. Ils sont d'abord digérés mécaniquement dans un Eppendorf de 2ml, en étant finement hachés à l'aide de ciseaux dans 1 ml de solution digestive enzymatique (collagénase D et DNase I à 0,1 mg/mL). Une digestion mécanique est ensuite réalisée en utilisant le protocole de dissociation GentleMACS. Le mélange est transféré du tube Eppendorf à un tube GentleMACS avec un total de 4ml de solution de digestion. Après homogénéisation, le tube GentleMACS est incubé pendant une heure à 37°C, après 30 minutes le tube est retiré et homogénéisé à nouveau pendant 1 min sur le dissociateur GentleMACS puis remis à 37°C pour 30 minutes supplémentaires. A l'issue de la digestion, l'activité enzymatique est arrêtée en ajoutant 5ml de SVF (sérum de veau fœtal 10270-106, conservé à 4°C) à chaque tube. Le tampon MACS composé de tampon phosphate salin 1X (PBS) et de 0,5% d'albumine de sérum bovin (BSA) est ensuite ajouté aux échantillons avant d'être filtrés sur 70 $\mu$ m et 40 $\mu$ m dans des tubes Falcon de 50 ml. Les tubes sont ensuite centrifugés à 400G pendant 10min avant le comptage des cellules au microscope



avec un hématimètre de Malassez. Après avoir filtré et compté les cellules, celles-ci sont à nouveau centrifugées à 400G pendant 10 minutes ; puis le culot est resuspendu dans 50µl de FC-Block (BD Biosciences 553142) dilué au 1/100 dans le tampon MACS et incubé pendant 20 minutes.

L'étape suivante consiste à réaliser des marquages extra et intra-cellulaire *via* l'utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes. Pour le marquage des cibles de surface, un mélange d'anticorps sélectionnés (**voir 3.1.1-3**) est préparé dans un tampon MACS, et 50µl sont distribués. Après une incubation de 30 minutes à 4°C, les échantillons sont lavés avec 2ml de tampon MACS et transférés dans des tubes FACS. Les échantillons sont centrifugés à 400G pendant 5 minutes à 4°C puis le culot récupéré est perméabilisé en utilisant le tampon de fixation/perméabilisation (eBioscience, 00-5532). Les échantillons sont incubés pendant 45 minutes à 4°C. Après l'incubation, les échantillons sont lavés avec 2 ml de Perm Wash, puis centrifugés à 400G pendant 5 minutes à température ambiante. 100µl d'anticorps pour le marquage intra-cellulaire sont ensuite ajoutés sur chaque échantillon après avoir éliminé le surnageant et incubés pendant 30 minutes à température ambiante. Ils sont ensuite lavés avec 2ml de Perm Wash et centrifugés à 400G pendant 5 minutes à température ambiante, deux fois, avant de passer les échantillons au cytométrie de flux.

### 3.1 Marquage des populations immunitaires intervenant durant les deux premiers jours de la régénération (Chapitre 2)

L'identification des différentes populations immunitaires présentes durant les deux premiers jours de la régénération musculaires est réalisée à l'aide des anticorps ci-dessous :

<b>Anticorps extra-cellulaire</b>			
<b>Fluorochrome</b>	<b>Cible</b>	<b>Dilution</b>	<b>Références</b>
<i>BUV395</i>	<i>CD11b</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 563553</i>
<i>BV421</i>	<i>Ly6C</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE128032</i>
<i>BV510</i>	<i>CD45</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE103138</i>
<i>BV650</i>	<i>CD206</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE141723</i>
<i>BV711</i>	<i>CD64</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE139311</i>
<i>FITC</i>	<i>CD115</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE135512</i>
<i>PE-CF594</i>	<i>SiglecF</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 562757</i>
<i>BUV496</i>	<i>CD3</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 564661</i>
<i>PE-Cy7</i>	<i>F4/80</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE123114</i>

<i>APC</i>	<i>Ly6G</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE127614</i>
------------	-------------	--------------	------------------

Table 1 : Liste d'anticorps utilisés pour le marquage des cellules durant les deux premiers après blessure.

Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux à l'aide d'une machine LSR Fortessa X20 disponible sur la plateforme d'immunophénotypage de l'EGID. La sélection des cellules a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo, comme illustré dans la Figure 41, sur les leucocytes totaux (CD45<sup>+</sup>) puis nous avons exclu les lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) et avons sélectionné les cellules myéloïdes (CD11b<sup>+</sup>). Nous avons ensuite distingué les éosinophiles (SiglecF<sup>+</sup>) et les neutrophiles (Ly6G<sup>+</sup>). Dans la population doublement négative pour ces marqueurs, nous avons identifié les monocytes (CD115<sup>+</sup>). Dans la population négative pour ce marqueur, nous avons sélectionné les macrophages CD64<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> pour enfin dissocier les macrophages pro-inflammatoires (Ly6C<sup>High</sup> CD206<sup>-</sup>) des macrophages anti-inflammatoires (Ly6C<sup>Low</sup> CD206<sup>+</sup>).

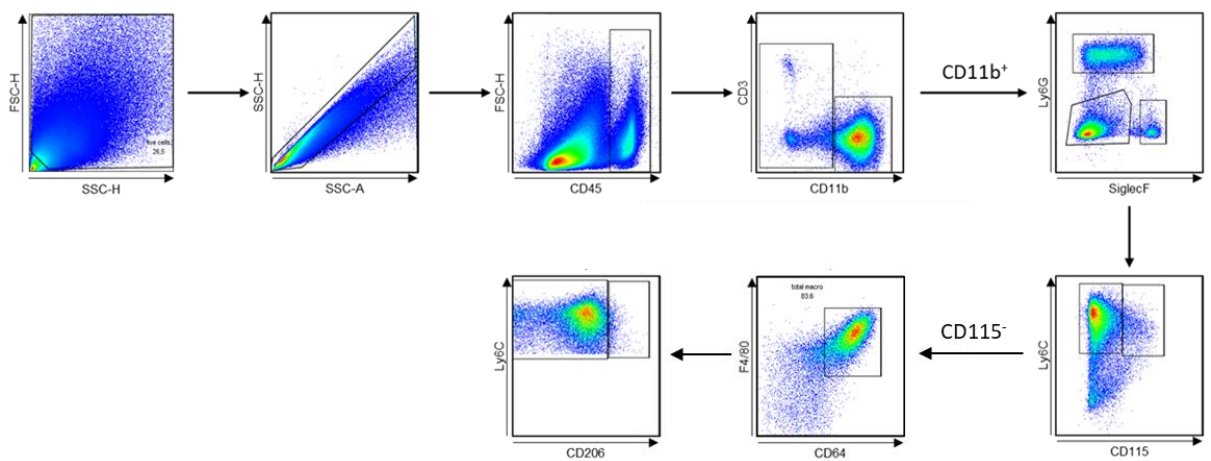


Figure 41 : Stratégie de sélection des populations immunitaires présentes durant les deux premiers après une blessure musculaire.

### 3.2 Marquage des populations immunitaires intervenant entre 2 et 7 jours après la blessure musculaire (Chapitre 2)

Le marquage des différentes populations immunitaires présentes entre 4 et 7 jours après la blessure musculaire sont marquées à l'aide de ces anticorps ci-dessous :

<i>Anticorps extra-cellulaire</i>			
Fluorochrome	Cible	Dilution	Références
<i>BUV395</i>	<i>CD11b</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 563553</i>
<i>BV786</i>	<i>Ly6C</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE128041</i>
<i>BV510</i>	<i>CD45</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE103138</i>
<i>BV650</i>	<i>CD206</i>	<i>1/100</i>	<i>BLE141723</i>

<i>BV711</i>	<i>CD64</i>	<i>1/100</i>	BLE139311
<i>BUV496</i>	<i>CD3</i>	<i>1/100</i>	BD 564661
<i>PE-Cy5</i>	<i>F4/80</i>	<i>1/100</i>	BLE123112

Table 2 : Liste d'anticorps utilisés pour le marquage des cellules de 4 à 7 jours après blessure.

Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux comme décrit précédemment. La sélection des cellules a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo, comme illustré dans la Figure 42, sur les leucocytes totaux (CD45<sup>+</sup>) puis nous avons exclu les lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) et avons sélectionné les cellules myéloïdes (CD11b<sup>+</sup>). Nous avons ensuite sélectionné les macrophages CD64<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> pour enfin dissocier les macrophages pro-inflammatoires (Ly6C<sup>High</sup> CD206<sup>-</sup>) des macrophages anti-inflammatoires (Ly6C<sup>Low</sup> CD206<sup>+</sup>).

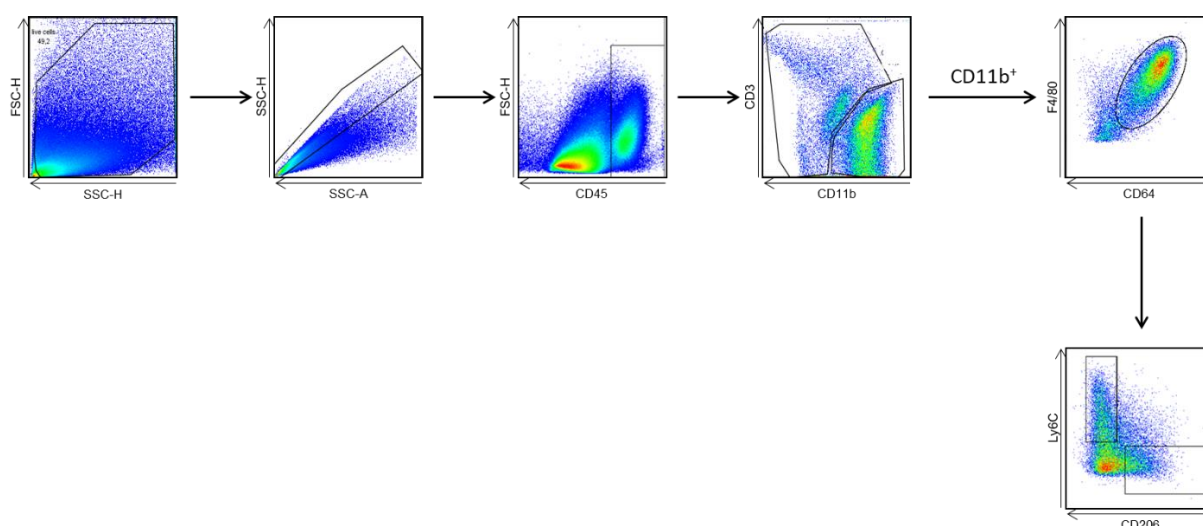


Figure 42 : Stratégie de sélection des populations immunitaires présentes de 4 à 7 jours après une blessure musculaire.

### 3.3 Sélection des populations immunitaires pour la cinétique des ILCs durant la régénération

Le marquage des différentes populations d'ILC présentes durant les 10 premiers jours après la blessure musculaire sont marquées à l'aide de ces anticorps ci-dessous :

<i>Anticorps extra-cellulaire</i>			
<b>Fluorochrome</b>	<b>Cible</b>	<b>Dilution</b>	<b>Références</b>
<i>BV510</i>	<i>ST2</i>	<i>1/200</i>	<i>BD 745080</i>
<i>BV605</i>	<i>NKp46</i>	<i>1/100</i>	BLE137619

<i>BV650</i>	<i>CD127</i>	<i>1/100</i>	BLE135043
<i>BV711</i>	<i>Icos</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 740763</i>
<i>BV786</i>	<i>CD90.2</i>	<i>1/100</i>	BLE105331
<i>APC-Cy7</i>	<i>KLRG1</i>	<i>1/100</i>	BLE138426
<i>FITC</i>	<i>CD11c</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 553801</i>
	<i>TCR<math>\beta</math></i>	<i>1/100</i>	<i>BD 553171</i>
	<i>TCR<math>\gamma\delta</math></i>	<i>1/100</i>	<i>BD 553177</i>
	<i>CD4</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 553047</i>
	<i>Siglec F</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 564514</i>
	<i>GR1</i>	<i>1/300</i>	BLE108417
	<i>Siglec H</i>	<i>1/100</i>	BLE129604
	<i>TER119</i>	<i>1/100</i>	BLE116215
	<i>F4/80</i>	<i>1/100</i>	BLE123120
	<i>FCeRI</i>	<i>1/100</i>	BLE134330
<i>PE-CF594</i>	<i>CD11b</i>	<i>1/100</i>	BLE101217
	<i>CD19</i>	<i>1/100</i>	<i>BD 562291</i>
	<i>CD3</i>	<i>1/100</i>	BD 562286
	<i>CD34</i>	<i>1/100</i>	BLE128616
<i>PE</i>	<i>CD200R</i>	<i>1/100</i>	BLE123907
<i>BUV737</i>	<i>CD45</i>	<i>1/100</i>	BD 564880
<i>AF700</i>	<i>CD49b</i>	<i>1/100</i>	eBioscience 56597182
<b>Anticorps intra-cellulaire</b>			
<i>PE-Cy7</i>	<i>GATA3</i>	<i>1/100</i>	eBioscience 25996642
<i>APC</i>	<i>Tbet</i>	<i>1/100</i>	BLE644813
<i>PerCP-Cy5.5</i>	<i>ROR<math>\gamma</math>t</i>	<i>1/100</i>	eBioscience 46698180

Table 3: Liste d'anticorps utilisés pour le marquage des ILCs durant la régénération.

Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux de la même manière que décrite précédemment. La sélection des cellules a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo, comme illustré dans la Figure 43, sur les leucocytes totaux (CD45<sup>+</sup>) puis nous avons exclu les types de cellules suivants comme canaux de décharge en utilisant les anticorps correspondant (Lin<sup>-</sup>) : CD11c<sup>+</sup> : cellules macrophages/dendritiques ; TCR  $\beta$ <sup>+</sup> : cellules T ; TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> : cellules T gamma delta ; CD4<sup>+</sup> : cellules T CD4 ; Siglec F<sup>+</sup> : Eosinophiles ; Gr1<sup>+</sup> : Neutrophiles ; Siglec H<sup>+</sup> : cellules dendritiques plasmacytoïdes ; TER 119<sup>+</sup> : érythrocytes ; CD 11b<sup>+</sup> : cellules myéloïdes ; F4/80<sup>+</sup> : macrophages ; FCeRI<sup>+</sup> : basophiles ; CD19<sup>+</sup> : cellules B ; CD34<sup>+</sup> : cellules souches hématopoïétiques ; CD49<sup>+</sup> : cellules NK. Enfin, nous avons sélectionné les différentes

populations d'ILCs à l'aide des marqueurs généraux CD90.2<sup>+</sup> et CD127<sup>+</sup> pour les cellules ILC totales ; ensuite, un marquage spécifique des ILC2 a été effectué avec les marqueurs spécifiques ST2<sup>+</sup> et GATA3<sup>+</sup>.

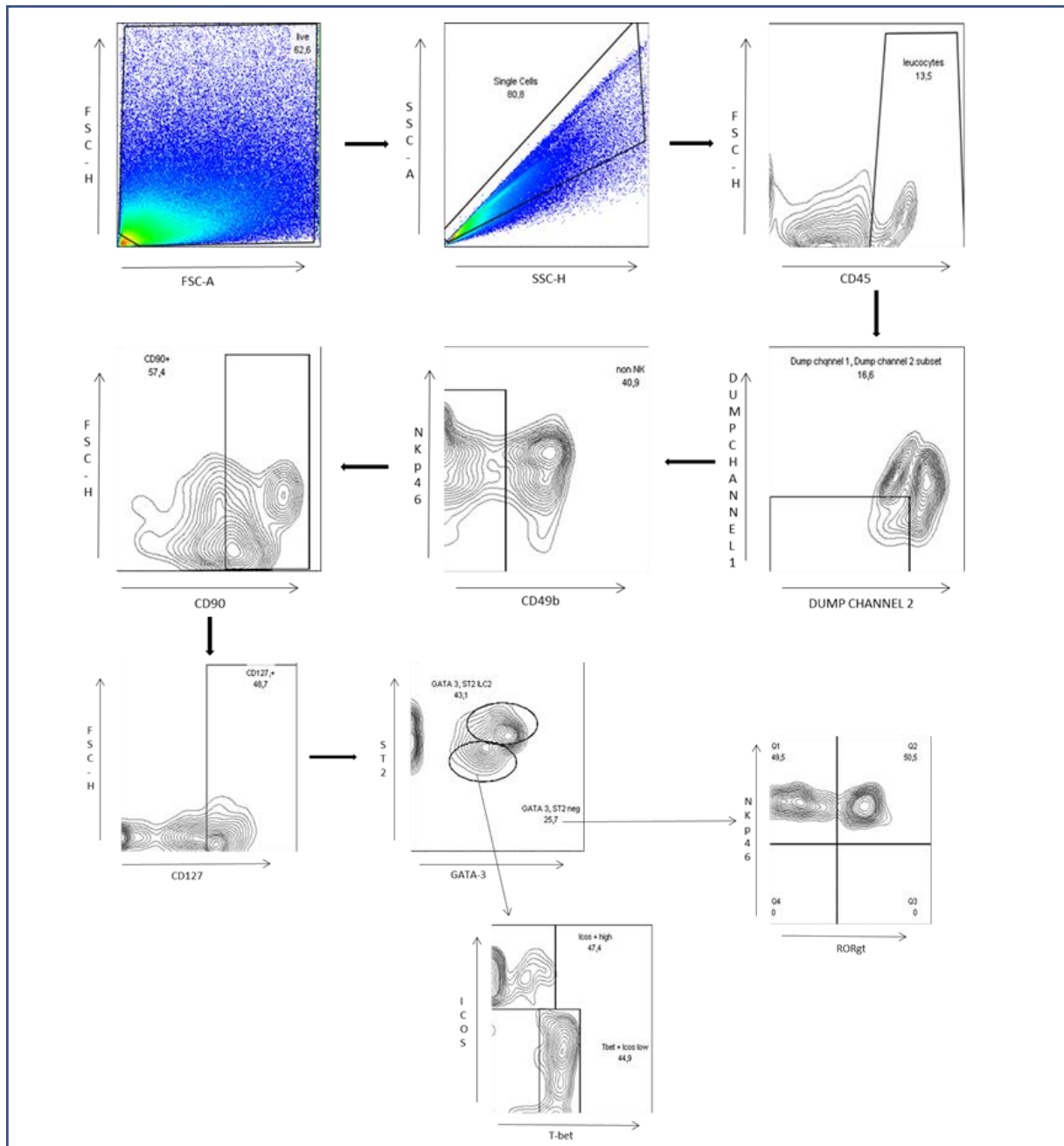


Figure 43 : Stratégie de sélection des différentes ILCs durant la régénération musculaire.

### 3.4 Etude de l'origine des leucocytes au sein des muscles blessés

Pour cette expérience, nous avons injecté en intra-veineux un anticorps reconnaissant le marqueur général des leucocytes : le CD45 (BLE103138, fluorochrome BV510) à des souris C57Bl/6J sauvages qui avaient été préalablement blessés 6 jours avant. Cette injection intra-

veineuse se fait au niveau de la queue de l'animal et nous sacrifions la souris 10 minutes après l'injection. Nous avons collecté les TA blessés ainsi que le sang puis effectué un marquage des leucocytes avec un second anticorps dirigé contre le marqueur CD45 portant un fluorochrome différent du premier anticorps utilisé (BD 562420, fluorochrome PE-CF594). L'identification des leucocytes ayant fixé ces différents anticorps est ensuite réalisée par cytométrie en flux.

### 3.5 Tri des macrophages durant la régénération musculaire par cytométrie en flux

La digestion des muscles pour cette expérience est identique au protocole détaillé en

3. La suspension cellulaire est ensuite marquée à l'aide des anticorps présentés ci-dessous :

<b>Anticorps extra-cellulaire</b>			
<b>Fluorochrome</b>	<b>Cible</b>	<b>Dilution</b>	<b>Références</b>
<i>BV510</i>	<i>CD45</i>	<i>1/100</i>	BLE103138
<i>BV711</i>	<i>CD64</i>	<i>1/100</i>	BLE139311
<i>BUV496</i>	<i>CD3</i>	<i>1/100</i>	BD 564661
<i>PE-Cy5</i>	<i>F4/80</i>	<i>1/100</i>	BLE123112

Table 4 : Liste d'anticorps utilisés pour le marquage des cellules de 4 à 7 jours après blessure.

La sélection des macrophages totaux se fait à partir des leucocytes totaux (CD45<sup>+</sup>) où nous excluons les lymphocytes (CD3<sup>+</sup>) pour enfin sélectionner les macrophages F4/80<sup>+</sup> CD64<sup>+</sup>. Pour isoler cette population, nous utilisons l'appareil BD Influx Cell Sorter disponible sur la plateforme de cytométrie d'EGID. Nous collectons ces cellules dans du trizol pour analyses transcriptomiques.

### 3.6 Etude de la prolifération des cellules souches musculaires par injection d'Edu (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)

Quatre heures avant le sacrifice, on injecte par voie intrapéritonéale 100µl d'Edu (10mg/ml) (Invitrogen EdU A10044). À H0, les souris (uniquement des femelles pour ces expériences) sont sacrifiées par dislocation cervicale et les TA sont récoltés, la digestion musculaire est réalisée selon la même procédure que celle décrite en 3.

Des immunomarquages de surface sont ensuite réalisés selon le panel suivant :

<b>Anticorps extra-cellulaire</b>
-----------------------------------

Fluorochrome	Cible	Dilution	Références
<i>BV786</i>	<i>CD31</i>	<i>1/100</i>	BLE102435
<i>BV510</i>	<i>CD45</i>	<i>1/100</i>	BLE103138
<i>FITC</i>	<i>A761 integrin</i>	<i>1/100</i>	130-103-774
<i>PE-Cy7</i>	<i>VCam1</i>	<i>1/100</i>	BLE105720

Table 5 : Marquage extra-cellulaire réalisé durant l'analyse de la prolifération des cellules souches musculaires.

Un mélange des anticorps a été préparé dans un tampon MACS, de la même manière que ci-dessus. 50µl ont été distribués à chaque échantillon et incubés pendant 30 minutes à 4°C à l'abri de la lumière. En utilisant le kit Click-iT plus EdU Flow Cytometry Assay Kits (C10633) de ThermoFisher, la fixation et la perméabilisation des échantillons sont effectuées après la période d'incubation. Le culot est repris dans 100µl de fixateur Click-iT (composant D). Les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. Ensuite les échantillons sont lavés dans 2ml de tampon MACS, vortexés, centrifugés et le surnageant est éliminé. Le culot est remis en suspension dans 100µl de réactif de perméabilisation et de lavage à base de saponine Click-iT et a été laissé à incuber pendant 15 minutes.

Le tampon Click-iT EdU buffer additive est préparé en diluant la solution mère 10x (préparée précédemment selon les instructions du kit) à 1x dans de l'eau désionisée. Le cocktail Click-iT Plus est préparé en suivant les instructions du fournisseur et 0,5 ml de ce cocktail est ajouté à chaque échantillon, suivi de 30 minutes d'incubation. Après deux lavages supplémentaires, les échantillons sont remis en suspension dans 400µl de tampon de lavage et la lecture au cytomètre en flux est réalisée selon la sélection suivante :



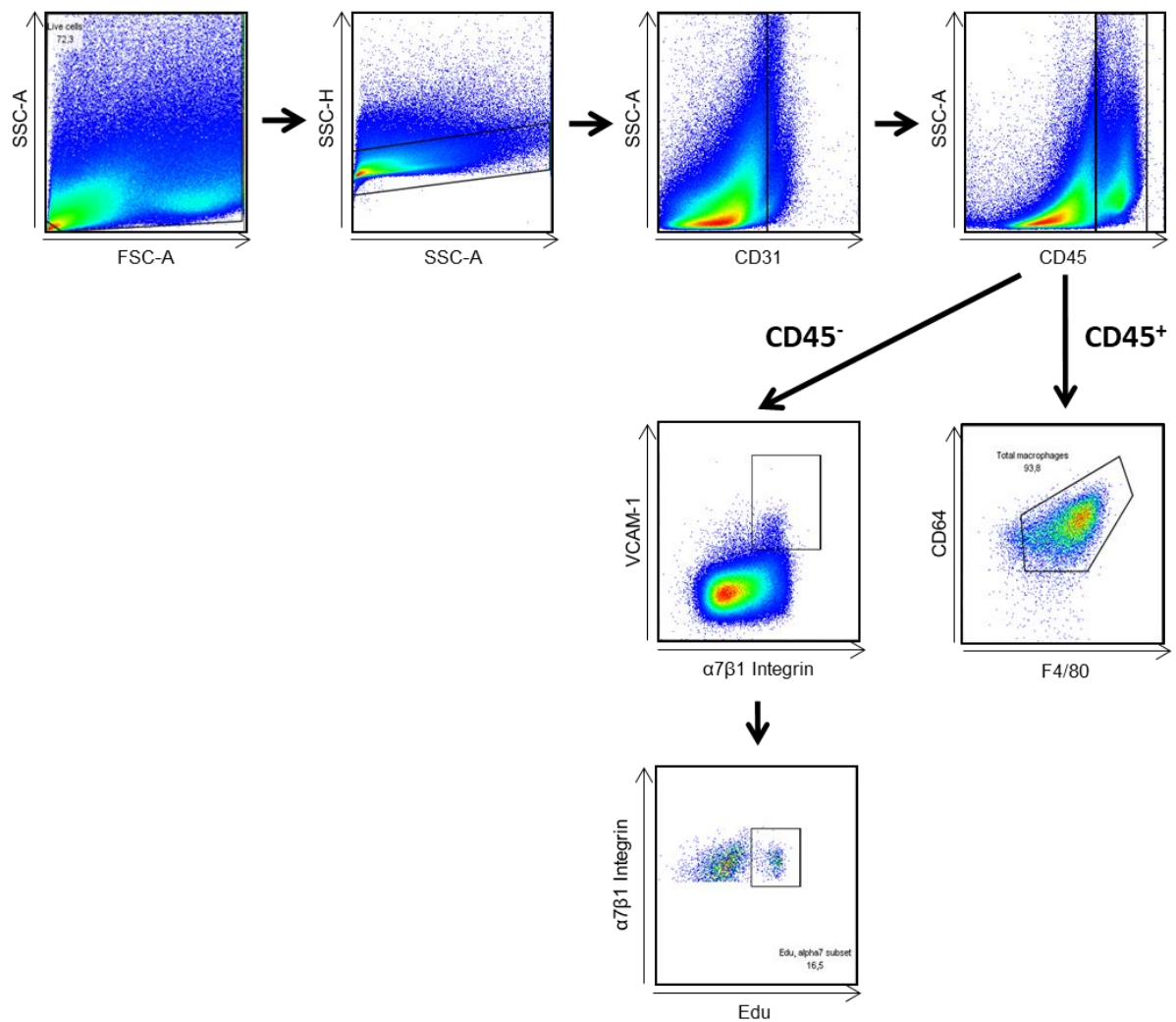


Figure 44 : Stratégie de sélection des macrophages et des cellules satellites 2 jours après la régénération.

## 4. MARQUAGES IMMUNO-HISTOCHIMIQUES

### 4.1 Marquage de la lignée C2C12

Les cellules C2C12 ont été fixées avec du paraformaldéhyde à 4%, et perméabilisées avec un tampon 0,2% de Triton 100X / 50 mM NH<sub>4</sub>Cl dans du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps reconnaissant la chaîne lourde de myosine (MF-20) (1:250, DSHB AB2147781), FoxO1 (1:250, Santa Cruz 2880 S) ou FoxOa3 (1:250, Santa Cruz 2497S), suivi un marquage avec des anticorps secondaire marqués à l'Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific A-11018) et le Dapi. Les cellules ont été montées avec le Dako Fluorescent Mounting Medium (S3023) et les images sont analysées avec un microscope confocal LSM 880(Zeiss).



## 4.2 Marquage de coupes histologiques de muscles (Projet 1)

### 4.2.1 Etude de la taille des fibres chez les souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup>

Les TA provenant de souris mâles sont excisés et sont fixés sur un support en liège avec de la gomme adragante (G1128-500G) avant d'être congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote puis conservés à -80°C jusqu'à réalisation des coupes histologiques. Des coupes transversales de 12µm sont préparées à l'aide d'un microtome cryostat (Microm HM 560) et montées sur des lames de microscope chargées positivement (ThermoFischer Superfrost Plus J1800AMNZ) en disposant les coupes de muscle en série.

La coloration par immunofluorescence a été réalisée après fixation avec du paraformaldéhyde 4 %. Les coupes sont ensuite perméabilisées via l'utilisation d'un tampon PBS 1X 0.1% triton X100 avant l'étape de blocage avec 5% de sérum de cheval dans du PBS. Les sections ont été incubées avec un anticorps primaire de Laminine  $\alpha 2$  (1:250, Santa Cruz SC59854) suivi d'un anticorps secondaire marqué à l'Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific A21208). Les sections ont été montées avec le milieu de montage Dako Fluorescent (Dako S3023). Les images ont été capturées avec un Axioscan (Axio scan.Z1, Zeiss).

### 4.2.2 Analyses histologiques (Projet 1)

La surface des fibres musculaires et le diamètre des myofibres primaires et C2C12 ont été quantifiés à l'aide d'une macro Fiji pour la préparation des images et leur prétraitement<sup>745</sup>. Pour le diamètre des myofibres primaires et des C2C12, entre 60 et 160 fibres ont été analysées pour chaque condition, et 3 mesures ont été prises manuellement pour chaque fibre et la moyenne a été calculée.

L'intensité nucléaire du marquage de FoxO1 et FoxO3a a été quantifiée à l'aide du logiciel d'analyse d'image Acapella (version 2.7-Perkin Elmer Technologies, Waltham, USA) en utilisant le module dédié à la détection de la forme des noyaux dans le Dapi suivi de l'intensité par noyau dans le canal FITC. Un minimum de 100 cellules par condition a été analysé dans deux expériences indépendantes.

## 4.3 Marquage des coupes histologiques de muscles blessés (Projet 2-3)

Des muscles provenant de souris mâles blessées ont été récupérés pour des analyses histologiques à différents jours selon les expériences présentées allant de 4 jours à 21 jours

après blessure. L'excision des muscles et la réalisation des coupes sont réalisées comme décrite en **5.2.1**.

Pour chacun des 3 marquages présentés ci-dessous, les lames sont préalablement séchées à température ambiante avant de fixer les muscles pendant 10 minutes avec du Paraformaldéhyde 4%.

#### 4.3.1 Immuno-marquage du contour des fibres et coloration des noyaux

Après fixation des lames, ces dernières sont perméabilisées en utilisant un tampon Triton .01% X100 PBS 1X durant 15 minutes avant de bloquer avec 5% de sérum de cheval dans du PBS 1X. Les muscles sont ensuite incubés durant une nuit avec un anticorps anti-Laminine  $\alpha 2$  (1:250, Santa Cruz SC59854) suivi d'un anticorps secondaire AlexaFluor 488nm (ThermoFisher Scientific A21208) et du colorant Dapi (33342) durant 45 minutes. Après 3 lavages successifs, les sections sont montées grâce au milieu de montage DAKO (Dako S3023) et les images des sections entières ont été réalisées par l'axioscan Z1.

#### 4.3.2 Marquage histologique à l'Hemathoxyline et l'Eosine

Après la fixation dans le paraformaldéhyde, les lames ont été lavées trois fois dans du PBS 1x. Après le troisième lavage, les lames sont transférées dans l'autostainer (Leica Autostainer XL), dans les bains suivants pendant les temps indiqués : eau distillée pendant une minute, hématoxyline pendant une minute, eau du robinet pendant trois minutes, éthanol à 90% pendant trente secondes, éosine pendant quarante-cinq secondes, éthanol à 90% pendant une minute, éthanol à 100% pendant trois minutes et xylène à 100% pendant douze minutes. Une lamelle couvre-objet est montée sur chaque lame à l'aide de Pertex (HistoLab 00811-EX) puis l'acquisition des images est réalisée par l'Axiocan Z1.

#### 4.3.3 Marquage histologique au Rouge Sirius

Après fixation dans le paraformaldéhyde, les lames sont placées dans une cassette et lavées dans l'eau du robinet pendant 5 minutes, deux fois. Ensuite, elles sont lavées dans l'eau distillée pendant 5 minutes et placées dans un bain d'éthanol à 96% pendant 5 minutes. Les lames sont séchées pendant 20 minutes puis plongées dans un bain de rouge sirius (rouge sirius 0,1% dans l'acide picrique) pendant 45 minutes. Après rinçage dans l'eau distillée, les lames sont fixées à l'aide de deux bains consécutifs d'acide acétique 0,5% de 5 minutes chacun. La déshydratation est réalisée par deux bains successifs d'éthanol à 96% et un bain de xylène de 10 minutes. Le montage des lames est fait avec le milieu de montage Pertex.

#### 4.3.4 Analyses histologiques (Projet 2-3)

La détection et la quantification de l'aire des fibres régénérées est réalisée en utilisant une extension du logiciel Fiji mise au point par notre laboratoire en collaboration avec Anne Danckaert de l'imagopole de l'institut pasteur de Paris et publiée en 2018<sup>746</sup>. Cette macro identifie le contour des fibres grâce au marquage de la laminine puis elle détermine si la fibre est régénérée ou non selon la présence de noyaux au centre de ces dernières, caractéristique d'une fibre nouvellement synthétisée.

Le niveau de fibrose a été évalué par une macro utilisable sur Fiji et élaborée en collaboration avec la plateforme d'imagerie Bicell localisée au campus CHR de Lille. Cette quantification se fait exclusivement sur les zones lésées des muscles. Ensuite, le programme utilise une valeur seuil de contraste spécifique à la coloration du rouge Sirius.

## 5. ETUDE DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR RT-QPCR

### 5.1 Extraction d'ARN

#### 5.1.1 Extraction à partir de muscles

Les muscles récupérés lors de la mise à mort de l'animal sont décongelés et broyés à l'aide d'un Polytron (IKA T10) dans 3 mL de tampon guanidine GSCN (4M Isothiocyanate de guanidine, EDTA pH8 10 mM, TRIS HCL pH7,5) complété avec du  $\beta$ -mercapto-éthanol à température ambiante. Une fois le tissu broyé, on ajoute de l'acétate de sodium 2M pH4, du phénol saturé et du chloroforme / alcool isoamylique (rapport de 49/1). Après 15 minutes sur glace, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 3000 rpm à 4°C et le surnageant est récupéré dans un nouveau tube.

#### 5.1.2 Extraction à partir des C2C12

L'ARN cellulaire a été extrait en utilisant du TRIzol produit par Invitrogen. Le milieu de culture est retiré des cellules puis elles sont lavées avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite lysées avec 300 $\mu$ L de TRIzol (15596018, Invitrogen). Après une incubation de 5 minutes, 60 $\mu$ L de chloroforme est ajouté et le tube est vortexé et centrifugés 15 minutes à 14000 rpm à 4°C.

### 5.1.3 Partie commune de l'extraction d'ARNm

Nous y ajoutons de l'isopropanol afin de précipiter l'ARN et nous laissons une nuit à 4°C pour faciliter cette précipitation. Après centrifugation à 8000 rpm durant 20 minutes à 4°C, nous procédons à une seconde précipitation en retirant le surnageant et en ajoutant 2,5 volumes d'éthanol 100% et 0,1 V d'acétate de sodium. Après une centrifugation de 15 minutes à 13000 rpm à 4°C, le culot est lavé par 500 µL d'éthanol 70%, vortexé et centrifugé de nouveau à 13000 rpm durant 10 minutes à 4°C puis séché au speed-vac (Concentrator 5301, eppendorf) durant 5 minutes. Le culot est finalement repris dans 20 µL d'eau RNase free et chauffé durant 10 minutes à 65°C pour permettre une totale solubilisation des ARN.

### 5.1.4 Extraction et amplification des ARNm issus de macrophages triés

L'extraction des ARNm et la dégradation des ADN se fait en utilisant le kit d'extraction RNA Isolation Nucleospin RNA XS (Macherey-Nagel ; 740902.50). Les ARNm récupérés sont ensuite dosés au bio-analyseur (Agilent 2100) en utilisant des puces RNA 6000 Pico (Agilent 5067-1511).

Les ARNm sont ensuite amplifiés en utilisant le kit Gene Chip WT Pico Amplification Kit (ThermoFisher Scientific ; 902618) pour études transcriptomiques en RT-qPCR ou en puces à ADN (Voir 7.4).

## 5.2 **Rétro-Transcription (RT)**

Tout d'abord, une étape de dégradation de l'ADN génomique est effectuée en incubant 1 µg de l'ARN extrait avec de la DNase (EN0521, Thermo Scientific) et son tampon (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>) à 37°C pendant 30 minutes. Ensuite, l'action de la DNase est stoppée par l'ajout d'1µL d'EDTA 2,5 mM par échantillon suivi d'une incubation de 10 minutes à 65°C. La véritable étape de rétro-transcription est réalisée par le kit « High-capacity cDNA reverse transcription » (4368814, Life Technologies). Le programme thermique nécessaire à la synthèse de l'ADNc est le suivant : 10 minutes à 25°C, 2 heures à 37°C et 5 minutes à 85°C.

## 5.3 **Réaction de polymérisation en chaîne (qPCR) et analyse quantitative des résultats**

Les ADN spécifiques des gènes d'intérêt ont été amplifiés en utilisant le kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Les mix sont préparés en suivant les recommandations du fabricant. Le gène d'intérêt est amplifié par l'enzyme Taq (*Thermus Aquaticus*) polymérase grâce au programme thermique suivant : 3 minutes à 95°C pour activer

l'enzyme puis 40 cycles alternant 5 à 20 secondes à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin et 20 secondes à 60°C pour hybrider les amorces spécifiques décrites ci-dessous et opérer l'élongation.

Nom du gène	Amorce sens	Amorce antisens
<b>Projet 1</b>		
<b><i>Cyclophilin A</i></b>	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGT CC	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
<b><i>Klf15</i></b>	AAGCCCTTTGCCTGCACCTGG	CGTACTGCGCGGCTGCTTCG
<b><i>Atrogin1</i></b>	GGGGTCACCCTGCAGCTTTGC	GGGAAAAGTGAGACGGAGCAGC
<b><i>Bcat2</i></b>	CCCTCCTGGCGGACCCTTCAT	AGCTGGTGGTCTGGCCCGT
<b><i>Foxo1</i></b>	CATCCACTCGTAGATCTGCG	TCGTCGCGCCGCAACGCGTG
<b><i>Foxo3a</i></b>	CCGGACAAACGGCTCACTT	GTTGTGCCGGATGGAGTT
<b><i>Redd1</i></b>	TCTCGAACTCCGGCCGCTGA	CCCAATCGCGCCTGGGACAG
<b><i>Murf1</i></b>	ATGGACCGGCACGGGGTGTA	GCACATCGGGTGGCTGCCTT
<b><i>Ubc</i></b>	CGCGCTGATCCCTCCG	CTGCATCGTCTCTCTCACGG
<b><i>Bmal1</i></b>	GGAATTGCGCTCTACCTGTTC	ACCCGTATTTCCTCCGTTT
<b><i>Rev-erbα (Nr1d1)</i></b>	TGGCCTCAGGCTTCCACTATG	CCGTTGCTTCTCTCTTGGG
<b>Projet 2</b>		
<b><i>Arntl (Bmal1)</i></b>	GGAATTGCGCTCTACCTGTTC	ACCCGTATTTCCTCCGTTT
<b><i>Clock</i></b>	GTCCTTCAGCAGTCAGTCCAT	GCCTCTATCATCCGTGTCCG
<b><i>Rev-erbα (Nr1d1)</i></b>	TGGCCTCAGGCTTCCACTATG	CCGTTGCTTCTCTCTTGGG
<b><i>Rora</i></b>	ATGCCACCTACTCCTGTCT	GCTTCTTGACATCCGACCA
<b><i>Per1</i></b>	TCAAACCTTCGACTGCCACCA	ATGTCCATGGCACAAGGCTC
<b><i>Cry1</i></b>	AGAGGGCTAGGTCTTCTCGC	CTACAGCTCGGGACGTTCTC
<b><i>Myh3</i></b>	AAGGAGCTCACATATCAGAGTG	GTGAAGTCACGGGTCTTTG
<b><i>Myh4</i></b>	CCAGGCTGCGGAGGCAATCA	TGCTCGGCCACTCTCCTGCT
<b><i>Vcam1</i></b>	AACCGAATCCCCAACTTGTGCAG	TCTCCAGCTTCTCTCAGGAAATG CC
<b><i>Icam1</i></b>	CCTGGCCTCGGAGACATTAGAGAA C	ACCCCAAGGAGATCACATTAC GG
<b><i>Ccl2</i></b>	ATGCAGGCCCTACTATTC	TTCTTTCTCTCCAGTTTT
<b><i>Cxcl1</i></b>	ATCCAGAGCTTGAAGGTGTTGC	AGCTTCAGGGTCAAGGCAAG
<b><i>Cxcl2</i></b>	AGTCATAGCCACTCTCAAGG	AGTAGCCTTGCCCTTTGTT
<b>Projet 3</b>		
<b><i>Myh3</i></b>	AAGGAGCTCACATATCAGAGTG	GTGAAGTCACGGGTCTTTG
<b><i>Myh4</i></b>	CCAGGCTGCGGAGGCAATCA	TGCTCGGCCACTCTCCTGCT
<b><i>Cd45</i></b>	CCTATTTCTTAGGGGCACAGC	CACTGGGTGTAGGTGTTTGC

<b><i>Il4</i></b>	GGTCTCAACCCCCAGCTAGTTG	ATGGCGTCCCTTCTCCTGTG
<b><i>Il9</i></b>	GACCAGCTGCTTGTGTCTCTCC	CCGATGGAAAACAGGCAAGA
<b><i>Areg</i></b>	TGCTGTTGCTGCTGGTCTTA	CCCACAGAAAGCTCAAGTCC
<b><i>Pdgfra</i></b>	TGCTAGCGCGGAACCTCAGA	ATAGCTCCTGAGACCCGCTG
<b><i>Il33</i></b>	ATCAGGCGACGGTGTGGAT	GACGTCACCCCTTTGAAGCTC
<b><i>Foxp3</i></b>	ATCGTAGCCACCAGTACTCA	TTTCATTGAGTGTCTCTGC

Table 6 : Liste des amorces utilisées en qPCR.

## 5.4 Analyses transcriptomiques par puces à ADN

Les ADNc issus de l'amplification des ARNm des macrophages triés (détaillée en section 5.1.4) ont ensuite fait l'objet d'une analyse transcriptomique. Cette analyse a été réalisée en utilisant les puces Affymetrix GeneChip MoGene 2.0 ST. Ces puces ont ensuite été analysées par le GeneChip Scanner 3000-7G d'Affymetrix paramétré avec la Command Console version 4.1.2. Les contrôles qualités ont été réalisés durant ce processus. La normalisation et la comparaison des données s'est faite à partir de GIANT, accessoire d'analyse des méta-datas développé au sein de notre unité sur la base du logiciel Galaxy. L'expression différentielle des gènes a été calculée sur ce logiciel par Limma.

## 6. IMMUNOPRECIPITATION DE LA CHROMATINE (CHIP)

Les expériences de ChIP ont été réalisées comme décrit précédemment<sup>747</sup> en utilisant les anticorps anti-Rev-erb $\alpha$  (1:50, #13418, Cell Signalling) et un IgG de lapin contrôle (1:250, #2729, Cell Signalling) en suivant les instructions du fabricant. Succinctement, les cellules C2C12 différenciées ont été fixées avec du paraformaldéhyde 1% pendant 10 minutes. Les noyaux extraits ont été remis en suspension dans un tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH8.0, EDTA 10 mM, SDS 1%, cocktail d'inhibiteurs de protéase). La chromatine a ensuite été segmentée pendant 20 minutes à l'aide d'un Biorupteur (Diagenode) et diluée 10 fois avec le tampon de dilution (Tris HCl 20 mM pH8.0, Triton X-100 1%, Glycérol 5%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases de Roche). 100  $\mu$ g d'ADN ont été utilisés par IP et la chromatine récupérée a été purifiée à l'aide du kit QIAquick PCR clean up (Qiagen). L'ADN immunoprécipité a été analysé par qPCR et normalisé par rapport aux échantillons.

Gene Name	Forward Primer	Reverse Primer
<b><i>Murf1 (-2.5kb)</i></b>	CCA GCC ACT TGG GTT TTT AG	GCT GGA GAT ATG GGT GGG TA
<b><i>Bcat2 (-2kb)</i></b>	GGCCCTTAGGGGAGAAGAGT	GAGTGTCCAGAGCCTGTTCC
<b><i>Bmal1</i></b>	GGACTTCGCCTCTACCTGTTC	ACCCGTATTTCCTCCGTTTC

Table 7 : Liste des amorces utilisées en CHIP.

## 7. MESURE DE L'ACTIVITE PROTEASOMALE

Cette mesure a été réalisée à l'aide du kit 20S proteasome activity assay kit (APT280, MERCK). Brièvement, ce kit consiste à mettre les échantillons en contact avec un substrat (LLVY-AMC) visible à l'aide d'un spectrophotomètre aux longueurs d'onde 380/460nm uniquement lorsque la méthylcoumarin (AMC) est clivé par le protéasome. En utilisant une gamme étalon fournie dans le kit, l'activité protéasomale est calculée.

## **Résultats**

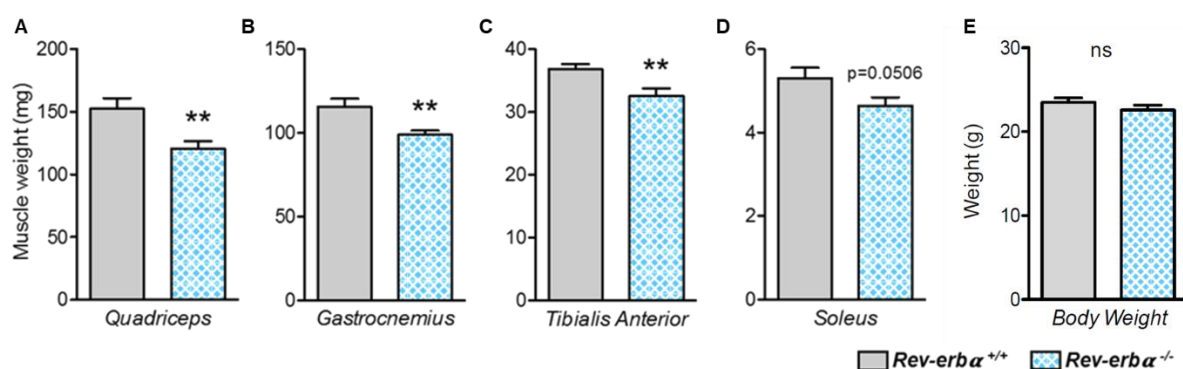


# CHAPITRE 1 : REV-ERB-A REGULE LES GENES RELATIFS A L'ATROPHIE POUR CONTROLER LA MASSE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

## 1.1 Impact de la délétion de *Rev-erba* *in vivo* et *in vitro* sur la masse musculaire et la taille des fibres

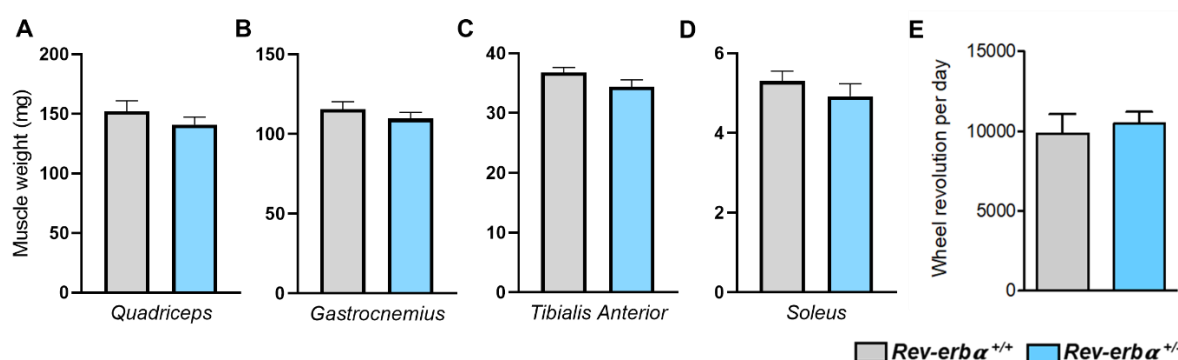
Le premier axe de ma thèse visait à explorer le rôle de Rev-erba dans le contrôle de la masse musculaire squelettique. En effet, des travaux précédents du laboratoire ont mis en évidence que Rev-erba est indispensable à l'activité oxydative du muscle squelettique. Précisément, l'invalidation de *Rev-erba in vivo* conduit à une diminution du contenu en mitochondries et de leur fonction au sein du muscle squelettique résultant en une capacité réduite des souris à l'exercice<sup>748</sup>. Au cours de cette étude il avait été également mis en lumière que Rev-erba est capable de réguler de façon directe différents gènes impliqués dans l'autophagie (Ulk1, Bnip3, Atg5, Beclin et Cathepsine L). Par ailleurs, des données de puces à ADN non publiées montraient une augmentation de différentes ubiquitine ligase E3 dans les muscles des souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup>. Ces différents éléments suggéraient donc fortement une implication de Rev-erba dans le contrôle de la masse musculaire.

Différents muscles squelettiques des membres postérieurs de souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> et de souris contrôles *Rev-erba*<sup>+/+</sup> ont donc tout d'abord été prélevés et pesés. Nous avons mis en évidence une diminution significative de la masse des muscles comme le quadriceps, le gastrocnémien et le TA (de -20,9%, -14,5% et -11,5%, respectivement) chez les souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> (Figure 45 A), alors que les poids des animaux étaient similaires (Figure 45 E). Le poids du muscle soléus, qui contient principalement des fibres oxydatives, était également réduit chez les souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> par rapport aux souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> (de 12,6 %), bien que la différence n'ait pas atteint la significativité statistique (Figure 45 D). Ceci est en accord avec des études démontrant que les muscles glycolytiques sont généralement plus sensibles à l'atrophie que les muscles oxydatifs<sup>95</sup>.



**Figure 45 : La délétion globale de *Rev-erba* impacte la masse des muscles squelettiques. (A-D) Masse musculaire du quadriceps, du gastrocnémien, du tibialis antérieur et du soléus de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> (n=13 et 11, respectivement). (E) Poids corporel des souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> (n=13). Les résultats sont exprimés en moyennes ± sem ; \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 par T-test.**

Il est intéressant de noter que des souris hétérozygotes pour *Rev-erba*<sup>+/-</sup> présentent également une tendance à la réduction de la masse musculaire par rapport aux souris contrôles alors que leur activité locomotrice est normale (Figure 46), ce qui indique que la réduction de la masse musculaire se produit indépendamment de tout changement de l'activité locomotrice.



**Figure 46 : La délétion d'un allèle de *Rev-erba* induit une tendance à la diminution de la masse musculaire sans altérer leur activité locomotrice. (A-D) Masse musculaire du quadriceps, du gastrocnémien, du tibialis antérieur et du soléus de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>+/-</sup> (n=13 et 11, respectivement). (E) Activité locomotrice des souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>+/-</sup> (n=13).**

Pour caractériser davantage l'impact d'une délétion en *Rev-erba* sur la masse du muscle squelettique, nous avons quantifié l'aire des fibres (CSA) sur des coupes transversales de TA en utilisant une coloration à la laminine qui entoure les fibres musculaires. Conformément à la réduction de la masse musculaire, la CSA moyenne des fibres est significativement plus faible chez les souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> que chez les souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup>,

associée à une modification de la distribution de la taille des fibres avec une plus grande proportion de fibres plus petites (Figure 47 B). Ces données indiquent donc que le muscle squelettique est atrophié en l'absence de *Rev-erba*.

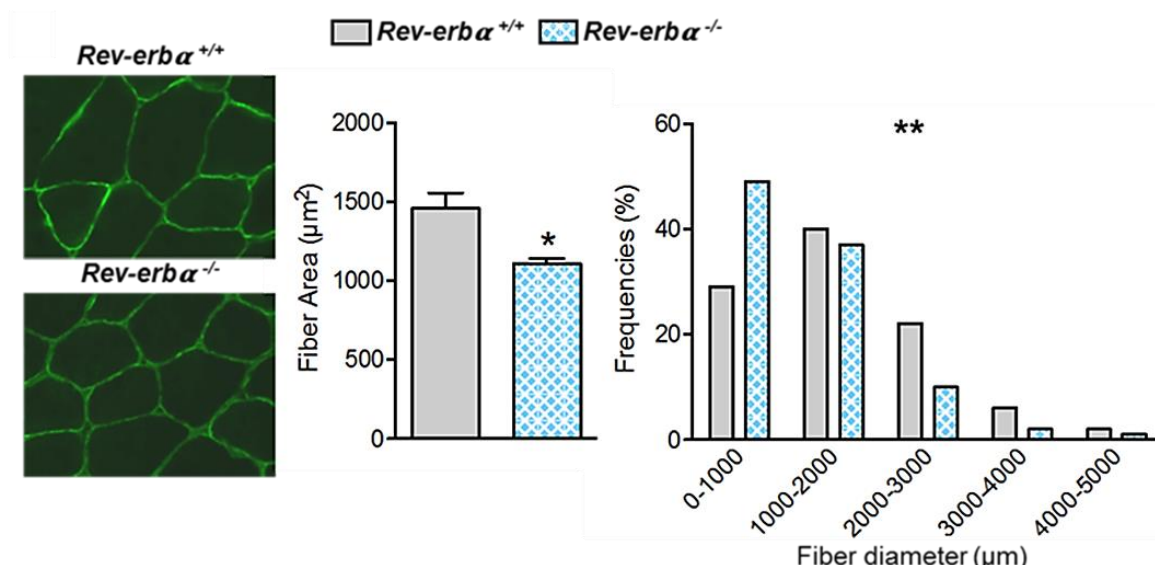


Figure 47 : La délétion de *Rev-erba* conduit à une diminution significative de l'aire des fibres saines du Tibialis anterior.

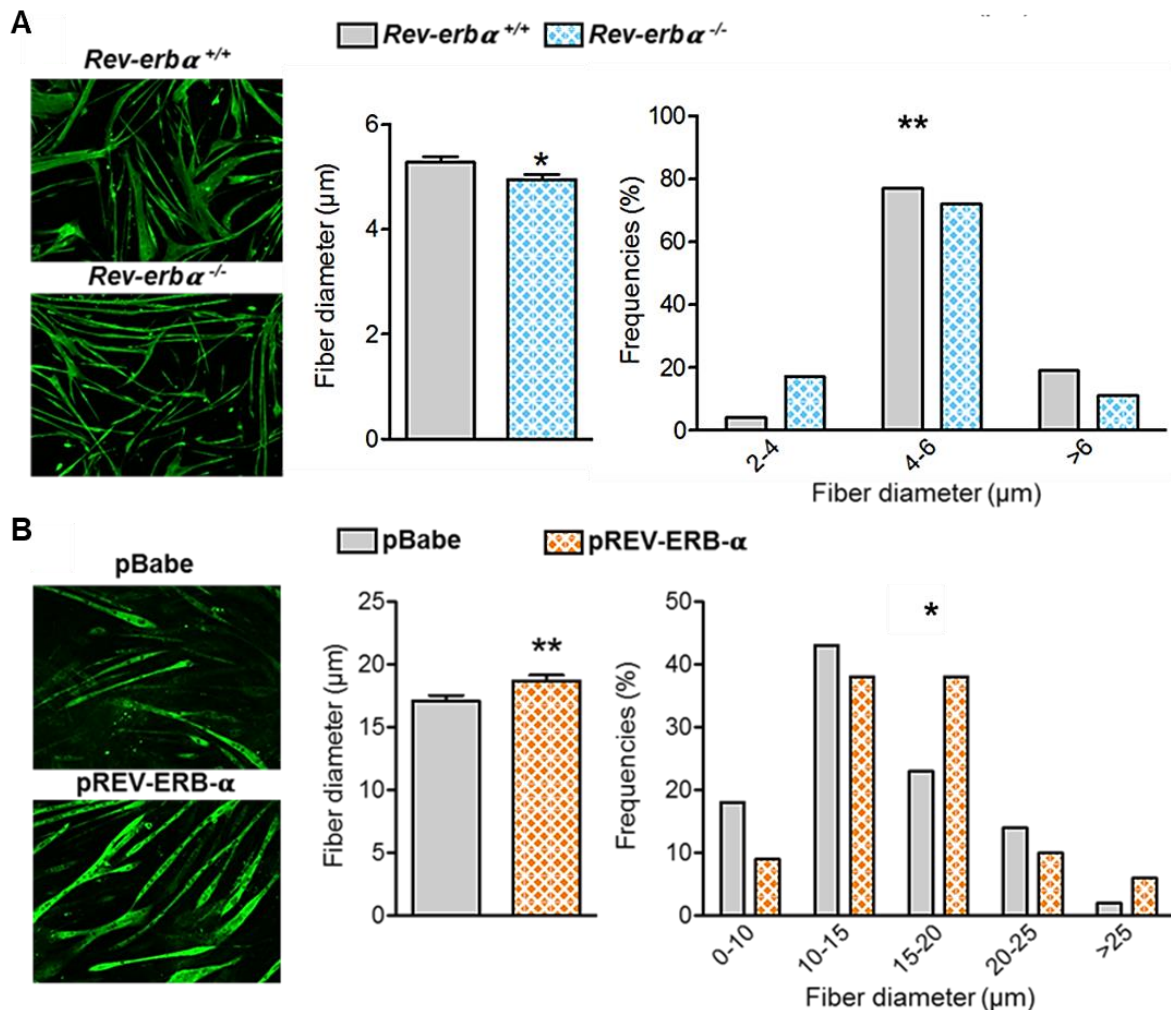
Immunomarquage représentatif de la laminine sur des coupes de muscles squelettiques (panel de gauche).

Moyenne de la CSA des fibres et répartition des fibres en fonction de leur surface réalisée sur des échantillons de tibialis anterior de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> (>13 000 fibres par souris, n=4 souris par génotype) (panel de droite).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± sem ; \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 par le test de Mann-Whitney ou le test chi-square pour comparer, respectivement, la moyenne ou la distribution de fréquence entre les groupes.

Les souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> disponibles au laboratoire au début de ma thèse étant un modèle d'inactivation totale du récepteur nucléaire, nous avons donc voulu vérifier l'action directe de *Rev-erba* sur des cellules musculaires. Pour cela, nous avons isolé des cellules satellites provenant de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> et les avons mis en culture pour obtenir des myotubes primaires. Ces myotubes ont ensuite été marqués grâce à l'anticorps MF-20 qui met en évidence les chaînes lourdes des myosines afin de mesurer leur diamètre. Comme observé *in vivo*, le diamètre moyen des myotubes est significativement plus faible dans les cellules déficientes en *Rev-erba*. De plus, ceci est associé à une plus grande fréquence de fibres de petits diamètres par rapport aux fibres de plus grands diamètres (Figure 48 A). Par ailleurs, nous avons également confirmé ces expériences dans un modèle de myoblastes C2C12 surexprimant *Rev-erba* (pREV-ERBa) et des C2C12 témoins (pBabe) différenciés en myotubes *in vitro*. Comme attendu, un phénotype miroir est observé dans ce modèle, à savoir que les fibres surexprimant *Rev-erba* présentent un diamètre moyen plus important par rapport aux fibres contrôle avec, à nouveau une diminution de la fréquence des fibres de petites tailles et une augmentation de la fréquence des fibres de plus grandes tailles (Figure 48 B). Ainsi,

les modifications de la masse musculaire et de la taille des fibres observées chez nos souris délétées globalement pour *Rev-erba* semblent refléter un impact direct et autonome de *Rev-erba* sur les cellules musculaires plutôt qu'une réponse adaptative à une situation chronique.



**Figure 48 : *Rev-erba* contrôle la masse du muscle squelettique.**

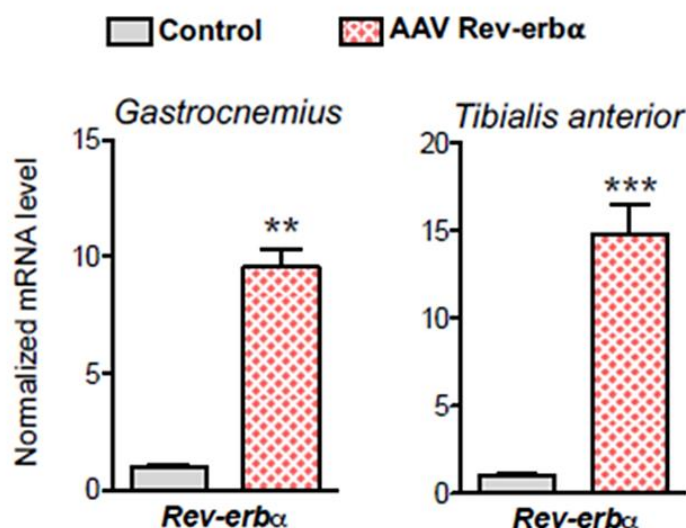
**(A)** Immunomarquage représentatif de la chaîne lourde de la myosine (panel de gauche) ; diamètre moyen des fibres et répartition des fibres différenciées à partir de précurseurs myogéniques isolés de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> en fonction de leur diamètre (3 mesures par fibre, n=120 fibres par génotype) (panel de droite).

**(B)** Immunomarquage représentatif de la chaîne lourde de la myosine (panel de gauche) ; diamètre moyen des fibres et distribution de la fréquence des des fibres des cellules C2C12 différenciées surexprimant *Rev-erba* (pREV-ERB-α) et des cellules témoins (pBabe) en fonction de leur diamètre (3 mesures par fibre, n=120 fibres par groupe) (à droite).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± sem ; \*p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 par le test de Mann-Whitney ou le test chi-square pour comparer, respectivement, la moyenne ou la distribution de fréquence entre les groupes.

## 1.2 Régulation par Rev-erba des voies cataboliques et anti-anaboliques dans le muscle squelettique

Afin de déterminer si les modifications de la masse musculaire et de la taille des fibres étaient dues à une augmentation de la transcription de gènes relatifs à l'atrophie musculaire, une analyse de l'expression de ces gènes a été réalisée sur des muscles squelettiques isolés à partir de notre modèle délété globalement en *Rev-erba* mais également sur des souris surexprimant Rev-erba dans le muscle. En effet, nous avons établi un modèle *in vivo* de surexpression de Rev-erba dans le muscle en utilisant un adénovirus injecté intramusculairement dans les muscles TA et gastrocnémiens. L'injection de cet adénovirus permet une expression du gène de *Rev-erba* dans le muscle de 10 à 15 fois supérieur à l'expression normal dans un muscle non injecté (Figure 49).



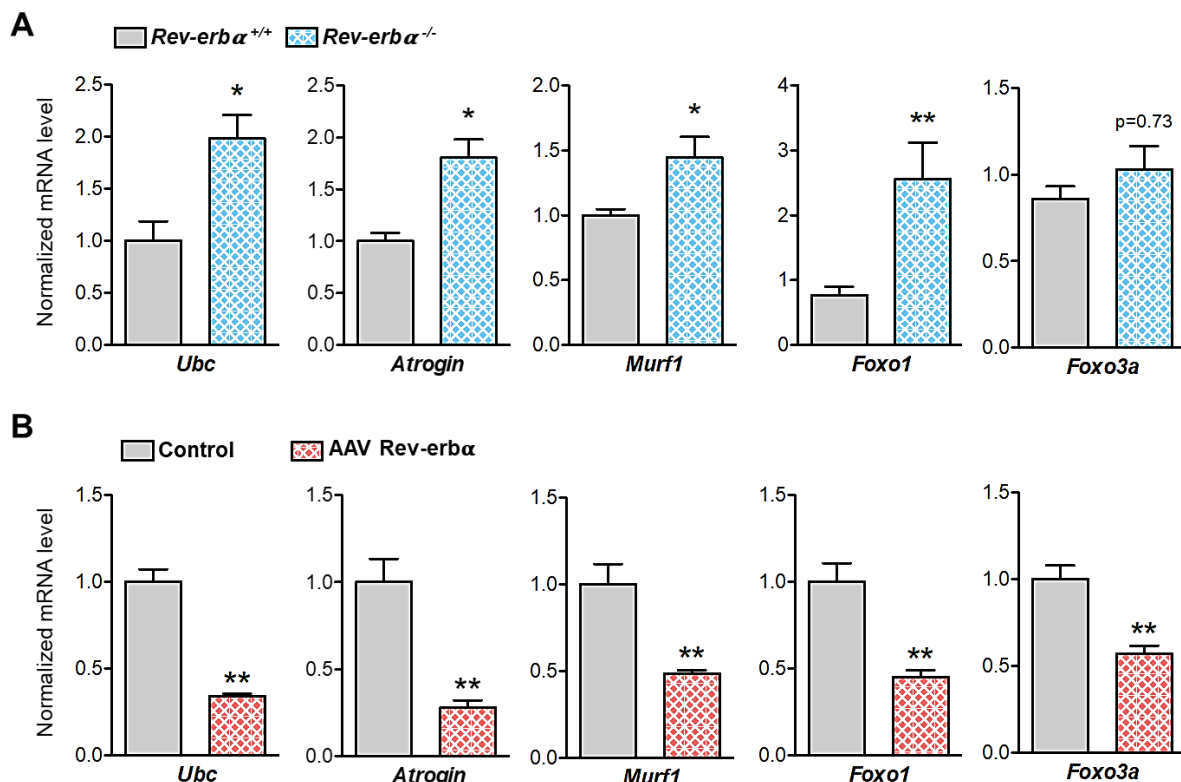
**Figure 49 : Caractérisation de l'expression de Rev-erba dans le muscle squelettique après injection de l'adénovirus Rev-erba.**

Analyse RT-qPCR de l'expression de Rev-erba dans les muscles gastrocnémiens et tibialis anterior de souris injectées par voie intramusculaire avec un vecteur AAV exprimant *Rev-erba* ou un vecteur AAV témoin.

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  sem ; \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  par test de Mann-Whitney.

Nous avons dans un premier temps étudié l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le système ubiquitine-protéasome. Nos résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression des gènes cataboliques ubiquitine C (Ubc), codant le précurseur de la polyubiquitine, et les deux ubiquitine ligases E3 que sont Atrogin et Murf1, ainsi que de leurs régulateurs transcriptionnels FoxO1 et FoxO3a dans les muscles des souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> par rapport à leurs contrôles *Rev-erba*<sup>+/+</sup> (Figure 50 A). A l'opposé, la surexpression de Rev-erba par AAV chez des souris contrôles a conduit au phénotype inverse, à savoir une

diminution significative de l'expression de ces gènes liés aux voies cataboliques dans le gastrocnémien (Figure 50 B).



**Figure 50 : *Rev-erba* contrôle l'expression des gènes relatifs à l'atrophie dans le muscle squelettique.**

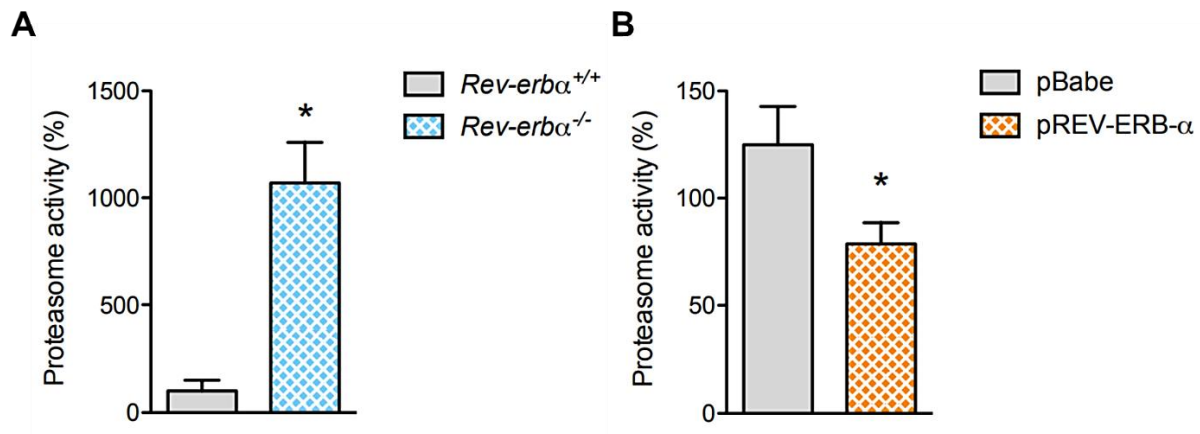
(A) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes liés à l'atrophie dans le muscle quadriceps de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> (n=5 par génotype).

(B) Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes liés à l'atrophie dans le muscle gastrocnémien de souris injectées par voie intramusculaire avec un vecteur AAV exprimant *Rev-erba* ou un vecteur AAV témoin (n=7 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± sem ; \*P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 par test de Mann-Whitney.

Suite à ces résultats, nous avons entrepris d'évaluer l'activité du protéasome dans des myotubes obtenus après différenciation de précurseurs myogéniques provenant de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup>. Nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'activité du protéasome dans les myotubes délétés en *Rev-erba* (Figure 51 A). Par ailleurs, il est intéressant de constater que dans des C2C12 surexprimant *Rev-erba*, ce phénotype est inversé avec une diminution significative de cette activité comparée à des C2C12 contrôles (Figure 51 B). Ces résultats suggèrent donc que l'expression des gènes relatifs au catabolisme ainsi que l'activité du système du protéasome est régulé par *Rev-erba*.





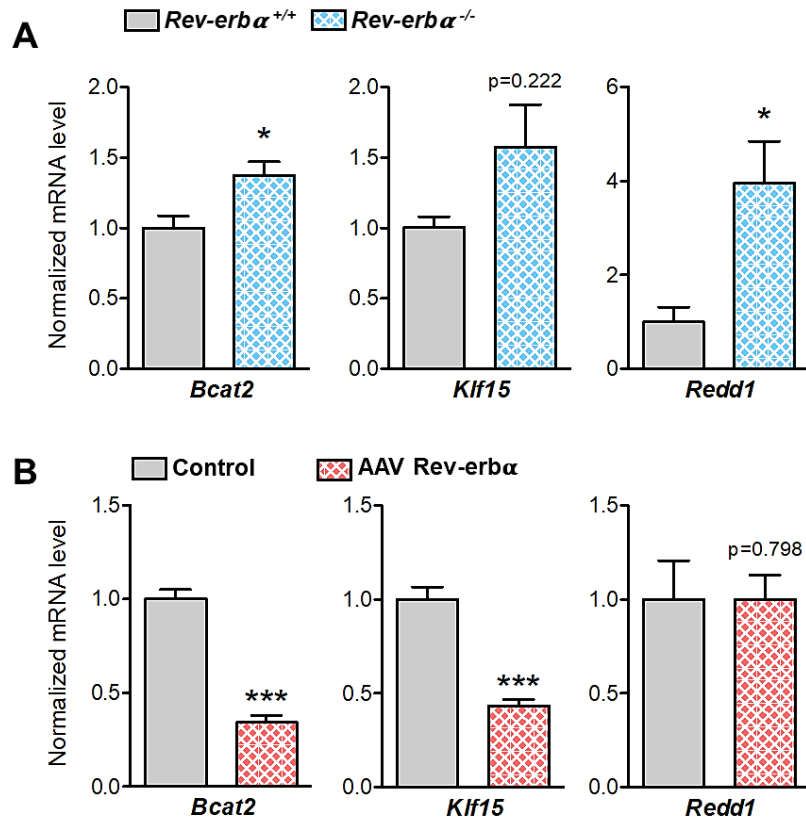
**Figure 51 : L'activité protéasomale est régulé par Rev-erba.**

(A) Activité protéasomale dans les cellules myogéniques isolées des souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> (n=3).

(B) Activité protéasomale dans des cellules C2C12 surexprimant Rev-erba (pREV-ERB-α) et des cellules témoins (pBabe) (n=4,5).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± sem ; \* P < 0,05, par test de Mann-Whitney.

Nous avons également examiné l'expression de *Redd1* et *Klf15*, deux gènes codant des régulateurs négatifs de la voie de signalisation anabolique mTOR et des gènes cibles connus du récepteur aux glucocorticoïdes (GR)<sup>94</sup>. L'expression de ces deux gènes est augmentée dans le muscle squelettique des souris délétées pour *Rev-erba* (Figure 52 A). A l'inverse, et de façon cohérente, la surexpression de *Rev-erba* diminue l'expression de ces gènes (Figure 52 B). En conséquence, l'expression de *Bcat2*, un gène cible de KLF15, est significativement augmenté dans le muscle squelettique *Rev-erba*<sup>-/-</sup>, et diminué lors de la surexpression de *Rev-erba* (Figure 52 A).



**Figure 52 : Rev-erba contrôle l'expression des gènes anti-anaboliques dans le muscle squelettique.**

(A) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes anti-anaboliques dans le muscle quadriceps de souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup> (n=5 par génotype).

(B) Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes anti-anaboliques dans le muscle gastrocnémien de souris injectées par voie intramusculaire avec un vecteur AAV exprimant *Rev-erba* ou un vecteur AAV témoin (n=7 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  sem ; \*P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 par test de Mann-Whitney.

Ainsi ces résultats associés aux précédentes données générées par le laboratoire, mettant en évidence que Rev-erba diminue l'autophagie du muscle squelettique<sup>748</sup>, indiquent que Rev-erba réprime les voies cataboliques et anti-anaboliques dans le muscle squelettique. L'ensemble de nos résultats suggèrent donc que l'atrophie du muscle squelettique observée *in vivo* en l'absence de *Rev-erba*, pourrait être consécutive à une dé-répression de la transcription des gènes impliqués dans les voies cataboliques.



### **1.3 Impact de la surexpression ou de l'activation pharmacologique de Rev-erba sur l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone**

Il est connu que le traitement chronique à la dexaméthasone induit une atrophie musculaire chez l'humain et la souris. Il a notamment été montré que GR induisait l'expression des FoxOs mais également des facteurs MuRF1 et atrogin1 tout en inhibant la voie anabolique *via* une action sur les protéines TSC1/2. Par conséquent, nous avons testé si l'activation pharmacologique ou la surexpression de Rev-erba pouvait contrecarrer la perte musculaire induite par la dexaméthasone. Dans ce but, des myoblastes C2C12 surexprimant *Rev-erba* et des myoblastes témoins ont été différenciés en myotubes puis traités pendant 48h avec de la dexaméthasone. Nous observons, comme attendu, que le traitement à la dexaméthasone induit une augmentation significative de l'expression de l'ensemble des gènes des voies cataboliques étudiés, à l'exception de FoxO1 (Figure 53). De façon intéressante, la surexpression de Rev-erba permet de partiellement ou totalement inhiber l'induction de l'expression des gènes cataboliques (Atrogin, Murf1, Foxo1 et Foxo3a) et anti-anaboliques (Klf15, Redd1 et Bcat2) par la dexaméthasone (Figure 53).

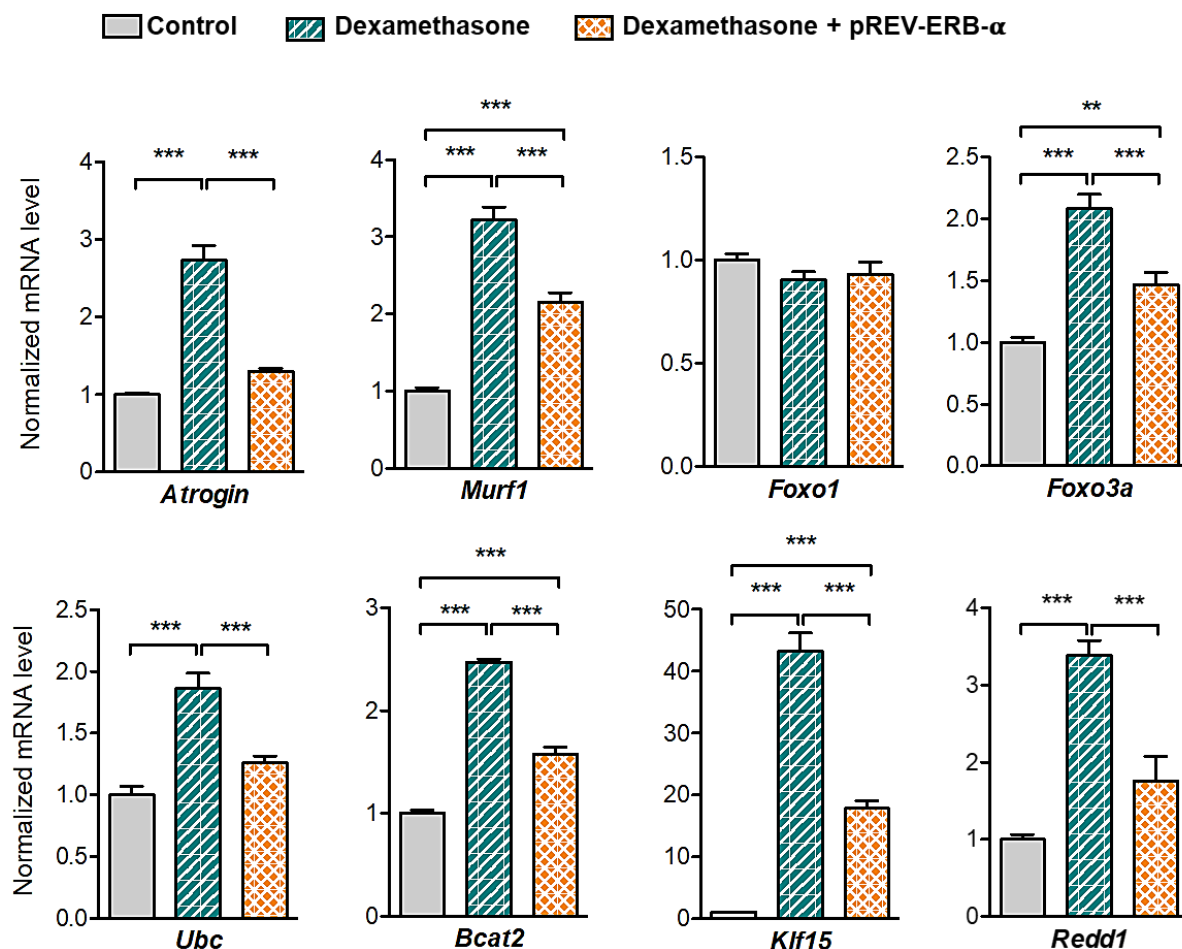
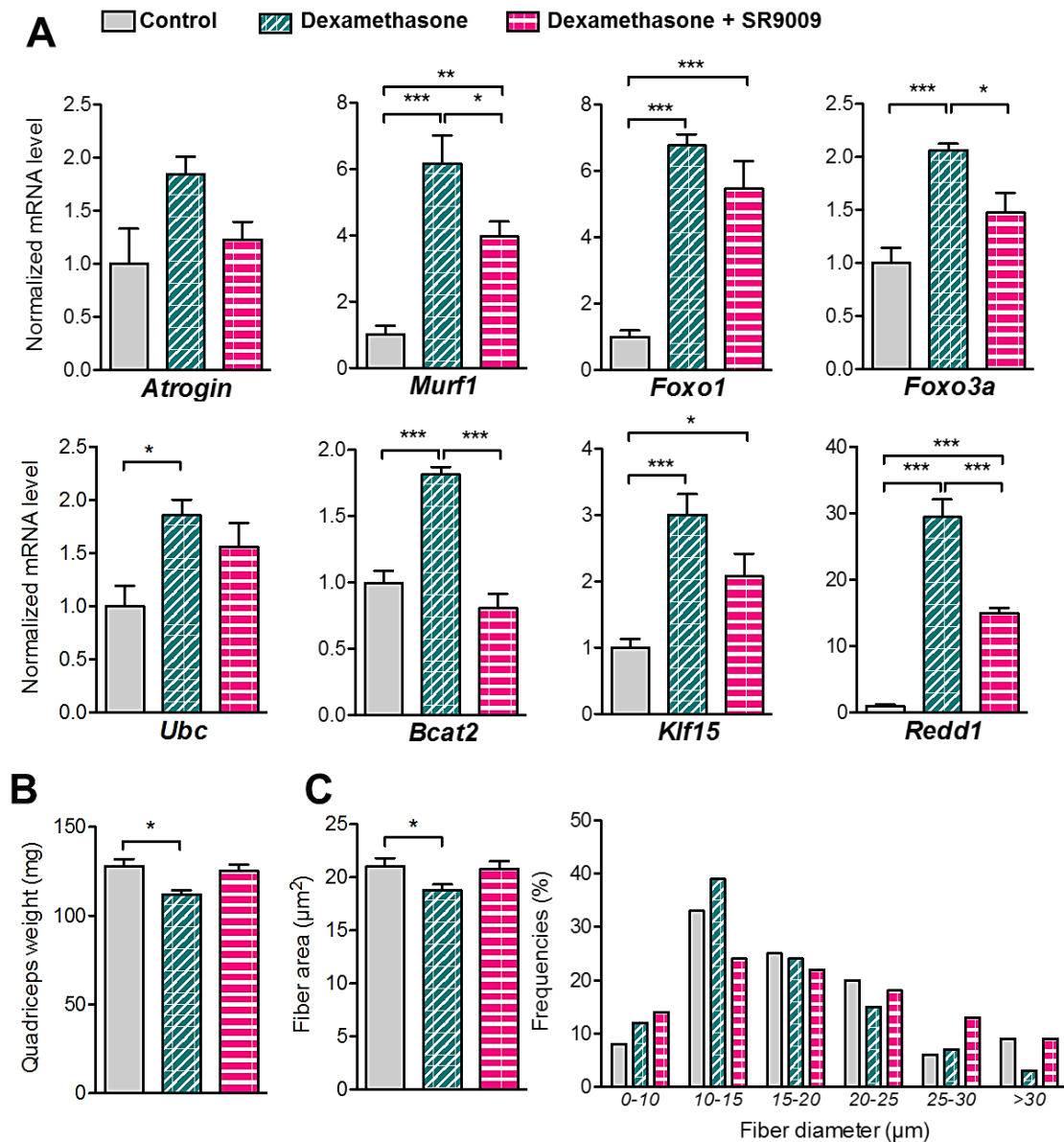


Figure 53 : La surexpression de Rev-erb $\alpha$  inhibe l'induction des gènes relatifs à l'atrophie médiée par la dexaméthasone.

Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes liés à l'atrophie dans les cellules C2C12 différenciées infectées par le rétrovirus Rev-erb $\alpha$  ou le rétrovirus témoin et traitées avec de la dexaméthasone (1  $\mu$ M) ou un véhicule pendant 48 heures (n=6 par condition). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  sem ; \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001 par One-way ANOVA avec analyse post-hoc de Bonferroni.

Comme décrit dans l'introduction, Rev-erb $\alpha$  est un récepteur nucléaire activé par un ligand naturel qui est l'hème, et des ligands synthétiques. Le laboratoire a précédemment démontré que l'activation pharmacologique de Rev-erb $\alpha$  avec le composé SR9009 *in vivo* permet d'augmenter la capacité d'endurance des souris<sup>748</sup>. Par conséquent, nous avons ensuite souhaité évaluer, *in vivo*, si l'activation pharmacologique de Rev-erb $\alpha$  permettait de protéger les souris de la perte de masse musculaire induite par l'administration de glucocorticoïdes. Dans ce but, des souris contrôles (C57BL/6J) ont été traitées avec de la dexaméthasone seule ou avec l'agoniste Rev-erb SR9009 pendant 3 jours. Comme attendu, le traitement à la dexaméthasone conduit à une forte augmentation de l'expression des gènes cataboliques (Atrogin, Murf1, Ubc, Foxo1 et Foxo3a) ainsi que des gènes cibles de GR comme Klf15, Redd 1 et Bcat2 (Figure 54 A). De manière intéressante, le co-traitement des souris avec le ligand

SR9009 permet de partiellement ou totalement bloquer l'induction de ces gènes par la dexaméthasone (Figure 54 A). Par ailleurs, l'activation pharmacologique de Rev-erb $\alpha$  prévient la perte de masse musculaire induite par les GCs (Figure 54 B). En complément, nous avons évalué *in vitro* le diamètre de myoblastes C2C12 différenciés en myotubes et traités pendant 3 jours à la dexaméthasone. Comme attendu, le diamètre des myotubes est fortement diminué par un traitement à la dexaméthasone, et la co-administration du SR9009 permet de contrer cet effet (Figure 54 C). Dans l'ensemble, nos données indiquent que la surexpression de Rev-erb $\alpha$  ou son activation pharmacologique permet d'abolir les effets atrophiques de la dexaméthasone *in vitro* et *in vivo*.



**Figure 54 : L'activation pharmacologique de Rev-erb $\alpha$  préserve la masse musculaire lors d'un traitement à la dexaméthasone.**

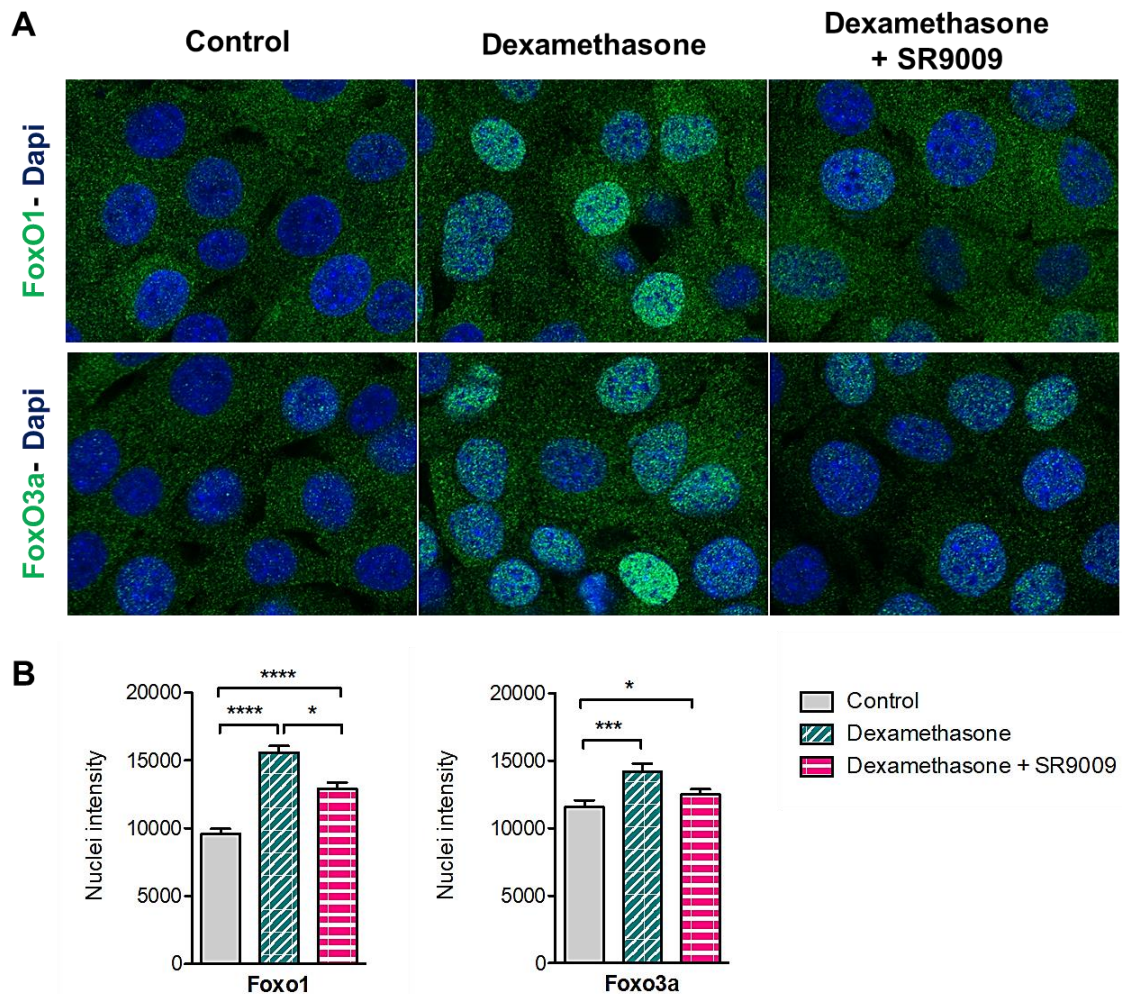
(A) Analyse RT-qPCR de l'expression génique liée à l'atrophie dans le muscle quadriceps (n=5 par groupe) et (B) Masse musculaire du quadriceps (n=4 par groupe) de souris recevant ou non 10 mg/kg/jour de dexaméthasone et co-traitées avec SR9009 (100 mpk) ou véhicule deux fois par jour pendant 3 jours.

(C) Diamètre moyen des fibres et répartition de la taille des fibres obtenus à partir de cellules C2C12 différenciées traitées ou non par la dexaméthasone (20  $\mu$ M) et co-traitées par le SR9009 (10  $\mu$ M) ou le véhicule pendant 3 jours (3 mesures par fibre, n=120 fibres par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  sem ; \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 par One-way ANOVA avec analyse post-hoc de Bonferroni ou test chi-square pour comparer respectivement la moyenne ou la distribution de fréquence entre les groupes.

#### **1.4 Rev-erb $\alpha$ contrôle la translocation nucléaire des FoxOs et cible directement les gènes relatifs à l'atrophie**

L'effet catabolique des GCs est notamment médié par la translocation nucléaire de FoxO1 et FoxO3a leur permettant ainsi d'activer la transcription de leurs gènes cibles Atrogin et MurF1. Afin de déterminer le mécanisme par lequel Rev-erb $\alpha$  est capable de prévenir la perte de masse musculaire induite par les GCs, nous avons tout d'abord voulu regarder si l'activation pharmacologique de Rev-erb $\alpha$  par le SR9009 pouvait moduler la localisation sub-cellulaire des FoxOs et ainsi modifier l'expression des gènes impliqués dans la voie catabolique. Pour cela nous avons traité des cellules C2C12 avec de la dexaméthasone en présence ou non de SR9009. L'intensité du signal de FoxO1 et FoxO3a a ensuite été analysée par immunofluorescence et quantifiée. De façon cohérente, nos résultats montrent que l'intensité nucléaire de FoxO1 et FoxO3a est significativement augmentée lors du traitement à la dexaméthasone, alors que le co-traitement avec le SR9009 atténue la translocation nucléaire de FoxO1 et FoxO3a induite par la dexaméthasone (Figure 55 A-B). Ces résultats indiquent donc que l'activation de Rev-erb $\alpha$  permet de bloquer la translocation nucléaire des FoxOs induite par l'administration de GCs.



**Figure 55 : Rev-erb $\alpha$  module la translocation nucléaire des FoxOs.**

(A) Immunomarquage représentatif de FoxO1 (panels supérieurs) et FoxO3a (panels inférieurs) en vert et marquage nucléaire Dapi en bleu de cellules myogéniques C2C12 traitées ou non avec de la dexaméthasone (1 $\mu$ M) et co-traitées avec SR9009 (10 $\mu$ M).

(B) Quantification de l'intensité nucléaire de FoxO1 et FoxO3a (n>100 cellules par condition).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*\*p<0,001 par One-way ANOVA avec analyse post-hoc de Bonferroni.

Rev-erb- $\alpha$  est un récepteur nucléaire qui agit comme un répresseur de la transcription. Outre son action sur la signalisation FoxOs, nous avons voulu déterminer si Rev-erb $\alpha$  réprimait directement des gènes impliqués dans les mécanismes d'atrophie musculaire en se liant à des séquences d'ADN spécifiques dans leurs régions régulatrices. De façon intéressante, des expériences de ChIP réalisées sur des cellules myogéniques C2C12 mettent en évidence que *Rev-erb $\alpha$*  se fixe sur un site situé dans les séquences promotrices des gènes *Bcat2* et *Murf1*, le gène *Bmal1* étant utilisé comme contrôle positif (Figure 56).

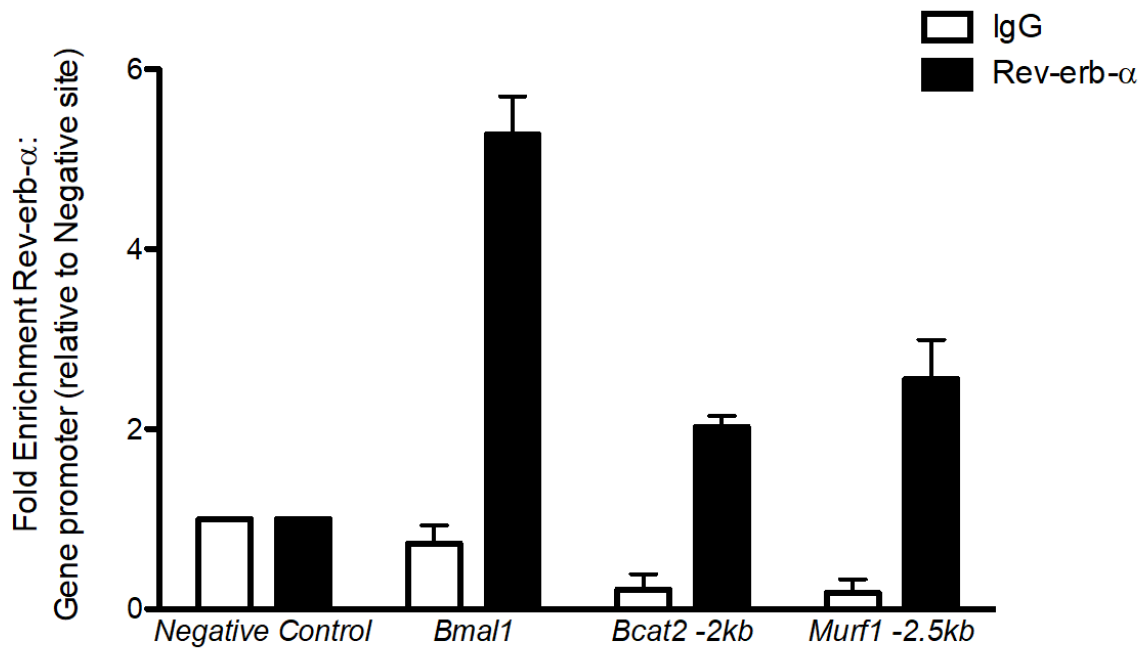


Figure 56 : Rev-erb $\alpha$  régule de façon direct l'expression des gènes relatifs à l'atrophie musculaire.

Liaison de Rev-erb $\alpha$  aux régions régulatrices des gènes liés à l'atrophie, mesurée par ChIP-qPCR (n $\geq$ 2 expériences indépendantes). Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  s.e.m.

En conclusion, nos résultats ont permis de mettre en lumière que Rev-erb $\alpha$  est un régulateur majeur du contrôle de la masse musculaire. En effet, les souris délétées pour ce gène présentent une perte de masse musculaire. De plus, nous avons montré que son activation pharmacologique permet de prévenir la perte de masse musculaire induite par les GCs. Sur un plan mécanistique, Rev-erb protège de l'atrophie musculaire en interférant avec la translocation des facteurs FoxOs, empêchant ainsi l'activation transcriptionnelle des gènes des voies cataboliques mais également en réprimant directement des gènes clefs de l'atrophie.



## CHAPITRE 2: RÔLE DE L'HORLOGE CIRCADIENNE SUR LE PROCESSUS DE RÉGÉNÉRATION MUSCULAIRE : IMPORTANCE DES CELLULES MYELOÏDES

Des études récentes ont mis en évidence que l'horloge biologique intervient dans des processus de régénération<sup>749,750</sup>. Au cours de cette étude, nous avons entrepris d'étudier le rôle de l'horloge dans un contexte de régénération musculaire puisque de nombreux travaux avaient identifié un contrôle circadien de la fonction ou de l'expression des différents acteurs du processus de régénération musculaire. En effet, il a été décrit que le transcriptome des cellules souches oscille de manière circadienne<sup>751</sup>. De plus, les nombreuses études portant sur les variations circadiennes observées dans le recrutement des cellules immunitaires suggéraient fortement que le processus de régénération musculaire diffère en fonction du moment de la journée.

Dans un premier temps, à l'aide de la macro Muscle J mis au point au laboratoire, nous avons mis en évidence une diminution significative de l'aire des fibres régénérées chez les souris invalidées pour *Rev-erba*, illustrée par une proportion plus faible de fibres de grandes tailles (Figure 57). Ces résultats suggéraient donc que la délétion de *Rev-erba*, un composant important de l'horloge, impactait le processus de régénération musculaire. Suite à ces résultats, nous avons souhaité étudier plus largement le rôle de l'horloge biologique sur le processus de régénération musculaire.

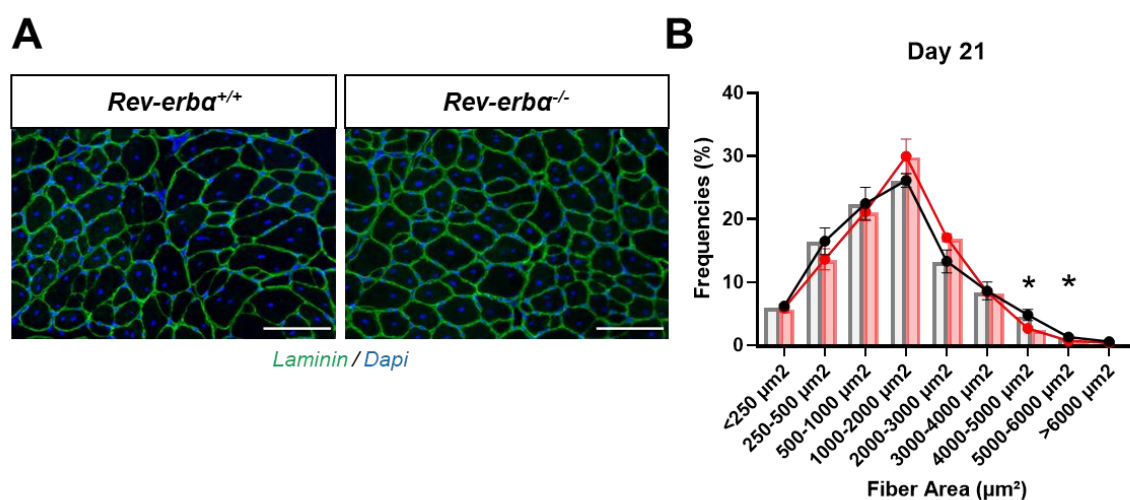


Figure 57 : La délétion globale de *Rev-erba* impacte la régénération musculaire.

(A) Immunomarquages représentatif de la laminine (Vert) et du Dapi (Bleu) 21 jours après une blessure au chlorure de baryum chez des souris *Rev-erba*<sup>+/+</sup> et *Rev-erba*<sup>-/-</sup>. Barre d'échelle correspondant à 100μm.

(B) Répartition des fibres en fonction de leur taille. (n=5 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test.



## **2.1 Impact d'une altération environnementale de l'horloge sur le processus de régénération du muscle squelettique ainsi que sur la cinétique des cellules myéloïdes**

Pour cela, nous avons tout d'abord entrepris de déterminer l'impact d'une dérégulation environnementale de l'horloge circadienne sur le processus de régénération. Pour cela, nous avons induit un « jetlag » chronique durant 8 semaines avant de réaliser la blessure chez des souris mâles C57BL/6J. Plus précisément, notre protocole consistait à induire un décalage (avance ou retard) de 12 heures du début de la phase lumineuse chez des souris WT comme indiqué sur la figure 58 A. Ce protocole a été maintenu durant 8 semaines afin d'assurer une altération efficace de l'horloge biologique des souris. Suite à ces 8 semaines, nous avons blessé les 2 groupes de souris au niveau du TA avec du BaCl<sub>2</sub> à 0.8%. Les muscles ont été collectés 7, 10 et 21 jours après la blessure musculaire afin de réaliser des analyses histologiques. Tout d'abord, nous pouvons observer que les muscles des souris placées sous jetlag présentent, après blessure, une morphologie structurale plus altérée que les souris contrôles, illustrée par une présence accrue de fibrose à 7 jours associée à la présence de fibres de plus petites tailles (Figure 58 B). L'impact du jetlag sur la taille des fibres régénérées a par ailleurs été quantifié et conforte le phénotype délétère de cette altération de l'horloge en mettant en évidence une augmentation significative de la proportion de petites fibres chez les souris jetlag 21 jours après la blessure (Figure 58 C-E). De plus, la quantité de dépôt fibrotique est également majorée chez ces souris 7 jours après la blessure mais n'est plus visible au delà comme en témoigne la quantification réalisée à partir du marquage du collagène au rouge sirius (Figure 58 D).

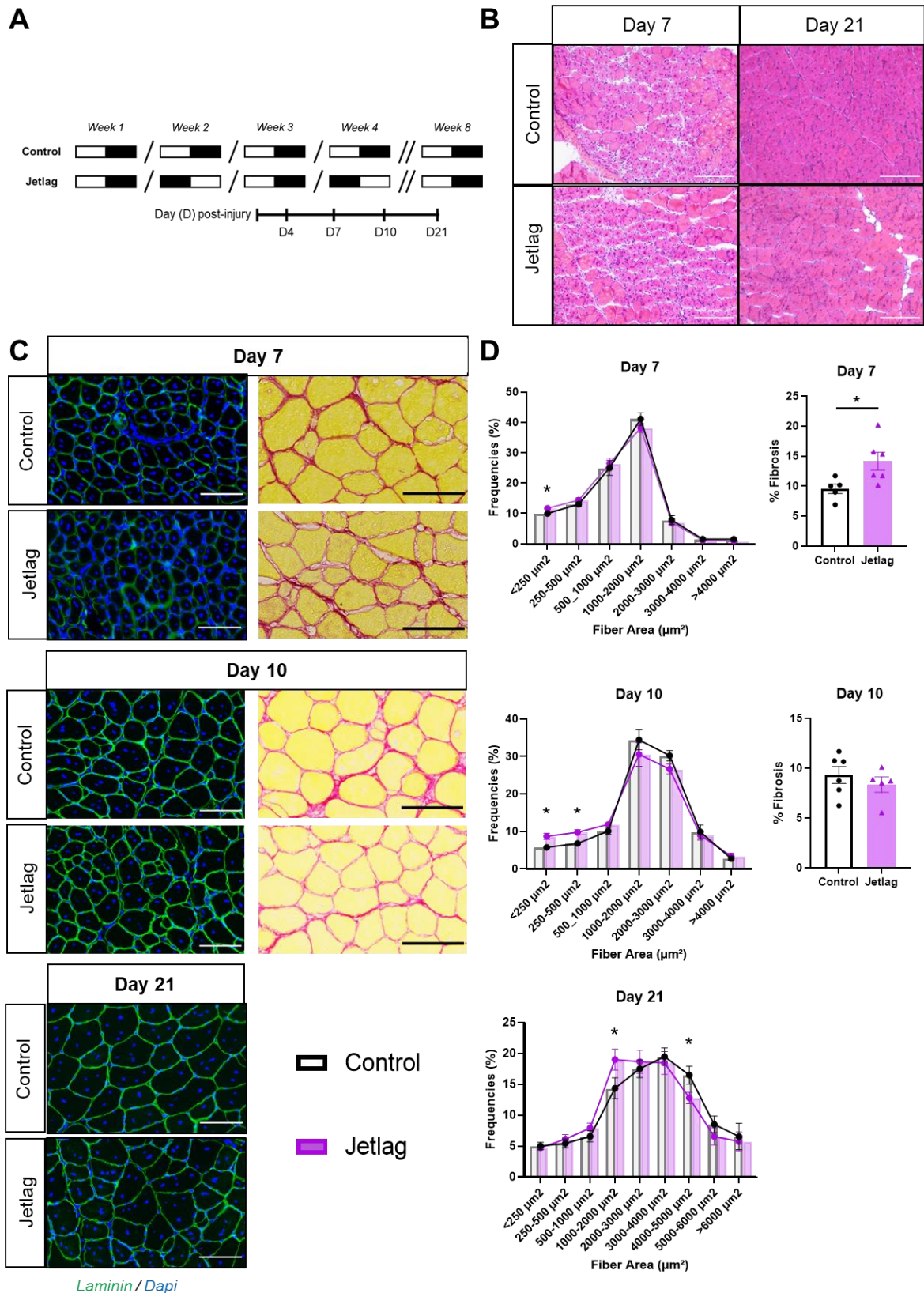


Figure 58 : Un jetlag chronique induit un défaut de régénération.

(A) Schéma du protocole expérimental de « Jetlag ».

(B) Coloration à l'Hématoxyline/éosine de coupes histologiques de muscles provenant de souris contrôle et jetlag et récupérés 7 et 21 jours après la blessure. Barre d'échelle correspondant à 100 $\mu\text{m}$ .

(C) Immunomarquages représentatifs de la laminine (Vert) et du Dapi (Bleu) à 7, 10 et 21 jours après la blessure (panel de gauche) et coloration au Sirius Red des coupes histologiques aux mêmes temps (panel de droite). Barre d'échelle correspondant à 100µm.

(D) Distribution de la surface des fibres (panel de gauche) et quantification de la surface de fibrose (panel de droite) des coupes histologiques. (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test ou simple T-test.

Par la suite, nous avons également voulu déterminer si une altération environnementale de l'horloge modulait l'infiltration leucocytaire qui se produit au cours du processus de régénération musculaire. Pour cela, nous avons collecté des TA blessés de souris contrôles et de souris sous jetlag 1, 2, 4 et 7 jours après la blessure. De façon surprenante, nous observons une altération de la cinétique inflammatoire avec un effet principalement sur les cellules myéloïdes durant les 2 premiers jours après l'induction de la blessure musculaire. En effet, nous observons une diminution significative du nombre de leucocytes normalisé par milligrammes de tissus 2 jours après blessure (Figure 59 B). Cette diminution s'accompagne d'une réduction du nombre de neutrophiles, de monocytes ainsi que de macrophages pro-inflammatoires chez les souris sous jetlag (Figure 59 D). Concernant les macrophages, cette diminution est observée uniquement 2 jours après blessure et n'est plus présente 4 jours après blessure. De plus, elle n'est pas visible dans la population de macrophages anti-inflammatoires (Figure 59 H). Nous observons également une tendance à la diminution du nombre d'éosinophiles chez les souris jetlag à 2 jours mais cette valeur n'atteint pas la significativité (Figure 59 C).

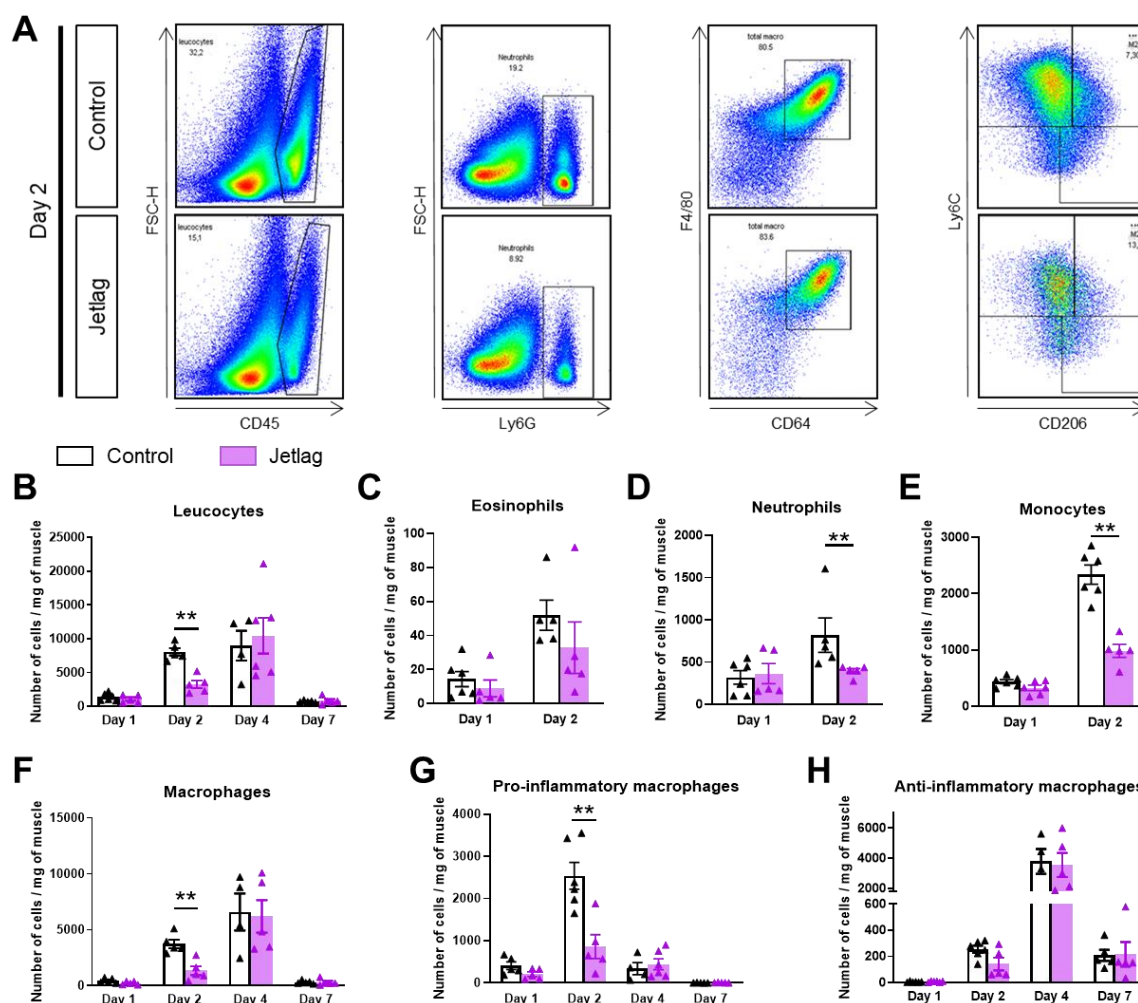


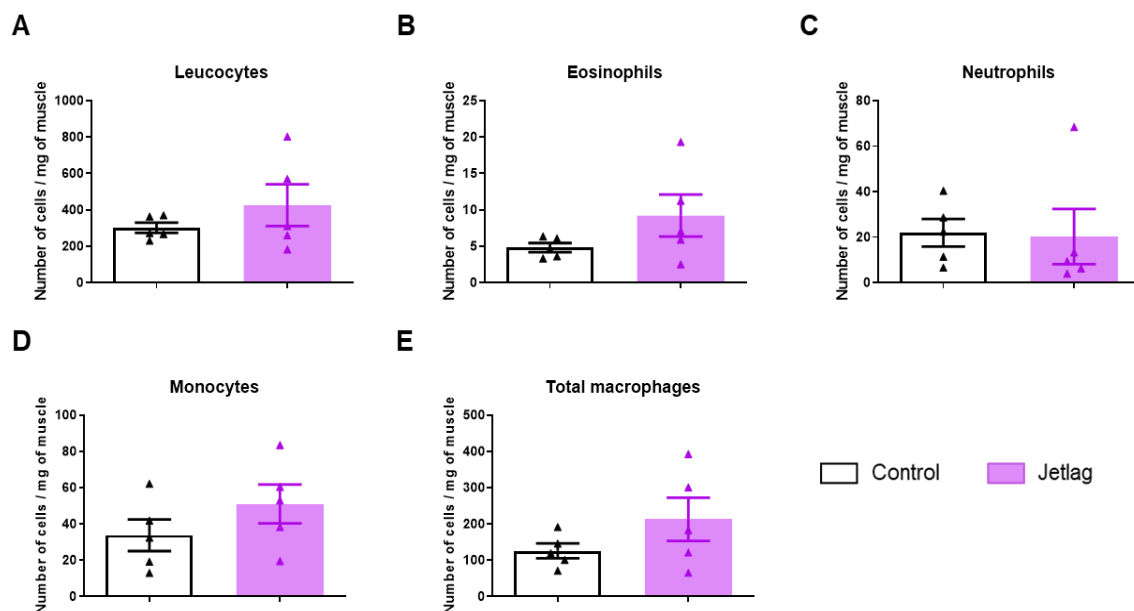
Figure 59 : La cinétique inflammatoire est modifiée chez les souris soumises à une altération environnementale de l'horloge.

(A) Dot-plot représentatif des populations de leucocytes, neutrophiles et macrophages au sein des broyats de muscle de souris contrôles et soumises à un « jet-lag » prélevés 2 jours après blessure.

(B-H) Cinétique des différentes populations immunitaires rapportées par milligrammes de muscle analysées par cytométrie en flux chez des souris contrôles et sous « jet-lag » et dont les muscles blessés ont été récupérés à 1, 2, 4 et 7 jours après blessure (n=5-6). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test.

Comme décrit dans l'introduction, le recrutement des leucocytes dans les tissus est soumis à des variations circadiennes même en condition basale. Afin de déterminer l'impact du jetlag sur le recrutement basal des leucocytes dans le muscle, la proportion des différentes populations immunitaires présentées ci-dessous a également été étudié au sein de muscles n'ayant pas été blessés. De façon intéressante, la proportion de leucocytes n'est pas diminuée comme observé après blessure et nous pouvons même constater une tendance à l'augmentation de la proportion de leucocytes, de monocytes, de macrophages chez les souris soumises à un jet-lag comparés aux souris contrôles (Figure 60 A, D, E). Cela suggère que

l'altération environnementale de l'horloge impacte de façon différentielle le recrutement basal des leucocytes dans le muscle et leur recrutement lié à une inflammation aiguë.



**Figure 60 : Impact d'une altération environnementale de l'horloge circadienne sur la proportion immunitaire dans des muscles non blessés.**

(A-E) Nombre de différentes cellules immunitaires rapporté par milligramme de muscle dans des quadriceps de souris contrôles et de souris sous « jetlag » (n=5-6).

Par ailleurs, étant donné qu'il est compliqué de perfuser le muscle avant de le collecter, nous avons voulu vérifier si les variations des leucocytes observées au sein des muscles blessés et non blessés n'étaient pas le reflet de la proportion de leucocytes circulant à travers le réseau vasculaire musculaire. Pour cela, nous avons collecté des muscles de souris WT C57BL/6J 6 jours après la réalisation d'une blessure musculaire. 10 minutes avant la mise à mort de l'animal, nous avons injecté en intraveineux un anticorps couplé à un fluorochrome et dirigé contre le marqueur général des leucocytes (CD45). Suite à la collecte des muscles, nous avons réalisé un immunophénotypage des échantillons en utilisant un second anticorps CD45 couplé à un autre fluorochrome afin de distinguer l'origine des leucocytes observés : ceux présents dans la circulation sanguine ou ceux ayant été recrutés au sein du muscle squelettique. Cette expérience nous a permis de clairement démontrer que les leucocytes totaux détectés au sein du muscle sont bien issus d'un recrutement cellulaire et non d'une contamination sanguine. En effet, nos marquages mettent en lumière que, dans le muscle, nous détectons uniquement les leucocytes marqués après la mise à mort de l'animal sur les broyats de muscle et non celui injecté par voie intraveineuse. De même, sur le prélèvement

sanguin, nous détectons uniquement l'anticorps CD45 injecté par voie intraveineuse (Figure 61 A-C). Cette observation est importante car elle confirme que nos résultats sont bien liés aux leucocytes recrutés au sein du muscle au cours d'une blessure et non aux leucocytes circulants dans le réseau vasculaire.

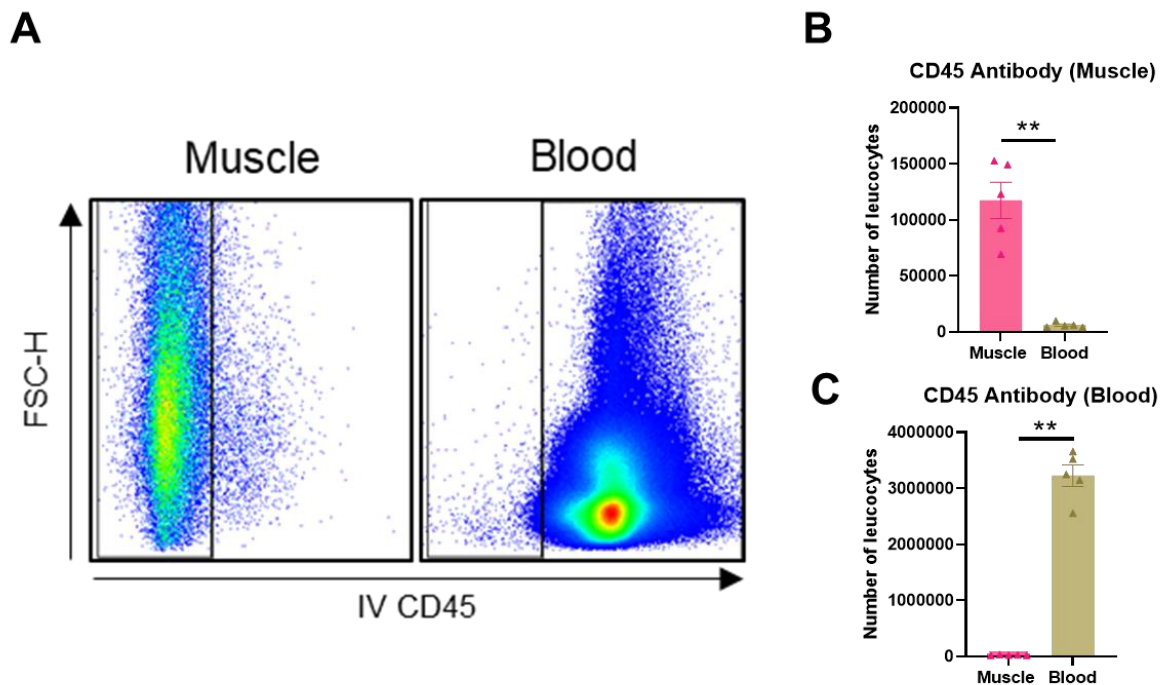


Figure 61 : Identification de l'origine des leucocytes observées dans le muscle squelettique blessé.

(A) Dot-Plot représentatif des leucocytes marqués par l'anticorps injecté par voie intraveineuse dans les populations récoltées à partir du muscle ou du sang.

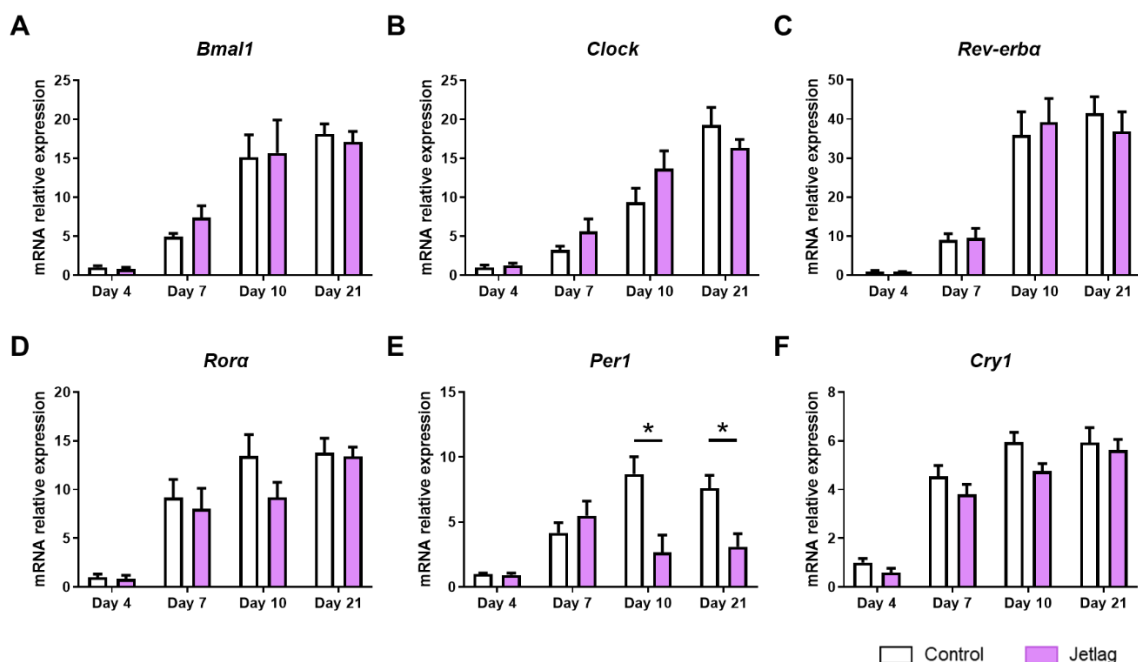
(B-C) Nombre de leucocytes totaux ayant fixé l'anticorps CD45 injecté par voie intraveineuse (n=5).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  par Mann-Whitney.

Par la suite, nous avons analysé l'expression des différents gènes de l'horloge au sein des muscles des souris contrôles et jet-lag collectés à 4, 7, 10 et 21 jours après la blessure. Ces analyses nous permettent de constater que, premièrement, l'expression des différents acteurs de l'horloge diminue fortement durant les premiers jours après la blessure, principalement 4 et 7 jours après la blessure. Durant ces premiers jours, aucune différence dans l'expression des gènes de l'horloge n'est observée entre le groupe contrôle et le groupe jet-lag. A partir de 10 jours après la blessure, on observe une augmentation de l'expression de l'ensemble des gènes de l'horloge pour atteindre leur maximum à 21 jours après la blessure. Cependant, aucune différence significative d'expression n'est observée pour les gènes *Bmal1*, *Clock*, *Rev-erba*, *Rora* et *Cry1* entre les groupes contrôles et jet-lag aux différents temps (Figure 62 A-D, F). On peut cependant noter que l'expression de *Per1* est significativement diminuée dans le



groupe jet-lag à 10 et 21 jours après la blessure (Figure 62 E). Ces données suggèrent, tout d'abord, que l'induction d'une blessure musculaire perturbe l'expression globale des gènes de l'horloge dans le muscle squelettique. Cette perte d'expression s'estompe conjointement avec le processus de régénération. De plus, on observe une différence légère dans l'expression de ces gènes à des stades tardifs de régénération avec une différence marquée uniquement pour *Per1*. A ce stade, il est important de noter que le protocole de jet-lag est arrêté dès que la blessure musculaire est faite et cela peut donc expliquer que les variations des gènes de l'horloge ne soient plus visibles 21 jours après l'arrêt de ce protocole. De plus, ce protocole de jetlag, bien qu'il se rapproche d'une condition physiologique, n'est pas considéré comme un protocole sévère ce qui pourrait également expliquer ces résultats. Cependant, il reste important de souligner qu'en raison du décalage subi, nous ne savons pas à quel ZT se situe les souris jetlag alors que nos souris contrôles ont été prélevées à ZT2. Néanmoins, nous pouvons constater que ce protocole a induit une forte altération du processus global de régénération musculaire.



**Figure 62 : L'expression des gènes de l'horloge est impactée par la blessure musculaire et le protocole de jet-lag.**

(A) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes de l'horloge circadienne dans le muscle TA après blessure de souris contrôles et jet-lag (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test.

Nous avons également réalisé une seconde expérience d'altération environnementale de l'horloge. Cette seconde expérience est considérée comme une altération plus sévère que la précédente. En effet, nous avons placé des souris contrôles C57BL/6J sous lumière constante durant 3 semaines. Après la première semaine, les souris ont été blessées et les muscles ont été collectés 7 et 16 jours après blessure pour des analyses histologiques et des analyses de l'ARNm. Nous retrouvons un phénotype similaire à celui observé lors de notre protocole précédent de jetlag, à savoir un défaut de régénération illustré par une diminution significative de l'aire des fibres 16 jours après la blessure visible avec le marquage H&E mais également avec un marquage à la laminine (Figure 63 A-C). De surcroît, l'altération du processus de régénération est visible sur la répartition des fibres en fonction de leur taille 16 jours après la blessure avec une diminution significative de la proportion des fibres de grande tailles chez les souris soumises à la lumière constante (Figure 63 D).

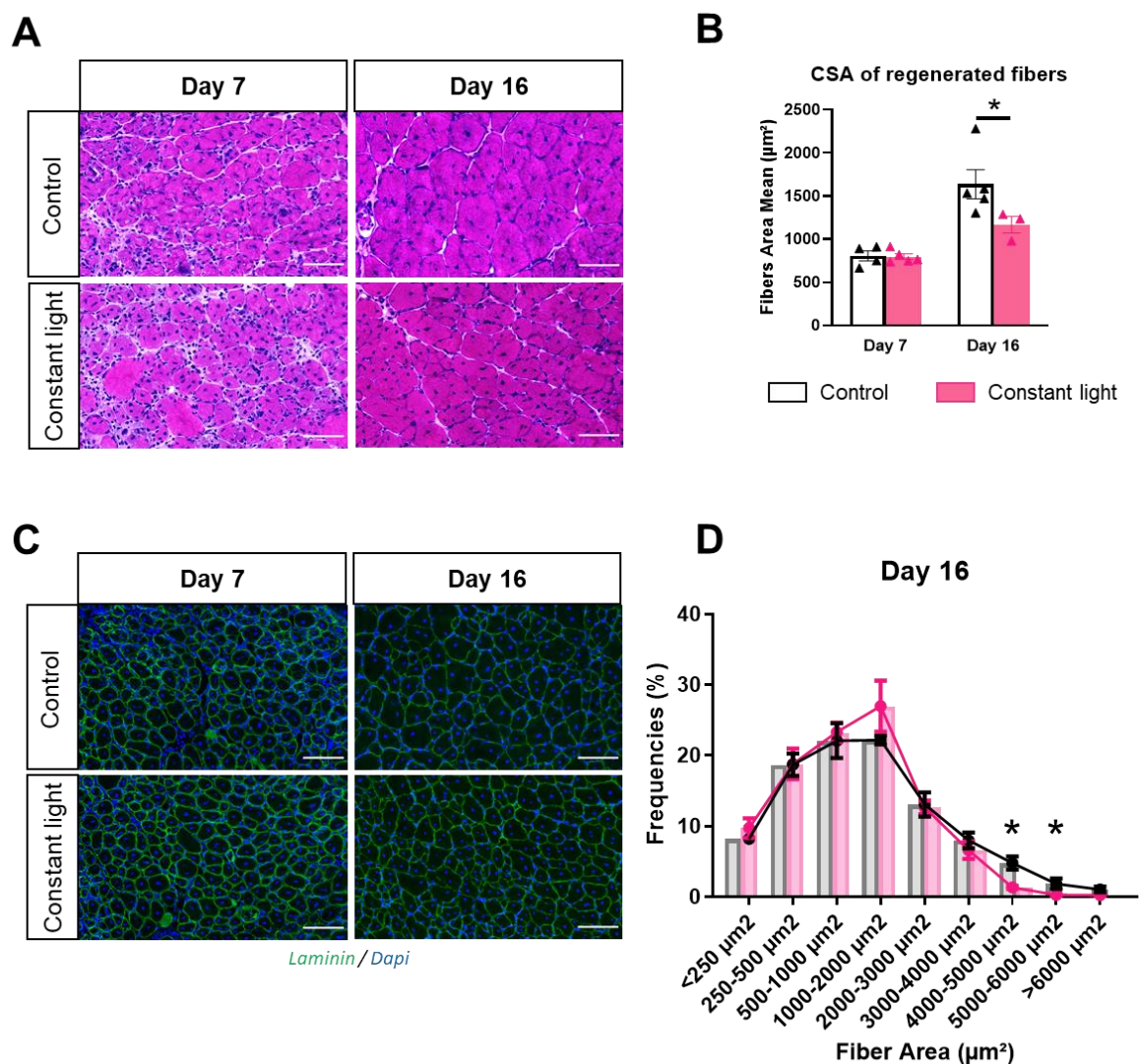




Figure 63 : L'altération environnementale de l'horloge par lumière constante altère le processus de régénération du muscle squelettique.

(A) Coloration à l'Hémaroxyline / éosine de coupes histologiques de muscles provenant de souris contrôle et de souris soumises à une lumière constante récupérés 7 et 16 jours après la blessure. Barre d'échelle correspondant à 100µm.

(B) Aire global des fibres régénérées des souris contrôles et sous lumière constante récupérés à 7 et 16 jours après blessure (n=3-4 par groupe).

(C) Immunomarquages représentatifs de la laminine (Vert) et du Dapi (Bleu) sur des coupes histologiques de TA récupérés 7 et 16 jours après la blessure. Barre d'échelle correspondant à 100µm.

(D) Répartition des fibres en fonction de leur taille (N=3-4 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test ou simple T-test.

De plus, l'altération génétique des gènes de l'horloge a été étudiée sur des ARNm extraits à partir de muscle total 7 jours après la blessure et, comme attendu, l'expression des gènes de l'horloge est globalement altérée avec des différences significatives concernant le gène *Rev-erba*, *Clock* et proche de la significativité pour *Bmal1* (Figure 64 A-C). Ces données montrent que l'instauration du protocole de lumière constante impacte significativement l'horloge circadienne au sein du muscle blessé.

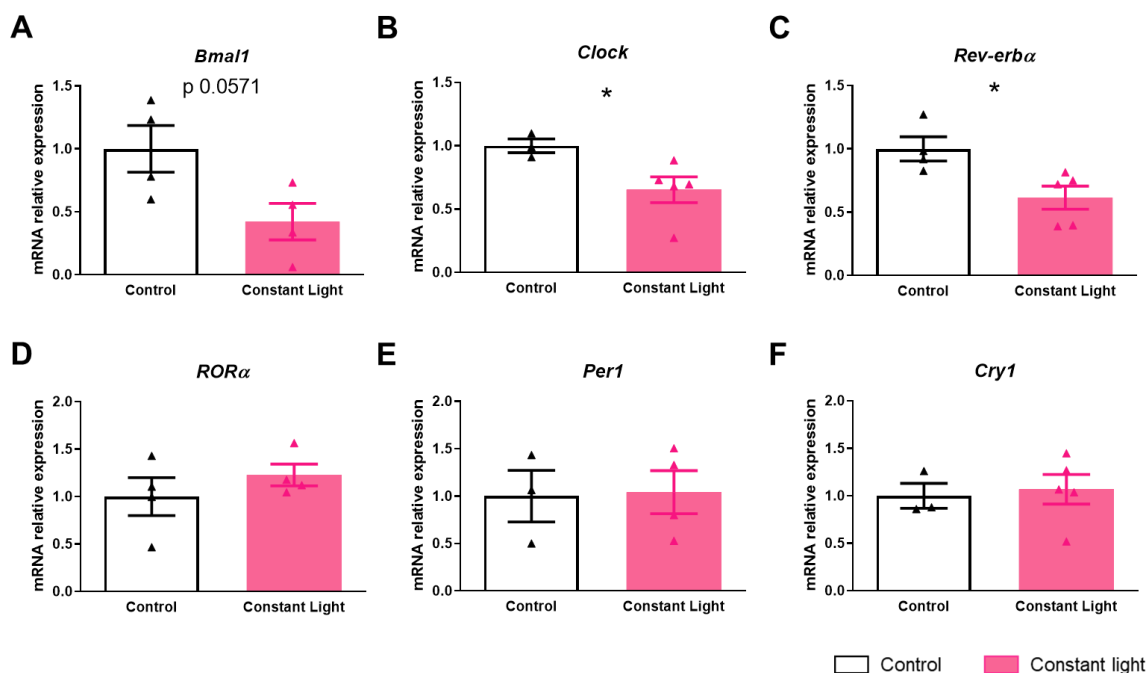


Figure 64 : L'expression des gènes de l'horloge est impactée par la blessure musculaire et le protocole de jet-lag.

(A-F) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes de l'horloge circadienne dans le muscle TA après blessure de souris contrôles et sous lumière constante (n=3-4 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par test Mann-Whitney.

L'ensemble de ces données démontrent que l'altération environnementale ou génétique de l'horloge circadienne altère significativement le processus de régénération et notamment le versant inflammatoire de ce processus.

## 2.2 Impact de l'heure de la blessure sur le processus de régénération musculaire

Nous avons ensuite voulu explorer la capacité régénérative de souris contrôles C57BL/6J WT blessées à 2 temps différents de la journée. Un groupe de souris est blessé au BaCl<sub>2</sub> 0,8% à ZT6 (13h) et le second groupe à ZT18 (1h). Nous avons choisi ces deux temps précisément parce qu'ils correspondent respectivement au milieu de la phase inactive et au milieu de la phase active de la souris (Figure 65) nous permettant d'étudier une véritable conséquence des rythmes circadien sur ce phénomène de régénération.

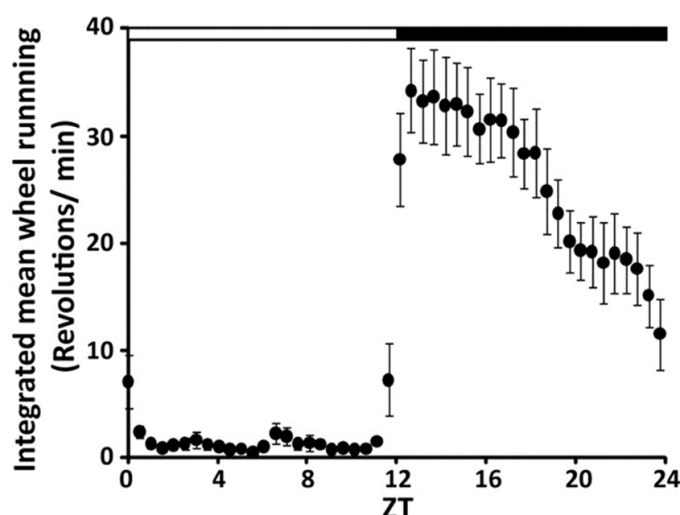
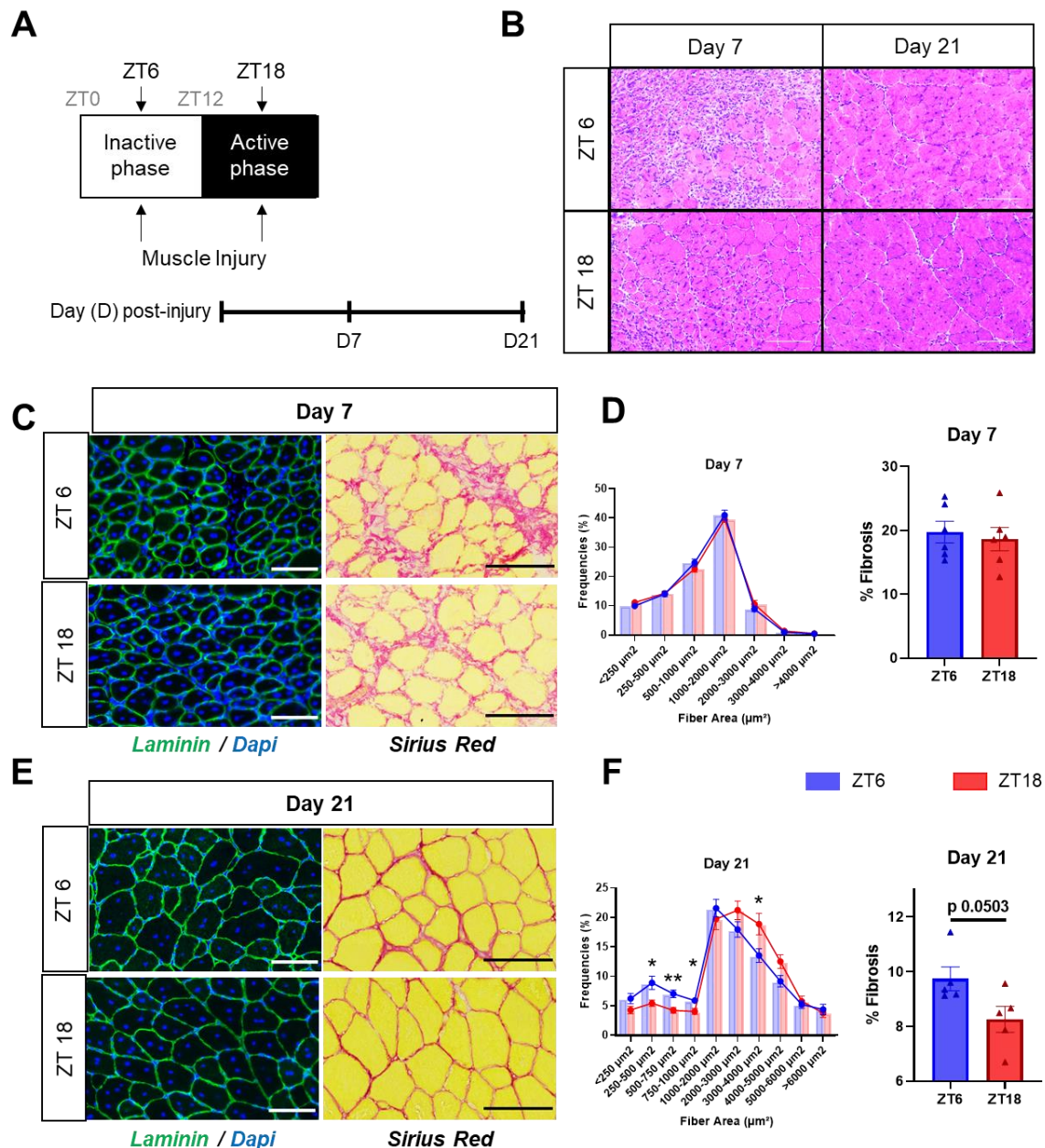


Figure 65 : Mesure de l'activité locomotrice de souris sauvages durant la journée (adaptée de Nakamura et al., 2011)<sup>752</sup>.

Les TA blessés ont été récupérés également à ZT6 et ZT18 respectivement 4, 7 et 21 jours après la blessure (Figure 66 A). Sur chaque souris, nous avons prélevé un TA pour une analyse histologique et un TA pour analyser l'expression des gènes. Nous avons également prélevé un quadriceps qui est utilisé comme un contrôle de muscle non blessé.

La capacité de régénération du muscle squelettique de ces souris est évaluée par des analyses histologiques comme précédemment. Les dommages globaux liés à la blessure sont plus sévères chez les souris blessées durant leur phase inactive (ZT6) que durant leur phase active (ZT18) au stade final du processus de régénération 21 jours après la blessure. En effet, nous n'observons aucune différence significative concernant la répartition de la taille des fibres ainsi que sur le dépôt fibrotique des muscles blessés 7 jours après la blessure entre nos 2

groupes (Figure 66 C, D). Cependant, après 21 jours nous observons une meilleure régénération chez les souris blessées en milieu de phase active. Cette amélioration du processus de régénération est visible sur les coupes marquées à la coloration H&E. Cette donnée est confirmée par la quantification de l'immunomarquage de la laminine qui nous permet de mettre en évidence une diminution significative des fibres régénérées de petite taille dans le groupe ZT18, associée à une augmentation significative des fibres de grandes tailles (Figure 66 E, G). De plus, le développement de la fibrose y est également moins prononcé avec une diminution de la quantification de collagène chez les souris blessées à ZT18 très proche de la significativité (Figure 66 E, G). L'ensemble de ces données indiquent donc que l'heure de la blessure a un impact important sur le processus global de la régénération en altérant la taille des fibres et en régulant de façon plus modeste le développement de la fibrose dans le muscle squelettique.



**Figure 66 : Les souris blessées en phase active régénèrent plus rapidement que les souris blessées en phase inactive.**

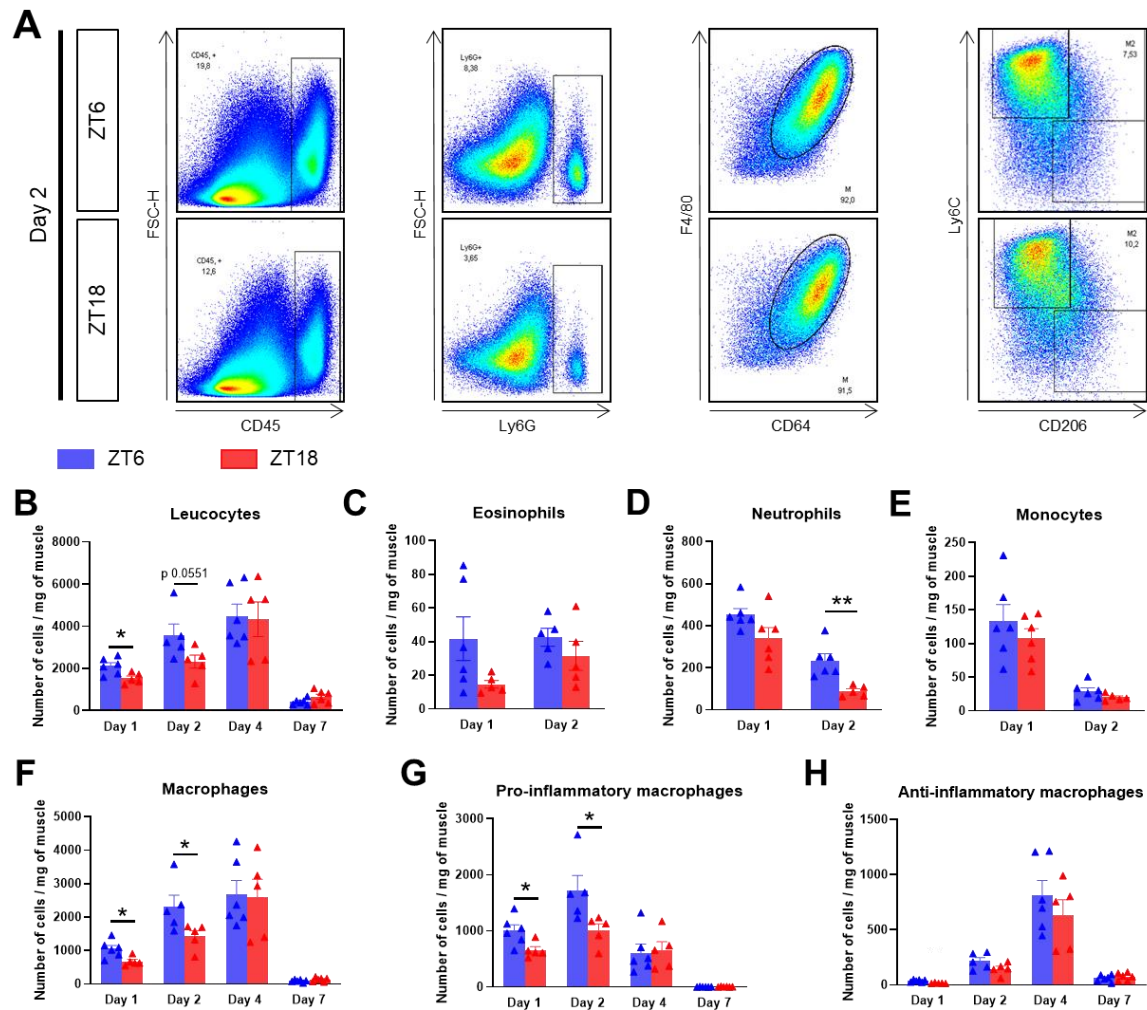
(A) Schéma du protocole expérimental de blessure à ZT6 et ZT18.

(B) Coloration à l'Hématoxyline / éosine de coupes histologiques de muscles provenant de souris blessées à ZT6 et ZT18 et récupérées 7 et 21 jours après la blessure. Barre d'échelle correspondant à 100µm.

(C-E) Immunomarquages représentatifs de la laminine (Vert) et du Dapi (Bleu) de coupes histologiques de TA récupérées 7 et 21 jours après blessure (panel de gauche) et colorées au Sirius Red (panel de droite). Barre d'échelle correspondant à 100µm.

(D-F) Distribution des fibres en fonction de leur taille (panel de gauche) et quantification de la surface de fibrose (panel de droite) des coupes histologiques (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test ou simple T-test.

Par ailleurs, nous avons voulu déterminer si l'heure de la blessure impactait également le recrutement leucocytaire au sein du muscle durant ce processus. Pour cela, nous avons réalisé un immunophénotypage sur des souris blessées dans les mêmes conditions que ci-dessus. Il est important de préciser que la récupération des tissus a également été réalisée à ZT6 et ZT18 pour maintenir le même délai de régénération dans les deux groupes de souris. Nous avons donc collecté les muscles selon la cinétique de 1, 2, 4 et 7 jours après blessure. Les résultats de cytométrie en flux mettent en évidence des variations dans certaines populations immunitaires entre les deux temps. En effet, la proportion de leucocytes totaux au sein du muscle est diminuée dans le groupe ZT18 durant le premier jour de régénération et une forte tendance est observée concernant le deuxième jour (Figure 67 A-B). Nous observons également une diminution significative du nombre de neutrophiles au sein du tissu chez les souris blessées en phase active 2 jours après blessure (Figure 67 D). D'autres cellules myéloïdes comme les macrophages sont également impactés durant les deux premiers jours de la régénération et plus précisément les macrophages Ly6C<sup>High</sup> correspondant aux macrophages pro-inflammatoires qui diminuent significativement comparés aux souris ZT6 (Figure 67 F-G). Ces variations ne s'appliquent pas aux macrophages anti-inflammatoires dont la cinétique est similaire entre les deux groupes (Figure 67 H). Enfin, une tendance importante à la diminution du nombre d'éosinophiles est observée 1 jour après la blessure (Figure 67 C). Toutes ces observations mettent en lumière une modification du recrutement leucocytaire dans le muscle squelettique selon l'heure de la blessure. Ce phénotype semble toucher plus particulièrement les cellules myéloïdes (neutrophiles, macrophages pro-inflammatoires) avec un recrutement minoré chez les souris blessées en milieu de phase active ZT18 comparé aux souris blessées en milieu de phase inactive ZT6.



**Figure 67 : La cinétique inflammatoire associée à la régénération musculaire est modifiée selon l'heure de la blessure.**

(A) Dot-plot représentatif des populations de leucocytes, neutrophiles et macrophages au sein des broyats de muscle de souris blessées à ZT6 et ZT18 prélevés 2 jours après blessure.

(B-H) Cinétique des différentes populations immunitaires rapportées par milligrammes de muscle et analysées par cytométrie en flux chez des souris blessées à ZT6 et ZT18 et dont les muscles blessés ont été récupérés à 1, 2, 4 et 7 jours après blessure (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test.

Suite à ces premiers résultats, nous avons voulu déterminer si le recrutement leucocytaire était modifié de façon plus précoce. Pour cela, nous avons analysé le recrutement leucocytaire dans les muscles blessés à ZT6 et ZT18 12 heures après la blessure. Nous observons des tendances similaires à celles constatées ci-dessus, à savoir un recrutement significativement minoré des leucocytes et des neutrophiles chez les souris blessées à ZT18 comparés au groupe ZT6 (Figure 68 A, C). Une tendance à la diminution du nombre de monocytes et d'éosinophiles est également observée chez ces souris comme cela peut être le cas dans

l'expérience précédente (Figure 68 B, D). Cependant, le niveau de macrophage est sensiblement identique entre les deux groupes 12 heures après la blessure (Figure 68 E). Ces résultats indiquent que le nombre global de leucocytes recrutés ainsi que celui de neutrophiles semble être directement modifié par l'heure de la blessure. De façon intéressante, à ce temps aussi précoce le nombre de macrophages n'est pas affecté ce qui suggère que les variations observées dans cette population s'effectuent entre 12 et 24 heures après la blessure.

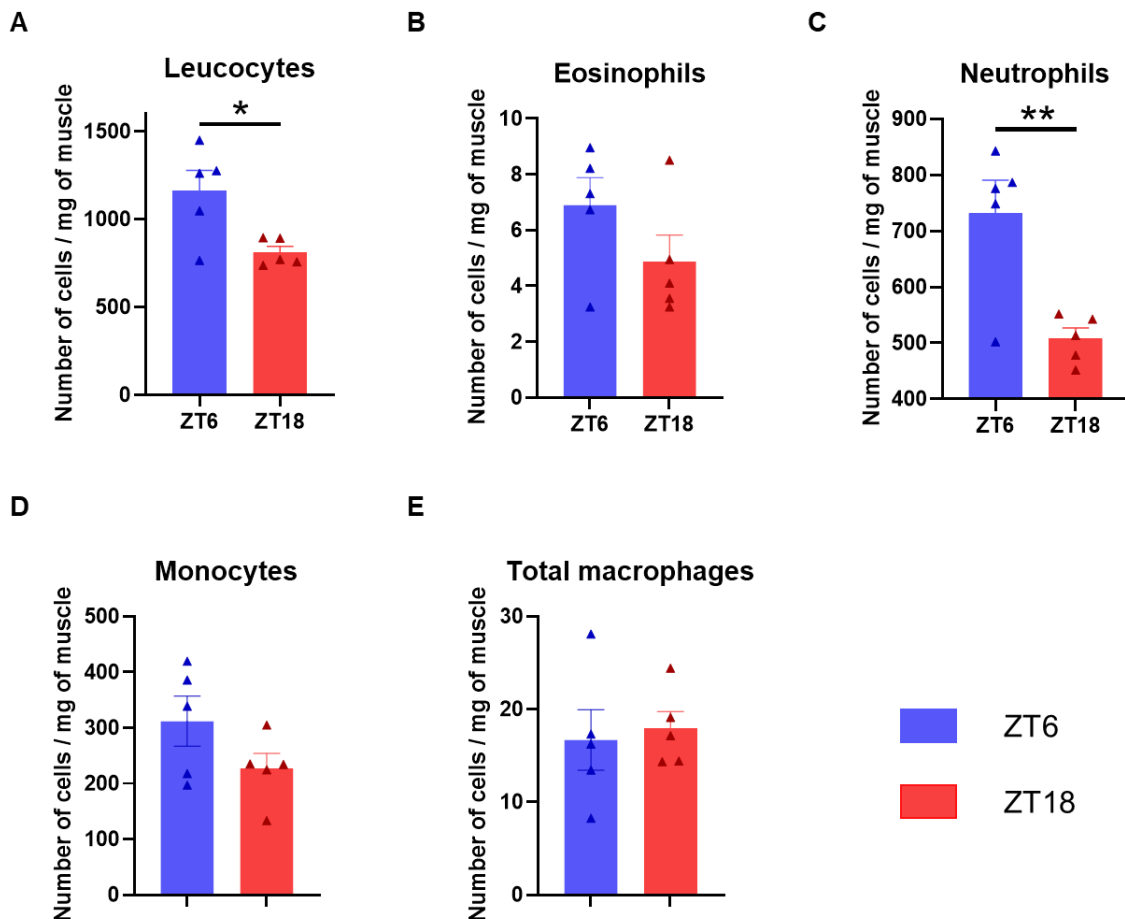


Figure 68 : La blessure musculaire à différents temps modifie la proportion des cellules immunitaires 12 heures après la blessure.

(A-E) Nombre de populations immunitaires par milligrammes de muscles chez les souris blessées à ZT6 et ZT18 et récupérées 12 heures après la blessure (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

Par ailleurs, nous avons également voulu évaluer en parallèle le recrutement leucocytaire au sein de muscles non blessés pour comparer la tendance observée entre les deux groupes. Pour cela, nous avons collecté les quadriceps de souris contrôles à ZT6 et ZT18. De façon intéressante, le profil de recrutement leucocytaire observé dans les muscles non blessés est inverse à celui observé dans des muscles blessés. En effet, la plupart des populations



immunitaires étudiées sont augmentées chez les souris en phase active (ZT18) par rapport à la phase inactive (ZT6) dont les leucocytes totaux et les monocytes qui présentent une augmentation significative (Figure 69 A-G) ce qui est en accord avec les données de la littérature<sup>578</sup>.

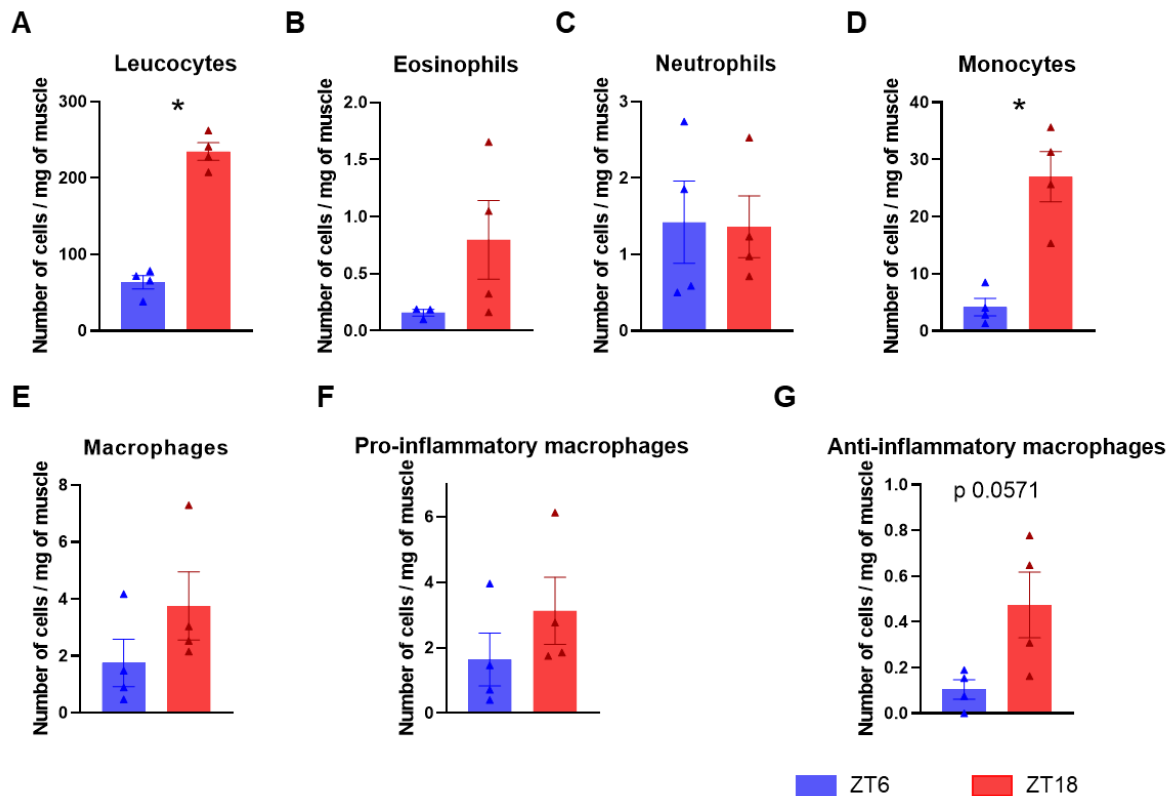


Figure 69 : La proportion de cellules immunitaires infiltrant le muscle non blessé est différente selon l'heure de la journée.

(A-G) Nombre de populations immunitaires par milligrammes de muscles chez les souris non blessées et collectées à ZT6 et ZT18 (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

Ce recrutement leucocytaire antagoniste selon l'état du muscle est intéressant et suggère que des mécanismes différents pourrait influencer le recrutement leucocytaire dans les muscles blessés et non blessés. C'est pourquoi nous avons analysé l'expression génique de deux récepteurs présents sur les cellules endothéliales et présenté comme les principales protéines responsable du recrutement circadien des cellules immunitaires au sein du muscle VCAM1 et ICAM1<sup>578</sup>. L'étude de l'expression de ces gènes à ZT6 et ZT18 ne montre aucune différence significative 4, 7 et 21 jours après blessure suggérant que les différences dans l'infiltration inflammatoire ne sont pas dues à des variations de ces récepteurs durant la régénération (Figure 70 A-B). Cependant, il demeure intéressant de noter que l'expression de ces deux gènes est augmentée dans les TA blessés quand on les compare au quadriceps non blessé.



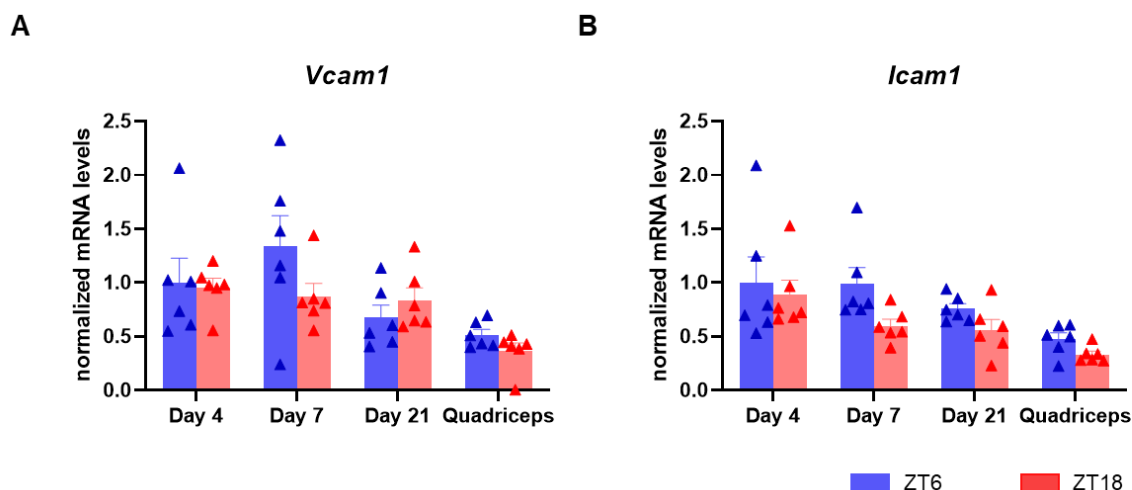


Figure 70 : L'expression de VCAM-1 et ICAM-1 ne sont pas modifiées significativement par l'heure de la blessure.

(A) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes *Vcam1* et *Icam1* dans le muscle TA après blessure de souris blessées à ZT6 et ZT18 (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

Dans ce contexte, nous nous sommes également intéressés au comportement des cellules souches musculaires durant la régénération selon l'heure à laquelle nous pratiquons la blessure musculaire. Nous avons ainsi évalué les capacités de prolifération et de différenciation des cellules souches musculaires dans nos deux groupes de souris. Dans un premier temps, nous avons analysé leur capacité proliférative *via* un marquage de l'ADN nouvellement synthétisé par l'Edu injecté *in vivo* 4 heures avant la mise à mort de l'animal. Cette expérience met en évidence une capacité minorée des cellules souches provenant de souris blessées en phase inactive (ZT6) à proliférer comparée aux cellules souches provenant de souris blessées durant la phase active (ZT18) (Figure 71 A-B). Nous avons ensuite investigué l'expression de gènes spécifiques de la maturation des myofibres à 4, 7 et 21 jours après la blessure musculaire. Ces données sont en accord avec nos résultats précédents puisque nous observons une expression plus faible, chez les souris blessées à ZT18, de la myosine embryonnaire (MYH3) 7 jours après blessure (Figure 71 C). Cette myosine est par ailleurs exprimée uniquement durant le développement embryonnaire et les premières phases de développement des myofibres au cours du processus de régénération musculaire. A l'inverse, nous observons une augmentation de l'expression de myosine 2B (MyH4) chez les souris blessées à ZT18 comparés au groupe ZT6. La myosine de type 2B est une myosine « mature » exprimée uniquement par les myofibres ayant finalisées leur développement. Cela est d'ailleurs confirmé par une expression maximale de cette myosine 21 jours après la blessure lorsque le processus de régénération est abouti (Figure 71 D). L'ensemble de ces données semble donc démontrer des processus de prolifération et de différenciation

myogénique accélérés chez les souris blessées en milieu de phase active comparé aux souris blessées en milieu de phase inactive.

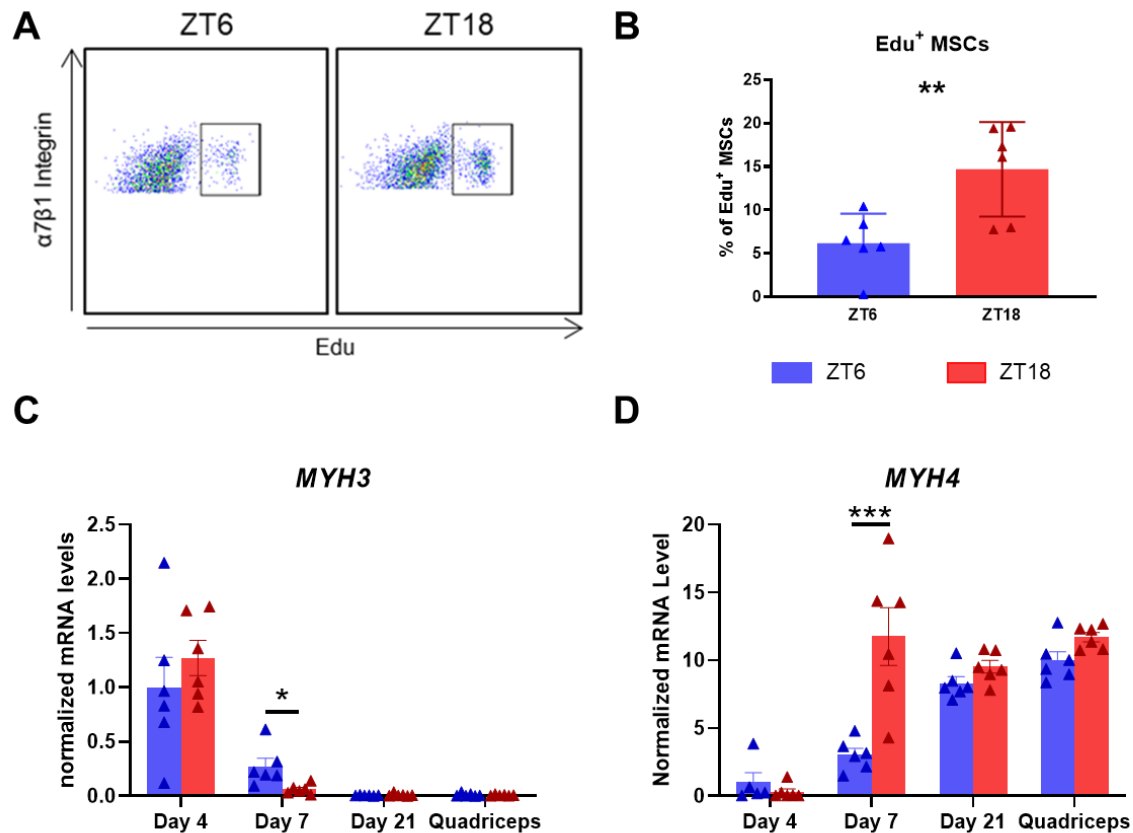


Figure 71 : La capacité proliférative des cellules souches musculaires et leur maturation est impactée par l'heure de la blessure.

(A) Dot-Plot représentatif de la quantité de cellules souches musculaires ayant incorporées de l'Edu et quantification (B) chez des souris blessées à ZT6 et ZT18 (n=6 par groupe).

(C-D) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes MYH3 et MYH4 dans le TA après blessure à ZT6 et ZT18 ainsi que dans le quadriceps non blessé (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

En parallèle, nous avons étudié l'expression des gènes de l'horloge sur des ARNm extraits des mêmes muscles que décrits précédemment. De façon intéressante, l'expression de l'ensemble des gènes de l'horloge est fortement diminuée durant les premières phases de la régénération entre 4 et 7 jours après la blessure comme nous l'avons observée dans nos expériences de jetlag (Figure 72 A-F). 7 jours après la blessure, nous pouvons observer que le niveau d'expression des gènes de l'horloge semble se rétablir plus rapidement chez les souris blessées à ZT18 par rapport au groupe blessé à ZT6 avec un niveau d'expression comparable au quadriceps non blessé. Enfin, 21 jours après la blessure, l'expression des différents gènes de l'horloge revient à un niveau comparable à celui du muscle contrôle,

témoignant d'un retour à un état physiologique du muscle. L'ensemble de ces résultats indique que, suite à une blessure, nous observons une perte de rythmicité et une diminution de l'expression des gènes de l'horloge durant les premières phases de la régénération. Cependant, le retour à un niveau d'expression physiologique est plus rapide chez les souris blessées durant leur phase active que celles blessées durant la phase inactive.

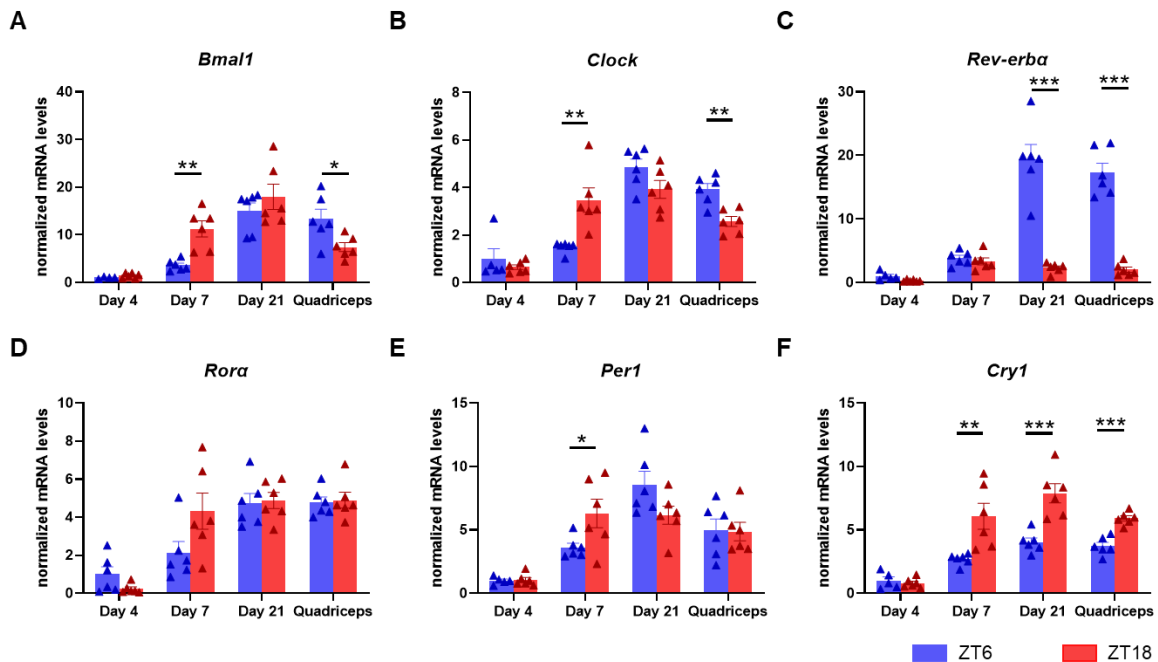


Figure 72 : L'expression des gènes de l'horloge est modifiée par la blessure musculaire et par l'heure de cette blessure.

(A-F) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes de l'horloge circadienne dans le TA de souris blessées à ZT6 et ZT18 que dans le quadriceps non blessé (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  par T-test.

### 2.3 Impact d'une altération génétique de l'horloge circadienne au sein des cellules myéloïdes sur le processus de régénération musculaire

Suite à nos résultats précédents mettant en lumière des modifications de recrutement des cellules myéloïdes lors d'une altération environnementale ou génétique de l'horloge, nous nous sommes par la suite concentrés sur les conséquences d'une altération de l'horloge biologique au sein des populations myéloïdes. Pour se faire, nous avons croisé des souris *LysM<sup>Cre/+</sup>* avec différents modèles génétiques présentant une invalidation ou une surexpression de *ROR $\alpha$*  et *Rev-erba*, deux acteurs majeurs de l'horloge biologique. Nous avons ainsi obtenu des souris *LysM<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>fl/fl</sup>* déplétées en *ROR $\alpha$*  dans les cellules myéloïdes ; des souris *LysM<sup>Cre/+</sup>; Rev-erba<sup>DBD<sup>fl/fl</sup></sup>* qui expriment un mutant de la protéine *Reverb- $\alpha$*  déplété en domaine de liaison à l'ADN et enfin des souris *LysM<sup>Cre/+</sup>; Tg(Rev-erba<sup>fl/fl</sup>)*

qui surexpriment spécifiquement Rev-erba dans les cellules myéloïdes. Sur l'ensemble de ces trois modèles, nous avons pratiqué des analyses histologiques 21 jours après la blessure musculaire. De façon très intéressante, nous mettons en évidence une altération importante du processus de régénération sur l'ensemble de ces modèles qui se caractérise par une modification de la distribution de la taille des fibres régénérées avec une proportion plus importante de fibres de petites tailles et une diminution de la fréquence des fibres de grandes tailles (Figure 73 A-F).

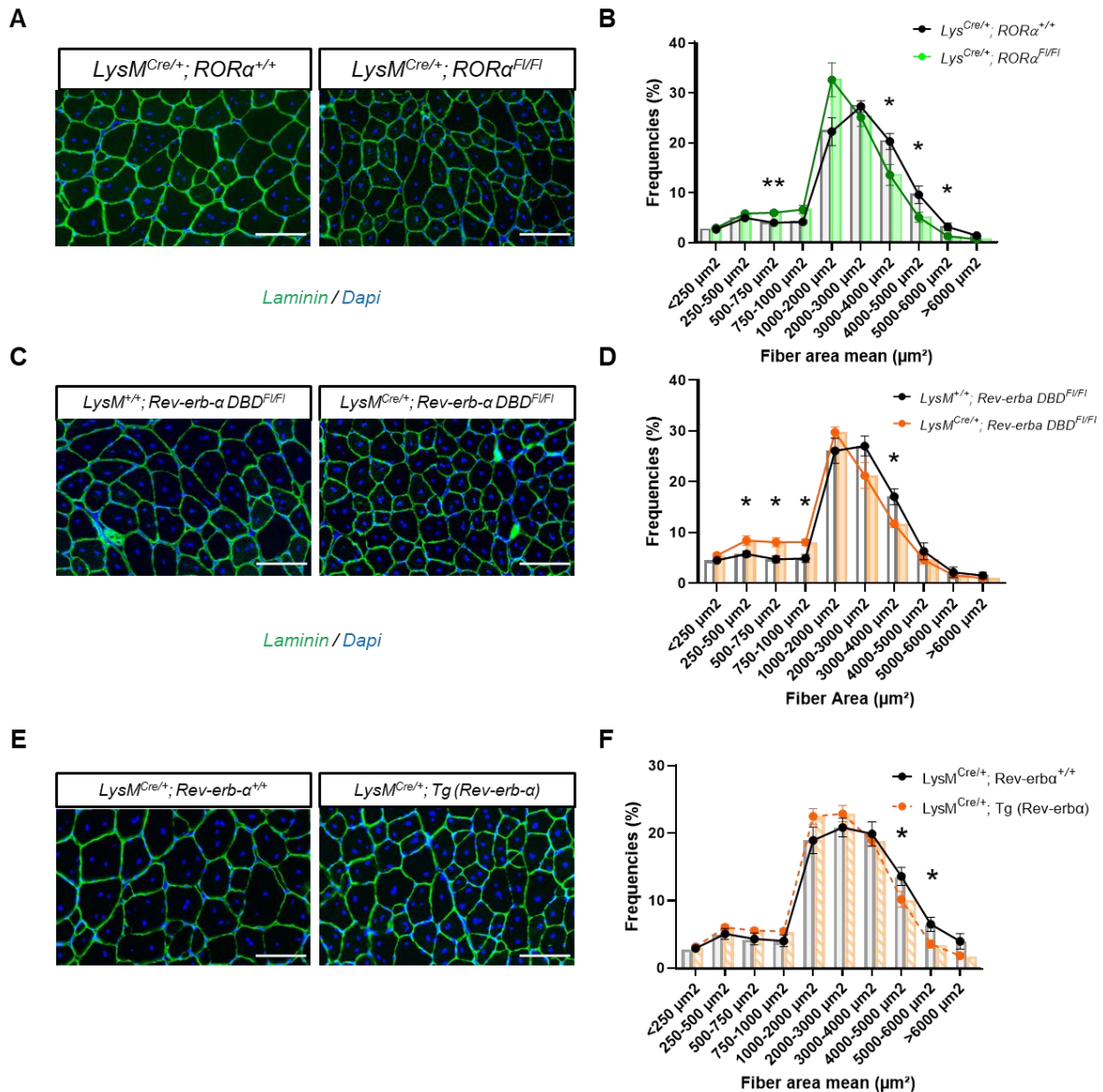
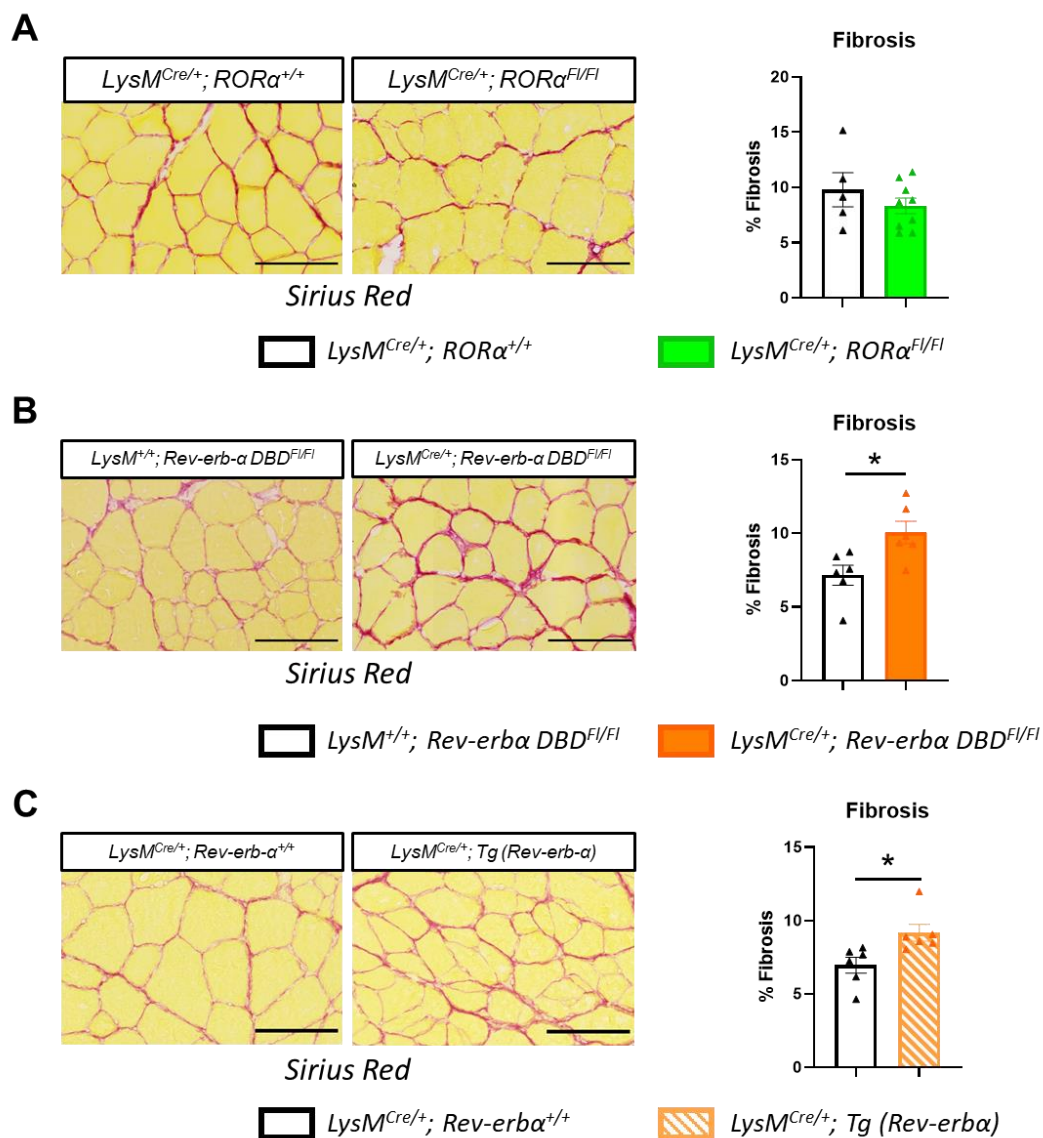


Figure 73 : Les modèles d'altération de l'horloge biologique au sein des cellules myéloïdes impacte le processus de régénération musculaire.

(A, C, E) Immunomarquages représentatifs de la laminine (Vert) et du Dapi (Bleu) des coupes histologiques de TA récupérés 21 jours après la blessure. Barre d'échelle correspondant à 100μm.

(B, D, F) Distribution de la surface des fibres. (n=5-6 par groupe pour les 3 expériences). Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test.

En parallèle, nous avons analysé le dépôt fibrotique dans ces trois modèles 21 jours après la blessure en utilisant une coloration au sirius red. Cette coloration a permis de mettre en évidence une augmentation significative de la fibrose dans les deux modèles impactant *Rev-erba* (Figure 74 B, C). Cependant, aucune différence significative n'est observée concernant le dépôt fibrotiques des souris *LysM<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>Fl/Fl</sup>* ce qui pourrait indiquer que la modulation de l'expression de *Rev-erba* dans les cellules myéloïdes est plus critique pour le développement de la fibrose que la délétion de *RORα* (Figure 74 A).



**Figure 74 : La modulation de l'expression de *Rev-erba* dans la population myéloïde induit une augmentation de la fibrose durant le processus de régénération.**

(A-C) Images représentative de la coloration au rouge sirius de muscles blessés et collectés 21 jours après la blessure (panel gauche) et quantification correspondante de la fibrose (panel droite) pour les modèles d'altération génétique de l'horloge circadienne au sein de la population myéloïde (n=5-6 par groupe pour les 3 expériences). Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

Grâce à ces analyses histologiques, nous avons également pu évaluer la capacité myogénique de ces souris en quantifiant le nombre de noyaux présents au centre des fibres régénérées. De façon intéressante, seule l'inactivation de *RORα* et la surexpression de *Rev-erba* modifie le nombre de noyaux au sein des fibres régénérées. En effet, nous observons dans ces modèles une proportion moins importante de fibres présentant plus de 2 noyaux associée à une proportion plus importante de fibres ayant moins de 2 noyaux en leur centre ce qui reflète la capacité de fusion des myoblastes (Figure 75 A-B, E-F). Par ailleurs, le phénotype semble moins marqué dans le modèle *LysM<sup>Cre/+</sup> ; ReverbaDB<sup>fl/fl</sup>* puisqu'aucune différence significative n'a été mise en évidence sur la répartition des noyaux au sein des fibres régénérés dans ce modèle (Figure 75 C-D). Ces données suggèrent donc que le processus de myogenèse, et particulièrement la capacité des myoblastes à fusionner, est modifié dans les différents modèles d'altération de l'horloge au sein des cellules myéloïdes.

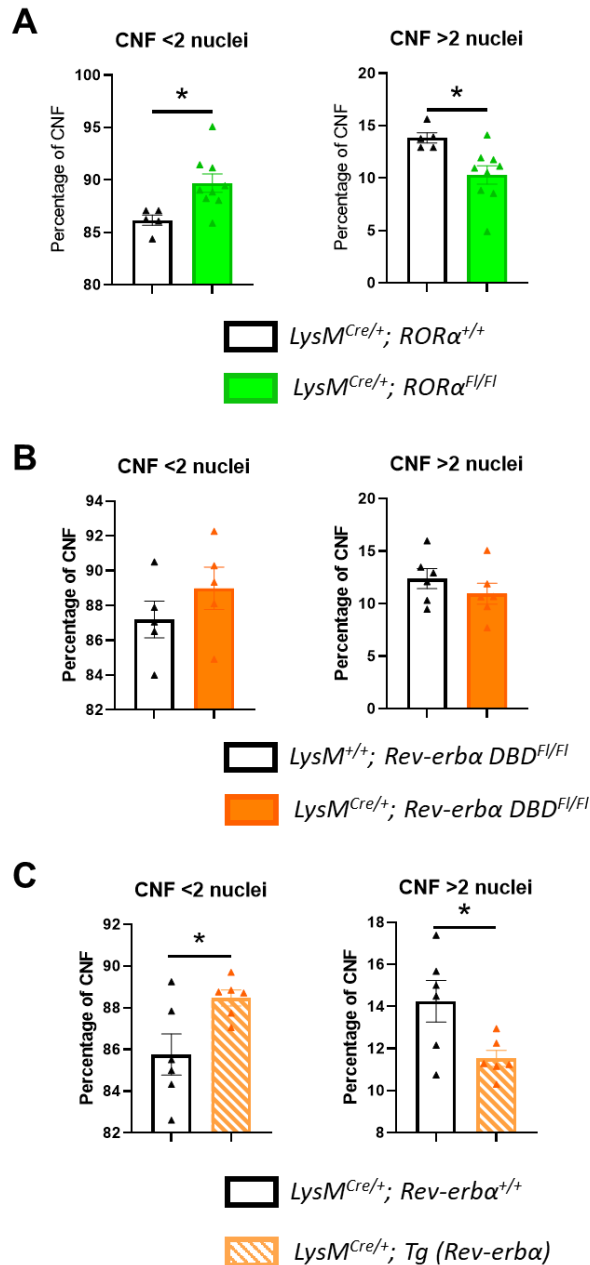


Figure 75 : La dérégulation du rythme circadien dans les cellules myéloïdes affecte la fusion des myoblastes durant la régénération.

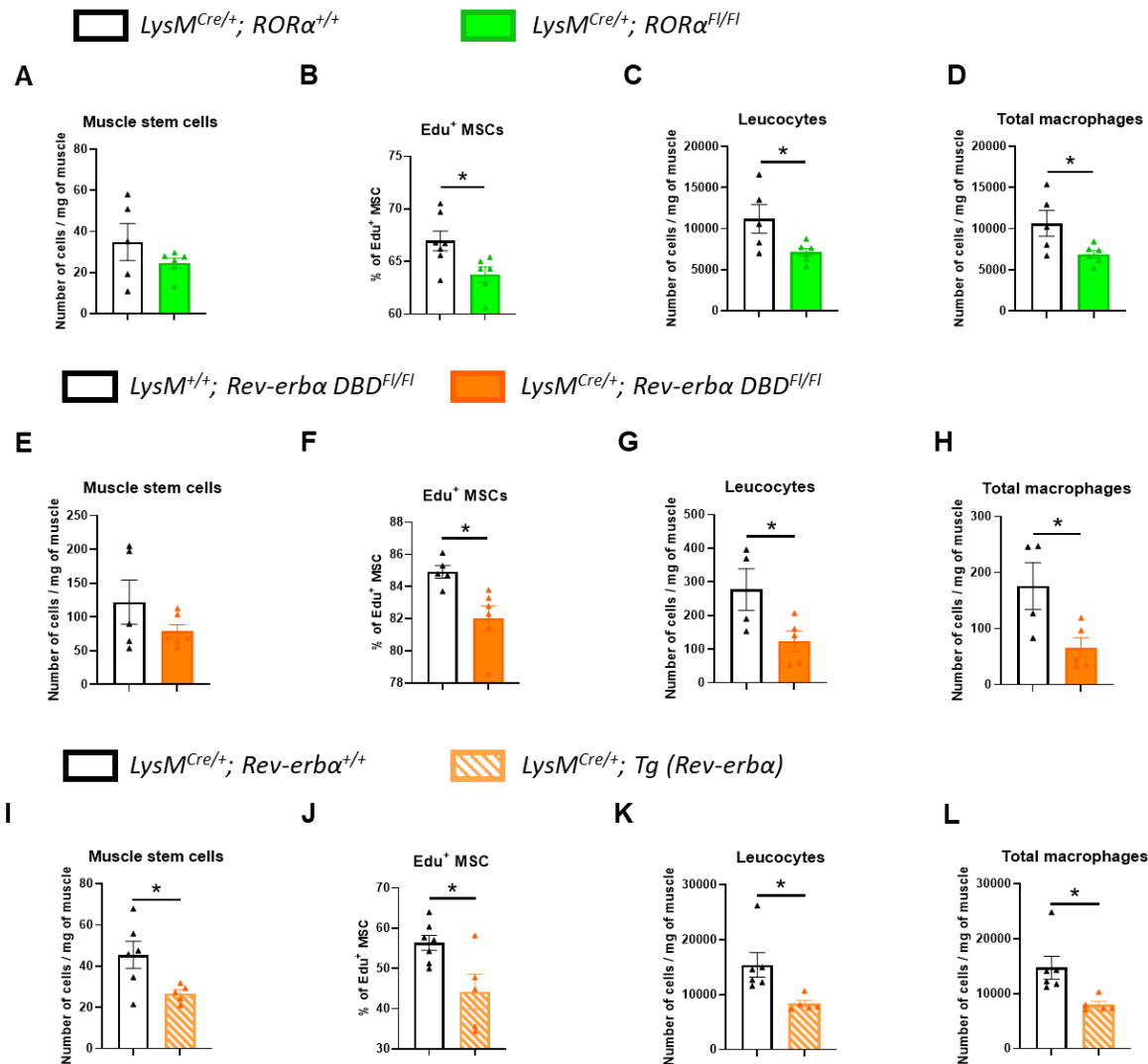
(A-C) Pourcentage de fibres régénérées comptant moins ou plus de 2 noyaux centraux (n=5-6 par groupe pour les 3 expériences).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

Afin de comprendre l'origine de ces altérations liées à la myogenèse globale, nous avons donc étudié les premières étapes de cette myogenèse en s'intéressant au nombre de cellules souches musculaires présent 2 jours après la blessure dans ces modèles ainsi que leur capacité de prolifération *via* l'intégration de l'Edu. Tout d'abord, nous observons une tendance à la diminution du nombre total de cellules souches musculaires présentes au sein du muscle dans tous nos modèles excepté pour le modèle de délétion de *RORα* pour lequel la diminution

est significative (Figure 76 A, E, I). Cependant, et de manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence pour l'ensemble des modèles, une capacité proliférative des cellules souches significativement diminuée comparés à leurs contrôles respectifs, identifiée par une moindre incorporation d'Edu (Figure 76 B, F, J). Lors de cette expérience réalisée par cytométrie en flux, nous avons également évalué la proportion de leucocytes et de macrophages au sein de ces modèles. Pour l'ensemble des trois modèles, nous avons mis en évidence une diminution similaire du nombre de leucocytes ainsi que du nombre de macrophages au sein du tissu blessé (Figure 76 C-D, G-H, K-L). Cette expérience apporte de nouveaux éléments sur ces modèles d'altération de l'horloge au sein des cellules myéloïdes. Tout d'abord, nous avons mis en lumière une altération de la capacité proliférative des cellules souches musculaires dans l'ensemble de ces modèles mais également une modification de la composante inflammatoire avec une diminution du recrutement de leucocytes et de macrophages. Ces données établissent qu'une altération génétique de l'horloge dans les cellules myéloïdes affecte le processus de régénération musculaire en modifiant leur capacité de recrutement mais également la prolifération des cellules satellites probablement *via* un défaut de sécrétion de différents messagers.





**Figure 76 : La capacité proliférative des cellules souches musculaires et le recrutement leucocytaire sont altérés dans les modèles de dérégulation de l'horloge dans les cellules myéloïdes.**

(A, E, I) Nombre de cellules souches musculaires rapporté par milligrammes de muscle 2 jours après blessure dans les 3 modèles d'altération de l'horloge dans les cellules myéloïdes.

(B, F, J) Pourcentage de cellules souches musculaires ayant incorporé l'Edu.

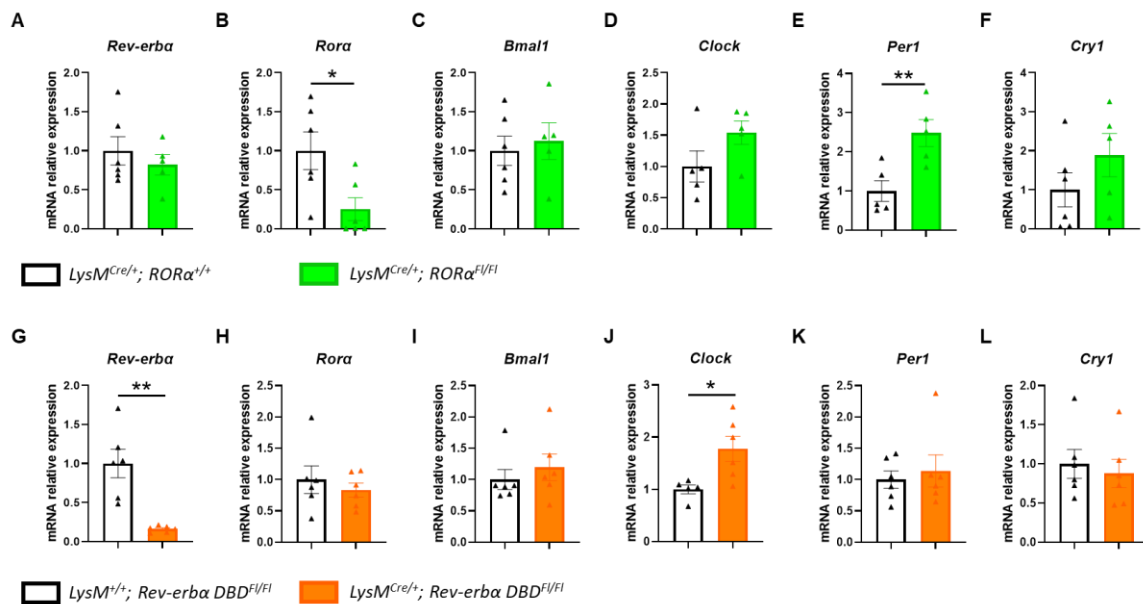
(C-D, G-H, K-L) Nombre de leucocytes et de macrophages totaux rapportés par milligrammes de muscles (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

## 2.4 Impact d'une délétion génétique de l'horloge sur la fonction des macrophages recrutés au cours de la régénération musculaire

Suite à ces observations, nous avons voulu approfondir notre analyse de l'impact d'une délétion des composants de l'horloge biologique au sein de la population myéloïde sur la fonction des macrophages, population myéloïde la plus représentée au cours de la régénération musculaire. Pour cela, nous avons trié des macrophages totaux provenant des souris *LysM<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>fl/fl</sup>* et *LysM<sup>Cre/+</sup>; ReverbaDBD<sup>fl/fl</sup>* afin d'évaluer les conséquences de la

délétion de ces récepteurs sur le transcriptome de ces cellules. Nous nous sommes tout d'abord placés 4 jours après la blessure, temps où le nombre de macrophages au sein du muscle est le plus élevé, afin d'obtenir un nombre suffisant de macrophages triés pour nos analyses transcriptomiques. Premièrement, nous avons analysé l'expression des différents acteurs de l'horloge au sein de ces macrophages et, comme attendu, nous observons des dérégulations d'expression des gènes délétés ou mutés (respectivement *Rora* et *Rev-erba*) mais également de certains autres gènes de l'horloge tels que *Per1* pour les macrophages délétés en *RORα* et du gène *Clock* pour les macrophages exprimant le mutant de *Rev-erba* (Figure 77 B, E, G, J). Pour les macrophages *LysM<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>fl/fl</sup>* nous observons également une tendance à l'augmentation de l'expression des gènes *Clock* et *Cry1* (Figure 77 D, F).

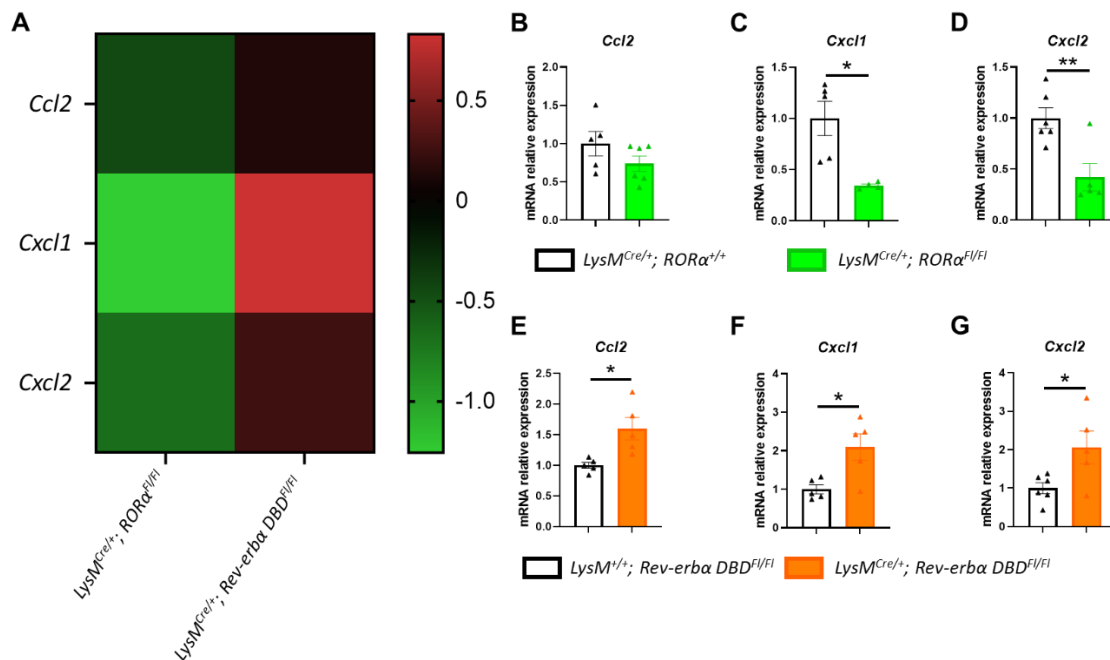


**Figure 77 : Les acteurs de l'horloge sont altérés au sein des macrophages délétés en *RORα* et exprimant un mutant de *Rev-erba*.**

(A-L) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes de l'horloge circadienne dans les macrophages récupérés à partir du TA 4 jours après blessure chez des souris *LysM<sup>Cre/+</sup>; Ror<sup>fl/fl</sup>* et *LysM<sup>Cre/+</sup>; Rev-erbaDBD<sup>fl/fl</sup>* et leurs contrôles respectifs (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

De façon intéressante, nous avons utilisé ces échantillons pour analyser le transcriptome global des macrophages recrutés au sein du muscle blessé grâce à des puces à ADN. Cette analyse a principalement permis de mettre en évidence une différence dans l'expression de plusieurs chimiokines ayant un rôle dans la régénération aussi bien sur le recrutement et la fonction de certaines cellules immunitaires que sur le processus de myogenèse que sont CCL2, CxCl1 et CxCl2 (Figure 78 A). Nous avons par ailleurs vérifié ce phénotype par des

qPCR et ces résultats confirment les résultats précédents et montrent que l'expression de ces 3 chimiokines sont régulées de façon opposé entre nos deux modèles. En effet, nous mettons en évidence une diminution significative de CxCL1 et CxCL2 et une tendance à la diminution pour CCL2 au sein des macrophages délétés pour *RORα* comparés aux contrôles. A l'inverse, une augmentation de l'expression de ces 3 chimiokines est observée dans le modèle *LysM<sup>Cre/+</sup> ; Rev-erbaDBD<sup>fl/fl</sup>* (Figure 78 E-G).



**Figure 78 : L'expression des chimiokines CCL2, CXCL1 et CXCL2 sont différenciellement régulées dans les macrophages délétés pour exprimant un mutant de Rev-erba dépourvu de domaine de liaison à l'ADN.**

(A) Heat-Map représentant l'expression relative des gènes *Ccl2*, *Cxcl1* et *Cxcl2* dans les macrophages récupérés à partir du TA 4 jours après blessure chez des souris *LysM<sup>Cre/+</sup> ; RORα<sup>fl/fl</sup>* et *LysM<sup>Cre/+</sup> ; Rev-erbaDBD<sup>fl/fl</sup>* et leurs contrôles respectifs (n=5-6 par groupe). (B-G) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes *Ccl2*, *Cxcl1* et *Cxcl2* dans les macrophages récupérés à partir du TA 4 jours après blessure chez des souris *LysM<sup>Cre/+</sup> ; RORα<sup>fl/fl</sup>* et *LysM<sup>Cre/+</sup> ; Rev-erbaDBD<sup>fl/fl</sup>* et leurs contrôles respectifs (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

Nous avons ensuite entrepris d'étudier l'expression de ces gènes dans des macrophages récupérés chez des souris blessées à ZT6 et ZT18. Au vu des variations au sein de la cinétique inflammatoire dans ces souris, nous avons pris le parti d'isoler les macrophages totaux de ces souris 2 et 4 jours après la blessure. Nous observons une tendance à une augmentation de l'expression des gènes *Ccl2*, *Cxcl1* et *Cxcl2* chez les macrophages provenant des souris blessées à ZT18 comparés à ceux des souris blessées à ZT6 (Figure 79 A-C). De façon intéressante, le profil s'inverse sur les macrophages triés 4 jours après la blessure avec cette fois-ci une tendance à la diminution de l'expression de ces chimiokines au sein des

macrophages des souris ZT18 (Figure 79 D-F). Le gène *Ccl2* semble par ailleurs être le gène le plus sensible à ces variations circadiennes puisque ce gène présente des différences significatives d'expression entre les deux groupes, et ceci pour les deux temps étudiés.

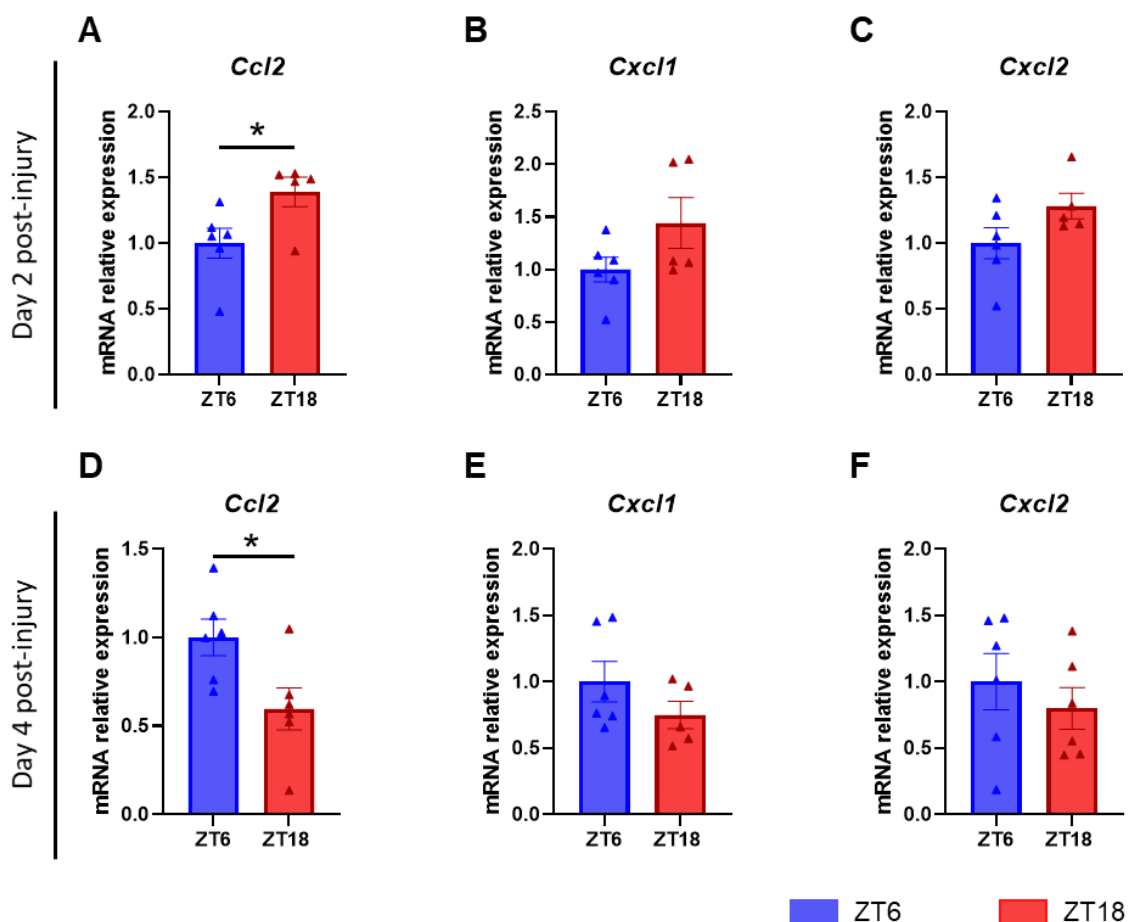


Figure 79 : L'expression des chimiokines CCL2, CXCL1 et CXCL2 est dépendant de l'heure de la blessure et du stade de régénération.

(A-C) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes *Ccl2*, *Cxcl1* et *Cxcl2* dans les macrophages récupérés à partir de TA de souris blessées à ZT6 et ZT18 et collectées 2 jours après blessure (n=5-6 par groupe).

(D-F) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes *Ccl2*, *Cxcl1* et *Cxcl2* dans les macrophages récupérés à partir du TA de souris blessées à ZT6 et ZT18 et collectées 4 jours après blessure (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,001$  par T-test.

De plus, nous avons également été en mesure de mesurer la concentration de ces chimiokines au sein de broyats de muscles blessés et collectés après 2 jours chez des souris blessées à ZT6 et ZT18. Les résultats obtenus sont cohérents avec ceux obtenus précédemment avec une tendance à l'augmentation de la quantité de CCL2, CXCL1 et CXCL2 au sein du muscle lorsque les souris sont blessées en phase active plutôt qu'en phase inactive (Figure 80). Cette tendance reste cependant modeste et d'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer

ce phénotype au niveau protéique. L'ensemble de nos résultats suggèrent que l'horloge circadienne régule principalement la communication entre les deux principaux compartiments de la régénération musculaire, à savoir les cellules immunitaires et les cellules souches musculaires. En effet, les variations circadiennes observées sur l'expression de ces chimiokines pourraient perturber cette communication et modifier la capacité myogénique des cellules souches. Ce phénomène est clairement visible dans nos modèles d'altérations génétiques de l'horloge au sein des cellules myéloïdes et apporte une notion de temporalité dans cette communication cellules souches-cellules immunitaires.

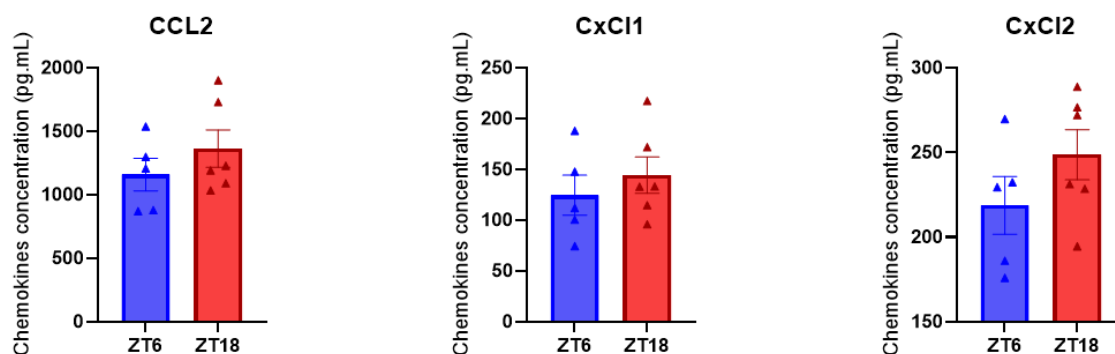


Figure 80 : Production des chimiokines CCL2, CxCl1 et CxCl2 au sein des muscles blessés à ZT6 et ZT18.

Concentration des chimiokines CCL2, CxCl1 et CxCl2 exprimé en pg.mL dans des broyats de muscles blessés à ZT6 et ZT18 et collectés 2 jours après blessure (n=5-6 par groupe).

## **CHAPITRE 3 : ROLE DES ILCS 2 DANS LA REGENERATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE**

Chez la souris, les capacités de réparation des ILC2 ont été démontrées dans plusieurs tissus tels que le poumon et la peau où elles sont stimulées par la libération d'IL33<sup>683,753</sup>. Dans le muscle, la sécrétion d'IL-33, principalement par les FAPs, favorise l'accumulation des cellules Treg qui ont un rôle bénéfique au cours du processus de régénération. Etant donné que les Treg et les ILC2 partagent de nombreuses fonctions et, qu'au début de ma thèse, la présence des ILCs n'avaient jamais été décrite dans le muscle squelettique, nous avons donc entrepris d'étudier cette population au cours du processus de régénération. Récemment, il a été démontré que les ILC2s étaient présentes dans le muscle squelettique au cours des dystrophies et que leur présence dans ce contexte était délétère<sup>252</sup>. Etant donné que la fonction de nombreuses cellules immunitaires diffère entre un muscle sain et un muscle dystrophique, et que cette étude n'abordait pas leur rôle dans un muscle sain, il nous semblait important de continuer à caractériser leur fonction au cours du processus de régénération musculaire.

### **3.1 Mise en évidence de la présence de cellules lymphoïdes innées (ILCs) au cours de la régénération musculaire**

Lors de notre première expérience au sein du muscle blessé, nous avons tout d'abord évalué la cinétique d'apparition de ces cellules 2, 4, 7 et 10 jours après la blessure du TA chez des souris contrôles C57BL/6J âgées de 8 semaines. Nous nous sommes donc tout d'abord intéressés à l'ensemble des sous-familles des ILCs, à savoir les ILC1, les ILC2 et les ILC3 que nous avons analysées par cytométrie en flux. Nous observons que le nombre de leucocytes recrutés au sein du muscle atteint son maximum 4 jours après la blessure ce qui est cohérent avec nos expériences précédentes et les données de la littérature (Figure 81).

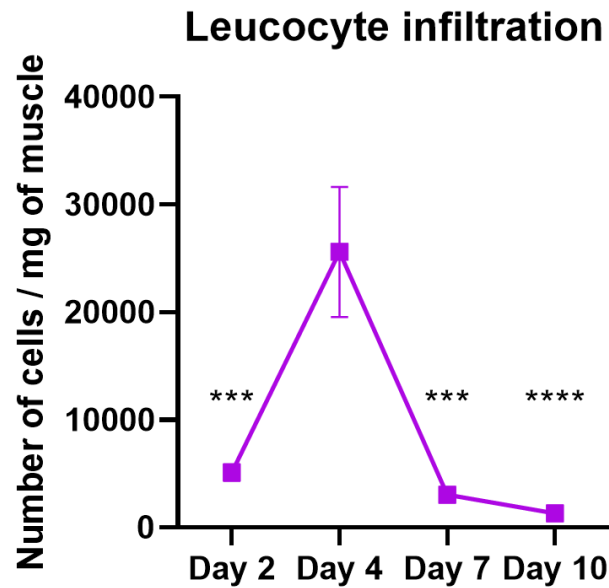


Figure 81 : Cinétique du recrutement de leucocytes au cours de la régénération musculaire.

Cinétique des leucocytes totaux rapportées par milligrammes de muscle et analysés par cytométrie en flux chez des souris C57Bl/6J sauvages dont les muscles blessés ont été récupérés 2, 4, 7 et 10 jours après blessure (n=5-6).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0005, \*\*\*\*p<0.0001 par multiple T-test.

Cette première expérience met en évidence une variation du nombre d'ILC2 au sein du muscle au cours du processus de régénération entre 2 et 10 jours après blessure. Le nombre d'ILC1 suit la même tendance mais avec une proportion beaucoup plus faible de cellules alors que le nombre de NCR<sup>+</sup> et NCR<sup>-</sup> ILC3 ne subit que très peu de fluctuation durant ces 10 premiers jours post-blessure (Figure 82 B-C). Concernant les ILC2, nous constatons une augmentation croissante du nombre d'ILC2 dans le muscle de 2 à 7 jours après la blessure. Après avoir atteint un pic à J7, la quantité de ces cellules décroît 10 jours après la blessure (Figure 82 B-C). Nos résultats permettent donc d'identifier les ILC2 comme la sous-population d'ILC la plus représentée dans la régénération musculaire comme en témoigne le calcul de l'aire sous la courbe entre les différentes sous-types d'ILCs (Figure 82 C). De plus, nous avons pu également dissocier certains sous-types d'ILC2 (GATA3<sup>+</sup> ST2<sup>+</sup>) au moyen de marqueur de surface décrits au cours d'autres études portant sur différents tissus. Ainsi, nous avons pu détecter conjointement des Tbet<sup>+</sup> ICOS<sup>Low</sup> ILC2, décrit comme ayant un phénotype proche des ILC1 et les ICOS<sup>High</sup> ILC2 décrites comme conventionnelles. Parmi les ILC2, les ILC2 Tbet<sup>+</sup> ICOS<sup>Low</sup> sont les plus représentées dans ce processus (Figure 82 D-E). Ces premiers résultats démontrent pour la première fois que les ILCs et principalement les ILC2 sont présentes durant

une blessure aiguë et qu'elles atteignent un nombre maximum 7 jours après blessure, suggérant ainsi un rôle de ces cellules au cours de ce processus.

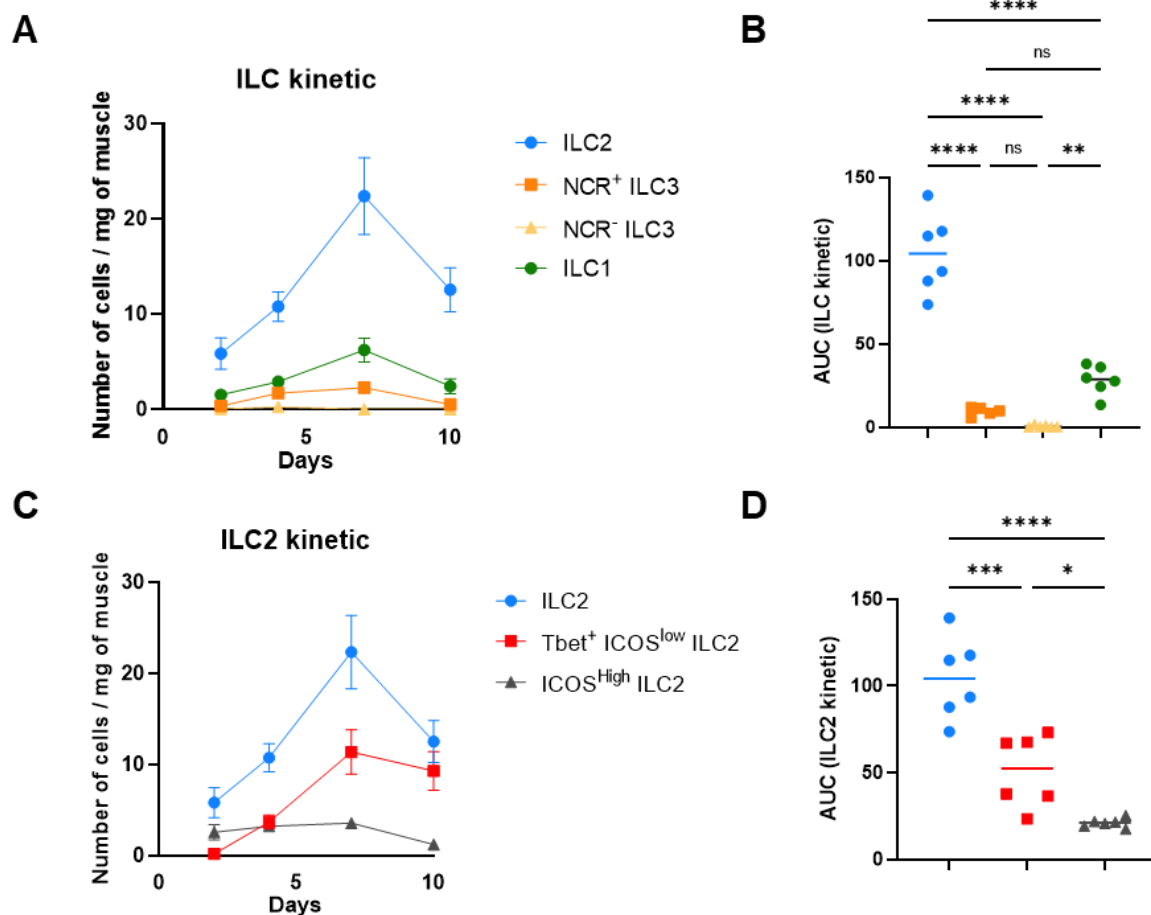


Figure 82 : La cinétique des ILCs après une blessure aiguë du TA.

(A-C) Cinétique des différentes populations d'ILCs rapportées par milligrammes de muscle et analysées par cytométrie en flux chez des souris C57Bl/6J sauvages dont les muscles blessés ont été récupérés à 2, 4, 7 et 10 jours après blessure (n=5-6).

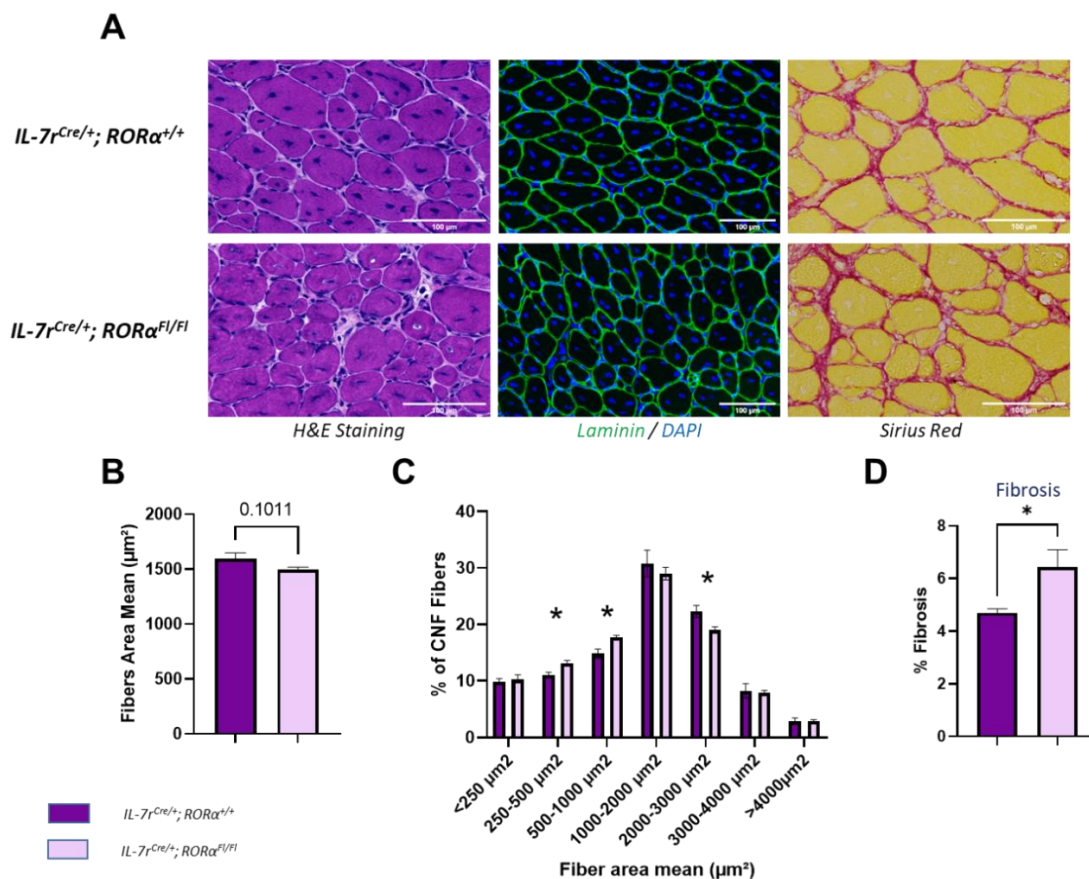
(B-D) Quantification de l'aire sous la courbes des populations correspondantes (n=5-6). Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0005, \*\*\*\*p<0.0001 par multiple T-test.

### 3.2 Impact d'une déplétion en ILC2 sur le processus de régénération musculaire

Nous avons donc par la suite travaillé avec des modèles de souris déplétées en ILC2 (*Il7r<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>fl/fl</sup>*) afin de caractériser en détail leur rôle au sein de la régénération musculaire. Nous avons donc induit une blessure musculaire par du BaCl<sub>2</sub> 0.8% au niveau du TA chez ce modèle murin ainsi que leurs contrôles (*Il7r<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>+/+</sup>*). Nous avons ensuite collecté les muscles blessés 10 jours après la blessure afin de caractériser le processus de régénération par des études histologiques et une analyse de l'expression des gènes. Nous avons évalué l'aire des fibres régénérées ainsi que le développement de la fibrose au sein de ces muscles



(Figure 79 A). La quantification de l'aire des fibres régénérées globale montre une tendance à la diminution de l'aire de ces fibres chez les souris déplétées en ILC2 par rapport à leurs contrôles (p0.1011). Par ailleurs, nous observons des différences significatives de la répartition des fibres régénérées selon leur taille avec une proportion plus importante de fibres de petite taille en l'absence d'ILC2 et, à l'inverse, une proportion moins importante de fibres de plus grande tailles (Figure 83 B-C). L'analyse du dépôt fibreux dans ces modèles met également en évidence un développement plus important de fibrose chez les souris déplétées en ILC2 (Figure 83 D). L'ensemble de ces données montre que la délétion en ILC2 impacte de façon significative le processus de régénération musculaire illustré par une diminution de la taille des fibres régénérées ainsi qu'un développement accru de la fibrose au sein du muscle blessé 10 jours après blessure.



**Figure 83 : La déplétion en ILC2 modifie significativement le processus de régénération du muscle squelettique suite à une blessure aiguë.**

(A) Coloration à l'Hémaroxyline/éosine, immunomarquage représentatif de la laminine (Vert) et du Dapi (Bleu) ainsi que la coloration au rouge sirius de coupes histologiques de muscles provenant de souris contrôle et *IL7r<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>fl/fl</sup>* et récupérés 10 jours après la blessure. Barre d'échelle correspondant à 100μm.

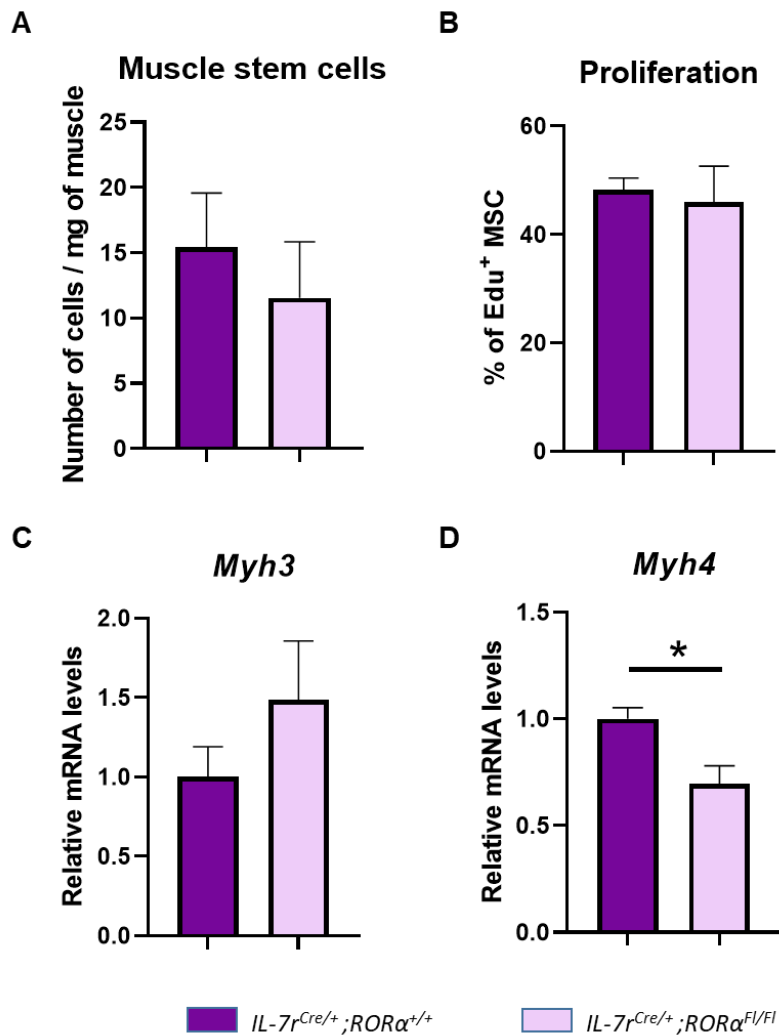
(B) Quantification de l'aire des fibres régénérées chez les souris contrôle et *IL7r<sup>Cre/+</sup>; Rora<sup>fl/fl</sup>* (n=5-6 par groupe).

(C) Distribution de la surface des fibres régénérées. (n=5-6 par groupe).

(D) Quantification de la surface de fibrose des coupes histologiques. (n=5-6 par groupe). Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test ou simple T-test.

### **3.3 Impact d'une déplétion en ILC2 sur la prolifération et la différenciation/fusion des myoblastes**

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'absence de cette population immunitaire sur le comportement des cellules myogéniques durant le processus de régénération. Nous avons tout d'abord analysé la capacité de prolifération des cellules souches musculaires grâce à l'injection d'Edu *in vivo* 2 jours après blessure comme décrit dans le chapitre précédent. De manière intéressante, cette expérience nous indique que la capacité proliférative de ces cellules ne semble pas être modifiée en l'absence d'ILC2 (Figure 84 A-B). Ensuite, grâce à l'étude des ARNm du muscle entier 10 jours après la blessure, nous avons étudié l'expression des myosines Myh3 (embryonnaire) et Myh4 (mature) afin d'évaluer la capacité de maturation des fibres. Nous observons une tendance prononcée à l'augmentation de l'expression de la myosine embryonnaire chez les souris déplétées en ILC2, associée à une diminution significative de l'expression de la myosine mature (Figure 84 C-D). L'ensemble de nos données semble donc indiquer que le processus de maturation des fibres est altéré en absence d'ILC2 mais sans modification de la capacité proliférative des cellules souches 2 jours après la blessure.



**Figure 84 : Prolifération et maturation des cellules myogéniques en absence d'ILC2.**

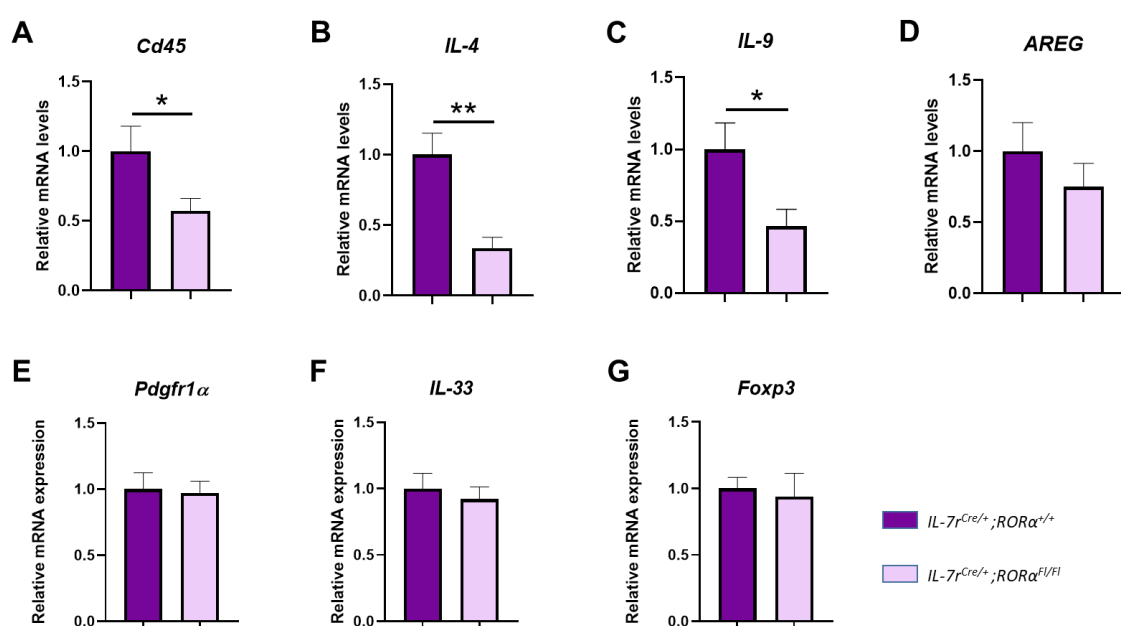
(A) Nombre de cellules souches musculaires rapportés par milligrammes de muscles 2 jours après blessure chez les souris contrôles et *IL7r<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>fl/fl</sup>* (n=5 par groupe).  
 (B) Pourcentage de cellules souches musculaires ayant incorporé l'Edu (n=5 par groupe).  
 (C) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes *Myh3* et *Myh4* dans les TA des souris contrôles et *IL7r<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>fl/fl</sup>* et collectées 10 jours après blessure (n=5-6 par groupe).  
 Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

### 3.4 Impact d'une déplétion en ILC2 sur l'inflammation au cours de la régénération musculaire

Outre l'action sur les cellules myogéniques, nous nous sommes intéressés aux conséquences de cette déplétion sur les cellules immunitaires et la réponse Th2, réponse immunitaire principale des ILC2. Tout d'abord, nous avons pu constater une diminution significative de l'expression du marqueur général des leucocytes CD45 chez les souris dépourvues en ILC2 (Figure 85 A). Par ailleurs, la réponse Th2 est elle aussi diminuée dans son ensemble chez ces souris avec une différence significative de l'expression de l'ARNm d'IL-4 et d'IL-9 (Figure 85 B-D). L'absence en ILC2 semble donc également altérer la

composante inflammatoire avec une diminution supposée de leucocytes dans le tissu et une diminution de la sécrétion de messagers Th2 dans le muscle 10 jours après la blessure.

Nous avons également analysé l'axe FAPs / IL-33 / mTregs qui est décrit dans le processus de régénération. En effet, l'IL33 est un activateur connu des ILC2 et sa sécrétion par les FAPs au cours du processus de régénération musculaire a été décrit comme capable de recruter les lymphocytes T régulateurs. L'absence d'ILC2 ne semble pas modifier les différents acteurs de cet axe puisqu'aucune variation de l'expression des gènes *Pdgfr1a* (FAPs), *Il-33* et *Foxp3* (mTregs) n'est mise en évidence entre nos deux génotypes de souris (Figure 85 A-C).



**Figure 85 : L'expression des gènes relatifs à la réponse Th2 et à l'axe FAPs/IL-33/ mTregs chez les souris déficientes en ILC2.**

(A-G) Analyse RT-qPCR de l'expression des gènes relatifs à la réponse Th<sub>2</sub> et à l'axe FAPs-IL-33 dans les TA des souris contrôles et *Il7r<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>fl/fl</sup>* et collectées 10 jours après blessure (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes ± s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

### 3.5 Impact d'une re-blessure sur le sous-type et le nombre d'ILC2 au sein du muscle blessé

Il a été décrit dans d'autres tissus comme les poumons, que les ILC2 pouvaient adopter un phénotype mémoire après la rencontre d'un pathogène afin de répondre plus efficacement à un second challenge comme cela a été montré avec le virus influenza. Dans cette optique, nous avons également analysé le recrutement des ILC2, 2, 4, 7 et 10 jours après une seconde blessure, réalisée 21 jours après une première blessure, sur des souris C57BL/6 d'âges

similaires aux souris utilisées pour la première cinétique. Nous avons donc pu comparer les données obtenues durant les deux cinétiques. Il en ressort que la cinétique globale des ILC2 totales connaît une faible augmentation durant la seconde blessure principalement durant les 7 premiers jours (Figure 86 A). Cependant, les différences majeures observées résident dans les différents phénotypes des ILC2. En effet, les ILC2 Tbet<sup>+</sup> ICOS<sup>Low</sup> présentent un niveau significativement plus élevé 2 et 4 jours après blessure et une forte tendance est observée jusqu'à 7 jours (Figure 86 B). A l'inverse, les ILC2 conventionnelles représentées par un marquage élevé pour ICOS sont largement moins représentées durant l'ensemble de la cinétique inflammatoire lors d'une seconde blessure (Figure 86 C). Ces données suggèrent donc une différence de sous-populations d'ILC2 présentes durant une première ou une seconde blessure, mettant en avant une possible adaptation de ces cellules durant la première blessure afin d'ajuster au mieux leur réponse durant un deuxième challenge.

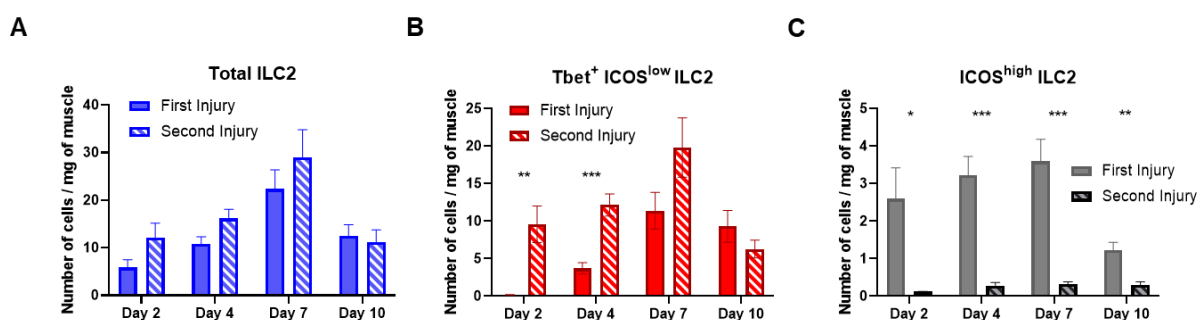


Figure 86 : La cinétique des sous-populations d'ILC2 est différente durant une première ou une seconde blessure.

(A-C) Cinétique des différentes populations d'ILCs 2 rapportées par milligrammes de muscle et analysés par cytométrie en flux chez des souris C57Bl/6J sauvages dont les muscles blessés ont été récupérés à 2, 4, 7 et 10 jours après 1 ou 2 blessures consécutives (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001, \*\*\*p<0,0005, \*\*\*\*p<0.0001 par multiple T-test.

## **Discussion**

## CHAPITRE 1 : REV-ERB-A REGULE LES GENES RELATIFS A L'ATROPHIE POUR CONTROLER LA MASSE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Le muscle squelettique remplit plusieurs fonctions essentielles de l'organisme, allant de la locomotion et la posture à l'homéostasie métabolique. Une perte de la masse du muscle est observée dans diverses situations physio-pathologiques (jeûne prolongé, vieillissement, cancer, septicémie ou autres états inflammatoires). Elle est associée à une aggravation de l'état général ainsi qu'à un mauvais pronostic. La préservation de la masse musculaire est donc, souvent, un enjeu clinique important.

Dans cette étude, nous avons examiné le rôle du récepteur nucléaire Rev-erb $\alpha$  dans le contrôle de la masse musculaire. Nous avons démontré que Rev-erb $\alpha$  module la masse musculaire et la taille des fibres musculaires *in vivo* et *in vitro* en réprimant l'expression de gènes de la voie de dégradation ubiquitine-protéasome tels que Ubc, les gènes atrogin-1 et MuRF1E3, ainsi que les régulateurs en amont FoxO1 et FoxO3a. Nos données mettent en évidence un rôle intrinsèque de Rev-erb $\alpha$  dans le contrôle de la masse musculaire. En effet, *in vitro*, les fibres musculaires différenciées à partir de progéniteurs myogéniques primaires issues de souris *Rev-erba*<sup>-/-</sup> présentent une diminution de la taille des fibres et une expression augmentée des gènes de l'atrophie. De la même manière, la surexpression de Rev-erb- $\alpha$  dans les myoblastes C2C12 conduit au phénotype opposé ce qui démontre ainsi une action cellulaire autonome de Rev-erb $\alpha$  dans la régulation de l'atrophie musculaire.

Atrogin-1 et MuRF1 régulent la dégradation des protéines myofibrillaires ainsi que l'atrophie musculaire induite par la privation de nutriments et la dexaméthasone<sup>68,71,74,754,755</sup>. Ces deux gènes sont régulés par les facteurs de transcription FoxO dont la surexpression *in vivo* favorise l'atrophie musculaire<sup>754,756,757</sup>. En effet, l'expression d'un mutant FoxO3 augmente la transcription d'Atrogin-1 et induit l'atrophie des muscles squelettiques, tandis qu'une délétion de FoxO3 prévient l'expression d'Atrogin-1 induite par le jeûne et la dexaméthasone dans les myotubes<sup>754,756,757</sup>. De la même manière, la délétion de FoxO1,3,4 prévient la perte et la faiblesse musculaires lors du jeûne<sup>77</sup>. Dans notre étude, nous montrons que Rev-erb $\alpha$  réprime ces gènes et contrôle la translocation nucléaire de FoxO, contrôlant ainsi la masse musculaire. Les FoxO contrôlent aussi la voie lysosome-autophagie qui, en parallèle du système ubiquitine-protéasomal, joue un rôle critique dans l'atrophie des muscles squelettiques<sup>758</sup>. Les FoxOs médient l'activation de certains gènes et protéines d'autophagie tels que Bnip3, LC3 et la cathepsine L, et le jeûne n'induit pas la formation d'autophagosomes chez les souris déficientes en FoxO<sup>77</sup>. De manière intéressante, nous avons déjà démontré que la déficience en *Rev-erba* dans le muscle squelettique augmentait l'expression de plusieurs gènes de l'autophagie tels que Bnip3, Pink et Parkin, et augmentait le flux autophagique comme le

prouve l'augmentation du ratio LC3-II/LC3-I<sup>433</sup>. Cela a été observé dans les myoblastes déficients en *Rev-erba*, alors qu'à l'inverse, la surexpression de *Rev-erba* conduit à une forte répression des gènes de l'autophagie. En plus d'être recruté sur le promoteur de plusieurs gènes d'autophagie (*Bnip3* et *Cathepsin L*, entre autres)<sup>433</sup>, nous montrons ici que *Rev-erba* régule cette voie de manière indirecte par la répression de *FoxOs*. Ainsi, cette étude, en complément de celle publiée par notre équipe en 2013, démontre que *Rev-erba* joue un rôle important dans le programme d'atrophie en régulant de manière coordonnée les voies de l'ubiquitine-protéasome et de l'autophagie.

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de la masse musculaire, parmi lesquels le cofacteur *PGC1α*. L'expression de *PGC1α* est diminuée dans l'atrophie musculaire et sa surexpression inhibe la signalisation de *FoxO3*, l'autophagie et les voies de dégradation de l'ubiquitine-protéasome, sans affecter la synthèse protéique<sup>759</sup>. En outre, l'expression des gènes codant pour la phosphorylation oxydative est réduite dans les muscles atrophiés, mettant en lumière que le dysfonctionnement mitochondrial peut avoir un impact négatif sur le maintien de la masse musculaire squelettique en déclenchant des voies cataboliques<sup>760</sup>. Il faut souligner que *Rev-erba* contrôle positivement l'expression et l'activité de *PGC1α*, ainsi que la biogenèse et la fonction mitochondriale dans le muscle squelettique<sup>433</sup>, ceci peut donc contribuer aux changements de masse musculaire observés dans les modèles de gain et de perte de fonction de *Rev-erba*.

Les glucocorticoïdes endogènes induisent un catabolisme modéré et réversible des protéines du muscle squelettique en réponse à l'infection, tandis que le traitement chronique par GC provoque une atrophie musculaire en augmentant les voies conduisant à la dégradation des protéines et en réduisant l'action des facteurs anaboliques. Dans le muscle squelettique, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) inhibe la signalisation *PI3K/Akt*, ce qui entraîne une augmentation de la signalisation des *FoxOs*<sup>754,761</sup>. De plus, GR réduit la voie anabolique en induisant l'expression de *Redd1* qui conduit à l'inhibition de *mTORC1*<sup>762</sup>. GR induit également l'expression de *Klf15*, ce qui augmente l'expression de l'enzyme de dégradation des Acides aminés ramifiés *BCAT2*, renforçant ainsi l'inhibition de l'activité de *mTOR* d'une manière indépendante de *Akt*<sup>94,97</sup>. *KLF15* réprime également l'expression des gènes *Murf1* et *Atrogin-1*, soit directement pour *Murf1* ou *via* l'induction de *FoxO* pour *Atrogin-1*. Il est important de souligner que les niveaux de corticostérone ne diffèrent pas chez les souris déficientes en *Rev-erba*<sup>509,763</sup>. D'autres équipes et nous-mêmes avons déjà mis en évidence une régulation de *Rev-erba* par GR et les interactions existantes entre ces deux récepteurs nucléaires dans le foie<sup>763,764</sup>. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la régulation négative de *Rev-erba*, ou la délétion de ce gène, est permissive à l'action de GR sur les gènes de l'atrophie. Ceci est en accord avec la diminution de la masse musculaire observée dans souris déficientes en



*Rev-erba* dans des conditions basales ainsi qu'avec les résultats obtenus concernant la répression de FoxOs, de Redd1, Klf15 et Bcat2 par Rev-erba. En accord avec ces données, nous démontrons que l'activation pharmacologique de Rev-erba est capable de contrecarrer l'induction de ces gènes médiée par la dexaméthasone, préservant ainsi la masse musculaire. Notre étude identifie Rev-erba comme un nouvel acteur du réseau complexe qui contrôle l'atrophie musculaire ainsi qu'une cible prometteuse pour la préservation de la masse musculaire en parallèle de son effet bénéfique sur la capacité d'exercice.

## CHAPITRE 2 : ROLE DE L'HORLOGE CIRCADIENTE DANS LA REGENERATION MUSCULAIRE

Au cours de notre étude globale du lien entre l'horloge circadienne et le maintien de l'homéostasie du muscle squelettique, nous nous sommes intéressés à un autre phénomène critique dans le contrôle de l'homéostasie : la capacité du muscle squelettique à se régénérer suite à une blessure. Certaines études font mention du rôle de l'horloge dans la myogénèse et notamment les acteurs Bmal1 et Rev-erba qui régulent certains facteurs myogéniques comme MyoD et MyoG<sup>447,448,528</sup>. Cependant, en réponse à ces études, nous avons entrepris d'étudier, de façon plus globale, le rôle de l'horloge dans ce processus de régénération *in vivo* et l'impact de cette horloge sur l'ensemble des composants impliqués dans ce processus. Tout d'abord, nous avons mis en évidence que les souris délétées pour *Rev-erba* présentaient une diminution significative de la taille des fibres régénérées 3 semaines après la blessure, mettant en lumière un défaut de régénération de ces souris. Nous nous sommes ensuite tournés vers une étude plus globale de l'impact de l'horloge en induisant une altération environnementale de cette dernière à l'aide d'un protocole de « jet-lag » chronique de 8 semaines ainsi que la mise en place d'un protocole de lumière constante afin d'étudier le processus de régénération musculaire. Ces deux protocoles induisent un défaut de régénération significatif respectivement jusqu'à 21 et 16 jours après la blessure. Ce protocole de jet-lag, considéré plus physiologique, induit également une augmentation de la fibrose durant les 7 premiers jours suivant la blessure et une altération du compartiment inflammatoire. Précisément, nous observons chez ces souris une diminution significative du nombre de leucocytes recrutés deux jours après la blessure, ciblant particulièrement les cellules myéloïdes tels que les neutrophiles, les monocytes et les macrophages pro-inflammatoires. Le compartiment inflammatoire semble être particulièrement touché par les altérations environnementales de l'horloge bien que ce type d'expérience n'ait pas été reproduit dans le protocole de lumière constante. Il est intéressant de noter que notre protocole de « jet-lag » a été arrêté au moment de l'injection du chlorure de baryum. Par conséquent, les phénotypes observés sont

uniquement la résultante de l'altération de l'horloge préalable à la blessure. Cette donnée est d'autant plus intéressante au vu des défauts de régénération relativement sévère engendrés par ce protocole. En parallèle, il serait pertinent de reproduire ce protocole en le maintenant durant la durée du processus de régénération afin d'analyser si le phénotype observé sur la réparation du muscle squelettique et sur la cinétique inflammatoire évolue ou est altéré de façon similaire.

La littérature concernant les conséquences immunitaires d'une altération environnementale de l'horloge pointe davantage vers un environnement plus inflammatoire, à savoir une augmentation du nombre de leucocytes infiltrant les différents tissus étudiés<sup>765-767</sup>. Dans ce contexte, nos résultats semblent donc opposés à la littérature actuelle. Cependant, nos analyses sur le recrutement leucocytaire dans des muscles non blessés confirment une tendance à l'augmentation des cellules myéloïdes pendant la phase active dans les muscles non blessés. Ceci soulève l'hypothèse que les mécanismes régissant le recrutement « basal » et pathologique des leucocytes au sein du muscle squelettique sont bien distincts. C'est la raison pour laquelle nous avons analysé l'expression lors de la régénération musculaire de gènes décrits comme étant impliqués dans ces processus de recrutement que sont les récepteurs VCAM1 et ICAM1<sup>578</sup>. Or, nos données n'indiquent aucune différence significative dans l'expression de ces récepteurs entre nos souris contrôles et soumises à un jetlag.

Nous avons également mis en évidence que l'heure à laquelle la blessure était induite avait un impact significatif sur la régénération ainsi que sur les compartiments myogéniques et inflammatoires associées à ce processus. En effet, une blessure réalisée durant la phase active de la souris permet une régénération plus efficace qu'une blessure faite en phase inactive avec des fibres régénérées de taille supérieure associée à des dépôts fibrotiques moins importants 21 jours après la blessure. Ce phénotype semble notamment dû à une capacité accrue des cellules souches musculaires à proliférer et une maturation des nouvelles fibres plus rapide. Le compartiment immunitaire est également modifié dans ce contexte avec une diminution significative du nombre de cellules myéloïdes (neutrophiles et macrophages pro-inflammatoires) durant les deux premiers jours après la blessure dans le groupe blessé en phase active.

Cette observation est pour le moins surprenante puisque le phénotype du recrutement leucocytaire est similaire à celui observé chez les souris sous « jet-lag », induisant dans ce contexte une meilleure capacité régénérative. Ces données suggèrent que les souris blessées en phase inactive (ZT6) connaissent un recrutement excessif de leucocytes instaurant un environnement pro-inflammatoire délétère au niveau du site de blessure, réduisant la myogénèse. A l'inverse, le recrutement du système immunitaire est mieux contrôlé quand la

blessure survient durant la phase active, permettant une régénération optimale. L'analyse des cellules immunitaires du muscle 12 heures après la blessure souligne un effet précoce sur le nombre de leucocytes recruté. Ceci suggère que ce changement est à l'origine des variations observées à des stades plus tardifs, notamment sur les macrophages pro-inflammatoires. Cette expérience n'a, par ailleurs, pas mis en évidence de différence sur le nombre de macrophages totaux présents dans le muscle 12h après blessure entre les deux groupes. Sachant que, dans le muscle, il a été décrit que les macrophages présents provenaient de la différenciation de monocytes infiltrants, cette donnée suggère que le nombre de macrophages résidents n'est pas modifié et que les résultats obtenus sur la cinétique post-blessure sont bien la conséquence d'un recrutement différent de cellules immunitaires entre les souris ZT6 et ZT18.

Dans cette optique, il est intéressant de noter que le recrutement basal des cellules immunitaires dans un muscle non blessé est opposé à ce qui est observé dans un muscle blessé, à savoir une augmentation significative des leucocytes et des monocytes durant la phase active, ce qui est en accord avec les données de la littérature<sup>590</sup>. De plus, l'expression des récepteurs VCAM1 et ICAM1 n'étant pas modifiée dans les muscles blessés à ZT6 et ZT18, cela suggère que les différences observées dans le recrutement des cellules immunitaires sont indépendantes de ce mécanisme. Cependant, il est important de souligner que nos temps de blessure ne correspondent pas aux temps utilisés par Scheiermann et al. durant son étude qui analysait l'expression de ces récepteurs à ZT5 et ZT13. Il serait intéressant d'analyser également l'expression de ces récepteurs aux mêmes temps après une blessure induite au niveau du TA. De plus, cette différence dans le recrutement basal et le recrutement pathologique fait écho aux études menées au sein des plaques d'athérosclérose dans lesquelles il a été montré que le recrutement des monocytes au niveau des artères se produisait à ZT13 alors que le recrutement de ces monocytes au sein de la microvascularisation se produisait à ZT1. Lors de cette étude, les auteurs ont ainsi montré que ce recrutement était dépendant de l'axe CCL2/CCR2 au sein des monocytes. Dans ce contexte, l'utilisation d'un antagoniste de CCR2 injecté quelques heures avant le pic de recrutement de ces monocytes dans les artères (ZT17) permettait de diminuer ce recrutement et réduire la taille des plaques d'athérosclérose. Cette étude est d'autant plus intéressante que ce traitement chrono-pharmacologique n'induit aucune perturbation du recrutement des monocytes au niveau de la microvascularisation du fait du temps de demi-vie court de l'antagoniste CCR2<sup>590</sup>. Un mécanisme similaire pourrait donc être à l'origine des différences observées dans nos études.

Enfin, nous constatons une diminution importante de l'expression des gènes de l'horloge dans le muscle total après blessure, que ce soit dans ce protocole de blessure à différents temps

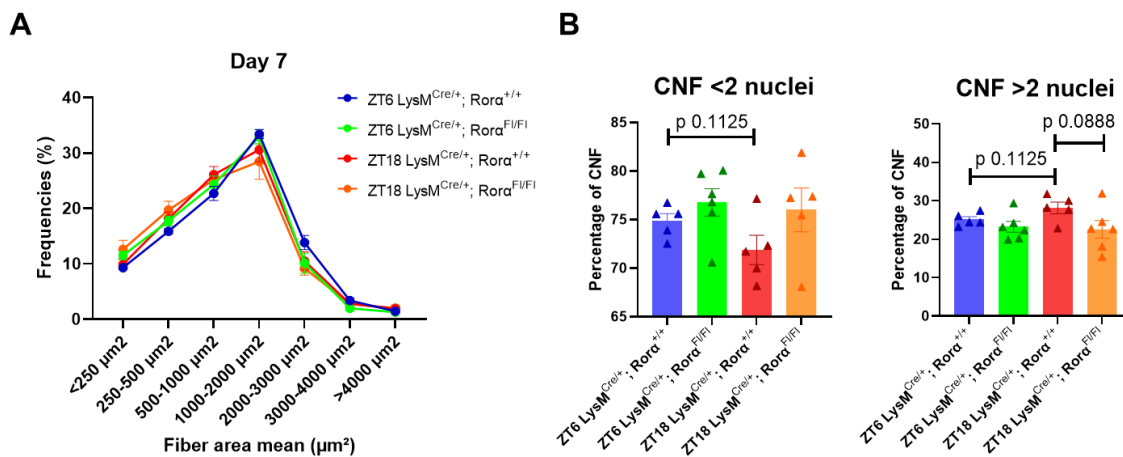
ou le modèle de « jet-lag ». En effet, une forte diminution dans l'expression des gènes de l'horloge, couplée à une perte de rythmicité, est observée dans ces muscles durant les premières phases de la régénération musculaire en comparaison avec un muscle sain. Leur niveau d'expression revient progressivement à un niveau comparable à un muscle non blessé entre 7 et 21 jours après la blessure. Cette donnée témoigne, probablement, de la perte de l'horloge circadienne dans les fibres musculaires blessées et suggère que la récupération progressive de l'horloge dans les fibres est associée à leur degré de maturation durant le processus de réparation. En ce sens, une étude publiée en début d'année fait mention d'une altération des gènes de l'horloge *Bmal1*, *Clock*, *Per1* et *Cry1* dans la lignée C2C12 suite à un stress mécanique induit par une élancement cyclique forcée des myoblastes. En effet, dans cette étude, l'application du stress mécanique induit une augmentation significative de l'expression de *Bmal1* et *Clock* et une diminution de *Per1* et *Cry1*. Les auteurs suggèrent que ces changements dans l'expression de ces acteurs circadiens pourraient être à l'origine de la prolifération des myoblastes induite par le stress mécanique<sup>768</sup>. De même, nous pouvons observer que la récupération du niveau d'expression de certains gènes de l'horloge semble plus rapide chez les souris blessées à ZT18, avec une récupération dès 7 jours après la blessure, contrairement aux souris blessées à ZT6 dont la récupération d'une expression comparable aux muscles non blessées se fait 21 jours après la blessure. Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées par ces résultats. Premièrement, de nombreuses études montrent qu'un environnement inflammatoire peut influencer l'expression de certains gènes de l'horloge. Par exemple, les cytokines inflammatoires comme le  $\text{TNF}\alpha$  ou l' $\text{IL-1}\beta$  diminuent l'expression de certains gènes de l'horloge (*Bmal1*, *Per1*, *Clock*, *Rev-erba*/ $\beta$ ) dans différents types cellulaires comme les fibroblastes ou les hépatocytes<sup>435,618,621</sup>. Nous pouvons donc nous demander si un processus similaire est en œuvre au sein du muscle squelettique et qu'une diminution plus rapide de l'expression de ces messagers en phase active pourrait être à l'origine de la récupération accélérée du niveau d'expression des gènes de l'horloge dans le muscle blessé à ZT18.

Cependant, bien que l'expression de ces gènes diminue de façon globale, nous avons tout de même mis en évidence l'importance de l'horloge circadienne dans le processus global de régénération, suggérant un maintien de cette horloge au sein des populations immunitaires impliquées. En ce sens, des données démontrent le maintien d'une horloge intrinsèque de certaines cellules immunitaires, *via* leur sensibilité à des signaux hormonaux délivrés par l'intermédiaire des nerfs. Cela a notamment été montré pour les cellules NK dans la rate qui expriment le récepteur  $\beta$ -adrénergiques. Ainsi la stimulation de ce récepteur par des neurotransmetteurs modifie la capacité des cellules NK à sécréter du  $\text{TNF}\alpha$  et des facteurs cytolytiques. Les macrophages possèdent des récepteurs à la mélatonine, une hormone

circadienne, qui stimule leur capacité de phagocytose *in vitro*<sup>602,605</sup>. Ces résultats pourraient également témoigner d'une préparation de certaines cellules à répondre plus efficacement à un danger qui se déroulerait en amont de la blessure musculaire. Dans cette optique, les cellules résidentes du muscle squelettique comme les macrophages, les lymphocytes CD8 et même les cellules endothéliales apparaissent comme des cibles potentielles qui, *via* une libération différentielle de certaines chimiokines entre ZT6 et ZT18 suite à une blessure, pourraient expliquer les variations circadiennes observées dans le recrutement des cellules immunitaires.

Nous avons ensuite montré que la délétion ou la surexpression de différents acteurs de l'horloge (*RORα* et *Rev-erba*) dans les cellules myéloïdes modifie significativement la régénération musculaire et la myogenèse. En effet, des altérations de la taille des fibres régénérées sont observées dans les trois modèles utilisés ainsi que des altérations significatives du nombre de noyaux présents au centre de ces fibres dans les modèles *LysM<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>fl/fl</sup>* et *LysM<sup>Cre/+</sup> ; Tg (Rev-erba)*. Cette observation est intéressante car, bien que les récepteurs *RORα* et *Rev-erba* présentent une activité transcriptionnelle antagoniste, ces modèles conduisent à une altération comparable du processus de régénération, plaçant l'altération globale de l'horloge au centre de ces phénotypes. De plus, une accumulation de fibrose est observée dans les deux modèles reliés à la modulation de l'expression de *Rev-erba* dans les cellules myéloïdes. Cette dernière donnée suggère une spécificité d'action des différents récepteurs nucléaires étudiés. Il serait donc pertinent d'étudier plus précisément le comportement des progéniteurs fibro-adipogéniques dans ces modèles afin de déterminer si l'altération de *Rev-erba* dans les cellules myéloïdes altère de façon significative leur destinée au cours du processus de régénération musculaire. Dans ce contexte, il serait intéressant d'analyser différents messagers tels que le *TNFα* et le *TGF-β*, qui induisent respectivement l'apoptose et la différenciation de ces progéniteurs en fibroblaste. L'ensemble de ces résultats démontre un rôle important de l'altération de l'horloge dans les cellules myéloïdes sur les différents compartiments cellulaires impliqués dans le processus de régénération musculaire. Concernant les progéniteurs myoblastiques, l'étude du pool de cellules satellites après une blessure, grâce à un marquage *Pax7* sur des coupes de muscles de ces différents modèles 21 jours après blessure serait intéressante. En effet, cela permettrait d'évaluer l'impact d'une altération de l'horloge des cellules myéloïdes sur la capacité de ces progéniteurs à assurer le maintien d'un pool optimal de cellules quiescentes après blessure. En ce sens, nous étudions actuellement l'impact d'une délétion de *RORα* dans les cellules myéloïdes sur le processus de régénération musculaire pratiqué à ZT6 et ZT18. Pour cela, nous avons blessées à ZT6 et ZT18 des souris *LysM<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>fl/fl</sup>* et leurs contrôles et nous avons collectés les muscles 4 et 7 jours après la blessure. Les premiers résultats ne montrent pas d'impact de cette délétion

sur la taille des fibres 7 jours après la blessure (Figure 87 A) mais restent encourageants concernant la capacité de fusion des myoblastes, à travers la quantification du nombre de noyaux présent au sein des fibres régénérées. En effet, on observe une proportion moins importante de fibres régénérées disposant de moins de 2 noyaux à ZT18 comparé à ZT6 chez les souris contrôles (Figure 87 B). A l'inverse, cette proportion est inversée pour les fibres à plus de 2 noyaux, avec une augmentation non significative pour le groupe contrôle blessé à ZT18 comparé au groupe contrôle blessé à ZT6. Or, cette tendance est totalement abolie dans les deux groupes délétés pour *RORα* dans les cellules myéloïdes (barres verte et orange) pour les deux graphiques. Cette expérience suggère une meilleure capacité de fusion chez les souris blessées à ZT18 comparées aux souris blessées à ZT6 et met en évidence une perte de cet effet lorsque l'horloge est altérée dans les cellules myéloïdes.



**Figure 87 : Impact de la délétion de *RORα* dans les cellules myéloïdes sur la capacité régénérative du muscle squelettique à ZT6 et ZT18.**

(A) Distribution de la surface des fibres. (n=5-6 par groupe).

(B) Pourcentage de fibres régénérées comptant moins ou plus de 2 noyaux centraux (n=5-6 par groupe)

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par T-test.

L'analyse de l'expression des gènes sur les muscles collectés à ces différents temps ainsi que l'analyse histologique de muscles prélevés 21 jours après la blessure sont nécessaires pour conclure. Cependant, l'ensemble de ces résultats préliminaires est prometteur et souligne le rôle central de l'horloge biologique au sein macrophages, dans la régulation circadienne du processus de régénération musculaire

Par ailleurs, nos analyses transcriptomiques ont mis en évidence une différence d'expression de plusieurs chimiokines (CCL2, CxCl1 et CxCl2) au sein des macrophages entre ZT6 et ZT18. Ces dernières ont été décrites comme étant indispensable au processus de régénération via une action sur la capacité proliférative des cellules souches musculaires et sur le recrutement

des différentes populations immunitaires. En effet, cette analyse montre que la régulation transcriptomique de ces gènes est dépendante de l'horloge et de ces acteurs. Par ailleurs, l'expression de ces chimiokines est inversée au sein des macrophages *LysM<sup>Cre/+</sup>* ; *Rora<sup>fl/fl</sup>* et *Rev-erba<sup>DBD<sup>fl/fl</sup></sup>*, suggérant ainsi une possible régulation directe de ces messagers par ces deux acteurs de l'horloge.

De surcroît, l'analyse de l'expression de ces chimiokines au sein de macrophages provenant de souris blessées à ZT6 et ZT18 met en évidence une augmentation de leur expression chez les macrophages récupérés en phase active 2 jours après la blessure et, qu'à l'inverse, leur expression est diminuée 4 jours après la blessure, au moment où les cellules souches musculaires initient leur différenciation pour former de nouvelles fibres.

Bien que l'expression de CCL2 soit sous le contrôle direct de Rev-erba au sein des macrophages et que l'expression des chimiokines CXCL1 et CXCL2 répond à des variations circadiennes dans certains contextes pathologiques, la découverte de cette régulation au sein du muscle apporte de nouvelles perspectives à notre étude<sup>453,454,570</sup>. En effet, différentes études placent ces chimiokines en tant que messagers clés dans la myogénèse, notamment via leur stimulation de la prolifération des myoblastes tout en inhibant transitoirement leur différenciation<sup>338,769</sup>. Ces données indiquent que l'horloge circadienne, dans ce contexte, pourrait jouer un rôle important dans la communication entre les cellules immunitaires et les cellules souches musculaires. Comme présenté ci-dessus, ces chimiokines régulent également le recrutement de nombreuses cellules myéloïdes comme les neutrophiles et les monocytes. Une altération très précoce de ces chimiokines pourrait également expliquer le recrutement altéré des cellules myéloïdes au sein du muscle dans nos modèles de régénération. Outre leur action sur la myogénèse, l'évaluation de la quantité de ces différentes chimiokines au sein du muscle à des temps très précoces après la blessure (avant 12h) prendrait tout son sens afin de déterminer si elles sont également au centre des différences observées dans le recrutement des cellules myéloïdes dans nos différents modèles et protocoles expérimentaux.

Nous aimerions également étudier *in vitro* le concept de temporalité dans la communication entre les cellules immunitaires et les cellules souches musculaires. En effet, nous projetons de mettre en contact des lignées de myoblastes avec des broyats de muscles blessés à ZT6 et ZT18 et récupérés à différents temps après la blessure (J2 et J4). Cela nous permettra d'analyser l'influence des différents messagers présents dans ces broyats sur les capacités de prolifération et de différenciation des lignées C2C12 via des analyses d'expression de gènes et différents immunomarquages de myosine embryonnaire et matures. Par la suite, nous pourrons également réaliser des expériences similaires mais en synchronisant les

lignées cellulaires à l'aide d'un choc au SVF afin de synchroniser leur cycle et d'ajouter le broyat à ZT6 ou ZT18. De cette façon, nous serions en mesure de déterminer si la synchronisation des différents compartiments cellulaires lors de la régénération est un facteur déterminant dans le bon déroulement de cette dernière.

Enfin, nous pourrions également utiliser des modulateurs (agonistes ou antagonistes) de l'activité des chimiokines CCL2, CxCl1 et CxCl2 dans ces études pour conclure de leur nécessité dans ce processus. Si cette expérience apporte les résultats escomptés, nous pourrions nous tourner vers des analyses *in vivo* en utilisant des agonistes ou des antagonistes de ces chimiokines lors du processus de régénération pour mettre en évidence des perspectives de chronothérapies comme cela a été montré au sein des plaques d'athérosclérose<sup>590</sup>.

Dans cette optique, nous avons initié une étude plus poussée de cette communication par des analyses transcriptomiques de l'ensemble des cellules impliquées dans la régénération du muscle squelettique. Cette étude sera faite par une technique de Single-nuclei RNA sequencing sur des échantillons de muscles provenant de souris blessées en phase active et en phase inactive et collectées à différents jours après la blessure. Ces analyses permettront de confirmer nos précédents résultats mais également d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la régulation circadienne de la régénération musculaire tout en impliquant de nouveaux acteurs dans cette régulation comme les FAPs.

Bien que la technique de Single-nuclei RNA sequencing ait déjà été réalisée dans le muscle squelettique, cette expérience représentera la première expérience se focalisant sur les noyaux collectés d'un muscle squelettique après blessure<sup>10</sup>. De par l'analyse strictement limitée aux ARNm présent dans le noyau, elle nous permettra de focaliser notre analyse sur les transcrits nouvellement synthétisés dans le noyau et donc de véritablement s'intéresser au transcriptome des différentes cellules à ZT6 et ZT18.

Pour conclure, bien que nous ayons centré cette étude sur l'impact de l'horloge circadienne au sein des cellules myéloïdes, le compartiment lymphoïde représente, lui aussi, une cible d'étude particulièrement intéressante. En effet, le rôle de l'horloge au sein de ces populations a été largement décrit, que ce soit dans le recrutement de ces cellules dans l'organisme, dans le développement de ces cellules ou encore dans leur fonction<sup>580,596,614</sup>. C'est pourquoi nous possédons des données préliminaires exposant des variations de recrutement de ces cellules, et principalement des lymphocytes mTregs, en fonction de l'heure de la blessure. En effet, nous observons une augmentation significative du nombre de lymphocytes CD4, majoritairement représentés par les lymphocytes mTregs au sein du muscle blessé à ZT18 comparé au muscle blessé à ZT6 seulement 7 jours après la blessure (Figure 88 A-B). Cette



nouvelle donnée pourrait s'inscrire dans le phénotype global que nous observons sur la capacité régénérative accélérée chez les souris blessées en phase active. Elle nécessiterait cependant de plus amples analyses *via* un modèle d'altération génétique de l'horloge au sein de cette population (*Foxp3<sup>Cre/+</sup>*).

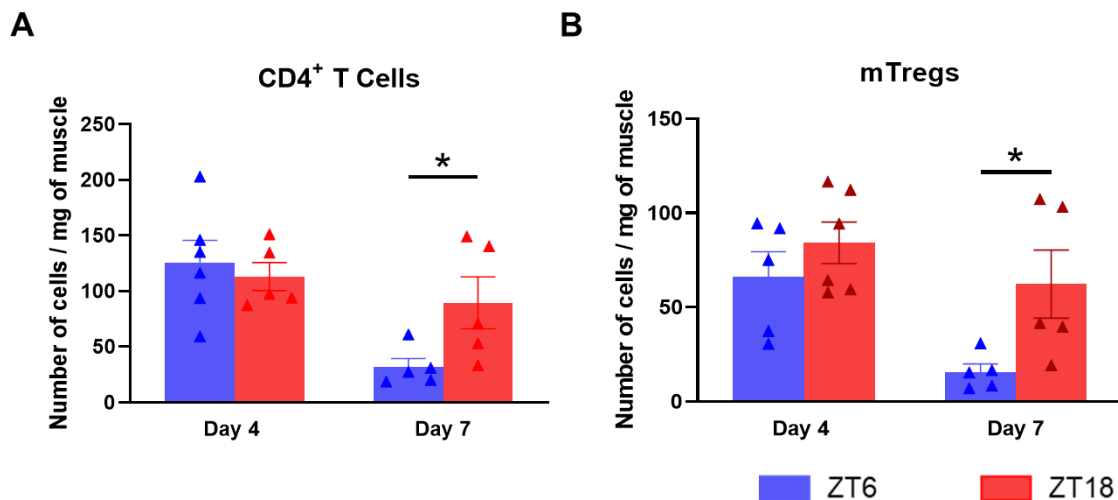


Figure 88 : La cinétique des lymphocytes associée à la régénération musculaire est modifiée selon l'heure de la blessure.

(A-B) Cinétique des lymphocytes CD4 et Tregs rapportées par milligrammes de muscle analysées par cytométrie en flux chez des souris blessées à ZT6 et ZT18 et dont les muscles ont été collectés à 4 et 7 jours après blessure (n=5-6 par groupe).

Les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  s.e.m.; \*p<0,05, \*\*p<0,001 par multiple T-test.

Une étude approfondie du rôle de l'horloge au sein de cette population de mTregs semble séduisante au vu de l'importance de ces cellules dans le processus global de régénération et notamment sur leur lien avec la myogénèse et les FAPs.

### CHAPITRE 3 : ROLE DES ILCS DANS LA REGENERATION

Dans la troisième partie de ma thèse, nous avons mis en évidence, pour la première fois, l'importance des ILCs, et principalement des ILC2, dans un contexte de régénération musculaire aiguë. En effet, un article récent fait état du rôle de ces ILCs dans le cas d'un modèle de myopathie : les souris Mdx. Il reste cependant important de préciser ici que ce modèle s'éloigne d'une régénération aiguë de par l'aspect chronique de la pathologie. En effet, de nombreuses études font état d'un rôle délétère de plusieurs cellules immunes dans le modèle mdx comme les neutrophiles et les éosinophiles alors que leur rôle est indispensable au bon déroulement d'une régénération aiguë<sup>201,202,204,770</sup>.

Nous avons initié notre étude par une analyse cinétique, qui nous a permis de détecter des ILCs dès deux jours après blessure, avec un pic à 7 jours pour ensuite diminuer 10 jours après la blessure. De façon intéressante, nous avons mis en évidence que les ILC2 correspondent à la population d'ILCs la plus représentée dans ce contexte. De ce fait, nous avons ensuite entrepris d'étudier l'impact de la délétion en ILC2 en utilisant un modèle murin *I17r<sup>Cre/+</sup> ; Rora<sup>fl/fl</sup>* sur la régénération du muscle squelettique. Bien que les souris n'aient été obtenues que récemment, nous avons pu observer un impact significatif de l'absence d'ILC2 sur ce processus. Précisément, ces souris présentent une diminution de la proportion de fibres régénérées de grandes tailles au profit de fibres de petites tailles, ainsi qu'une augmentation de la quantité de fibrose au sein du muscle 10 jours après blessure. De plus, des analyses d'expression de gènes sur muscle entier indiquent une diminution de la réponse Th2 ainsi qu'une diminution de l'expression du marqueur des leucocytes CD45, suggérant une altération du compartiment inflammatoire suite à la déplétion en ILC2. Dans ce contexte, la myogenèse semble également modifiée puisque les études de l'expression des myosines embryonnaires et matures suggèrent un défaut de maturation des fibres nouvellement synthétisées. Nous avons analysé, par des études d'incorporation d'Edu *in vivo*, la capacité proliférative des cellules souches musculaires. Nos données montrent une absence d'altération de cette capacité et que les défauts de la myogenèse semblent intervenir en aval. Cette découverte n'est pas étonnante au vu de la cinétique des ILC2 au sein du processus de régénération et de leurs caractéristiques communes avec les lymphocytes mTregs, dont la fonction principale a été décrite comme étant de favoriser les derniers stades de la myogenèse que sont les stades de différenciation et de fusion<sup>232</sup>.

Une caractérisation plus poussée de la capacité régénérative de ce modèle est cependant nécessaire. D'une part, nous devons reproduire ces analyses à des jours plus tardifs jusqu'à 21 jours après la blessure pour étudier si la délétion en ILC2 induit un phénotype durable sur la régénération musculaire. De plus, une analyse du compartiment inflammatoire est requise pour déterminer si la délétion de cette population influence l'ensemble du processus inflammatoire. En effet, il a été montré que, dans d'autres tissus, les ILC2 sont capables de réguler le recrutement et la fonction de différentes cellules immunitaires tels que les éosinophiles et les lymphocytes<sup>618,621-623</sup>. C'est pourquoi il est important, dans notre modèle, d'étudier les variations dans le recrutement des autres cellules immunitaires pour déterminer si les ILC2 influencent également le compartiment inflammatoire lors de la régénération musculaire.

D'autre part, l'action des ILC2 sur le développement des fibres musculaires nécessite de plus amples analyses. Par exemple, l'IL-4 et l'amphiréguline, normalement sécrétés par les ILC2 dans d'autres tissus, ont déjà été décrits comme favorisant la différenciation des myoblastes.

Il serait donc pertinent d'étudier l'impact la délétion de cette population sur les étapes de différenciation et de fusion des myoblastes *in vivo*, en parallèle de notre analyse sur le compartiment inflammatoire. Outre ces cellules, et au vu des résultats énoncés précédemment, la communication entre les ILC2 et les FAPs semble être déterminante dans le phénotype observé dans notre modèle. Ainsi, nous nous intéresserons à l'évolution des FAPs et leur possible différenciation en fibroblaste chez les souris déplétées en ILC2.

Nos analyses sur la cinétique des ILC2 chez la souris sauvage a permis d'identifier deux sous-type d'ILC2. Le premier sous-type sont les ILC2 conventionnels capable, selon la littérature, de sécréter de l'IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 et l'Amphiréguline. Ces cytokines ont été décrites dans la régénération comme participant à la stimulation des éosinophiles, la polarisation et l'activation des macrophages et des mTregs et agissant principalement sur la différenciation et la fusion des myoblastes. Le deuxième sous-type d'ILC2 observé dans nos expériences sont les ILC2 de type 1 (T-bet<sup>+</sup> ILC2), dont le phénotype se rapproche de celui d'un ILC1 avec une sécrétion d'IFN $\gamma$  mais également d'IL-13. La découverte de cette sous-population est surprenante à ce stade de la régénération (7 à 10 jours après la blessure) puisque l'IFN $\gamma$  est sécrété principalement durant les 4 premiers jours après la blessure. De plus, l'analyse des ARNm du muscle des souris déplétées en ILC2 relève une diminution importante de l'expression d'IL-4 et d'IL-9, sans diminution significative de l'AREG. Cette donnée suggère un phénotype des ILC2 spécifique dans le muscle orienté vers une production accrue de cytokines de type T<sub>H</sub>2 sans production majeure d'AREG. Cependant, ces analyses préliminaires sont axées uniquement sur l'ARNm et des analyses des cytokines par ELISA sont nécessaires pour conclure. Quoiqu'il en soit, il est important à ce stade de caractériser plus amplement les ILC2 présent dans le muscle. Douées d'une forte plasticité, des analyses transcriptomiques plus poussées seront nécessaires pour y parvenir. Nos expériences de Single-cell RNA sequencing décrites au préalable permettront l'étude de ces phénotypes, ainsi qu'une analyse fiable malgré la faible proportion d'ILC2 présentes dans le muscle.

Enfin, nos dernières expériences visaient à investiguer l'instauration d'un phénotype mémoire chez ces ILC2. En effet, de nombreuses études ont montré ces dernières années une telle fonction chez les ILC2, notamment après infection au virus influenza dans le poumon. Ce phénotype est très intéressant puisqu'il leur permet une action plus rapide et plus efficace suite au deuxième contact avec un pathogène. En outre, ce phénotype mémoire a été mis en évidence dans le muscle durant la régénération concernant les lymphocytes mTregs. En effet, certaines études montrent une capacité accrue de ces cellules à s'accumuler dans le muscle blessé après des blessures répétées. Bien que les mécanismes contrôlant cette fonction mémoire restent encore obscurs, certains auteurs suggèrent que ce phénotype s'acquiert en

contact de certains peptides libérés par les fibres nécrosées. En effet, les mTregs répondraient plus efficacement en réponse à ces peptides après une deuxième blessure<sup>232,771,772</sup>.

De façon similaire, nous pouvons nous demander si, au cours d'une première blessure, certaines ILC2 acquièrent un phénotype mémoire en vue d'une seconde blessure au sein du même muscle. Dans ce contexte, nous avons réalisé une expérience similaire à celle réalisée sur les souris C57Bl/6J sauvages, sur lesquelles nous avons induit deux blessures successives à 21 jours d'intervalles afin de comparer la cinétique des populations d'ILC2 après une ou deux blessures. De façon intéressante, cette expérience ne montre pas de différence significative sur le nombre total d'ILC2 infiltrant le muscle, avec toujours un pic d'ILC2 7 jours après la blessure. Cependant, nous pouvons observer une forte tendance à l'augmentation du nombre d'ILC2 durant la deuxième blessure pour les jours 2 et 4. Cela suggère une stimulation plus rapide des ILC2 après la deuxième blessure en accord avec la mise en place d'un phénotype mémoire. De plus, l'augmentation significative du phénotype d'ILC2 Tbet<sup>+</sup> ICOS<sup>Low</sup> durant les 4 premiers jours après la seconde blessure, par rapport à la première blessure, est intéressante. En effet, la polarisation vers un phénotype ILC1 durant cette période de temps semble en accord avec l'importance de l'IFN $\gamma$  pour le développement de l'environnement pro-inflammatoire, nécessaire à la polarisation des macrophages pro-inflammatoires et à la stimulation de la prolifération des SCs durant cette période. Cependant, cette expérience doit être reproduite afin de confirmer ce phénotype.

Dans un second temps, nous pourrions nous intéresser non seulement à ce phénotype mémoire dans un muscle déjà blessé mais également au sein d'autres muscles sains provenant d'une souris blessée. En effet, des études démontrent une préparation des cellules souches musculaires au sein de muscles non blessées provenant d'une souris blessée afin de réagir plus rapidement à une blessure, intégrant un phénotype décrit comme un phénotype « G alert »<sup>773</sup>. Ce phénotype soulève encore de nombreuses interrogations et certaines alarmines tels que HMGB1 semble participer à l'activation de ces cellules souches. Cependant, il n'est pas à exclure que des cellules immunitaires telles que les ILC2 puissent participer à ce phénotype et, compte tenu de leur rôle de sentinelle dans l'organisme, l'analyse des populations d'ILC2 dans des muscles non blessés provenant de souris blessées serait tout à fait pertinente pour apporter cette réponse.



# **Bibliographie**

Les illustrations ont été créées à partir de [Biorender.com](https://biorender.com) et [smart.servier.com](https://smart.servier.com)

1. Webb, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv. Physiol. Educ.* **27**, 201–206 (2003).
2. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif. Tissue Int.* **96**, 183–195 (2015).
3. Buckingham, M. *et al.* The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* **202**, 59–68 (2003).
4. Grifone, R. *et al.* Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 2235–2249 (2005).
5. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, (2012).
6. Birchmeier, C. & Brohmann, H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 725–730 (2000).
7. Mukund, K. & Subramaniam, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *WIREs Syst. Biol. Med.* **12**, (2020).
8. Murach, K. A., Englund, D. A., Dupont-Versteegden, E. E., McCarthy, J. J. & Peterson, C. A. Myonuclear Domain Flexibility Challenges Rigid Assumptions on Satellite Cell Contribution to Skeletal Muscle Fiber Hypertrophy. *Front. Physiol.* **9**, 635 (2018).
9. Allen, D. L., Roy, R. R. & Edgerton, V. R. Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* **22**, 1350–1360 (1999).
10. Dos Santos, M. *et al.* Single-nucleus RNA-seq and FISH identify coordinated transcriptional activity in mammalian myofibers. *Nat. Commun.* **11**, 5102 (2020).

11. Wilkins, J. T., Krivickas, L. S., Goldstein, R., Suh, D. & Frontera, W. R. Contractile properties of adjacent segments of single human muscle fibers. *Muscle Nerve* **24**, 1319–1326 (2001).
12. Denker, A. & Rizzoli, S. O. Synaptic vesicle pools: an update. *Front. Synaptic Neurosci.* **2**, 135 (2010).
13. Maximov, A., Tang, J., Yang, X., Pang, Z. P. & Südhof, T. C. Complexin controls the force transfer from SNARE complexes to membranes in fusion. *Science* **323**, 516–521 (2009).
14. Südhof, T. C. & Rizo, J. Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a005637 (2011).
15. Wang, C.-T., Bai, J., Chang, P. Y., Chapman, E. R. & Jackson, M. B. Synaptotagmin- $\text{Ca}^{2+}$  triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J. Physiol.* **570**, 295–307 (2006).
16. Kramer, Ij. M. Cholinergic Signaling and Muscle Contraction. in *Signal Transduction* 263–327 (Elsevier, 2016). doi:10.1016/B978-0-12-394803-8.00004-8.
17. Franzini-Armstrong, C. Functional implications of RyR-DHPR relationships in skeletal and cardiac muscles. *Biol. Res.* **37**, (2004).
18. Beard, N. A., Laver, D. R. & Dulhunty, A. F. Calsequestrin and the calcium release channel of skeletal and cardiac muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **85**, 33–69 (2004).
19. Györke, I., Hester, N., Jones, L. R. & Györke, S. The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys. J.* **86**, 2121–2128 (2004).
20. Tripathy, A., Xu, L., Mann, G. & Meissner, G. Calmodulin activation and inhibition of skeletal muscle  $\text{Ca}^{2+}$  release channel (ryanodine receptor). *Biophys. J.* **69**, 106–119 (1995).
21. Huxley, H. E. The double array of filaments in cross-striated muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 631–648 (1957).

22. Ackermann, M. A. & Kontogianni-Konstantopoulos, A. Myosin binding protein-C slow: a multifaceted family of proteins with a complex expression profile in fast and slow twitch skeletal muscles. *Front. Physiol.* **4**, 391 (2013).
23. Wang, K., McClure, J. & Tu, A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 3698–3702 (1979).
24. Wallimann, T. & Eppenberger, H. M. Localization and Function of M-Line-Bound Creatine Kinase. in *Cell and Muscle Motility* (ed. Shay, J. W.) 239–285 (Springer US, 1985). doi:10.1007/978-1-4757-4723-2\_8.
25. Kontogianni-Konstantopoulos, A. *et al.* Obscurin modulates the assembly and organization of sarcomeres and the sarcoplasmic reticulum. *FASEB J.* **20**, 2102–2111 (2006).
26. Galińska-Rakoczy, A. *et al.* Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin. *J. Mol. Biol.* **379**, 929–935 (2008).
27. Horowitz, R., Kempner, E. S., Bisher, M. E. & Podolsky, R. J. A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature* **323**, 160–164 (1986).
28. Gokhin, D. S., Ochala, J., Domenighetti, A. A. & Fowler, V. M. Tropomodulin 1 directly controls thin filament length in both wild-type and tropomodulin 4-deficient skeletal muscle. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 4351–4362 (2015).
29. Luther, P. K. The vertebrate muscle Z-disc: sarcomere anchor for structure and signalling. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **30**, 171–185 (2009).
30. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiol. Rev.* **91**, 1447–1531 (2011).
31. Espinoza-Fonseca, L. M., Autry, J. M. & Thomas, D. D. Sarcolipin and phospholamban inhibit the calcium pump by populating a similar metal ion-free intermediate state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 37–41 (2015).
32. Yoshida, M. *et al.* Impaired Ca<sup>2+</sup> store functions in skeletal and cardiac muscle cells from sarcalumenin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 3500–3506 (2005).



33. Periasamy, M. & Kalyanasundaram, A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* **35**, 430–442 (2007).
34. Sartori, R., Romanello, V. & Sandri, M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat. Commun.* **12**, 330 (2021).
35. Sandri, M. *et al.* PGC-1 $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 16260–16265 (2006).
36. Aravamudan, B., Mantilla, C. B., Zhan, W.-Z. & Sieck, G. C. Denervation effects on myonuclear domain size of rat diaphragm fibers. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **100**, 1617–1622 (2006).
37. Li, J. B. & Goldberg, A. L. Effects of food deprivation on protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* **231**, 441–448 (1976).
38. Argadine, H. M., Hellyer, N. J., Mantilla, C. B., Zhan, W.-Z. & Sieck, G. C. The effect of denervation on protein synthesis and degradation in adult rat diaphragm muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **107**, 438–444 (2009).
39. Quy, P. N., Kuma, A., Pierre, P. & Mizushima, N. Proteasome-dependent activation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) is essential for autophagy suppression and muscle remodeling following denervation. *J. Biol. Chem.* **288**, 1125–1134 (2013).
40. Goldberg, A. L. Protein turnover in skeletal muscle. I. Protein catabolism during work-induced hypertrophy and growth induced with growth hormone. *J. Biol. Chem.* **244**, 3217–3222 (1969).
41. Murgia, M. *et al.* Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat. Cell Biol.* **2**, 142–147 (2000).
42. Pallafacchina, G., Calabria, E., Serrano, A. L., Kalhovde, J. M. & Schiaffino, S. A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 9213–9218 (2002).

43. Inoki, K., Li, Y., Xu, T. & Guan, K.-L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* **17**, 1829–1834 (2003).
44. Inoki, K., Corradetti, M. N. & Guan, K.-L. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat. Genet.* **37**, 19–24 (2005).
45. Liu, G. Y. & Sabatini, D. M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 183–203 (2020).
46. Bentzinger, C. F. *et al.* Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy. *Cell Metab.* **8**, 411–424 (2008).
47. You, J.-S. *et al.* The role of raptor in the mechanical load-induced regulation of mTOR signaling, protein synthesis, and skeletal muscle hypertrophy. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**, 4021–4034 (2019).
48. Meyuhas, O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6321–6330 (2000).
49. Avruch, J., Belham, C., Weng, Q., Hara, K. & Yonezawa, K. The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **26**, 115–154 (2001).
50. Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963 (1999).
51. Mamane, Y. *et al.* eIF4E – from translation to transformation. *Oncogene* **23**, 3172–3179 (2004).
52. Waskiewicz, A. J. *et al.* Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1871–1880 (1999).
53. Pyronnet, S. *et al.* Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. *EMBO J.* **18**, 270–279 (1999).
54. Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B. & Sandri, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* **280**, 4294–4314 (2013).

55. Kim, D.-H. *et al.* mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**, 163–175 (2002).
56. Kline, W. O., Panaro, F. J., Yang, H. & Bodine, S. C. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **102**, 740–747 (2007).
57. Gonçalves, D. A. *et al.* Insulin/IGF1 signalling mediates the effects of  $\beta_2$  -adrenergic agonist on muscle proteostasis and growth. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **10**, 455–475 (2019).
58. Mammucari, C. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter controls skeletal muscle trophism in vivo. *Cell Rep.* **10**, 1269–1279 (2015).
59. White, J. P. *et al.* G protein-coupled receptor 56 regulates mechanical overload-induced muscle hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 15756–15761 (2014).
60. Das, S. *et al.* ATP citrate lyase improves mitochondrial function in skeletal muscle. *Cell Metab.* **21**, 868–876 (2015).
61. Hunt, L. C. *et al.* A Key Role for the Ubiquitin Ligase UBR4 in Myofiber Hypertrophy in *Drosophila* and Mice. *Cell Rep.* **28**, 1268-1281.e6 (2019).
62. Conte, M. *et al.* Muscle-specific Perilipin2 down-regulation affects lipid metabolism and induces myofiber hypertrophy. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle* **10**, 95–110 (2019).
63. Goberdhan, D. C. I. *et al.* Amino acid sensing and mTOR regulation: inside or out? *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 248–252 (2009).
64. Demetriades, C., Doumpas, N. & Teleman, A. A. Regulation of TORC1 in response to amino acid starvation via lysosomal recruitment of TSC2. *Cell* **156**, 786–799 (2014).
65. Gao, X. *et al.* Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 699–704 (2002).
66. Sancak, Y. *et al.* The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* **320**, 1496–1501 (2008).
67. Summermatter, S. *et al.* Blockade of Metallothioneins 1 and 2 Increases Skeletal Muscle Mass and Strength. *Mol. Cell. Biol.* **37**, e00305-16 (2017).

68. Bodine, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704–1708 (2001).
69. Hwee, D. T., Baehr, L. M., Philp, A., Baar, K. & Bodine, S. C. Maintenance of muscle mass and load-induced growth in Muscle RING Finger 1 null mice with age. *Aging Cell* **13**, 92–101 (2014).
70. Cohen, S., Nathan, J. A. & Goldberg, A. L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 58–74 (2014).
71. Baehr, L. M., Furlow, J. D. & Bodine, S. C. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J. Physiol.* **589**, 4759–4776 (2011).
72. Csibi, A. *et al.* The translation regulatory subunit eIF3f controls the kinase-dependent mTOR signaling required for muscle differentiation and hypertrophy in mouse. *PloS One* **5**, e8994 (2010).
73. Lokireddy, S. *et al.* Identification of atrogin-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **303**, C512–C529 (2012).
74. Cong, H., Sun, L., Liu, C. & Tien, P. Inhibition of atrogin-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Hum. Gene Ther.* **22**, 313–324 (2011).
75. Cohen, S., Zhai, B., Gygi, S. P. & Goldberg, A. L. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J. Cell Biol.* **198**, 575–589 (2012).
76. Paul, P. K. *et al.* The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 1248–1259 (2012).
77. Milan, G. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat. Commun.* **6**, 6670 (2015).
78. Sartori, R. *et al.* BMP signaling controls muscle mass. *Nat. Genet.* **45**, 1309–1318 (2013).
79. Piccirillo, R. & Goldberg, A. L. The p97/VCP ATPase is critical in muscle atrophy and the accelerated degradation of muscle proteins: Inhibition of p97 retards muscle atrophy. *EMBO J.* **31**, 3334–3350 (2012).

80. Wang, C. *et al.* Methyltransferase-like 21c methylates and stabilizes the heat shock protein Hspa8 in type I myofibers in mice. *J. Biol. Chem.* **294**, 13718–13728 (2019).
81. Wiederstein, J. L. *et al.* Skeletal Muscle-Specific Methyltransferase METTL21C Trimethylates p97 and Regulates Autophagy-Associated Protein Breakdown. *Cell Rep.* **23**, 1342–1356 (2018).
82. Sandri, M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2121–2129 (2013).
83. Suzuki, N. *et al.* NO production results in suspension-induced muscle atrophy through dislocation of neuronal NOS. *J. Clin. Invest.* **117**, 2468–2476 (2007).
84. Sanchez, A. M. J. *et al.* AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J. Cell. Biochem.* **113**, 695–710 (2012).
85. Yin, J. *et al.* Dkk3 dependent transcriptional regulation controls age related skeletal muscle atrophy. *Nat. Commun.* **9**, 1752 (2018).
86. McPherron, A. C., Lawler, A. M. & Lee, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83–90 (1997).
87. Trendelenburg, A. U. *et al.* Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C1258-1270 (2009).
88. Sartori, R. *et al.* Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **296**, C1248-1257 (2009).
89. Winbanks, C. E. *et al.* Follistatin-mediated skeletal muscle hypertrophy is regulated by Smad3 and mTOR independently of myostatin. *J. Cell Biol.* **197**, 997–1008 (2012).
90. Sartori, R., Gregorevic, P. & Sandri, M. TGF $\beta$  and BMP signaling in skeletal muscle: potential significance for muscle-related disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 464–471 (2014).
91. Winbanks, C. E. *et al.* Smad7 gene delivery prevents muscle wasting associated with cancer cachexia in mice. *Sci. Transl. Med.* **8**, 348ra98 (2016).

92. Braun, T. P. & Marks, D. L. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Front. Physiol.* **6**, 12 (2015).
93. Sundahl, N., Bridelance, J., Libert, C., De Bosscher, K. & Beck, I. M. Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds. *Pharmacol. Ther.* **152**, 28–41 (2015).
94. Shimizu, N. *et al.* Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab.* **13**, 170–182 (2011).
95. Schakman, O., Kalista, S., Barbé, C., Loumaye, A. & Thissen, J. P. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2163–2172 (2013).
96. Britto, F. A. *et al.* REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **307**, E983-993 (2014).
97. Waddell, D. S. *et al.* The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E785-797 (2008).
98. Paul, P. K. *et al.* Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J. Cell Biol.* **191**, 1395–1411 (2010).
99. Mittal, A. *et al.* The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J. Cell Biol.* **188**, 833–849 (2010).
100. Bonetto, A. *et al.* JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **303**, E410-421 (2012).
101. Ebert, S. M. *et al.* Stress-induced skeletal muscle Gadd45a expression reprograms myonuclei and causes muscle atrophy. *J. Biol. Chem.* **287**, 27290–27301 (2012).
102. Gallot, Y. S. *et al.* PERK regulates skeletal muscle mass and contractile function in adult mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **33**, 1946–1962 (2019).
103. Bohnert, K. R. *et al.* The Toll-Like Receptor/MyD88/XBP1 Signaling Axis Mediates Skeletal Muscle Wasting during Cancer Cachexia. *Mol. Cell. Biol.* **39**, e00184-19 (2019).

104. Favaro, G. *et al.* DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. *Nat. Commun.* **10**, 2576 (2019).
105. Tezze, C. *et al.* Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell Metab.* **25**, 1374-1389.e6 (2017).
106. Parajuli, P. *et al.* Twist1 Activation in Muscle Progenitor Cells Causes Muscle Loss Akin to Cancer Cachexia. *Dev. Cell* **45**, 712-725.e6 (2018).
107. He, W. A. *et al.* NF- $\kappa$ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. *J. Clin. Invest.* **123**, 4821–4835 (2013).
108. Madaro, L. *et al.* Denervation-activated STAT3-IL-6 signalling in fibro-adipogenic progenitors promotes myofibres atrophy and fibrosis. *Nat. Cell Biol.* **20**, 917–927 (2018).
109. Carlson, B. M. The regeneration of skeletal muscle. A review. *Am. J. Anat.* **137**, 119–149 (1973).
110. Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9**, 493–495 (1961).
111. Tedesco, F. S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G. & Cossu, G. Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 11–19 (2010).
112. Cossu, G. & Biressi, S. Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 623–631 (2005).
113. Sambasivan, R. *et al.* Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 3647–3656 (2011).
114. Der Vartanian, A. *et al.* PAX3 Confers Functional Heterogeneity in Skeletal Muscle Stem Cell Responses to Environmental Stress. *Cell Stem Cell* **24**, 958-973.e9 (2019).
115. Scaramozza, A. *et al.* Lineage Tracing Reveals a Subset of Reserve Muscle Stem Cells Capable of Clonal Expansion under Stress. *Cell Stem Cell* **24**, 944-957.e5 (2019).

116. Montarras, D., L'honoré, A. & Buckingham, M. Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *FEBS J.* **280**, 4036–4050 (2013).
117. Comai, G. & Tajbakhsh, S. Molecular and Cellular Regulation of Skeletal Myogenesis. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 110 1–73 (Elsevier, 2014).
118. Cheung, T. H. & Rando, T. A. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 329–340 (2013).
119. Baghdadi, M. B. *et al.* Notch-Induced miR-708 Antagonizes Satellite Cell Migration and Maintains Quiescence. *Cell Stem Cell* **23**, 859-868.e5 (2018).
120. Wang, X. *et al.* KLF7 Regulates Satellite Cell Quiescence in Response to Extracellular Signaling. *Stem Cells Dayt. Ohio* **34**, 1310–1320 (2016).
121. Low, S., Barnes, J. L., Zammit, P. S. & Beauchamp, J. R. Delta-Like 4 Activates Notch 3 to Regulate Self-Renewal in Skeletal Muscle Stem Cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **36**, 458–466 (2018).
122. Eliazer, S. *et al.* Wnt4 from the Niche Controls the Mechano-Properties and Quiescent State of Muscle Stem Cells. *Cell Stem Cell* **25**, 654-665.e4 (2019).
123. Kim, J.-H. *et al.* Sex hormones establish a reserve pool of adult muscle stem cells. *Nat. Cell Biol.* **18**, 930–940 (2016).
124. Baghdadi, M. B. *et al.* Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature* **557**, 714–718 (2018).
125. Xian, X., Gopal, S. & Couchman, J. R. Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* **339**, 31–46 (2010).
126. Cornelison, D. D. W., Filla, M. S., Stanley, H. M., Rapraeger, A. C. & Olwin, B. B. Syndecan-3 and Syndecan-4 Specifically Mark Skeletal Muscle Satellite Cells and Are Implicated in Satellite Cell Maintenance and Muscle Regeneration. *Dev. Biol.* **239**, 79–94 (2001).
127. Pallafacchina, G. *et al.* An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res.* **4**, 77–91 (2010).



128. Shea, K. L. *et al.* Sprouty1 Regulates Reversible Quiescence of a Self-Renewing Adult Muscle Stem Cell Pool during Regeneration. *Cell Stem Cell* **6**, 117–129 (2010).
129. Crist, C. G., Montarras, D. & Buckingham, M. Muscle satellite cells are primed for myogenesis but maintain quiescence with sequestration of Myf5 mRNA targeted by microRNA-31 in mRNP granules. *Cell Stem Cell* **11**, 118–126 (2012).
130. Bye-A-Jee, H. *et al.* The RNA-binding proteins Zfp36l1 and Zfp36l2 act redundantly in myogenesis. *Skelet. Muscle* **8**, 37 (2018).
131. de Morrée, A. *et al.* Staufen1 inhibits MyoD translation to actively maintain muscle stem cell quiescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E8996–E9005 (2017).
132. Kitajima, Y. *et al.* The Ubiquitin-Proteasome System Is Indispensable for the Maintenance of Muscle Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **11**, 1523–1538 (2018).
133. Cheung, T. H. *et al.* Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature* **482**, 524–528 (2012).
134. Sato, T., Yamamoto, T. & Sehara-Fujisawa, A. miR-195/497 induce postnatal quiescence of skeletal muscle stem cells. *Nat. Commun.* **5**, 4597 (2014).
135. Machado, L. *et al.* In Situ Fixation Redefines Quiescence and Early Activation of Skeletal Muscle Stem Cells. *Cell Rep.* **21**, 1982–1993 (2017).
136. Hart, C. A., Tsui, J., Khanna, A., Abraham, D. J. & Baker, D. M. Stem cells of the lower limb: Their role and potential in management of critical limb ischemia. *Exp. Biol. Med.* **238**, 1118–1126 (2013).
137. Relaix, F. *et al.* Perspectives on skeletal muscle stem cells. *Nat. Commun.* **12**, 692 (2021).
138. Griger, J. *et al.* Loss of Ptpn11 (Shp2) drives satellite cells into quiescence. *eLife* **6**, e21552 (2017).
139. Cornelison, D. D. W. Essential and separable roles for Syndecan-3 and Syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes Dev.* **18**, 2231–2236 (2004).

140. Webster, M. T., Manor, U., Lippincott-Schwartz, J. & Fan, C.-M. Intravital Imaging Reveals Ghost Fibers as Architectural Units Guiding Myogenic Progenitors during Regeneration. *Cell Stem Cell* **18**, 243–252 (2016).
141. Kuang, S., Kuroda, K., Le Grand, F. & Rudnicki, M. A. Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**, 999–1010 (2007).
142. Chang, N. C. *et al.* The Dystrophin Glycoprotein Complex Regulates the Epigenetic Activation of Muscle Stem Cell Commitment. *Cell Stem Cell* **22**, 755-768.e6 (2018).
143. Takaesu, G. *et al.* Activation of p38 $\alpha$ / $\beta$  MAPK in myogenesis via binding of the scaffold protein JLP to the cell surface protein Cdo. *J. Cell Biol.* **175**, 383–388 (2006).
144. Troy, A. *et al.* Coordination of satellite cell activation and self-renewal by Par-complex-dependent asymmetric activation of p38 $\alpha$ / $\beta$  MAPK. *Cell Stem Cell* **11**, 541–553 (2012).
145. Palacios, D. *et al.* TNF/p38 $\alpha$ /polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. *Cell Stem Cell* **7**, 455–469 (2010).
146. Perdiguero, E. *et al.* Genetic analysis of p38 MAP kinases in myogenesis: fundamental role of p38 $\alpha$  in abrogating myoblast proliferation. *EMBO J.* **26**, 1245–1256 (2007).
147. Wei, L. *et al.* RhoA signaling via serum response factor plays an obligatory role in myogenic differentiation. *J. Biol. Chem.* **273**, 30287–30294 (1998).
148. Chen, J.-F. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* **38**, 228–233 (2006).
149. Cardinali, B. *et al.* MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PloS One* **4**, e7607 (2009).
150. Sun, L. *et al.* JAK1–STAT1–STAT3, a key pathway promoting proliferation and preventing premature differentiation of myoblasts. *J. Cell Biol.* **179**, 129–138 (2007).
151. Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomès, D. & Tajbakhsh, S. Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 677–687 (2006).

152. Hollenberg, S. M., Cheng, P. F. & Weintraub, H. Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8028–8032 (1993).
153. Halevy, O. *et al.* Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**, 1018–1021 (1995).
154. Davie, J. K. *et al.* Target gene selectivity of the myogenic basic helix-loop-helix transcription factor myogenin in embryonic muscle. *Dev. Biol.* **311**, 650–664 (2007).
155. Rawls, A. *et al.* Overlapping functions of the myogenic bHLH genes MRF4 and MyoD revealed in double mutant mice. *Dev. Camb. Engl.* **125**, 2349–2358 (1998).
156. Kaushal, S., Schneider, J. W., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. Activation of the myogenic lineage by MEF2A, a factor that induces and cooperates with MyoD. *Science* **266**, 1236–1240 (1994).
157. Liu, N. *et al.* Requirement of MEF2A, C, and D for skeletal muscle regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4109–4114 (2014).
158. Brack, A. S., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Shen, J. & Rando, T. A. A Temporal Switch from Notch to Wnt Signaling in Muscle Stem Cells Is Necessary for Normal Adult Myogenesis. *Cell Stem Cell* **2**, 50–59 (2008).
159. Wu, Z. *et al.* p38 and extracellular signal-regulated kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3951–3964 (2000).
160. Lluís, F., Ballestar, E., Suelves, M., Esteller, M. & Muñoz-Cánoves, P. E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* **24**, 974–984 (2005).
161. Friday, B. B., Mitchell, P. O., Kegley, K. M. & Pavlath, G. K. Calcineurin initiates skeletal muscle differentiation by activating MEF2 and MyoD. *Differ. Res. Biol. Divers.* **71**, 217–227 (2003).
162. Lu, J., McKinsey, T. A., Nicol, R. L. & Olson, E. N. Signal-dependent activation of the MEF2 transcription factor by dissociation from histone deacetylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4070–4075 (2000).

163. Xu, Q. *et al.* p38 Mitogen-activated protein kinase-, calcium-calmodulin-dependent protein kinase-, and calcineurin-mediated signaling pathways transcriptionally regulate myogenin expression. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1940–1952 (2002).
164. Koning, M., Werker, P. M. N., van der Schaft, D. W. J., Bank, R. A. & Harmsen, M. C. MicroRNA-1 and microRNA-206 improve differentiation potential of human satellite cells: a novel approach for tissue engineering of skeletal muscle. *Tissue Eng. Part A* **18**, 889–898 (2012).
165. Koning, M., Werker, P. M. N., van Luyn, M. J. A., Krenning, G. & Harmsen, M. C. A global downregulation of microRNAs occurs in human quiescent satellite cells during myogenesis. *Differ. Res. Biol. Divers.* **84**, 314–321 (2012).
166. Sohn, R. L. *et al.* A role for nephrin, a renal protein, in vertebrate skeletal muscle cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 9274–9279 (2009).
167. Abmayr, S. M. & Pavlath, G. K. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Dev. Camb. Engl.* **139**, 641–656 (2012).
168. Millay, D. P. *et al.* Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* **499**, 301–305 (2013).
169. Millay, D. P., Sutherland, L. B., Bassel-Duby, R. & Olson, E. N. Myomaker is essential for muscle regeneration. *Genes Dev.* **28**, 1641–1646 (2014).
170. Zhang, Q. *et al.* The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. *Nat. Commun.* **8**, 15664 (2017).
171. Dalkilic, I., Schienda, J., Thompson, T. G. & Kunkel, L. M. Loss of FilaminC (FLNC) results in severe defects in myogenesis and myotube structure. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6522–6534 (2006).
172. Schwander, M. *et al.* Beta1 integrins regulate myoblast fusion and sarcomere assembly. *Dev. Cell* **4**, 673–685 (2003).
173. Horsley, V., Jansen, K. M., Mills, S. T. & Pavlath, G. K. IL-4 acts as a myoblast recruitment factor during mammalian muscle growth. *Cell* **113**, 483–494 (2003).

174. Latil, M. *et al.* Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat. Commun.* **3**, 903 (2012).
175. Ryall, J. G. *et al.* The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell* **16**, 171–183 (2015).
176. Pala, F. *et al.* Distinct metabolic states govern skeletal muscle stem cell fates during prenatal and postnatal myogenesis. *J. Cell Sci.* **131**, jcs212977 (2018).
177. Wellen, K. E. *et al.* ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* **324**, 1076–1080 (2009).
178. Shyh-Chang, N. & Ng, H.-H. The metabolic programming of stem cells. *Genes Dev.* **31**, 336–346 (2017).
179. Pecqueur, C. *et al.* Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J.* **22**, 9–18 (2008).
180. L'honoré, A. *et al.* The role of Pitx2 and Pitx3 in muscle stem cells gives new insights into P38 $\alpha$  MAP kinase and redox regulation of muscle regeneration. *eLife* **7**, e32991 (2018).
181. Theret, M. *et al.* AMPK $\alpha$ 1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis. *EMBO J.* **36**, 1946–1962 (2017).
182. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
183. Merrick, M. A. Secondary injury after musculoskeletal trauma: a review and update. *J. Athl. Train.* **37**, 209–217 (2002).
184. Martinez, C. O. *et al.* Regulation of skeletal muscle regeneration by CCR2-activating chemokines is directly related to macrophage recruitment. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **299**, R832-842 (2010).
185. Villalta, S. A. *et al.* Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Sci. Transl. Med.* **6**, 258ra142 (2014).

186. Wang, Y., Wehling-Henricks, M., Samengo, G. & Tidball, J. G. Increases of M2a macrophages and fibrosis in aging muscle are influenced by bone marrow aging and negatively regulated by muscle-derived nitric oxide. *Aging Cell* **14**, 678–688 (2015).
187. Brigitte, M. *et al.* Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin-induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* **62**, 268–279 (2010).
188. Krippendorff, B. B. & Riley, D. A. Distinguishing unloading- versus reloading-induced changes in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* **16**, 99–108 (1993).
189. Radley, H. G. & Grounds, M. D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol. Dis.* **23**, 387–397 (2006).
190. Yang, W. & Hu, P. Skeletal muscle regeneration is modulated by inflammation. *J. Orthop. Transl.* **13**, 25–32 (2018).
191. Butterfield, T. A., Best, T. M. & Merrick, M. A. The dual roles of neutrophils and macrophages in inflammation: a critical balance between tissue damage and repair. *J. Athl. Train.* **41**, 457–465 (2006).
192. Zhang, J. *et al.* CD8 T Cells Are Involved in Skeletal Muscle Regeneration through Facilitating MCP-1 Secretion and Gr1<sup>high</sup> Macrophage Infiltration. *J. Immunol.* **193**, 5149–5160 (2014).
193. Sass, F. *et al.* Immunology Guides Skeletal Muscle Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 835 (2018).
194. Pizza, F. X., Peterson, J. M., Baas, J. H. & Koh, T. J. Neutrophils contribute to muscle injury and impair its resolution after lengthening contractions in mice. *J. Physiol.* **562**, 899–913 (2005).
195. Quindry, J. C., Stone, W. L., King, J. & Broeder, C. E. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* **35**, 1139–1145 (2003).
196. Cassatella, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* **73**, 369–509 (1999).

197. Lim, L. H. K. & Pervaiz, S. Annexin 1: the new face of an old molecule. *FASEB J.* **21**, 968–975 (2007).
198. McArthur, S. *et al.* Annexin A1 drives macrophage skewing to accelerate muscle regeneration through AMPK activation. *J. Clin. Invest.* 10.1172/JCI124635 (2020) doi:10.1172/JCI124635.
199. Toumi, H. & Best, T. M. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br. J. Sports Med.* **37**, 284–286 (2003).
200. Lindborg, J. A., Mack, M. & Zigmond, R. E. Neutrophils Are Critical for Myelin Removal in a Peripheral Nerve Injury Model of Wallerian Degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **37**, 10258–10277 (2017).
201. Teixeira, C. F. P. *et al.* Neutrophils do not contribute to local tissue damage, but play a key role in skeletal muscle regeneration, in mice injected with Bothrops asper snake venom. *Muscle Nerve* **28**, 449–459 (2003).
202. Selva-O’Callaghan, A., Trallero-Araguás, E. & Grau, J. M. Eosinophilic myositis: an updated review. *Autoimmun. Rev.* **13**, 375–378 (2014).
203. Heredia, J. E. *et al.* Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* **153**, 376–388 (2013).
204. Moratal, C. *et al.* IL-1 $\beta$ - and IL-4-polarized macrophages have opposite effects on adipogenesis of intramuscular fibro-adipogenic progenitors in humans. *Sci. Rep.* **8**, 17005 (2018).
205. Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G. R., Jones, C. E. & Trifilieff, A. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **170**, 2106–2112 (2003).
206. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).

207. Ho, A. T. V. *et al.* Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell function, augmenting regeneration and strength. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 6675–6684 (2017).
208. Ratnayake, D. *et al.* Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. *Nature* **591**, 281–287 (2021).
209. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* **420**, 846–852 (2002).
210. Deng, B., Wehling-Henricks, M., Villalta, S. A., Wang, Y. & Tidball, J. G. IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3669–3680 (2012).
211. Juban, G. Transcriptional control of macrophage inflammatory shift during skeletal muscle regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* S1084952121001622 (2021) doi:10.1016/j.semcdb.2021.06.011.
212. Tonkin, J. *et al.* Monocyte/Macrophage-derived IGF-1 Orchestrates Murine Skeletal Muscle Regeneration and Modulates Autocrine Polarization. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **23**, 1189–1200 (2015).
213. Perdiguero, E. *et al.* p38/MKP-1–regulated AKT coordinates macrophage transitions and resolution of inflammation during tissue repair. *J. Cell Biol.* **195**, 307–322 (2011).
214. Mounier, R. *et al.* AMPK $\alpha$ 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metab.* **18**, 251–264 (2013).
215. Nakagawa, A., Shiratsuchi, A., Tsuda, K. & Nakanishi, Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 166–177 (2005).
216. Acton, S. *et al.* Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* **271**, 518–520 (1996).
217. Zhang, J. *et al.* Phagocytosis mediated by scavenger receptor class BI promotes macrophage transition during skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **294**, 15672–15685 (2019).



218. Ruffell, D. *et al.* A CREB-C/EBP cascade induces M2 macrophage-specific gene expression and promotes muscle injury repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 17475–17480 (2009).
219. Varga, T. *et al.* Macrophage PPAR $\gamma$ , a Lipid Activated Transcription Factor Controls the Growth Factor GDF3 and Skeletal Muscle Regeneration. *Immunity* **45**, 1038–1051 (2016).
220. Baht, G. S. *et al.* Meteorin-like facilitates skeletal muscle repair through a Stat3/IGF-1 mechanism. *Nat. Metab.* **2**, 278–289 (2020).
221. Rossi, G. *et al.* Nfix Regulates Temporal Progression of Muscle Regeneration through Modulation of Myostatin Expression. *Cell Rep.* **14**, 2238–2249 (2016).
222. Saclier, M. *et al.* The Transcription Factor Nfix Requires RhoA-ROCK1 Dependent Phagocytosis to Mediate Macrophage Skewing during Skeletal Muscle Regeneration. *Cells* **9**, 708 (2020).
223. Varga, T. *et al.* Highly Dynamic Transcriptional Signature of Distinct Macrophage Subsets during Sterile Inflammation, Resolution, and Tissue Repair. *J. Immunol.* **196**, 4771–4782 (2016).
224. Hardie, D. G. AMPK—Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways. *Cell Metab.* **20**, 939–952 (2014).
225. Soehnlein, O. & Lindbom, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 427–439 (2010).
226. Cantó, C. *et al.* AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**, 1056–1060 (2009).
227. Zhang, S. *et al.* Efferocytosis Fuels Requirements of Fatty Acid Oxidation and the Electron Transport Chain to Polarize Macrophages for Tissue Repair. *Cell Metab.* **29**, 443–456.e5 (2019).
228. Saini, J., McPhee, J. S., Al-Dabbagh, S., Stewart, C. E. & Al-Shanti, N. Regenerative function of immune system: Modulation of muscle stem cells. *Ageing Res. Rev.* **27**, 67–76 (2016).

229. Dort, J., Fabre, P., Molina, T. & Dumont, N. A. Macrophages Are Key Regulators of Stem Cells during Skeletal Muscle Regeneration and Diseases. *Stem Cells Int.* **2019**, 4761427 (2019).
230. Woszczyna, M. N. & Rando, T. A. A Muscle Stem Cell Support Group: Coordinated Cellular Responses in Muscle Regeneration. *Dev. Cell* **46**, 135–143 (2018).
231. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197 (2005).
232. Burzyn, D. *et al.* A special population of regulatory T cells potentiates muscle repair. *Cell* **155**, 1282–1295 (2013).
233. Kuswanto, W. *et al.* Poor Repair of Skeletal Muscle in Aging Mice Reflects a Defect in Local, Interleukin-33-Dependent Accumulation of Regulatory T Cells. *Immunity* **44**, 355–367 (2016).
234. Yablonka-Reuveni, Z., Balestreri, T. M. & Bowen-Pope, D. F. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF. *J. Cell Biol.* **111**, 1623–1629 (1990).
235. Tiemessen, M. M. *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19446–19451 (2007).
236. Castiglioni, A. *et al.* FOXP3+ T Cells Recruited to Sites of Sterile Skeletal Muscle Injury Regulate the Fate of Satellite Cells and Guide Effective Tissue Regeneration. *PloS One* **10**, e0128094 (2015).
237. Capote, J. *et al.* Osteopontin ablation ameliorates muscular dystrophy by shifting macrophages to a pro-regenerative phenotype. *J. Cell Biol.* **213**, 275–288 (2016).
238. Smith, L. R. & Barton, E. R. Regulation of fibrosis in muscular dystrophy. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **68–69**, 602–615 (2018).
239. Theret, M., Rossi, F. M. V. & Contreras, O. Evolving Roles of Muscle-Resident Fibro-Adipogenic Progenitors in Health, Regeneration, Neuromuscular Disorders, and Aging. *Front. Physiol.* **12**, 673404 (2021).

240. Biferali, B., Proietti, D., Mozzetta, C. & Madaro, L. Fibro–Adipogenic Progenitors Cross-Talk in Skeletal Muscle: The Social Network. *Front. Physiol.* **10**, 1074 (2019).
241. Roberts, E. W. *et al.* Depletion of stromal cells expressing fibroblast activation protein- $\alpha$  from skeletal muscle and bone marrow results in cachexia and anemia. *J. Exp. Med.* **210**, 1137–1151 (2013).
242. Uezumi, A. *et al.* Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia. *J. Clin. Invest.* **131**, e139617 (2021).
243. Mann, C. J. *et al.* Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* **1**, 21 (2011).
244. Fadic, R. *et al.* Increase in decorin and biglycan in Duchenne Muscular Dystrophy: role of fibroblasts as cell source of these proteoglycans in the disease. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 758–769 (2006).
245. Pakshir, P. & Hinz, B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **68–69**, 81–93 (2018).
246. Wosczyzna, M. N. *et al.* Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Rep.* **27**, 2029-2035.e5 (2019).
247. Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
248. Contreras, O. *et al.* Cross-talk between TGF- $\beta$  and PDGFR $\alpha$  signaling pathways regulates the fate of stromal fibro-adipogenic progenitors. *J. Cell Sci.* **132**, jcs232157 (2019).
249. Urciuolo, A. *et al.* Collagen VI regulates satellite cell self-renewal and muscle regeneration. *Nat. Commun.* **4**, 1964 (2013).
250. Mashinchian, O., Pisconti, A., Le Moal, E. & Bentzinger, C. F. The Muscle Stem Cell Niche in Health and Disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* **126**, 23–65 (2018).

251. Scott, R. W., Arostegui, M., Schweitzer, R., Rossi, F. M. V. & Underhill, T. M. Hic1 Defines Quiescent Mesenchymal Progenitor Subpopulations with Distinct Functions and Fates in Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Stem Cell* **25**, 797-813.e9 (2019).
252. Kastenschmidt, J. M. *et al.* A stromal progenitor and ILC2 niche promotes muscle eosinophilia and fibrosis-associated gene expression. *Cell Rep.* **35**, 108997 (2021).
253. Lemos, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
254. Dong, Y., Silva, K. A. S., Dong, Y. & Zhang, L. Glucocorticoids increase adipocytes in muscle by affecting IL-4 regulated FAP activity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 4123–4132 (2014).
255. Juban, G. *et al.* AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF- $\beta$ 1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Rep.* **25**, 2163-2176.e6 (2018).
256. Stepien, D. M. *et al.* Tuning Macrophage Phenotype to Mitigate Skeletal Muscle Fibrosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **204**, 2203–2215 (2020).
257. Moratal, C., Arrighi, N., Dechesne, C. A. & Dani, C. Control of Muscle Fibro-Adipogenic Progenitors by Myogenic Lineage is Altered in Aging and Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **53**, 1029–1045 (2019).
258. Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **12**, 143–152 (2010).
259. Santini, M. P. *et al.* Tissue-Resident PDGFR $\alpha$ + Progenitor Cells Contribute to Fibrosis versus Healing in a Context- and Spatiotemporally Dependent Manner. *Cell Rep.* **30**, 555-570.e7 (2020).
260. Verma, M. *et al.* Muscle Satellite Cell Cross-Talk with a Vascular Niche Maintains Quiescence via VEGF and Notch Signaling. *Cell Stem Cell* **23**, 530-543.e9 (2018).

261. Theret, M. *et al.* Targeting fibrosis in the Duchenne Muscular Dystrophy mice model: an uphill battle. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.01.20.427485> (2021) doi:10.1101/2021.01.20.427485.
262. Drouin, G. *et al.* Muscle injury-induced hypoxia alters the proliferation and differentiation potentials of muscle resident stromal cells. *Skelet. Muscle* **9**, 18 (2019).
263. Lo, A., Fuglevand, A. J. & Secomb, T. W. Oxygen delivery to skeletal muscle fibers: effects of microvascular unit structure and control mechanisms. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **285**, H955–H963 (2003).
264. Porter, M. M., Stuart, S., Boij, M. & Lexell, J. Capillary supply of the tibialis anterior muscle in young, healthy, and moderately active men and women. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* **1985** **92**, 1451–1457 (2002).
265. Sjøgaard, G. Capillary supply and cross-sectional area of slow and fast twitch muscle fibres in man. *Histochemistry* **76**, 547–555 (1982).
266. Bailey, A. M., O'Neill, T. J., Morris, C. E. & Peirce, S. M. Arteriolar remodeling following ischemic injury extends from capillary to large arteriole in the microcirculation. *Microcirc. N. Y. N* **1994** **15**, 389–404 (2008).
267. Waters, R. E., Rotevatn, S., Li, P., Annex, B. H. & Yan, Z. Voluntary running induces fiber type-specific angiogenesis in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **287**, C1342-1348 (2004).
268. Olfert, I. M. *et al.* Muscle-specific VEGF deficiency greatly reduces exercise endurance in mice. *J. Physiol.* **587**, 1755–1767 (2009).
269. Mounier, R. *et al.* Effect of intermittent hypoxic training on HIF gene expression in human skeletal muscle and leukocytes. *Eur. J. Appl. Physiol.* **105**, 515–524 (2009).
270. Frydelund-Larsen, L. *et al.* Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle: Regulation of CXCR2 by exercise. *Exp. Physiol.* **92**, 233–240 (2007).
271. Christov, C. *et al.* Muscle satellite cells and endothelial cells: close neighbors and privileged partners. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1397–1409 (2007).

272. Abou-Khalil, R. *et al.* Autocrine and paracrine angiopoietin 1/Tie-2 signaling promotes muscle satellite cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **5**, 298–309 (2009).
273. Luque, E., Peña, J., Martin, P., Jimena, I. & Vaamonde, R. Capillary supply during development of individual regenerating muscle fibers. *Anat. Histol. Embryol.* **24**, 87–89 (1995).
274. Scholz, D., Thomas, S., Sass, S. & Podzuweit, T. Angiogenesis and myogenesis as two facets of inflammatory post-ischemic tissue regeneration. *Mol. Cell. Biochem.* **246**, 57–67 (2003).
275. Latroche, C. *et al.* Skeletal Muscle Microvasculature: A Highly Dynamic Lifeline. *Physiology* **30**, 417–427 (2015).
276. Abou-Khalil, R., Mounier, R. & Chazaud, B. Regulation of myogenic stem cell behaviour by vessel cells: The ‘ménage à trois’ of satellite cells, periendothelial cells and endothelial cells. *Cell Cycle* **9**, 892–896 (2010).
277. Tang, K., Breen, E. C., Gerber, H.-P., Ferrara, N. M. A. & Wagner, P. D. Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiol. Genomics* **18**, 63–69 (2004).
278. Bryan, B. A. *et al.* Coordinated vascular endothelial growth factor expression and signaling during skeletal myogenic differentiation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 994–1006 (2008).
279. Germani, A. *et al.* Vascular endothelial growth factor modulates skeletal myoblast function. *Am. J. Pathol.* **163**, 1417–1428 (2003).
280. Ochoa, O. *et al.* Delayed angiogenesis and VEGF production in CCR2<sup>-/-</sup> mice during impaired skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R651–661 (2007).
281. Wagatsuma, A. Endogenous expression of angiogenesis-related factors in response to muscle injury. *Mol. Cell. Biochem.* **298**, 151–159 (2007).
282. Walgenbach, K. J., Gratas, C., Shestak, K. C. & Becker, D. Ischaemia-induced expression of bFGF in normal skeletal muscle: a potential paracrine mechanism for mediating angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. *Nat. Med.* **1**, 453–459 (1995).

283. Doukas, J. *et al.* Delivery of FGF genes to wound repair cells enhances arteriogenesis and myogenesis in skeletal muscle. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **5**, 517–527 (2002).
284. Emanuelli, C. *et al.* Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation* **106**, 2257–2262 (2002).
285. Kim, K. *et al.* Beta-catenin overexpression augments angiogenesis and skeletal muscle regeneration through dual mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell proliferation and progenitor cell mobilization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 91–98 (2006).
286. Latroche, C. *et al.* Coupling between Myogenesis and Angiogenesis during Skeletal Muscle Regeneration Is Stimulated by Restorative Macrophages. *Stem Cell Rep.* **9**, 2018–2033 (2017).
287. Jerusalem, F., Engel, A. G. & Gomez, M. R. Duchenne dystrophy. I. Morphometric study of the muscle microvasculature. *Brain J. Neurol.* **97**, 115–122 (1974).
288. Desguerre, I. *et al.* Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 762–773 (2009).
289. Straino, S. *et al.* Enhanced arteriogenesis and wound repair in dystrophin-deficient mdx mice. *Circulation* **110**, 3341–3348 (2004).
290. Palladino, M. *et al.* Angiogenic impairment of the vascular endothelium: a novel mechanism and potential therapeutic target in muscular dystrophy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2867–2876 (2013).
291. Rhoads, R. P. *et al.* Satellite cells isolated from aged or dystrophic muscle exhibit a reduced capacity to promote angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440**, 399–404 (2013).
292. Dunwoodie, S. L. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev. Cell* **17**, 755–773 (2009).

293. Śliwicka, E., Cisoń, T., Kasprzak, Z., Nowak, A. & Pilaczyńska-Szcześniak, Ł. Serum irisin and myostatin levels after 2 weeks of high-altitude climbing. *PLoS One* **12**, e0181259 (2017).
294. Ogilvie, M. *et al.* Erythropoietin Stimulates Proliferation and Interferes with Differentiation of Myoblasts. *J. Biol. Chem.* **275**, 39754–39761 (2000).
295. Koning, M., Werker, P. M. N., van Luyn, M. J. A. & Harmsen, M. C. Hypoxia promotes proliferation of human myogenic satellite cells: a potential benefactor in tissue engineering of skeletal muscle. *Tissue Eng. Part A* **17**, 1747–1758 (2011).
296. Urbani, L., Piccoli, M., Franzin, C., Pozzobon, M. & De Coppi, P. Hypoxia Increases Mouse Satellite Cell Clone Proliferation Maintaining both In Vitro and In Vivo Heterogeneity and Myogenic Potential. *PLoS ONE* **7**, e49860 (2012).
297. Jia, Y., Suzuki, N., Yamamoto, M., Gassmann, M. & Noguchi, C. T. Endogenous erythropoietin signaling facilitates skeletal muscle repair and recovery following pharmacologically induced damage. *FASEB J.* **26**, 2847–2858 (2012).
298. Jazwa, A. *et al.* Pre-emptive hypoxia-regulated HO-1 gene therapy improves post-ischaemic limb perfusion and tissue regeneration in mice. *Cardiovasc. Res.* **97**, 115–124 (2013).
299. Kozakowska, M. *et al.* Heme Oxygenase-1 Inhibits Myoblast Differentiation by Targeting Myomirs. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 113–127 (2012).
300. Gustafsson, M. V. *et al.* Hypoxia Requires Notch Signaling to Maintain the Undifferentiated Cell State. *Dev. Cell* **9**, 617–628 (2005).
301. Majmundar, A. J. *et al.* HIF modulation of Wnt signaling regulates skeletal myogenesis *in vivo*. *Development* dev.123026 (2015) doi:10.1242/dev.123026.
302. von Maltzahn, J., Bentzinger, C. F. & Rudnicki, M. A. Wnt7a–Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **14**, 186–191 (2012).
303. Veeman, M. T., Axelrod, J. D. & Moon, R. T. A Second Canon. *Dev. Cell* **5**, 367–377 (2003).



304. Novitch, B. G., Mulligan, G. J., Jacks, T. & Lassar, A. B. Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J. Cell Biol.* **135**, 441–456 (1996).
305. Di Carlo, A. *et al.* Hypoxia Inhibits Myogenic Differentiation through Accelerated MyoD Degradation. *J. Biol. Chem.* **279**, 16332–16338 (2004).
306. Ren, H., Accili, D. & Duan, C. Hypoxia converts the myogenic action of insulin-like growth factors into mitogenic action by differentially regulating multiple signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 5857–5862 (2010).
307. Won Kim, H., Haider, H. K., Jiang, S. & Ashraf, M. Ischemic Preconditioning Augments Survival of Stem Cells via miR-210 Expression by Targeting Caspase-8-associated Protein 2. *J. Biol. Chem.* **284**, 33161–33168 (2009).
308. Chakraborty, A. A. *et al.* Histone demethylase KDM6A directly senses oxygen to control chromatin and cell fate. *Science* **363**, 1217–1222 (2019).
309. Pircher, T. *et al.* Hypoxic Signaling in Skeletal Muscle Maintenance and Regeneration: A Systematic Review. *Front. Physiol.* **12**, 684899 (2021).
310. Marxsen, J. H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF- $\alpha$ -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem. J.* **381**, 761–767 (2004).
311. Kubis, H.-P., Hanke, N., Scheibe, R. J. & Gros, G. Accumulation and nuclear import of HIF1  $\alpha$  during high and low oxygen concentration in skeletal muscle cells in primary culture. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1745**, 187–195 (2005).
312. Bracken, C. P., Whitelaw, M. L. & Peet, D. J. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **60**, 1376–1393 (2003).
313. Wang, C. *et al.* Hypoxia Inhibits Myogenic Differentiation through p53 Protein-dependent Induction of Bhlhe40 Protein. *J. Biol. Chem.* **290**, 29707–29716 (2015).
314. Yang, X., Yang, S., Wang, C. & Kuang, S. The hypoxia-inducible factors HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  are dispensable for embryonic muscle development but essential for postnatal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **292**, 5981–5991 (2017).

315. Londhe, P. & Davie, J. K. Gamma interferon modulates myogenesis through the major histocompatibility complex class II transactivator, CIITA. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2854–2866 (2011).
316. Londhe, P. & Davie, J. K. Interferon- $\gamma$  resets muscle cell fate by stimulating the sequential recruitment of JARID2 and PRC2 to promoters to repress myogenesis. *Sci. Signal.* **6**, ra107 (2013).
317. Cheng, M., Nguyen, M.-H., Fantuzzi, G. & Koh, T. J. Endogenous interferon-gamma is required for efficient skeletal muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C1183-1191 (2008).
318. Zhao, Q. *et al.* TNF alpha inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF- $\kappa$ B activation and impairment of IGF-1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 790–795 (2015).
319. Chen, S.-E. *et al.* Role of TNF- $\alpha$  signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C1179-1187 (2005).
320. Liu, Q.-C. *et al.* Comparative expression profiling identifies differential roles for Myogenin and p38 $\alpha$  MAPK signaling in myogenesis. *J. Mol. Cell Biol.* **4**, 386–397 (2012).
321. Torrente, Y. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates chemotactic response in mouse myogenic cells. *Cell Transplant.* **12**, 91–100 (2003).
322. Wilson-Rawls, J., Molkentin, J. D., Black, B. L. & Olson, E. N. Activated notch inhibits myogenic activity of the MADS-Box transcription factor myocyte enhancer factor 2C. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2853–2862 (1999).
323. Zhang, C. *et al.* Interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathway is essential for macrophage infiltration and myoblast proliferation during muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* **288**, 1489–1499 (2013).
324. Wright, C. R. *et al.* Regulation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor in Skeletal Muscle is Dependent Upon the Type of Inflammatory Stimulus. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **35**, 710–719 (2015).

325. Stratos, I., Rotter, R., Eipel, C., Mittlmeier, T. & Vollmar, B. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 **103**, 1857–1863 (2007).
326. Serrano, A. L., Baeza-Raja, B., Perdiguero, E., Jardí, M. & Muñoz-Cánoves, P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* **7**, 33–44 (2008).
327. Pelosi, M., De Rossi, M., Barberi, L. & Musarò, A. IL-6 Impairs Myogenic Differentiation by Downmodulation of p90RSK/eEF2 and mTOR/p70S6K Axes, without Affecting AKT Activity. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–12 (2014).
328. Du, H. *et al.* Macrophage-released ADAMTS1 promotes muscle stem cell activation. *Nat. Commun.* **8**, 669 (2017).
329. Spangenburg, E. E. & Booth, F. W. Multiple signaling pathways mediate LIF-induced skeletal muscle satellite cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C204-211 (2002).
330. Alter, J., Rozentzweig, D. & Bengal, E. Inhibition of Myoblast Differentiation by Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Is Mediated by c-Jun N-terminal Kinase 1 and Leukemia Inhibitory Factor. *J. Biol. Chem.* **283**, 23224–23234 (2008).
331. Tollefsen, S. E., Sadow, J. L. & Rotwein, P. Coordinate expression of insulin-like growth factor II and its receptor during muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1543–1547 (1989).
332. Forcina, L., Miano, C., Scicchitano, B. M. & Musarò, A. Signals from the Niche: Insights into the Role of IGF-1 and IL-6 in Modulating Skeletal Muscle Fibrosis. *Cells* **8**, (2019).
333. Barton-Davis, E. R., Shoturma, D. I. & Sweeney, H. L. Contribution of satellite cells to IGF-I induced hypertrophy of skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* **167**, 301–305 (1999).
334. Bark, T. H., McNurlan, M. A., Lang, C. H. & Garlick, P. J. Increased protein synthesis after acute IGF-I or insulin infusion is localized to muscle in mice. *Am. J. Physiol.* **275**, E118-123 (1998).

335. Mourkioti, F. & Rosenthal, N. IGF-1, inflammation and stem cells: interactions during muscle regeneration. *Trends Immunol.* **26**, 535–542 (2005).
336. Chakravarthy, M. V., Abraha, T. W., Schwartz, R. J., Fiorotto, M. L. & Booth, F. W. Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **275**, 35942–35952 (2000).
337. Broussard, S. R. *et al.* IL-1 $\beta$  Impairs Insulin-Like Growth Factor I-Induced Differentiation and Downstream Activation Signals of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor in Myoblasts. *J. Immunol.* **172**, 7713–7720 (2004).
338. Blanc, R. S. *et al.* Inhibition of inflammatory CCR2 signaling promotes aged muscle regeneration and strength recovery after injury. *Nat. Commun.* **11**, 4167 (2020).
339. Masuda, S. *et al.* Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 is a myokine induced by palmitate and is required for myogenesis in mouse satellite cells. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **222**, (2018).
340. Romanazzo, S., Forte, G., Morishima, K. & Taniguchi, A. IL-12 involvement in myogenic differentiation of C2C12 in vitro. *Biomater. Sci.* **3**, 469–479 (2015).
341. Possidonio, A. C. B. *et al.*  $\alpha$ -Cyclodextrin enhances myoblast fusion and muscle differentiation by the release of IL-4. *Cytokine* **55**, 280–287 (2011).
342. Strle, K. *et al.* Novel activity of an anti-inflammatory cytokine: IL-10 prevents TNF $\alpha$ -induced resistance to IGF-I in myoblasts. *J. Neuroimmunol.* **188**, 48–55 (2007).
343. Bosurgi, L. *et al.* Transplanted Mesoangioblasts Require Macrophage IL-10 for Survival in a Mouse Model of Muscle Injury. *J. Immunol.* **188**, 6267–6277 (2012).
344. Liu, D., Black, B. L. & Derynck, R. TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3. *Genes Dev.* **15**, 2950–2966 (2001).
345. Brennan, T. J., Edmondson, D. G., Li, L. & Olson, E. N. Transforming growth factor beta represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 3822–3826 (1991).

346. Schabert, E. J., van der Merwe, M., Loos, B., Moore, F. P. & Niesler, C. U. TGF-beta's delay skeletal muscle progenitor cell differentiation in an isoform-independent manner. *Exp. Cell Res.* **315**, 373–384 (2009).
347. Rodgers, B. D. *et al.* Myostatin stimulates, not inhibits, C2C12 myoblast proliferation. *Endocrinology* **155**, 670–675 (2014).
348. Zanotti, S. *et al.* Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **26**, 615–624 (2007).
349. Dong, Y. *et al.* Interactions between p-Akt and Smad3 in injured muscles initiate myogenesis or fibrogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **305**, E367–375 (2013).
350. Foster, W., Li, Y., Usas, A., Somogyi, G. & Huard, J. Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **21**, 798–804 (2003).
351. Shoyab, M., Plowman, G. D., McDonald, V. L., Bradley, J. G. & Todaro, G. J. Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* **243**, 1074–1076 (1989).
352. Chazaud, B. *et al.* Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell Biol.* **163**, 1133–1143 (2003).
353. Johnson, C. H. Bacterial circadian programs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **72**, 395–404 (2007).
354. McClung, C. R. Plant circadian rhythms. *Plant Cell* **18**, 792–803 (2006).
355. Lowrey, P. L. & Takahashi, J. S. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **5**, 407–441 (2004).
356. Czeisler, C. A. Stability, Precision, and Near-24-Hour Period of the Human Circadian Pacemaker. *Science* **284**, 2177–2181 (1999).

357. Zeitzer, J. M., Dijk, D. J., Kronauer, R., Brown, E. & Czeisler, C. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. *J. Physiol.* **526 Pt 3**, 695–702 (2000).
358. Prayag, A. S., Jost, S., Avouac, P., Dumortier, D. & Gronfier, C. Dynamics of Non-visual Responses in Humans: As Fast as Lightning? *Front. Neurosci.* **13**, 126 (2019).
359. Prayag, A. S., Najjar, R. P. & Gronfier, C. Melatonin suppression is exquisitely sensitive to light and primarily driven by melanopsin in humans. *J. Pineal Res.* **66**, e12562 (2019).
360. Brainard, G. C. *et al.* Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **21**, 6405–6412 (2001).
361. Khalsa, S. B. S., Jewett, M. E., Cajochen, C. & Czeisler, C. A. A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *J. Physiol.* **549**, 945–952 (2003).
362. Siwicki, K. K., Eastman, C., Petersen, G., Rosbash, M. & Hall, J. C. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron* **1**, 141–150 (1988).
363. Vosshall, L. B., Price, J. L., Sehgal, A., Saez, L. & Young, M. W. Block in nuclear localization of period protein by a second clock mutation, timeless. *Science* **263**, 1606–1609 (1994).
364. Eckel-Mahan, K. & Sassone-Corsi, P. Metabolism and the circadian clock converge. *Physiol. Rev.* **93**, 107–135 (2013).
365. Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E. & Hogenesch, J. B. A circadian gene expression atlas in mammals: Implications for biology and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 16219–16224 (2014).
366. Dyar, K. A. *et al.* Atlas of Circadian Metabolism Reveals System-wide Coordination and Communication between Clocks. *Cell* **174**, 1571-1585.e11 (2018).
367. Mauvoisin, D. & Gachon, F. Proteomics in Circadian Biology. *J. Mol. Biol.* **432**, 3565–3577 (2020).
368. Mangelsdorf, D. J. *et al.* The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**, 835–839 (1995).

369. Kumar, R. & Thompson, E. B. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **17**, 1–10 (2003).
370. Rastinejad, F., Huang, P., Chandra, V. & Khorasanizadeh, S. Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *J. Mol. Endocrinol.* **51**, T1–T21 (2013).
371. Schwabe, J. W., Chapman, L., Finch, J. T. & Rhodes, D. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* **75**, 567–578 (1993).
372. Glass, C. K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr. Rev.* **15**, 391–407 (1994).
373. Chen, J. D. & Evans, R. M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454–457 (1995).
374. Wurtz, J.-M. *et al.* A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 87–94 (1996).
375. Moras, D. & Gronemeyer, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 384–391 (1998).
376. Montano, M. M., Müller, V., Trobaugh, A. & Katzenellenbogen, B. S. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **9**, 814–825 (1995).
377. Sladek, F. M., Ruse, M. D., Nepomuceno, L., Huang, S. M. & Stallcup, M. R. Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ 1. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6509–6522 (1999).
378. Grimaldi, M. *et al.* Reporter Cell Lines for the Characterization of the Interactions between Human Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors. *Front. Endocrinol.* **6**, (2015).

379. Pratt, W. B., Galigniana, M. D., Morishima, Y. & Murphy, P. J. M. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem.* **40**, 41–58 (2004).
380. O'Malley, B. W. & Tsai, M. J. Molecular pathways of steroid receptor action. *Biol. Reprod.* **46**, 163–167 (1992).
381. Tata, J. R. Signalling through nuclear receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 702–710 (2002).
382. Lonard, D. M. & O'malley, B. W. Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol. Cell* **27**, 691–700 (2007).
383. White, J. H., Fernandes, I., Mader, S. & Yang, X.-J. Corepressor recruitment by agonist-bound nuclear receptors. *Vitam. Horm.* **68**, 123–143 (2004).
384. Glass, C. K. & Rosenfeld, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* **14**, 121–141 (2000).
385. Lewis, B. A. & Reinberg, D. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J. Cell Sci.* **116**, 3667–3675 (2003).
386. Cook, D. N., Kang, H. S. & Jetten, A. M. Retinoic Acid-Related Orphan Receptors (RORs): Regulatory Functions in Immunity, Development, Circadian Rhythm, and Metabolism. *Nucl. Recept. Res.* **2**, (2015).
387. Jetten, A. M. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl. Recept. Signal.* **7**, e003 (2009).
388. Giguère, V. *et al.* Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev.* **8**, 538–553 (1994).
389. Giguère, V., McBroom, L. D. & Flock, G. Determinants of target gene specificity for ROR alpha 1: monomeric DNA binding by an orphan nuclear receptor. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2517–2526 (1995).
390. Medvedev, A., Yan, Z. H., Hirose, T., Giguère, V. & Jetten, A. M. Cloning of a cDNA encoding the murine orphan receptor RZR/ROR gamma and characterization of its response element. *Gene* **181**, 199–206 (1996).



391. Duez, H. & Staels, B. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **5**, 82–88 (2008).
392. Solt, L. A. & Burris, T. P. Action of RORs and their ligands in (patho)physiology. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **23**, 619–627 (2012).
393. Ermisch, M., Firla, B. & Steinhilber, D. Protein kinase A activates and phosphorylates ROR $\alpha$ 4 in vitro and takes part in ROR $\alpha$  activation by CaMK-IV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**, 442–446 (2011).
394. Lechtken, A. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase-2 phosphorylates ROR $\alpha$ 4 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 890–896 (2007).
395. Hwang, E. J. *et al.* SUMOylation of ROR $\alpha$  potentiates transcriptional activation function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **378**, 513–517 (2009).
396. Zhang, Y., Liu, Y., Liu, Y., Zhang, Y. & Su, Z. Genetic Variants of Retinoic Acid Receptor-Related Orphan Receptor Alpha Determine Susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus in Han Chinese. *Genes* **7**, E54 (2016).
397. Klar, J. *et al.* RAR-related orphan receptor A isoform 1 (ROR $\alpha$ 1) is disrupted by a balanced translocation t(4;15)(q22.3;q21.3) associated with severe obesity. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **13**, 928–934 (2005).
398. Chambers, J. C. *et al.* Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nat. Genet.* **43**, 1131–1138 (2011).
399. Raspé, E. *et al.* Transcriptional regulation of apolipoprotein C-III gene expression by the orphan nuclear receptor ROR $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **276**, 2865–2871 (2001).
400. Chopra, A. R. *et al.* Absence of the SRC-2 coactivator results in a glycogenopathy resembling Von Gierke's disease. *Science* **322**, 1395–1399 (2008).
401. Kim, K. *et al.* ROR $\alpha$  controls hepatic lipid homeostasis via negative regulation of PPAR $\gamma$  transcriptional network. *Nat. Commun.* **8**, 162 (2017).
402. Kim, H.-J. *et al.* Liver-specific deletion of ROR $\alpha$  aggravates diet-induced nonalcoholic steatohepatitis by inducing mitochondrial dysfunction. *Sci. Rep.* **7**, 16041 (2017).

403. Boukhtouche, F., Mariani, J. & Tedgui, A. The 'CholesteROR' protective pathway in the vascular system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 637–643 (2004).
404. Vu-Dac, N. *et al.* Transcriptional regulation of apolipoprotein A-I gene expression by the nuclear receptor RORalpha. *J. Biol. Chem.* **272**, 22401–22404 (1997).
405. Sidman, R. L., Lane, P. W. & Dickie, M. M. Staggerer, a new mutation in the mouse affecting the cerebellum. *Science* **137**, 610–612 (1962).
406. Hamilton, B. A. *et al.* Disruption of the nuclear hormone receptor RORalpha in staggerer mice. *Nature* **379**, 736–739 (1996).
407. Mamontova, A. *et al.* Severe atherosclerosis and hypoalphalipoproteinemia in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor RORalpha. *Circulation* **98**, 2738–2743 (1998).
408. Lau, P. *et al.* Rora deficiency and decreased adiposity are associated with induction of thermogenic gene expression in subcutaneous white adipose and brown adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E159-171 (2015).
409. Monnier, C., Auclair, M., Le Cam, G., Garcia, M.-P. & Antoine, B. The nuclear retinoid-related orphan receptor ROR $\alpha$  controls circadian thermogenic programming in white fat depots. *Physiol. Rep.* **6**, e13678 (2018).
410. Trenkner, E. & Hoffmann, M. K. Defective development of the thymus and immunological abnormalities in the neurological mouse mutation 'staggerer'. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **6**, 1733–1737 (1986).
411. Kopmels, B. *et al.* Evidence for a hyperexcitability state of staggerer mutant mice macrophages. *J. Neurochem.* **58**, 192–199 (1992).
412. Dzhalgalov, I., Giguère, V. & He, Y.-W. Lymphocyte development and function in the absence of retinoic acid-related orphan receptor alpha. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **173**, 2952–2959 (2004).
413. Jaradat, M. *et al.* Modulatory role for retinoid-related orphan receptor alpha in allergen-induced lung inflammation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 1299–1309 (2006).

414. Friesenhagen, J. *et al.* Highly pathogenic influenza viruses inhibit inflammatory response in monocytes via activation of rar-related orphan receptor ROR $\alpha$ . *J. Innate Immun.* **5**, 505–518 (2013).
415. Mukherji, A., Kobiita, A., Ye, T. & Chambon, P. Homeostasis in intestinal epithelium is orchestrated by the circadian clock and microbiota cues transduced by TLRs. *Cell* **153**, 812–827 (2013).
416. Wong, S. H. *et al.* Transcription factor ROR $\alpha$  is critical for nuocyte development. *Nat. Immunol.* **13**, 229–236 (2012).
417. Yang, X. O. *et al.* T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity* **28**, 29–39 (2008).
418. Baumjohann, D. *et al.* The microRNA cluster miR-17~92 promotes TFH cell differentiation and represses subset-inappropriate gene expression. *Nat. Immunol.* **14**, 840–848 (2013).
419. Wang, N. S. *et al.* Divergent transcriptional programming of class-specific B cell memory by T-bet and ROR $\alpha$ . *Nat. Immunol.* **13**, 604–611 (2012).
420. Lazar, M. A., Hodin, R. A., Darling, D. S. & Chin, W. W. A novel member of the thyroid/steroid hormone receptor family is encoded by the opposite strand of the rat c-erbA alpha transcriptional unit. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1128–1136 (1989).
421. Feng, D. *et al.* A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science* **331**, 1315–1319 (2011).
422. Harding, H. P. & Lazar, M. A. The monomer-binding orphan receptor Rev-Erb represses transcription as a dimer on a novel direct repeat. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4791–4802 (1995).
423. Zhang, Y. *et al.* HNF6 and Rev-erb $\alpha$  integrate hepatic lipid metabolism by overlapping and distinct transcriptional mechanisms. *Genes Dev.* **30**, 1636–1644 (2016).
424. Welch, R. D. *et al.* Rev-Erb co-regulates muscle regeneration via tethered interaction with the NF-Y cistrome. *Mol. Metab.* **6**, 703–714 (2017).

425. Berthier, A. *et al.* Combinatorial regulation of hepatic cytoplasmic signaling and nuclear transcriptional events by the OGT/REV-ERB $\alpha$  complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E11033–E11042 (2018).
426. Raghuram, S. *et al.* Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB $\alpha$  and REV-ERB $\beta$ . *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1207–1213 (2007).
427. Raghuram, S. *et al.* Identification of heme as the ligand for the orphan nuclear receptors REV-ERB $\alpha$  and REV-ERB $\beta$ . *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 1207–1213 (2007).
428. Pardee, K. I. *et al.* The Structural Basis of Gas-Responsive Transcription by the Human Nuclear Hormone Receptor REV-ERB $\beta$ . *PLoS Biol.* **7**, e1000043 (2009).
429. Li, M., Gallo, D., Csizmadia, E., Otterbein, L. E. & Wegiel, B. Carbon monoxide induces chromatin remodelling to facilitate endothelial cell migration. *Thromb. Haemost.* **111**, 951–959 (2014).
430. Chu, G., Zhou, X., Hu, Y., Shi, S. & Yang, G. Rev-erb $\alpha$  Inhibits Proliferation and Promotes Apoptosis of Preadipocytes through the Agonist GSK4112. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E4524 (2019).
431. Solt, L. A. *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* **485**, 62–68 (2012).
432. Kumar, N. *et al.* Regulation of adipogenesis by natural and synthetic REV-ERB ligands. *Endocrinology* **151**, 3015–3025 (2010).
433. Woldt, E. *et al.* Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat. Med.* **19**, 1039–1046 (2013).
434. Dierickx, P. *et al.* SR9009 has REV-ERB-independent effects on cell proliferation and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 12147–12152 (2019).
435. Pariollaud, M. *et al.* Circadian clock component REV-ERB $\alpha$  controls homeostatic regulation of pulmonary inflammation. *J. Clin. Invest.* **128**, 2281–2296 (2018).
436. Kojetin, D. J. & Burris, T. P. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **13**, 197–216 (2014).

437. Vieira, E. *et al.* Involvement of the clock gene Rev-erb alpha in the regulation of glucagon secretion in pancreatic alpha-cells. *PLoS One* **8**, e69939 (2013).
438. Le Martelot, G. *et al.* REV-ERBalpha participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol.* **7**, e1000181 (2009).
439. Sitaula, S., Zhang, J., Ruiz, F. & Burris, T. P. Rev-erb regulation of cholesterologenesis. *Biochem. Pharmacol.* **131**, 68–77 (2017).
440. Duez, H. *et al.* Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erbalpha. *Gastroenterology* **135**, 689–698 (2008).
441. Zhang, T. *et al.* REV-ERB  $\alpha$  Regulates CYP7A1 Through Repression of Liver Receptor Homolog-1. *Drug Metab. Dispos.* **46**, 248–258 (2018).
442. Coste, H. & Rodríguez, J. C. Orphan nuclear hormone receptor Rev-erbalpha regulates the human apolipoprotein CIII promoter. *J. Biol. Chem.* **277**, 27120–27129 (2002).
443. Yin, L. *et al.* Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* **318**, 1786–1789 (2007).
444. Fontaine, C. *et al.* The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 37672–37680 (2003).
445. Wang, J. & Lazar, M. A. Bifunctional role of Rev-erbalpha in adipocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2213–2220 (2008).
446. Hunter, A. L. *et al.* Adipocyte NR1D1 dictates adipose tissue expansion during obesity. *eLife* **10**, e63324 (2021).
447. Burke, L., Downes, M., Carozzi, A., Giguère, V. & Muscat, G. E. Transcriptional repression by the orphan steroid receptor RVR/Rev-erb beta is dependent on the signature motif and helix 5 in the E region: functional evidence for a biological role of RVR in myogenesis. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3481–3489 (1996).
448. Downes, M., Carozzi, A. J. & Muscat, G. E. Constitutive expression of the orphan receptor, Rev-erbA alpha, inhibits muscle differentiation and abrogates the expression of the myoD gene family. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **9**, 1666–1678 (1995).

449. Fontaine, C. *et al.* The nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **22**, 1797–1811 (2008).
450. Eichenfield, D. Z. *et al.* Tissue damage drives co-localization of NF- $\kappa$ B, Smad3, and Nrf2 to direct Rev-erb sensitive wound repair in mouse macrophages. *eLife* **5**, (2016).
451. Ma, H. *et al.* Increased atherosclerotic lesions in LDL receptor deficient mice with hematopoietic nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  knock- down. *J. Am. Heart Assoc.* **2**, e000235 (2013).
452. Pourcet, B. *et al.* Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 Regulates Circadian Activity of NLRP3 Inflammasome to Reduce the Severity of Fulminant Hepatitis in Mice. *Gastroenterology* **154**, 1449-1464.e20 (2018).
453. Gibbs, J. E. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 582–587 (2012).
454. Sato, S. *et al.* A circadian clock gene, Rev-erb $\alpha$ , modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 407–417 (2014).
455. Chang, C. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  modulates Th17 cell-mediated autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 18528–18536 (2019).
456. Bechtold, D. A. & Loudon, A. S. I. Hypothalamic clocks and rhythms in feeding behaviour. *Trends Neurosci.* **36**, 74–82 (2013).
457. Damiola, F. *et al.* Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev.* **14**, 2950–2961 (2000).
458. Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y. & Menaker, M. Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding. *Science* **291**, 490–493 (2001).
459. Manella, G. *et al.* The liver-clock coordinates rhythmicity of peripheral tissues in response to feeding. *Nat. Metab.* **3**, 829–842 (2021).

460. Cox, K. H. & Takahashi, J. S. Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *J. Mol. Endocrinol.* **63**, R93–R102 (2019).
461. Patke, A., Young, M. W. & Axelrod, S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2019) doi:10.1038/s41580-019-0179-2.
462. Milev, N. B. & Reddy, A. B. Circadian redox oscillations and metabolism. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* **26**, 430–437 (2015).
463. Rijo-Ferreira, F. & Takahashi, J. S. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med.* **11**, 82 (2019).
464. Bass, J. & Lazar, M. A. Circadian time signatures of fitness and disease. *Science* **354**, 994–999 (2016).
465. Asher, G. *et al.* SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* **134**, 317–328 (2008).
466. Asher, G. *et al.* Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding. *Cell* **142**, 943–953 (2010).
467. Nakahata, Y. *et al.* The NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* **134**, 329–340 (2008).
468. Lamia, K. A. *et al.* AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* **326**, 437–440 (2009).
469. Zhang, C.-S. *et al.* Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature* **548**, 112–116 (2017).
470. Um, J. H. *et al.* Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iε (CKIε)-dependent degradation of clock protein mPer2. *J. Biol. Chem.* **282**, 20794–20798 (2007).
471. Hirano, A., Braas, D., Fu, Y.-H. & Ptáček, L. J. FAD Regulates CRYPTOCHROME Protein Stability and Circadian Clock in Mice. *Cell Rep.* **19**, 255–266 (2017).
472. Klemz, R. *et al.* Reciprocal regulation of carbon monoxide metabolism and the circadian clock. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **24**, 15–22 (2017).

473. Pastore, N. *et al.* Nutrient-sensitive transcription factors TFEB and TFE3 couple autophagy and metabolism to the peripheral clock. *EMBO J.* **38**, (2019).
474. Crosby, P. *et al.* Insulin/IGF-1 Drives PERIOD Synthesis to Entrain Circadian Rhythms with Feeding Time. *Cell* **177**, 896-909.e20 (2019).
475. de Goede, P., Wefers, J., Brombacher, E. C., Schrauwen, P. & Kalsbeek, A. Circadian rhythms in mitochondrial respiration. *J. Mol. Endocrinol.* **60**, R115–R130 (2018).
476. Dallmann, R., Viola, A. U., Tarokh, L., Cajochen, C. & Brown, S. A. The human circadian metabolome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2625–2629 (2012).
477. Chua, E. C.-P. *et al.* Extensive diversity in circadian regulation of plasma lipids and evidence for different circadian metabolic phenotypes in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 14468–14473 (2013).
478. Loizides-Mangold, U. *et al.* Lipidomics reveals diurnal lipid oscillations in human skeletal muscle persisting in cellular myotubes cultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E8565–E8574 (2017).
479. Dyar, K. A. *et al.* Muscle insulin sensitivity and glucose metabolism are controlled by the intrinsic muscle clock. *Mol. Metab.* **3**, 29–41 (2014).
480. Lamia, K. A., Storch, K.-F. & Weitz, C. J. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 15172–15177 (2008).
481. Van Cauter, E., Polonsky, K. S. & Scheen, A. J. Roles of Circadian Rhythmicity and Sleep in Human Glucose Regulation\*. *Endocr. Rev.* **18**, 716–738 (1997).
482. Vetter, C. *et al.* Night Shift Work, Genetic Risk, and Type 2 Diabetes in the UK Biobank. *Diabetes Care* **41**, 762–769 (2018).
483. van Leeuwen, W. M. A. *et al.* Prolonged Sleep Restriction Affects Glucose Metabolism in Healthy Young Men. *Int. J. Endocrinol.* **2010**, 1–7 (2010).
484. Cedernaes, J. *et al.* A single night of partial sleep loss impairs fasting insulin sensitivity but does not affect cephalic phase insulin release in young men. *J. Sleep Res.* **25**, 5–10 (2016).



485. Adamovich, Y., Ladeux, B., Golik, M., Koeners, M. P. & Asher, G. Rhythmic Oxygen Levels Reset Circadian Clocks through HIF1 $\alpha$ . *Cell Metab.* **25**, 93–101 (2017).
486. Manella, G. *et al.* Hypoxia induces a time- and tissue-specific response that elicits intertissue circadian clock misalignment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 779–786 (2020).
487. Cedernaes, J. *et al.* Transcriptional Basis for Rhythmic Control of Hunger and Metabolism within the AgRP Neuron. *Cell Metab.* **29**, 1078-1091.e5 (2019).
488. Petrenko, V. *et al.* Pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cellular clocks have distinct molecular properties and impact on islet hormone secretion and gene expression. *Genes Dev.* **31**, 383–398 (2017).
489. Gil-Lozano, M., Mingomataj, E. L., Wu, W. K., Ridout, S. A. & Brubaker, P. L. Circadian Secretion of the Intestinal Hormone GLP-1 by the Rodent L Cell. *Diabetes* **63**, 3674–3685 (2014).
490. Turek, F. W. *et al.* Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* **308**, 1043–1045 (2005).
491. Rudic, R. D. *et al.* BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol.* **2**, e377 (2004).
492. So, A. Y.-L., Bernal, T. U., Pillsbury, M. L., Yamamoto, K. R. & Feldman, B. J. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17582–17587 (2009).
493. Vollmers, C. *et al.* Time of feeding and the intrinsic circadian clock drive rhythms in hepatic gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21453–21458 (2009).
494. Zhang, E. E. *et al.* Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nat. Med.* **16**, 1152–1156 (2010).
495. Roesler, W. J. & Khandelwal, R. L. The diurnal rhythm of liver glycogen phosphorylase: correlating changes in enzyme activity and enzymic protein. *FEBS Lett.* **195**, 344–346 (1986).
496. Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T. & Ishida, N. A role for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the mammalian circadian clock. *J. Biol. Chem.* **280**, 29397–29402 (2005).

497. Doi, R., Oishi, K. & Ishida, N. CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. *J. Biol. Chem.* **285**, 22114–22121 (2010).
498. Sinturel, F. & Gachon, F. Diurnal liver mass is associated with ribosome biogenesis. *Oncotarget* **8**, 96476–96477 (2017).
499. Marcheva, B. *et al.* Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* **466**, 627–631 (2010).
500. Saini, C. *et al.* A functional circadian clock is required for proper insulin secretion by human pancreatic islet cells. *Diabetes Obes. Metab.* **18**, 355–365 (2016).
501. Rakshit, K. & Matveyenko, A. V. Induction of Core Circadian Clock Transcription Factor Bmal1 Enhances  $\beta$ -Cell Function and Protects Against Obesity-Induced Glucose Intolerance. *Diabetes* **70**, 143–154 (2021).
502. He, B. *et al.* The Small Molecule Nobiletin Targets the Molecular Oscillator to Enhance Circadian Rhythms and Protect against Metabolic Syndrome. *Cell Metab.* **23**, 610–621 (2016).
503. Adamovich, Y. *et al.* Circadian clocks and feeding time regulate the oscillations and levels of hepatic triglycerides. *Cell Metab.* **19**, 319–330 (2014).
504. Bugge, A. *et al.* Rev-erb $\alpha$  and Rev-erb $\beta$  coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev.* **26**, 657–667 (2012).
505. Guan, D. *et al.* The hepatocyte clock and feeding control chronophysiology of multiple liver cell types. *Science* **369**, 1388–1394 (2020).
506. Zhang, Y. *et al.* GENE REGULATION. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  couple metabolism to the clock. *Science* **348**, 1488–1492 (2015).
507. Hunter, A. L. *et al.* Nuclear receptor REVERB $\alpha$  is a state-dependent regulator of liver energy metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 25869–25879 (2020).
508. Shostak, A., Husse, J. & Oster, H. Circadian regulation of adipose function. *Adipocyte* **2**, 201–206 (2013).

509. Delezie, J. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 3321–3335 (2012).
510. Paschos, G. K. *et al.* Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nat. Med.* **18**, 1768–1777 (2012).
511. Yang, L. *et al.* Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **291**, G902-911 (2006).
512. Carrasco-Benso, M. P. *et al.* Human adipose tissue expresses intrinsic circadian rhythm in insulin sensitivity. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **30**, 3117–3123 (2016).
513. Adlanmerini, M. *et al.* Circadian lipid synthesis in brown fat maintains murine body temperature during chronic cold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 18691–18699 (2019).
514. van den Berg, R. *et al.* A Diurnal Rhythm in Brown Adipose Tissue Causes Rapid Clearance and Combustion of Plasma Lipids at Wakening. *Cell Rep.* **22**, 3521–3533 (2018).
515. van der Veen, D. R., Shao, J., Chapman, S., Leevy, W. M. & Duffield, G. E. A diurnal rhythm in glucose uptake in brown adipose tissue revealed by in vivo PET-FDG imaging. *Obes. Silver Spring Md* **20**, 1527–1529 (2012).
516. Hussain, M. M. & Pan, X. Circadian regulators of intestinal lipid absorption. *J. Lipid Res.* **56**, 761–770 (2015).
517. Douris, N. *et al.* Nocturnin regulates circadian trafficking of dietary lipid in intestinal enterocytes. *Curr. Biol. CB* **21**, 1347–1355 (2011).
518. Martchenko, A. *et al.* Suppression of circadian secretion of glucagon-like peptide-1 by the saturated fatty acid, palmitate. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **222**, e13007 (2018).
519. Sene-Fiorese, M. *et al.* The potential of phototherapy to reduce body fat, insulin resistance and ‘metabolic inflexibility’ related to obesity in women undergoing weight loss treatment. *Lasers Surg. Med.* **47**, 634–642 (2015).

520. Henriksson, E. *et al.* The Liver Circadian Clock Modulates Biochemical and Physiological Responses to Metformin. *J. Biol. Rhythms* **32**, 345–358 (2017).
521. Humphries, P. S. *et al.* Carbazole-containing amides and ureas: Discovery of cryptochrome modulators as antihyperglycemic agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **28**, 293–297 (2018).
522. Chaix, A., Manoogian, E. N. C., Melkani, G. C. & Panda, S. Time-Restricted Eating to Prevent and Manage Chronic Metabolic Diseases. *Annu. Rev. Nutr.* **39**, 291–315 (2019).
523. Chow, L. S. *et al.* Time-Restricted Eating Effects on Body Composition and Metabolic Measures in Humans who are Overweight: A Feasibility Study. *Obes. Silver Spring Md* **28**, 860–869 (2020).
524. Reeds, P. J., Palmer, R. M., Hay, S. M. & McMillan, D. N. Protein synthesis in skeletal muscle measured at different times during a 24 hour period. *Biosci. Rep.* **6**, 209–213 (1986).
525. Zylka, M. J., Shearman, L. P., Weaver, D. R. & Reppert, S. M. Three period homologs in mammals: differential light responses in the suprachiasmatic circadian clock and oscillating transcripts outside of brain. *Neuron* **20**, 1103–1110 (1998).
526. Harfmann, B. D., Schroder, E. A. & Esser, K. A. Circadian Rhythms, the Molecular Clock, and Skeletal Muscle. *J. Biol. Rhythms* **30**, 84–94 (2015).
527. Perrin, L. *et al.* Human skeletal myotubes display a cell-autonomous circadian clock implicated in basal myokine secretion. *Mol. Metab.* **4**, 834–845 (2015).
528. Andrews, J. L. *et al.* CLOCK and BMAL1 regulate MyoD and are necessary for maintenance of skeletal muscle phenotype and function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 19090–19095 (2010).
529. Miller, B. H. *et al.* Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3342–3347 (2007).
530. Perrin, L. *et al.* Transcriptomic analyses reveal rhythmic and CLOCK-driven pathways in human skeletal muscle. *eLife* **7**, (2018).

531. Bae, K. *et al.* Differential effects of two period genes on the physiology and proteomic profiles of mouse anterior tibialis muscles. *Mol. Cells* **22**, 275–284 (2006).
532. Kondratov, R. V., Kondratova, A. A., Gorbacheva, V. Y., Vykhovanets, O. V. & Antoch, M. P. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev.* **20**, 1868–1873 (2006).
533. Mayeux-Louchart, A. *et al.* Rev-erb- $\alpha$  regulates atrophy-related genes to control skeletal muscle mass. *Sci. Rep.* **7**, 14383 (2017).
534. Pircher, P., Chomez, P., Yu, F., Vennström, B. & Larsson, L. Aberrant expression of myosin isoforms in skeletal muscles from mice lacking the *rev-erbA $\alpha$*  orphan receptor gene. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**, R482–R490 (2005).
535. Shavlakadze, T. *et al.* Impact of fasting on the rhythmic expression of myogenic and metabolic factors in skeletal muscle of adult mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **305**, C26–35 (2013).
536. Hodge, B. A. *et al.* MYOD1 functions as a clock amplifier as well as a critical co-factor for downstream circadian gene expression in muscle. *eLife* **8**, (2019).
537. Chatterjee, S. *et al.* Brain and muscle Arnt-like 1 is a key regulator of myogenesis. *J. Cell Sci.* **126**, 2213–2224 (2013).
538. Chatterjee, S., Yin, H., Nam, D., Li, Y. & Ma, K. Brain and muscle Arnt-like 1 promotes skeletal muscle regeneration through satellite cell expansion. *Exp. Cell Res.* **331**, 200–210 (2015).
539. Martin, A.-M. *et al.* Circadian regulation of locomotor activity and skeletal muscle gene expression in the horse. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **109**, 1328–1336 (2010).
540. Amaral, I. P. G. & Johnston, I. A. Circadian expression of clock and putative clock-controlled genes in skeletal muscle of the zebrafish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **302**, R193–206 (2012).
541. Zitting, K.-M. *et al.* Human Resting Energy Expenditure Varies with Circadian Phase. *Curr. Biol. CB* **28**, 3685–3690.e3 (2018).

542. Hodge, B. A. *et al.* The endogenous molecular clock orchestrates the temporal separation of substrate metabolism in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* **5**, 17 (2015).
543. Guo, H., Guo, H., Brewer, J. M., Lehman, M. N. & Bittman, E. L. Suprachiasmatic regulation of circadian rhythms of gene expression in hamster peripheral organs: effects of transplanting the pacemaker. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 6406–6412 (2006).
544. Yamanaka, Y., Honma, S. & Honma, K. Scheduled exposures to a novel environment with a running-wheel differentially accelerate re-entrainment of mice peripheral clocks to new light-dark cycles. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **13**, 497–507 (2008).
545. Reznick, J. *et al.* Altered feeding differentially regulates circadian rhythms and energy metabolism in liver and muscle of rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1832**, 228–238 (2013).
546. Saad, A. *et al.* Diurnal pattern to insulin secretion and insulin action in healthy individuals. *Diabetes* **61**, 2691–2700 (2012).
547. Stenvers, D. J., Scheer, F. A. J. L., Schrauwen, P., la Fleur, S. E. & Kalsbeek, A. Circadian clocks and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **15**, 75–89 (2019).
548. Wefers, J. *et al.* Circadian misalignment induces fatty acid metabolism gene profiles and compromises insulin sensitivity in human skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 7789–7794 (2018).
549. Cedernaes, J. *et al.* Acute sleep loss results in tissue-specific alterations in genome-wide DNA methylation state and metabolic fuel utilization in humans. *Sci. Adv.* **4**, eaar8590 (2018).
550. Mayeuf-Louchart, A., Staels, B. & Duez, H. Skeletal muscle functions around the clock. *Diabetes Obes. Metab.* **17 Suppl 1**, 39–46 (2015).
551. Ezagouri, S. *et al.* Physiological and Molecular Dissection of Daily Variance in Exercise Capacity. *Cell Metab.* **30**, 78-91.e4 (2019).
552. Murphy, B. A. *et al.* Exercise influences circadian gene expression in equine skeletal muscle. *Vet. J. Lond. Engl. 1997* **201**, 39–45 (2014).
553. Zambon, A. C. *et al.* Time- and exercise-dependent gene regulation in human skeletal muscle. *Genome Biol.* **4**, R61 (2003).

554. Schroeder, A. M. *et al.* Voluntary scheduled exercise alters diurnal rhythms of behaviour, physiology and gene expression in wild-type and vasoactive intestinal peptide-deficient mice: Effects of scheduled exercise on the circadian system. *J. Physiol.* **590**, 6213–6226 (2012).
555. Reeb, S. G. & Mrosovsky, N. Effects of Induced Wheel Running on the Circadian Activity Rhythms of Syrian Hamsters: Entrainment and Phase Response Curve. *J. Biol. Rhythms* **4**, 39–48 (1989).
556. Wolff, G. & Esser, K. A. Scheduled exercise phase shifts the circadian clock in skeletal muscle. *Med. Sci. Sports Exerc.* **44**, 1663–1670 (2012).
557. Marchant, E. G. & Mistlberger, R. E. Entrainment and phase shifting of circadian rhythms in mice by forced treadmill running. *Physiol. Behav.* **60**, 657–663 (1996).
558. Balsalobre, A. *et al.* Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* **289**, 2344–2347 (2000).
559. Yasumoto, Y., Nakao, R. & Oishi, K. Correction: Free access to a running-wheel advances the phase of behavioral and physiological circadian rhythms and peripheral molecular clocks in mice. *PloS One* **10**, e0125646 (2015).
560. Droste, S. K. *et al.* Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology* **144**, 3012–3023 (2003).
561. Savikj, M. *et al.* Afternoon exercise is more efficacious than morning exercise at improving blood glucose levels in individuals with type 2 diabetes: a randomised crossover trial. *Diabetologia* **62**, 233–237 (2019).
562. Nakao, R., Yamamoto, S., Yasumoto, Y. & Oishi, K. Dosing schedule-dependent attenuation of dexamethasone-induced muscle atrophy in mice. *Chronobiol. Int.* **31**, 506–514 (2014).
563. Ehlen, J. C. *et al.* Bmal1 function in skeletal muscle regulates sleep. *eLife* **6**, (2017).
564. Halberg, F., Johnson, E. A., Brown, B. W. & Bittner, J. J. Susceptibility Rhythm to *E. coli* Endotoxin and Bioassay. *Exp. Biol. Med.* **103**, 142–144 (1960).

565. Stone, E. F. *et al.* The circadian clock protein timeless regulates phagocytosis of bacteria in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* **8**, e1002445 (2012).
566. Wang, W. *et al.* Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* **470**, 110–114 (2011).
567. Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L. & Loudon, A. Clocking in to immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 423–437 (2018).
568. Teng, F. *et al.* A circadian clock is essential for homeostasis of group 3 innate lymphoid cells in the gut. *Sci. Immunol.* **4**, eaax1215 (2019).
569. Scheiermann, C., Kunisaki, Y. & Frenette, P. S. Circadian control of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 190–198 (2013).
570. Adrover, J. M. *et al.* A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity* **50**, 390-402.e10 (2019).
571. Palomino-Segura, M. & Hidalgo, A. Circadian immune circuits. *J. Exp. Med.* **218**, e20200798 (2021).
572. Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M. & Frenette, P. S. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* **452**, 442–447 (2008).
573. Ludin, A. *et al.* Reactive Oxygen Species Regulate Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal, Migration and Development, As Well As Their Bone Marrow Microenvironment. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1605–1619 (2014).
574. Golan, K. *et al.* Daily Onset of Light and Darkness Differentially Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Maintenance. *Cell Stem Cell* **23**, 572-585.e7 (2018).
575. Massberg, S. *et al.* Immunosurveillance by Hematopoietic Progenitor Cells Trafficking through Blood, Lymph, and Peripheral Tissues. *Cell* **131**, 994–1008 (2007).
576. Janowska-Wieczorek, A., Marquez-Curtis, L. A., Shirvaikar, N. & Ratajczak, M. Z. The role of complement in the trafficking of hematopoietic stem/progenitor cells: COMPLEMENT IN HSPC TRAFFICKING. *Transfusion (Paris)* **52**, 2706–2716 (2012).
577. Yuan, Y., Wu, S., Li, W. & He, W. A Tissue-Specific Rhythmic Recruitment Pattern of Leukocyte Subsets. *Front. Immunol.* **11**, 102 (2020).



578. Scheiermann, C. *et al.* Adrenergic Nerves Govern Circadian Leukocyte Recruitment to Tissues. *Immunity* **37**, 290–301 (2012).
579. He, W. *et al.* Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity* **49**, 1175–1190.e7 (2018).
580. Pick, R., He, W., Chen, C.-S. & Scheiermann, C. Time-of-Day-Dependent Trafficking and Function of Leukocyte Subsets. *Trends Immunol.* **40**, 524–537 (2019).
581. Gao, Y. *et al.* Clock upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression and promotes mononuclear cells adhesion to endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 586–591 (2014).
582. Casanova-Acebes, M. *et al.* Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell* **153**, 1025–1035 (2013).
583. Ella, K., Csépanyi-Kömi, R. & Káldi, K. Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain. Behav. Immun.* **57**, 209–221 (2016).
584. Gibbs, J. *et al.* An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat. Med.* **20**, 919–926 (2014).
585. Acland, J. D. & Gould, A. H. Normal variation in the count of circulating eosinophils in man. *J. Physiol.* **133**, 456–466 (1956).
586. Panzer, S. E., Dodge, A. M., Kelly, E. A. B. & Jarjour, N. N. Circadian variation of sputum inflammatory cells in mild asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 308–312 (2003).
587. Mishra, A., Hogan, S. P., Lee, J. J., Foster, P. S. & Rothenberg, M. E. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. *J. Clin. Invest.* **103**, 1719–1727 (1999).
588. Nussbaum, J. C. *et al.* Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. *Nature* **502**, 245–248 (2013).
589. Chong, S. Z. *et al.* CXCR4 identifies transitional bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses. *J. Exp. Med.* **213**, 2293–2314 (2016).

590. Winter, C. *et al.* Chrono-pharmacological Targeting of the CCL2-CCR2 Axis Ameliorates Atherosclerosis. *Cell Metab.* **28**, 175-182.e5 (2018).
591. Nguyen, K. D. *et al.* Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* **341**, 1483–1488 (2013).
592. Abo, T., Kawate, T., Itoh, K. & Kumagai, K. Studies on the bioperiodicity of the immune response. I. Circadian rhythms of human T, B, and K cell traffic in the peripheral blood. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **126**, 1360–1363 (1981).
593. Born, J., Lange, T., Hansen, K., Mölle, M. & Fehm, H. L. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **158**, 4454–4464 (1997).
594. Dimitrov, S. *et al.* Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood* **113**, 5134–5143 (2009).
595. Besedovsky, L., Born, J. & Lange, T. Endogenous glucocorticoid receptor signaling drives rhythmic changes in human T-cell subset numbers and the expression of the chemokine receptor CXCR4. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **28**, 67–75 (2014).
596. Druzd, D. *et al.* Lymphocyte Circadian Clocks Control Lymph Node Trafficking and Adaptive Immune Responses. *Immunity* **46**, 120–132 (2017).
597. Shimba, A. *et al.* Glucocorticoids Drive Diurnal Oscillations in T Cell Distribution and Responses by Inducing Interleukin-7 Receptor and CXCR4. *Immunity* **48**, 286-298.e6 (2018).
598. Silver, A. C. *et al.* Daily oscillations in expression and responsiveness of Toll-like receptors in splenic immune cells. *Heliyon* **4**, e00579 (2018).
599. Keller, M. *et al.* A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 21407–21412 (2009).
600. Silver, A. C., Arjona, A., Walker, W. E. & Fikrig, E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity* **36**, 251–261 (2012).

601. Hriscu, M. L. Modulatory factors of circadian phagocytic activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1057**, 403–430 (2005).
602. Logan, R. W., Arjona, A. & Sarkar, D. K. Role of sympathetic nervous system in the entrainment of circadian natural-killer cell function. *Brain. Behav. Immun.* **25**, 101–109 (2011).
603. Kitchen, G. B. *et al.* The clock gene Bmal1 inhibits macrophage motility, phagocytosis, and impairs defense against pneumonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2020) doi:10.1073/pnas.1915932117.
604. Oliva-Ramírez, J., Moreno-Altamirano, M. M. B., Pineda-Olvera, B., Cauich-Sánchez, P. & Sánchez-García, F. J. Crosstalk between circadian rhythmicity, mitochondrial dynamics and macrophage bactericidal activity. *Immunology* **143**, 490–497 (2014).
605. Pires-Lapa, M. A., Tamura, E. K., Salustiano, E. M. A. & Markus, R. P. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. *J. Pineal Res.* **55**, 240–246 (2013).
606. Baumann, A. *et al.* The circadian clock is functional in eosinophils and mast cells. *Immunology* **140**, 465–474 (2013).
607. Baumann, A., Feilhauer, K., Bischoff, S. C., Froy, O. & Lorentz, A. IgE-dependent activation of human mast cells and fMLP-mediated activation of human eosinophils is controlled by the circadian clock. *Mol. Immunol.* **64**, 76–81 (2015).
608. Early, J. O. *et al.* Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 $\beta$  in macrophages via NRF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E8460–E8468 (2018).
609. Narasimamurthy, R. *et al.* Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12662–12667 (2012).
610. Logan, R. W., Wynne, O., Levitt, D., Price, D. & Sarkar, D. K. Altered circadian expression of cytokines and cytolytic factors in splenic natural killer cells of Per1(-/-) mutant mice. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **33**, 108–114 (2013).

611. Cardoso, V. *et al.* Neuronal regulation of type 2 innate lymphoid cells via neuromedin U. *Nature* **549**, 277–281 (2017).
612. Talbot, J. *et al.* Feeding-dependent VIP neuron–ILC3 circuit regulates the intestinal barrier. *Nature* **579**, 575–580 (2020).
613. Hopwood, T. W. *et al.* The circadian regulator BMAL1 programmes responses to parasitic worm infection via a dendritic cell clock. *Sci. Rep.* **8**, 3782 (2018).
614. Suzuki, K., Hayano, Y., Nakai, A., Furuta, F. & Noda, M. Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. *J. Exp. Med.* **213**, 2567–2574 (2016).
615. Brooks, J. F. *et al.* The microbiota coordinates diurnal rhythms in innate immunity with the circadian clock. *Cell* **184**, 4154–4167.e12 (2021).
616. Budkowska, M. *et al.* A Circadian Rhythm in both Complement Cascade (ComC) Activation and Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Levels in Human Peripheral Blood Supports a Role for the ComC–S1P Axis in Circadian Changes in the Number of Stem Cells Circulating in Peripheral Blood. *Stem Cell Rev. Rep.* **14**, 677–685 (2018).
617. Cao, Q. *et al.* Circadian clock cryptochrome proteins regulate autoimmunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 12548–12553 (2017).
618. Cavadini, G. *et al.* TNF- $\alpha$  suppresses the expression of clock genes by interfering with E-box-mediated transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 12843–12848 (2007).
619. Curtis, A. M. *et al.* Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 7231–7236 (2015).
620. Bellet, M. M. *et al.* Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 9897–9902 (2013).
621. Koyanagi, S. & Ohdo, S. Alteration of intrinsic biological rhythms during interferon treatment and its possible mechanism. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1393–1399 (2002).

622. Hergenhan, S., Holtkamp, S. & Scheiermann, C. Molecular Interactions Between Components of the Circadian Clock and the Immune System. *J. Mol. Biol.* S0022283620300280 (2020) doi:10.1016/j.jmb.2019.12.044.
623. Schloss, M. J. *et al.* The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO Mol. Med.* **8**, 937–948 (2016).
624. Castro, M. *et al.* Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials. *Lancet Respir. Med.* **3**, 355–366 (2015).
625. Zhuang, X. *et al.* The circadian clock components BMAL1 and REV-ERB $\alpha$  regulate flavivirus replication. *Nat. Commun.* **10**, 377 (2019).
626. Borrmann, H. *et al.* Pharmacological activation of the circadian component REV-ERB inhibits HIV-1 replication. *Sci. Rep.* **10**, 13271 (2020).
627. Ray, S. & Reddy, A. B. COVID-19 management in light of the circadian clock. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 494–495 (2020).
628. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **136**, 2348–2357 (1986).
629. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123–1132 (2005).
630. Cella, M. *et al.* A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* **457**, 722–725 (2009).
631. Moro, K. *et al.* Innate production of TH2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> lymphoid cells. *Nature* **463**, 540–544 (2010).
632. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 145–149 (2013).
633. Kondo, M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol. Rev.* **238**, 37–46 (2010).

634. Harly, C., Cam, M., Kaye, J. & Bhandoola, A. Development and differentiation of early innate lymphoid progenitors. *J. Exp. Med.* **215**, 249–262 (2018).
635. Geiger, T. L. & Sun, J. C. Development and maturation of natural killer cells. *Curr. Opin. Immunol.* **39**, 82–89 (2016).
636. Constantinides, M. G., McDonald, B. D., Verhoef, P. A. & Bendelac, A. A committed precursor to innate lymphoid cells. *Nature* **508**, 397–401 (2014).
637. Ghaedi, M. & Takei, F. Innate lymphoid cell development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **147**, 1549–1560 (2021).
638. Halim, T. Y. F. *et al.* Retinoic-Acid-Receptor-Related Orphan Nuclear Receptor Alpha Is Required for Natural Helper Cell Development and Allergic Inflammation. *Immunity* **37**, 463–474 (2012).
639. Hoyler, T. *et al.* The transcription factor GATA-3 controls cell fate and maintenance of type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* **37**, 634–648 (2012).
640. Koga, S. *et al.* Peripheral PDGFR $\alpha$ +gp38+ mesenchymal cells support the differentiation of fetal liver-derived ILC2. *J. Exp. Med.* **215**, 1609–1626 (2018).
641. Ebihara, T. *et al.* Runx3 specifies lineage commitment of innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **16**, 1124–1133 (2015).
642. Schneider, C. *et al.* Tissue-Resident Group 2 Innate Lymphoid Cells Differentiate by Layered Ontogeny and In Situ Perinatal Priming. *Immunity* **50**, 1425–1438.e5 (2019).
643. Daussy, C. *et al.* T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J. Exp. Med.* **211**, 563–577 (2014).
644. Diefenbach, A. & Raulet, D. H. Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol. Rev.* **181**, 170–184 (2001).
645. Klose, C. S. N. & Artis, D. Innate lymphoid cells control signaling circuits to regulate tissue-specific immunity. *Cell Res.* **30**, 475–491 (2020).
646. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. & Diefenbach, A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* **26**, 503–517 (2007).

647. Klose, C. S. N. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* **157**, 340–356 (2014).
648. Mérino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Solary, E. & Micheau, O. TRAIL in cancer therapy: present and future challenges. *Expert Opin. Ther. Targets* **11**, 1299–1314 (2007).
649. Nabekura, T., Riggan, L., Hildreth, A. D., O'Sullivan, T. E. & Shibuya, A. Type 1 Innate Lymphoid Cells Protect Mice from Acute Liver Injury via Interferon- $\gamma$  Secretion for Upregulating Bcl-xL Expression in Hepatocytes. *Immunity* **52**, 96-108.e9 (2020).
650. Weizman, O.-E. *et al.* ILC1 Confer Early Host Protection at Initial Sites of Viral Infection. *Cell* **171**, 795-808.e12 (2017).
651. O'Sullivan, T. E. *et al.* Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. *Immunity* **45**, 428–441 (2016).
652. Paust, S. *et al.* Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat. Immunol.* **11**, 1127–1135 (2010).
653. Wang, X. *et al.* Memory formation and long-term maintenance of IL-7R $\alpha$ + ILC1s via a lymph node-liver axis. *Nat. Commun.* **9**, 4854 (2018).
654. Neill, D. R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**, 1367–1370 (2010).
655. Price, A. E. *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 11489–11494 (2010).
656. Mathä, L., Martinez-Gonzalez, I., Steer, C. A. & Takei, F. The Fate of Activated Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Front. Immunol.* **12**, 671966 (2021).
657. Dahlgren, M. W. *et al.* Adventitial Stromal Cells Define Group 2 Innate Lymphoid Cell Tissue Niches. *Immunity* **50**, 707-722.e6 (2019).
658. Flamar, A.-L. *et al.* Interleukin-33 Induces the Enzyme Tryptophan Hydroxylase 1 to Promote Inflammatory Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Immunity. *Immunity* **52**, 606-619.e6 (2020).
659. Mahlaköiv, T. *et al.* Stromal cells maintain immune cell homeostasis in adipose tissue via production of interleukin-33. *Sci. Immunol.* **4**, eaax0416 (2019).

660. Li, Z., Jackson, R. J. & Ranasinghe, C. A hierarchical role of IL-25 in ILC development and function at the lung mucosae following viral-vector vaccination. *Vaccine X* **2**, 100035 (2019).
661. Halim, T. Y. F., Krauss, R. H., Sun, A. C. & Takei, F. Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* **36**, 451–463 (2012).
662. Salimi, M. *et al.* A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* **210**, 2939–2950 (2013).
663. Furusawa, J. *et al.* Critical role of p38 and GATA3 in natural helper cell function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **191**, 1818–1826 (2013).
664. Guo, L. *et al.* IL-1 family members and STAT activators induce cytokine production by Th2, Th17, and Th1 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 13463–13468 (2009).
665. Rochman, Y. *et al.* Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 19455–19460 (2010).
666. Wallrapp, A. *et al.* The neuropeptide NMU amplifies ILC2-driven allergic lung inflammation. *Nature* **549**, 351–356 (2017).
667. Konya, V. & Mjösberg, J. Lipid mediators as regulators of human ILC2 function in allergic diseases. *Immunol. Lett.* **179**, 36–42 (2016).
668. Li, B. W. S. *et al.* T cells are necessary for ILC2 activation in house dust mite-induced allergic airway inflammation in mice. *Eur. J. Immunol.* **46**, 1392–1403 (2016).
669. Laffont, S. *et al.* Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* **214**, 1581–1592 (2017).
670. Cephus, J.-Y. *et al.* Testosterone Attenuates Group 2 Innate Lymphoid Cell-Mediated Airway Inflammation. *Cell Rep.* **21**, 2487–2499 (2017).
671. Molofsky, A. B. *et al.* Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *J. Exp. Med.* **210**, 535–549 (2013).



672. Odegaard, J. I. *et al.* Perinatal Licensing of Thermogenesis by IL-33 and ST2. *Cell* **166**, 841–854 (2016).
673. Lee, M.-W. *et al.* Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell* **160**, 74–87 (2015).
674. Pelly, V. S. *et al.* IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Mucosal Immunol.* **9**, 1407–1417 (2016).
675. Molofsky, A. B. *et al.* Interleukin-33 and Interferon- $\gamma$  Counter-Regulate Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation during Immune Perturbation. *Immunity* **43**, 161–174 (2015).
676. Halim, T. Y. F. *et al.* Tissue-Restricted Adaptive Type 2 Immunity Is Orchestrated by Expression of the Costimulatory Molecule OX40L on Group 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **48**, 1195-1207.e6 (2018).
677. Kuperman, D. A. *et al.* Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. *Nat. Med.* **8**, 885–889 (2002).
678. Halim, T. Y. F. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity* **40**, 425–435 (2014).
679. Townsend, J. M. *et al.* IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity* **13**, 573–583 (2000).
680. Dalmas, E. *et al.* Interleukin-33-Activated Islet-Resident Innate Lymphoid Cells Promote Insulin Secretion through Myeloid Cell Retinoic Acid Production. *Immunity* **47**, 928-942.e7 (2017).
681. Gause, W. C., Wynn, T. A. & Allen, J. E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 607–614 (2013).
682. Enomoto, Y. *et al.* Tissue remodeling induced by hypersecreted epidermal growth factor and amphiregulin in the airway after an acute asthma attack. *J. Allergy Clin. Immunol.* **124**, 913-920.e1–7 (2009).

683. Monticelli, L. A. *et al.* Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nat. Immunol.* **12**, 1045–1054 (2011).
684. Fallon, P. G. *et al.* Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J. Exp. Med.* **203**, 1105–1116 (2006).
685. O’Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L. & von Andrian, U. H. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat. Immunol.* **7**, 507–516 (2006).
686. Martinez-Gonzalez, I. *et al.* Allergen-Experienced Group 2 Innate Lymphoid Cells Acquire Memory-like Properties and Enhance Allergic Lung Inflammation. *Immunity* **45**, 198–208 (2016).
687. Seehus, C. R. *et al.* Alternative activation generates IL-10 producing type 2 innate lymphoid cells. *Nat. Commun.* **8**, 1900 (2017).
688. Kim, H. S. *et al.* A novel IL-10-producing innate lymphoid cells (ILC10) in a contact hypersensitivity mouse model. *BMB Rep.* **49**, 293–296 (2016).
689. Morita, H. *et al.* Induction of human regulatory innate lymphoid cells from group 2 innate lymphoid cells by retinoic acid. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 2190-2201.e9 (2019).
690. Dutton, E. E. *et al.* Characterisation of innate lymphoid cell populations at different sites in mice with defective T cell immunity. *Wellcome Open Res.* **2**, 117 (2017).
691. Klose, C. S. N. & Artis, D. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* **17**, 765–774 (2016).
692. Longman, R. S. *et al.* CX<sub>3</sub>CR1<sup>+</sup> mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *J. Exp. Med.* **211**, 1571–1583 (2014).
693. Reynders, A. *et al.* Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+RORγt<sup>+</sup> and NKp46+RORγt<sup>-</sup> lymphoid cells. *EMBO J.* **30**, 2934–2947 (2011).
694. Kim, M. H., Taparowsky, E. J. & Kim, C. H. Retinoic Acid Differentially Regulates the Migration of Innate Lymphoid Cell Subsets to the Gut. *Immunity* **43**, 107–119 (2015).

695. Chun, E. *et al.* Metabolite-Sensing Receptor Ffar2 Regulates Colonic Group 3 Innate Lymphoid Cells and Gut Immunity. *Immunity* **51**, 871-884.e6 (2019).
696. Duffin, R. *et al.* Prostaglandin E<sub>2</sub> constrains systemic inflammation through an innate lymphoid cell-IL-22 axis. *Science* **351**, 1333–1338 (2016).
697. Kruglov, A. A. *et al.* Nonredundant function of soluble LTα3 produced by innate lymphoid cells in intestinal homeostasis. *Science* **342**, 1243–1246 (2013).
698. Ibiza, S. *et al.* Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature* **535**, 440–443 (2016).
699. Klose, C. S. N. *et al.* A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORγt<sup>+</sup> innate lymphoid cells. *Nature* **494**, 261–265 (2013).
700. Wolk, K. *et al.* IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* **21**, 241–254 (2004).
701. Sonnenberg, G. F., Fouser, L. A. & Artis, D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat. Immunol.* **12**, 383–390 (2011).
702. Aparicio-Domingo, P. *et al.* Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J. Exp. Med.* **212**, 1783–1791 (2015).
703. Mortha, A. *et al.* Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science* **343**, 1249288 (2014).
704. Magri, G. *et al.* Innate lymphoid cells integrate stromal and immunological signals to enhance antibody production by splenic marginal zone B cells. *Nat. Immunol.* **15**, 354–364 (2014).
705. Muir, R. *et al.* Innate Lymphoid Cells Are the Predominant Source of IL-17A during the Early Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 407–416 (2016).
706. Lee, J. S. *et al.* Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* **43**, 727–738 (2015).

707. Wang, Q. *et al.* Circadian rhythm–dependent and circadian rhythm–independent impacts of the molecular clock on type 3 innate lymphoid cells. *Sci. Immunol.* **4**, eaay7501 (2019).
708. Seillet, C. *et al.* The neuropeptide VIP confers anticipatory mucosal immunity by regulating ILC3 activity. *Nat. Immunol.* **21**, 168–177 (2020).
709. Mebius, R. E. Organogenesis of lymphoid tissues. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 292–303 (2003).
710. Eberl, G. *et al.* An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation of fetal lymphoid tissue inducer cells. *Nat. Immunol.* **5**, 64–73 (2004).
711. Hepworth, M. R. *et al.* Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* **348**, 1031–1035 (2015).
712. Kim, M.-Y. *et al.* OX40 ligand and CD30 ligand are expressed on adult but not neonatal CD4<sup>+</sup>CD3<sup>−</sup> inducer cells: evidence that IL-7 signals regulate CD30 ligand but not OX40 ligand expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 6686–6691 (2005).
713. Tsuji, M. *et al.* Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut. *Immunity* **29**, 261–271 (2008).
714. Mortha, A. & Diefenbach, A. Natural killer cell receptor-expressing innate lymphocytes: more than just NK cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 3541–3555 (2011).
715. Gury-BenAri, M. *et al.* The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome. *Cell* **166**, 1231–1246.e13 (2016).
716. Vonarbourg, C. *et al.* Regulated expression of nuclear receptor RORγt confers distinct functional fates to NK cell receptor-expressing RORγt(+) innate lymphocytes. *Immunity* **33**, 736–751 (2010).
717. Bal, S. M., Golebski, K. & Spits, H. Plasticity of innate lymphoid cell subsets. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 552–565 (2020).

718. Rankin, L. C. *et al.* The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46+ innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat. Immunol.* **14**, 389–395 (2013).
719. Bernink, J. H. *et al.* Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* **43**, 146–160 (2015).
720. Cortez, V. S. *et al.* SMAD4 impedes the conversion of NK cells into ILC1-like cells by curtailing non-canonical TGF- $\beta$  signaling. *Nat. Immunol.* **18**, 995–1003 (2017).
721. Cuff, A. O. *et al.* The Obese Liver Environment Mediates Conversion of NK Cells to a Less Cytotoxic ILC1-Like Phenotype. *Front. Immunol.* **10**, 2180 (2019).
722. Park, E. *et al.* Toxoplasma gondii infection drives conversion of NK cells into ILC1-like cells. *eLife* **8**, e47605 (2019).
723. Raykova, A. *et al.* Interleukins 12 and 15 induce cytotoxicity and early NK-cell differentiation in type 3 innate lymphoid cells. *Blood Adv.* **1**, 2679–2691 (2017).
724. Silver, J. S. *et al.* Inflammatory triggers associated with exacerbations of COPD orchestrate plasticity of group 2 innate lymphoid cells in the lungs. *Nat. Immunol.* **17**, 626–635 (2016).
725. Shih, H.-Y. *et al.* Developmental Acquisition of Regulomes Underlies Innate Lymphoid Cell Functionality. *Cell* **165**, 1120–1133 (2016).
726. Ohne, Y. *et al.* IL-1 is a critical regulator of group 2 innate lymphoid cell function and plasticity. *Nat. Immunol.* **17**, 646–655 (2016).
727. Lim, A. I. *et al.* IL-12 drives functional plasticity of human group 2 innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* **213**, 569–583 (2016).
728. Mjösberg, J. *et al.* The transcription factor GATA3 is essential for the function of human type 2 innate lymphoid cells. *Immunity* **37**, 649–659 (2012).
729. Bal, S. M. *et al.* IL-1 $\beta$ , IL-4 and IL-12 control the fate of group 2 innate lymphoid cells in human airway inflammation in the lungs. *Nat. Immunol.* **17**, 636–645 (2016).
730. Zhang, K. *et al.* Cutting Edge: Notch Signaling Promotes the Plasticity of Group-2 Innate Lymphoid Cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **198**, 1798–1803 (2017).

731. Koyasu, S. Inflammatory ILC2 cells: disguising themselves as progenitors? *Nat. Immunol.* **16**, 133–134 (2015).
732. Huang, Y. *et al.* IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* **16**, 161–169 (2015).
733. Huang, Y. & Paul, W. E. Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. *Int. Immunol.* **28**, 23–28 (2016).
734. Golebski, K. *et al.* IL-1 $\beta$ , IL-23, and TGF- $\beta$  drive plasticity of human ILC2s towards IL-17-producing ILCs in nasal inflammation. *Nat. Commun.* **10**, 2162 (2019).
735. Bernink, J. H. *et al.* c-Kit-positive ILC2s exhibit an ILC3-like signature that may contribute to IL-17-mediated pathologies. *Nat. Immunol.* **20**, 992–1003 (2019).
736. Huang, Y. *et al.* S1P-dependent interorgan trafficking of group 2 innate lymphoid cells supports host defense. *Science* **359**, 114–119 (2018).
737. Hoyle, N. P. *et al.* Circadian actin dynamics drive rhythmic fibroblast mobilization during wound healing. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
738. Welch, R. D., Billon, C., Valfort, A.-C., Burris, T. P. & Flaveny, C. A. Pharmacological inhibition of REV-ERB stimulates differentiation, inhibits turnover and reduces fibrosis in dystrophic muscle. *Sci. Rep.* **7**, 17142 (2017).
739. Katoku-Kikyo, N. *et al.* Per1/Per2–Igf2 axis–mediated circadian regulation of myogenic differentiation. *J. Cell Biol.* **220**, e202101057 (2021).
740. Curtis, A. M., Bellet, M. M., Sassone-Corsi, P. & O'Neill, L. A. J. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* **40**, 178–186 (2014).
741. He, W. *et al.* Circadian Expression of Migratory Factors Establishes Lineage-Specific Signatures that Guide the Homing of Leukocyte Subsets to Tissues. *Immunity* (2018) doi:10.1016/j.immuni.2018.10.007.
742. Cermakian, N., Westfall, S. & Kiessling, S. Circadian Clocks and Inflammation: Reciprocal Regulation and Shared Mediators. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **62**, 303–318 (2014).

743. Chomez, P. *et al.* Increased cell death and delayed development in the cerebellum of mice lacking the rev-erbA(alpha) orphan receptor. *Dev. Camb. Engl.* **127**, 1489–1498 (2000).
744. L'homme, L. *et al.* Deletion of the nuclear receptor ROR $\alpha$  in macrophages does not modify the development of obesity, insulin resistance and NASH. *Sci. Rep.* **10**, 21095 (2020).
745. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
746. Mayeuf-Louchart, A. *et al.* MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool. *Skelet. Muscle* **8**, 25 (2018).
747. Pourcet, B. *et al.* LXR $\alpha$  regulates macrophage arginase 1 through PU.1 and interferon regulatory factor 8. *Circ. Res.* **109**, 492–501 (2011).
748. Woldt, E. *et al.* Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat. Med.* **19**, 1039–1046 (2013).
749. Plikus, M. V. *et al.* The circadian clock in skin: implications for adult stem cells, tissue regeneration, cancer, aging, and immunity. *J. Biol. Rhythms* **30**, 163–182 (2015).
750. Stokes, K. *et al.* The Circadian Clock Gene BMAL1 Coordinates Intestinal Regeneration. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 95–114 (2017).
751. Weger, M., Diotel, N., Dorsemans, A.-C., Dickmeis, T. & Weger, B. D. Stem cells and the circadian clock. *Dev. Biol.* **431**, 111–123 (2017).
752. Nakamura, T. J. *et al.* Age-Related Decline in Circadian Output. *J. Neurosci.* **31**, 10201–10205 (2011).
753. Rak, G. D. *et al.* IL-33-Dependent Group 2 Innate Lymphoid Cells Promote Cutaneous Wound Healing. *J. Invest. Dermatol.* **136**, 487–496 (2016).
754. Sandri, M. *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399–412 (2004).
755. Clarke, B. A. *et al.* The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* **6**, 376–385 (2007).

756. Kamei, Y. *et al.* Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J. Biol. Chem.* **279**, 41114–41123 (2004).
757. Sandri, M. Regulation and involvement of the ubiquitin ligases in muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med.* **75 Suppl 1**, S4 (2014).
758. Mammucari, C. *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* **6**, 458–471 (2007).
759. Brault, J. J., Jespersen, J. G. & Goldberg, A. L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J. Biol. Chem.* **285**, 19460–19471 (2010).
760. Romanello, V. & Sandri, M. Mitochondrial Quality Control and Muscle Mass Maintenance. *Front. Physiol.* **6**, (2016).
761. Stitt, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* **14**, 395–403 (2004).
762. Wang, H., Kubica, N., Ellisen, L. W., Jefferson, L. S. & Kimball, S. R. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J. Biol. Chem.* **281**, 39128–39134 (2006).
763. Okabe, T. *et al.* REV-ERB $\alpha$  influences stability and nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *J. Cell Sci.* jcs.190959 (2016) doi:10.1242/jcs.190959.
764. Torra, I. P. *et al.* Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb $\alpha$  expression in liver. *Endocrinology* **141**, 3799–3806 (2000).
765. Everson, C. A. Clinical assessment of blood leukocytes, serum cytokines, and serum immunoglobulins as responses to sleep deprivation in laboratory rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **289**, R1054-1063 (2005).
766. Besedovsky, L., Lange, T. & Haack, M. The Sleep-Immune Crosstalk in Health and Disease. *Physiol. Rev.* **99**, 1325–1380 (2019).



767. McAlpine, C. S. *et al.* Sleep modulates haematopoiesis and protects against atherosclerosis. *Nature* **566**, 383–387 (2019).
768. Wang, M. *et al.* Mechanical Stress Affects Circadian Rhythm in Skeletal Muscle (C2C12 Myoblasts) by Reducing Per/Cry Gene Expression and Increasing Bmal1 Gene Expression. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **27**, e928359 (2021).
769. Hogan, K. A. *et al.* Tumor-derived cytokines impair myogenesis and alter the skeletal muscle immune microenvironment. *Cytokine* **107**, 9–17 (2018).
770. Hodgetts, S., Radley, H., Davies, M. & Grounds, M. D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul. Disord. NMD* **16**, 591–602 (2006).
771. Deyhle, M. R. & Hyldahl, R. D. The Role of T Lymphocytes in Skeletal Muscle Repair From Traumatic and Contraction-Induced Injury. *Front. Physiol.* **9**, 768 (2018).
772. Hyldahl, R. D., Chen, T. C. & Nosaka, K. Mechanisms and Mediators of the Skeletal Muscle Repeated Bout Effect. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **45**, 24–33 (2017).
773. Rodgers, J. T. *et al.* mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* **510**, 393–396 (2014).

## **Annexes**

## **Annexe 1**

### **Rev-erba regulates atrophy related genes to control skeletal muscle mass.**

Mayeuf-Louchart A\*, Thorel Q\*, Delhay S, Beauchamp J, Duhem C, Danckaert A, Woldt E, Staels B, Sebti Y and Duez H.

**Scientific Report** 2017 ; 7: 14383

DOI : 10.1038/s41598-017-14596-2

## **Annexe 2**

### **Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 Regulates Circadian Activity of NLRP3 Inflammasome to Reduce the Severity of Fulminant Hepatitis in Mice.**

Pourcet B\*, Zecchin M\*, Ferri L, Sitaula S, Billon C, Delhay S, Derudas B, Vanhoutte J, Mayeuf-Louchart A, Thorel Q, Eeckhoutte J, Dombrowicz D, Duhem C, Boulinguez A, Sebti Y, Lancel S, Woldt E, Burris T, Staels B and Duez H.

**Gastroenterology** 2018 ; 154:1449–1464

DOI : 10.1053/j.gastro.2017.12.019

## **Annexe 3**

### **MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool.**

Mayeuf-Louchart A\*, Hardy D, Thorel Q, Roux P, Gueniot L, Briand D, Mazeraud A, Bouglé A, Shorte SL, Staels B, Chrétien F, Duez H, Danckaert A.

**Skeletal muscle** 2018 ; 8:25

DOI : 10.1186/s13395-018-0171-0

## **Annexe 4**

### **Endospalin-2 enhances skeletal muscle energy metabolism and running endurance capacity.**

Lancel S\*, Hesselink MK, Woldt E, Rouillé Y, Dorchie E, Delhay S, Duhem C, **Thorel Q**, Mayeuf-Louchart A, Pourcet B, Montel V, Schaart G, Beton N, Picquet F, Briand O, Salles JP, Duez H, Schrauwen P, Bastide B, Bailleul B, Staels B, Sebti Y.

**JCI Insight** 2018 ; 3(9):e98081

DOI : 10.1172/jci.insight.98081.

### **Annexe 5**

**Glycogen dynamics drives lipid droplet biogenesis during brown adipocyte differentiation.**

Mayeuf-Louchart A, Lancel S, Sebti Y, Pourcet B, Loyens A, Delhay S, Duhem C, Beauchamp J, Ferri L, Thorel Q, Boulinguez A, Zecchin M, Dubois-Chevalier J, Eeckhoutte J, Vaughn L, Roach P, Dani C, Pederson B and Duez H (2019).


**Cell Reports** 2019 ; 29, 1410–1418

DOI : 10.1016/j.celrep.2019.09.073

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Rev-erb- $\alpha$ regulates atrophy-related genes to control skeletal muscle mass

Alicia Mayeuf-Louchart<sup>1</sup>, Quentin Thorel<sup>1</sup>, Stéphane Delhaye<sup>1</sup>, Justine Beauchamp<sup>1</sup>, Christian Duhem<sup>1</sup>, Anne Danckaert<sup>2</sup>, Steve Lancel<sup>1</sup>, Benoit Pourcet<sup>1</sup>, Estelle Woldt<sup>1</sup>, Alexis Boulinguez<sup>1</sup>, Lise Ferri<sup>1</sup>, Mathilde Zecchin<sup>1</sup>, Bart Staels<sup>1</sup>, Yasmine Sebti<sup>1</sup> & Hélène Duez<sup>1</sup> 

The nuclear receptor Rev-erb- $\alpha$  modulates hepatic lipid and glucose metabolism, adipogenesis and thermogenesis. We have previously demonstrated that Rev-erb- $\alpha$  is also an important regulator of skeletal muscle mitochondrial biogenesis and function, and autophagy. As such, Rev-erb- $\alpha$  over-expression in skeletal muscle or its pharmacological activation improved mitochondrial respiration and enhanced exercise capacity. Here, in gain- and loss-of function studies, we show that Rev-erb- $\alpha$  also controls muscle mass. Rev-erb- $\alpha$ -deficiency in skeletal muscle leads to increased expression of the atrophy-related genes (atrogenes), associated with reduced muscle mass and decreased fiber size. By contrast, *in vivo* and *in vitro* Rev-erb- $\alpha$  over-expression results in reduced atrogenes expression and increased fiber size. Finally, Rev-erb- $\alpha$  pharmacological activation blocks dexamethasone-induced upregulation of atrogenes and muscle atrophy. This study identifies Rev-erb- $\alpha$  as a promising pharmacological target to preserve muscle mass.

Skeletal muscle is the most abundant tissue in the body, accounting for 30 to 40% of total body mass. Besides its role in locomotion and posture, skeletal muscle controls whole body energy metabolism by ensuring blood glucose control and is also the major source of amino acids (AAs) that can be used by various tissues during prolonged periods of fasting. Skeletal muscle is highly plastic and muscle mass, fiber type and size can undergo major remodeling to meet developmental and environmental challenges<sup>1</sup>. Muscle mass increases during development and in the adult in response to mechanical overload or hormonal stimulation, whereas muscle wasting is a common condition in diverse pathologies including obesity/type 2 diabetes, cancers, myopathies, chronic inflammatory disorders and is also a hallmark of aging, undernutrition or inactivity<sup>2,3</sup>. Chronic glucocorticoid therapies for the treatment of inflammatory or auto-immune disorders are also characterized by a rapid muscle atrophy. Loss of muscle mass results in reduced ability to sustain contraction, weakness of peripheral and respiratory muscles that compromises mobility and negatively affects quality of life. Muscle wasting also results in poor prognosis in diverse diseases, and ultimately has major clinical implications<sup>3</sup>. Therefore, understanding the signaling pathways that control muscle mass is of special interest for the development of novel therapies to preserve muscle mass.

Skeletal muscle mass reflects the delicate balance between protein synthesis and degradation. Protein synthesis is essentially controlled by the insulin-like growth factor 1–phosphoinositide-3-kinase–Akt/protein kinase B–mammalian target of rapamycin (IGF1–PI3K–Akt–mTOR) signaling pathway in response to a variety of stimuli such as IGF1, insulin, AAs derived from protein degradation,  $\beta$ 2-adrenergic receptor agonists or androgens<sup>1</sup>. Activation of PI3K induces Akt phosphorylation which, in turn, inhibits the protein complex TSC1 (Tuberous Sclerosis Complex 1)–TSC2 thus activating the mTOR pathway through the two main downstream effectors of mTORC1: S6K (p70S6 kinase) and 4E-BP1 (eIF-4E-binding protein)<sup>4</sup>. pAkt also negatively regulates protein degradation by phosphorylating the Forkhead box O (FoxO) transcription factors and by promoting their exclusion from the nucleus<sup>1</sup>.

Protein degradation occurs via two proteolytic pathways that are tightly regulated by signaling pathways and transcription factors: the ubiquitin-proteasomal system, which predominantly breakdowns myofibrillar proteins, and the autophagic-lysosomal machinery, which ensures the maintenance of cellular homeostasis and the

<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000, Lille, France. <sup>2</sup>Institut Pasteur, Imagopole - CITech, Paris, France. Alicia Mayeuf-Louchart and Quentin Thorel contributed equally to this work. Yasmine Sebti and Hélène Duez jointly supervised this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.D. (email: [Helene.duez@pasteur-lille.fr](mailto:Helene.duez@pasteur-lille.fr))



physiological turnover of damaged/aged cellular organelles<sup>1,3</sup>. Upon atrophy signals, FoxOs induce the transcription of the two E3 ubiquitin ligases MuRF1 (Muscle-Specific RING Finger Protein 1) and Atrogin-1 (MAFbx) to promote proteasomal protein degradation<sup>5,6</sup>. Mouse models invalidated for *atrogin-1* or *Murf1* are resistant to starvation and glucocorticoid (GC)-induced atrophy, respectively<sup>7–10</sup>. The FoxO family is composed of three isoforms FoxO1, FoxO3a and FoxO4 and *in vivo* upregulation of FoxO1 and FoxO3 is sufficient to promote muscle atrophy<sup>6,11–13</sup>. In addition, FoxO activation also induces autophagy<sup>14,11</sup>, a process tightly regulated at the gene, protein and flux levels and involving several autophagy-related genes (*atg*) as well as proteins such as Parkin and Bnip3 which contribute to mitochondrial remodeling<sup>15</sup>.

Circulating levels of GC are increased in diseases associated with muscle atrophy like sepsis or cachexia, and promote muscle mass loss<sup>16,17</sup>. Similarly, administration of synthetic GCs, such as dexamethasone used for the treatment of chronic inflammatory and immune diseases, results in muscle atrophy<sup>18</sup>. GCs promote both protein proteasomal degradation and autophagy-mediated proteolysis<sup>7–9</sup>. In addition, GCs exert anti-anabolic actions by up-regulating Regulated in Development and DNA damage responses 1 (Redd1, also known as ddit4) and Kruppel Like Factor 15 (KLF15), which directly repress mTOR signalling<sup>9,19,20</sup>. Besides, KLF15 acts on mTOR activity through the up-regulation of Branched Chain Amino Acid Transaminase 2 (BCAT2), a mitochondrial enzyme that degrades branched chain AAs. KLF15 also enhances *Murf1* and *atrogin-1* gene expression<sup>9</sup>.

The nuclear receptor Rev-erb- $\alpha$  acts as a transcriptional repressor by recruiting co-repressors and binding to specific DNA regions of its target genes<sup>21,22</sup> or by recruiting co-repressors to sites to which it is tethered by tissue-specific transcription factors<sup>23</sup>. We and others have shed light on the role of Rev-erb- $\alpha$  in the circadian control of hepatic lipid, bile acid and glucose metabolism<sup>21,22,24–27</sup>, white adipocyte *in vitro* differentiation<sup>28,29</sup>, as well as brown adipocyte thermogenesis<sup>30</sup>. We have recently shown that Rev-erb- $\alpha$  controls skeletal muscle autophagy and mitochondrial biogenesis. Moreover, pharmacological activation of Rev-erb- $\alpha$  *in vivo* increases skeletal muscle mitochondrial respiration and exercise capacity, identifying Rev-erb- $\alpha$  as a target to improve muscle function<sup>31</sup>. Whether Rev-erb- $\alpha$  controls muscle mass has not been investigated yet.

Here, we report that *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice display significantly reduced skeletal muscle mass and decreased fiber cross section area. This is associated with an increased expression of atrophy-related genes in skeletal muscle from *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice, while AAV-mediated skeletal muscle-specific-Rev-erb- $\alpha$  overexpression confers an opposite phenotype. This effect on gene expression and fiber size was recapitulated in *in vitro* models of Rev-erb- $\alpha$  gain- and loss-of-function in myogenic cells. In addition, Rev-erb- $\alpha$  over-expression and/or pharmacological activation partially or totally blunted the induction of atrophy genes by dexamethasone in a mouse myoblast cell line as well as muscle mass loss *in vivo*. Together these data point to a new role for Rev-erb- $\alpha$  in the control of skeletal muscle mass and suggest that pharmacological activation of Rev-erb- $\alpha$  may constitute a promising approach to limit muscle wasting and improve the quality of life and survival of patients.

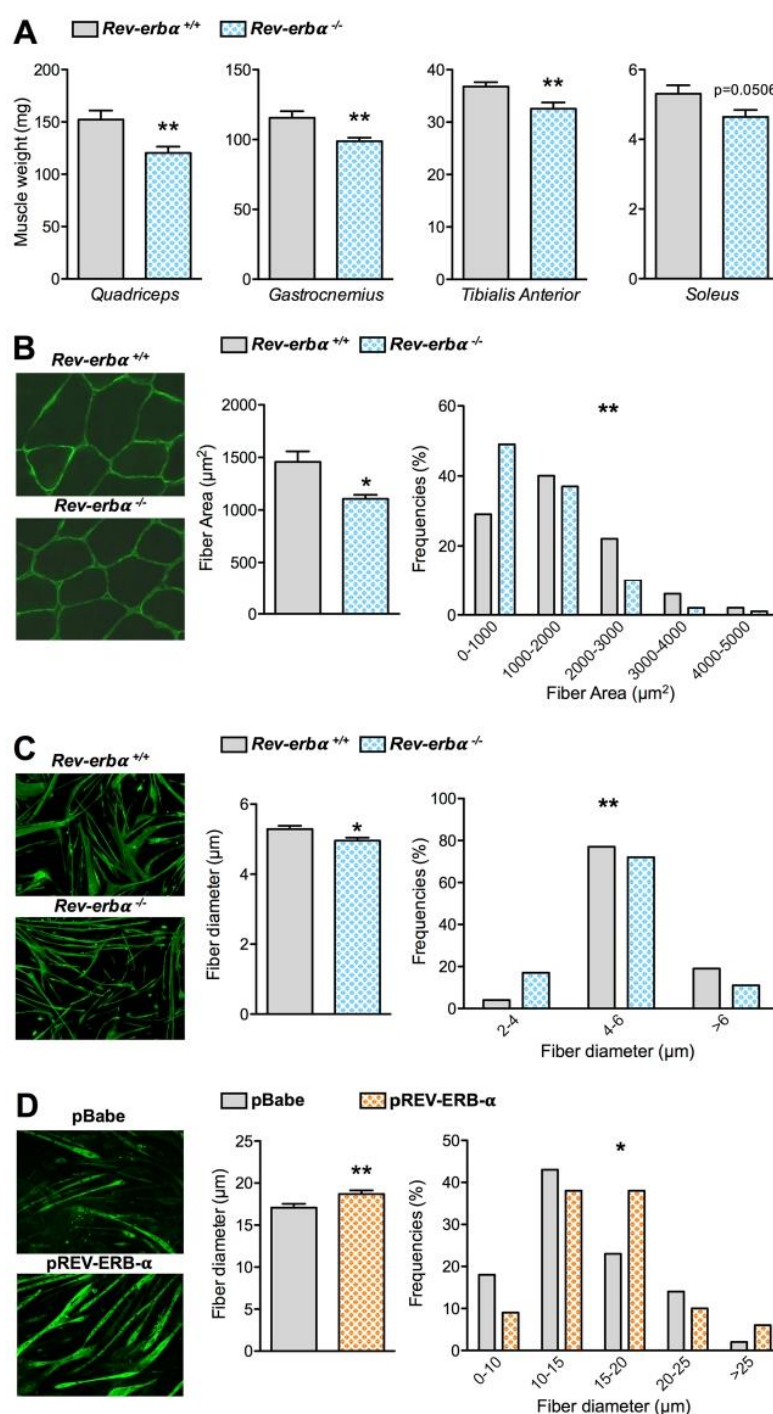
## Results

***Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice display reduced muscle mass associated with smaller muscle fibers.** Here, we explored whether Rev-erb- $\alpha$  plays a role in the control of skeletal muscle mass or fiber size. Different hind-limb skeletal muscles were harvested from the *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice and their *Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>* littermates and weighed. Quadriceps, gastrocnemius and tibialis anterior (TA) mass was significantly lower (by -20.9%, -14.5% and -11.5%, respectively) in *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* compared to *Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>* mice (Fig. 1A), whereas body weights were similar (Figure S1). The weight of the soleus muscle, which mostly contains oxidative fibers, was also reduced in *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice compared to *Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>* mice (by 12.6%) although the difference did not reach statistical significance (Fig. 1A). This is in accordance with the fact that glycolytic muscles are generally more vulnerable to atrophy than oxidative muscles<sup>19</sup>. Interestingly, *Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>* mice which have normal locomotor activity also display a tendency to reduced muscle mass compared to the wild-type mice (data not shown), thus indicating that reduced muscle mass occurs independently of any changes in the locomotor activity.

To further characterize the impact of Rev-erb- $\alpha$  on skeletal muscle mass, skeletal muscle fiber cross sectional areas (CSA) were quantified on TA sections using a laminin staining which surrounds muscle fibers. In line with the reduction of muscle mass, the mean fiber CSA was significantly lower in *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* compared to *Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>* mice with a shift in the fiber size distribution toward smaller fibers (Fig. 1B). These data therefore indicate that skeletal muscle is atrophied in absence of Rev-erb- $\alpha$ .

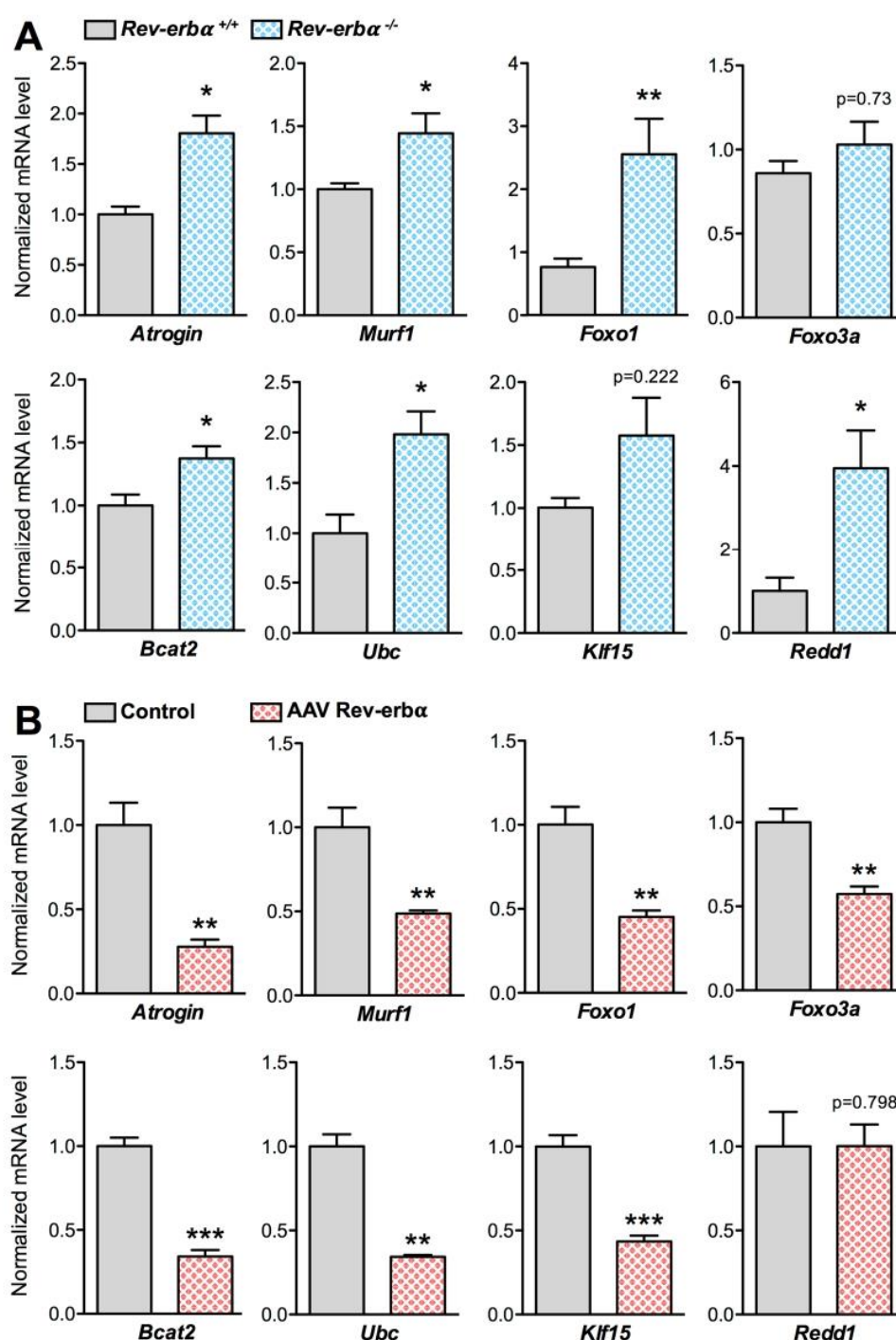
Next, primary myofibers were differentiated *in vitro* from myogenic precursors isolated from *Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>* and *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice to assess the role of Rev-erb- $\alpha$  exclusively in myogenic cells. As observed *in vivo*, the mean muscle fiber diameter was significantly lower in *Rev-erb $\alpha$* -deficient cells, again with a shift toward smaller fibers (Fig. 1C). Next, fiber diameter was measured on *in vitro* differentiated C2C12 overexpressing Rev-erb- $\alpha$  (pREV-ERB- $\alpha$ ) and control C2C12 myofibers (pBabe). Expectedly, a mirror phenotype was observed, i.e. the mean fiber diameter was significantly higher in Rev-erb- $\alpha$  overexpressing fibers compared to controls, with a decrease in smaller fiber size and an increase in larger fibers (Fig. 1D). Thus, muscle mass and fiber size changes reflect a direct, cell autonomous, impact of Rev-erb- $\alpha$  on fibers rather than an adaptive response to a chronic situation.

**Rev-erb- $\alpha$  negatively regulates catabolic and anti-anabolic pathways in skeletal muscle.** To determine whether these changes in muscle mass and fiber size are due to a dysregulation of the transcriptional programs elevated in muscle atrophy, expression analysis of the genes belonging to these processes was performed on skeletal muscles isolated from both Rev-erb- $\alpha$  loss- and gain-of-function mouse models. In particular, expression of genes encoding proteins involved in the ubiquitin-proteasome system was measured. Our results show that expression of the catabolic genes *ubiquitin* (*Ubc*), encoding the polyubiquitin precursor, and the two E3 ubiquitin ligases *Atrogin* and *Murf1*, as well as their transcriptional regulators *Foxo1* and *Foxo3a* is significantly increased in muscle from *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* mice compared to their *Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>* littermates (Fig. 2A). By contrast,



**Figure 1.** *Rev-erb-α* controls skeletal muscle mass. (A) Quadriceps, gastrocnemius, tibialis anterior and soleus muscle mass from *Rev-erbα*<sup>+/+</sup> and *Rev-erbα*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 13$  and  $11$ , respectively). (B) Representative immunostaining of laminin on skeletal muscle sections (left) and mean fiber cross-sectional area and fiber area distribution of tibialis anterior muscle from *Rev-erbα*<sup>+/+</sup> and *Rev-erbα*<sup>-/-</sup> mice ( $>13\,000$  fibers per mouse,  $n = 4$  mice per genotype) (right). (C) Representative immunostaining of myosin Heavy Chain (left) and mean fiber diameter and fiber diameter distribution of fibers differentiated from myogenic precursors isolated from *Rev-erbα*<sup>+/+</sup> and *Rev-erbα*<sup>-/-</sup> mice (3 measures per fiber,  $n = 120$  fibers per genotype) (right). (D) Representative immunostaining of Myosin Heavy Chain (left) and mean fiber diameter and fiber diameter distribution of differentiated C2C12 cells over-expressing *Rev-erbα* (pREV-ERB- $\alpha$ ) and control cells (pBabe) (3 measures per fiber,  $n = 120$  fibers per group) (right). Results are expressed as means  $\pm$  sem; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  by  $t$ -test (A), Mann-Whitney test (B–D) or chi-square test (B–D) to compare, respectively, the mean or the frequency distribution between groups.

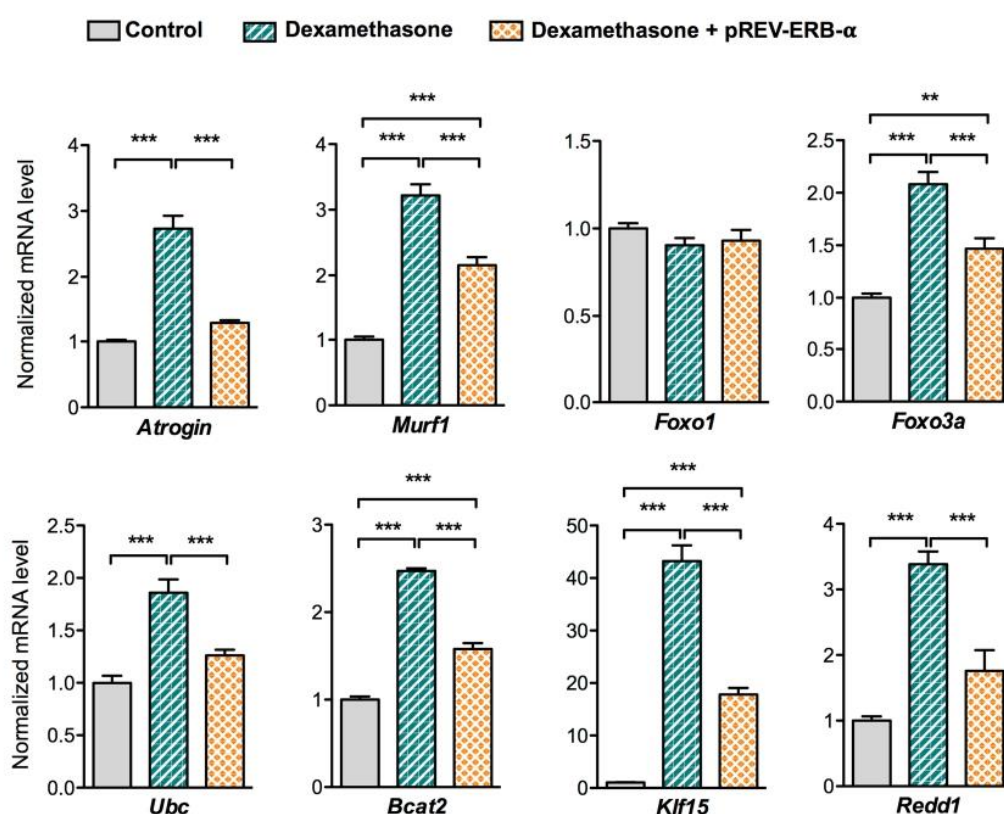




**Figure 2.** *Rev-erb-α* controls atrophy-related genes in skeletal muscle. (A) RT-qPCR analysis of atrophy-related gene expression in quadriceps muscle from *Rev-erbα*<sup>+/+</sup> and *Rev-erbα*<sup>-/-</sup> mice (*n* = 5 per genotype). (B) RT-qPCR analysis of atrophy-related gene expression in gastrocnemius muscle from mice intra-muscularly injected with a *Rev-erb-α* expressing or a control AAV vector (*n* = 7 per group). Results are expressed as means ± sem; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 by Mann-Whitney test.

AAV-mediated *Rev-erb-α* over-expression in wild-type mice (Figure S2A) led to the mirror phenotype, namely a significant downregulation of these catabolic genes (Fig. 2B, Figure S2). These results are in accordance with the increase in proteosomal activity in myofibers obtained after differentiation of myogenic precursor isolated from





**Figure 3.** Rev-erb- $\alpha$  over-expression counteracts dexamethasone-mediated induction of atrophy-related genes. RT-qPCR analysis of atrophy-related gene expression in differentiated C2C12 cells infected with Rev-erb- $\alpha$  or control retrovirus and treated with dexamethasone (1  $\mu$ M) or vehicle for 48hrs (n = 6 per condition). Results are expressed as means  $\pm$  sem; \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 by One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis.

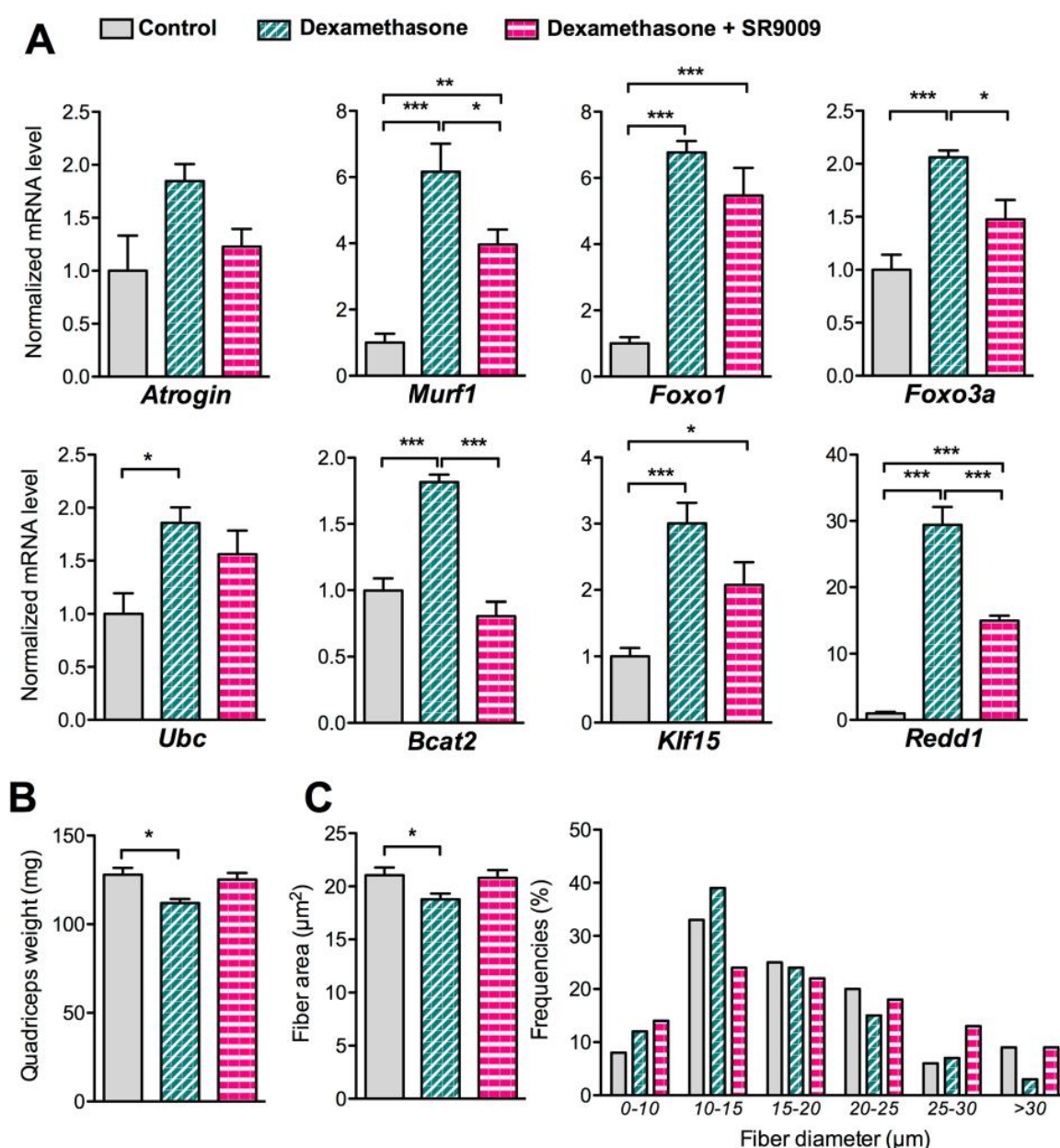
Rev-erb $\alpha^{+/+}$  and Rev-erb $\alpha^{-/-}$  mice and the mirrored decreased proteasomal activity measured in C2C12 cells overexpressing Rev-erb- $\alpha$  (Figure S3).

We also examined the expression of *Redd1* and *Klf15*, two genes encoding negative regulators of the anabolic mTOR signaling pathway and known glucocorticoid receptor (GR) targets<sup>9</sup>. Expression of both genes was upregulated in skeletal muscle in absence of Rev-erb $\alpha$  (Fig. 2A), while Rev-erb- $\alpha$  over-expression decreased expression of these genes (Fig. 2B, Figure S2B). Accordingly, expression of *Bcat2*, a downstream *Klf15* target gene, was significantly upregulated in Rev-erb $\alpha^{-/-}$  skeletal muscle, and down-regulated upon Rev-erb- $\alpha$  over-expression (Fig. 2A,B, Figure S2B). These alterations occurred in absence of any changes in the mTOR signaling pathway assessed by western blot (data not shown).

Altogether with our previous observation that Rev-erb- $\alpha$  down-regulates skeletal muscle autophagy<sup>31</sup>, these findings indicate that Rev-erb- $\alpha$  represses catabolic and anti-anabolic pathways in skeletal muscle, and that its absence leads to skeletal muscle atrophy through the activation of these pathways.

### Rev-erb- $\alpha$ over-expression and pharmacological activation counteracts atrophy induced by dexamethasone.

Chronic dexamethasone treatment induces skeletal muscle fibers atrophy through the activation of different genes found to be regulated by Rev-erb- $\alpha$ . Therefore, we tested whether Rev-erb- $\alpha$  can counteract dexamethasone-induced muscle wasting. To this aim, Rev-erb- $\alpha$  over-expressing and control C2C12 myogenic cells were differentiated and then treated during 48 hrs with dexamethasone. Rev-erb- $\alpha$  over-expression partially or totally blunted dexamethasone-mediated induction of the catabolic (*Atrogin*, *Murf1*, *Foxo1* and *Foxo3a*) and anti-anabolic (*Klf15*, *Redd1* and *Bcat2*) genes (Fig. 3). Rev-erb- $\alpha$  is a ligand-activated nuclear receptor, and we have previously demonstrated that its pharmacological activation with the SR9009 compound has beneficial effects on skeletal muscle endurance training<sup>31</sup>. Therefore, we next assessed whether Rev-erb- $\alpha$  activation may preserve muscle mass upon glucocorticoid administration *in vivo*. To this aim, wild-type mice were treated with dexamethasone alone or with the Rev-erb agonist SR9009 for 3 days. As expected, dexamethasone treatment potently induced the expression of the catabolic genes (*Atrogin*, *Murf1*, *Ubc*, *Foxo1* and *Foxo3a*) as well as the well-known *Klf15*, *Redd1* and *Bcat2* GR target genes (Fig. 4A). Interestingly, co-treatment of the mice with the SR9009 Rev-erb- $\alpha$  ligand partially or totally blunted the induction of these genes by dexamethasone (Fig. 4A), resulting in muscle mass preservation (Fig. 4B). Quantification of muscle fiber diameter was performed upon 3 days treatment with dexamethasone on fully differentiated cells. Fiber diameter was strongly reduced upon dexamethasone treatment, and SR9009 co-treatment fully prevented this effect (Fig. 4C). Altogether, these

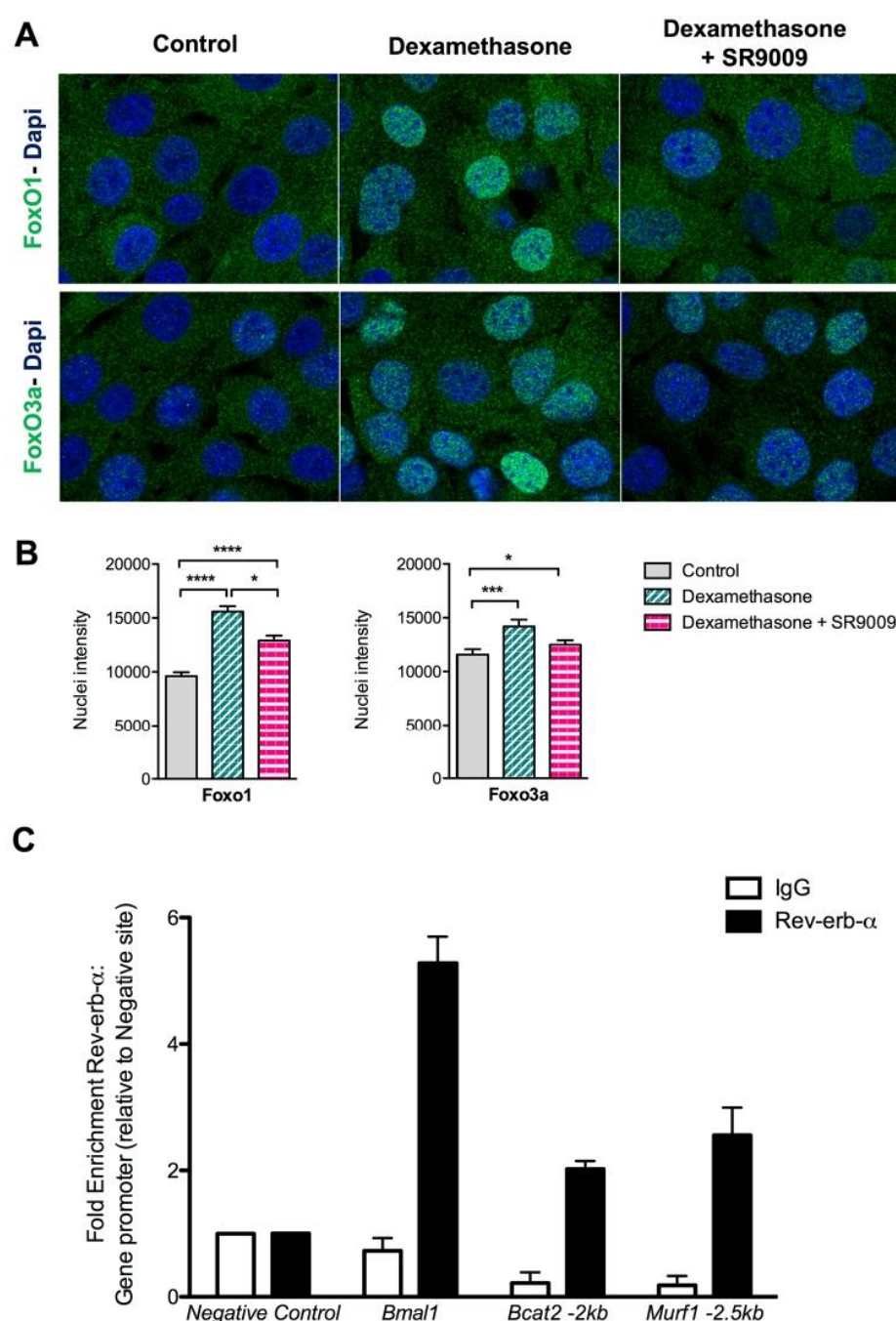


**Figure 4.** Pharmacological Rev-erb- $\alpha$  activation preserves muscle mass upon dexamethasone treatment. (A) RT-qPCR analysis of atrophy-related gene expression in quadriceps muscle ( $n = 5$  per group) and (B) quadriceps muscle mass ( $n = 4$  per group) from mice receiving or not 10 mg/kg/day of dexamethasone and co-treated with SR9009 (100 mpk) twice daily or vehicle for 3 days. (C) Mean fiber diameter and fiber size distribution of differentiated C2C12 cells treated or not with dexamethasone (20  $\mu\text{M}$ ) and co-treated with SR9009 (10  $\mu\text{M}$ ) or vehicle for 3 days (3 measures per fiber,  $n = 120$  fibers per group). Results are expressed as means  $\pm$  sem; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  by One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis or chi-square test to compare respectively the mean or the frequency distribution between groups.

data indicate that Rev-erb- $\alpha$  overexpression or its pharmacological activation abolishes dexamethasone atrophic effects *in vitro* and *in vivo*.

**Rev-erb- $\alpha$  controls FoxOs nuclear translocation and directly targets atrophy-related genes.** Dexamethasone treatment promotes nuclear translocation of FoxO1 and FoxO3a. Once in the nucleus, they activate the expression of their target genes such as *Atrogin* or *Murf1*. To determine if pharmacological activation of Rev-erb- $\alpha$  with the SR9009 is able to modulate FoxOs cellular localization, C2C12 cells were treated with dexamethasone and co-treated or not with SR9009 and the intensity of FoxO1 and FoxO3a signal was analysed by





**Figure 5.** Rev-erb- $\alpha$  modulates FoxO nuclear translocation and directly regulates atrophy-related genes through a direct binding to their regulatory sequences. (A) Representative immunostaining of FoxO1 (upper panels) and FoxO3a (lower panels) in green and Dapi nuclear staining in blue of C2C12 myogenic cells treated or not with dexamethasone (1  $\mu$ M) and co-treated with SR9009 (10  $\mu$ M). (B) Nuclear intensity quantification of FoxO1 and FoxO3a ( $n > 100$  cells per condition). Results are expressed as means  $\pm$  s.e.m.; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  by One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis. (C) Rev-erb- $\alpha$  binding to regulatory regions of the indicated atrophy-related genes measured by ChIP-qPCR ( $n \geq 2$  independent experiments). Data are expressed as means  $\pm$  s.e.m.

immunofluorescence and quantified. Results show that the nuclear intensity of both FoxO1 and FoxO3a is significantly increased upon dexamethasone treatment, whereas SR9009 co-treatment blunted dexamethasone-induced FoxO1 and FoxO3a nuclear translocation (Fig. 5A,B).

Beside its action through FoxO signaling, Rev-erb- $\alpha$  may directly repress its target genes by binding specific DNA sequences in their regulatory regions. Results from ChIP experiments performed on C2C12 myogenic cells show that Rev-erb- $\alpha$  occupies a site located at  $-2$  kb from the transcription start site (TSS) within the promoter sequence of *Bcat2* gene and a site located at  $-2.5$  kb from the TSS in *Murfl* gene regulatory sequences (Fig. 5C).

In conclusion, these data show that Rev-erb- $\alpha$  counteracts atrophy through the modulation of FoxOs translocation, thus preventing their transcriptional activation and by a direct binding to atrophy-related genes.

## Discussion

Skeletal muscle serves several important functions in the body, from locomotion and posture to metabolic homeostasis. Muscle loss is observed in and aggravates diverse physiological (such as fasting or aging) and pathological situations (such as cancer, sepsis, inflammatory conditions), and is associated with a poor quality of life and prognosis<sup>3</sup>. Thus, preservation of muscle mass may have major clinical benefits.

In this study, we addressed the role of the druggable nuclear receptor Rev-erb- $\alpha$  in the control of muscle mass. We demonstrated that Rev-erb- $\alpha$  modulates muscle mass and fiber size *in vivo* and *in vitro* by repressing the expression of genes of the ubiquitin-proteasomal degradation pathway such as Ubc, the atrogin-1 and MuRF1E3 ubiquitin ligases, as well as the upstream FoxO1 and FoxO3a regulators. Our data support an intrinsic role for Rev-erb- $\alpha$  in the control of muscle mass. Indeed, *in vitro* observation that muscle fibers differentiated from *Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>* primary myogenic progenitors display similar alterations (decreased fiber size and upregulated expression of atrophy genes), whereas Rev-erb- $\alpha$  over-expression in C2C12 myoblasts led to the opposite phenotype, demonstrate a cell autonomous action of Rev-erb- $\alpha$  in regulating muscle atrophy.

Atrogin-1 and MuRF1 mediate myofibrillar protein degradation, and nutrient-deprivation-induced and dexamethasone-induced muscle atrophy, respectively<sup>5-7,10,32</sup>. These two genes are regulated by FoxO transcription factors whose upregulation *in vivo* promotes muscle atrophy<sup>6,12,13</sup>. Indeed, the expression of a constitutively active FoxO3 mutant up-regulates *Atrogin-1* transcription and induces skeletal muscle atrophy, whereas a dominant negative FoxO3 prevents fasting-induced *Atrogin-1* expression and dexamethasone-induced atrophy in myotubes<sup>6</sup>. In line, *FoxO1,3,4* deletion prevented muscle loss and weakness upon fasting<sup>11</sup>. In our study, we show that Rev-erb- $\alpha$  represses these genes and controls FoxO nuclear translocation, thereby controlling muscle mass. FoxOs also control the lysosome-autophagy pathway that, beside the ubiquitin-proteasomal system, plays a critical role in skeletal muscle atrophy<sup>33</sup>. FoxOs mediate activation of some autophagy genes and proteins such as Bnip3, LC-3, and cathepsin L, and fasting failed to induce autophagosome formation in *FoxO*-deficient mice<sup>11</sup>. Interestingly, we have already demonstrated that *Rev-erb $\alpha$* -deficiency in skeletal muscle increased expression of several autophagy genes such as *Bnip3*, *Pink* and *Parkin*, and increased autophagy flux as shown by increased LC3-II/LC3-I ratio<sup>31</sup>. This was also observed in *Rev-erb $\alpha$* -deficient myoblasts, whereas Rev-erb- $\alpha$  over-expression led to a strong repression of autophagy genes. Besides being recruited to the promoter of several autophagy genes (*Bnip3* and *Cathepsin L*, among others)<sup>31</sup>, we show here that Rev-erb- $\alpha$  may also regulate this pathway in an indirect manner through the repression of FoxOs. Thus, our previous study and the present report demonstrate that Rev-erb- $\alpha$  plays a prominent role in the atrophy program by regulating the ubiquitin-proteasome and autophagy pathways in a coordinated manner.

Other transcription regulators have been shown to modulate muscle mass, amongst which the cofactor PGC1- $\alpha$ . *PGC1 $\alpha$*  expression is decreased in muscle atrophy and its over-expression inhibits FoxO3 signaling, autophagy and the ubiquitin-proteasome degradation pathways without affecting protein synthesis<sup>34</sup>. In addition, the expression of gene encoding oxidative phosphorylation is reduced in atrophying muscle suggesting that mitochondrial dysfunction can negatively impact skeletal muscle mass maintenance by triggering catabolic pathways<sup>35</sup>. It is noteworthy that Rev-erb- $\alpha$  positively controls PGC1 $\alpha$  expression and activity, as well as mitochondrial biogenesis and function in skeletal muscle<sup>31</sup>, which may contribute to the changes in muscle mass observed in the Rev-erb- $\alpha$  gain- and loss-of function models.

Endogenous GCs induce a moderate and reversible skeletal muscle protein catabolism in response to infection, whereas chronic GC treatment elicits muscle atrophy by increasing pathways leading to protein degradation and by antagonizing the action of anabolic factors in an exacerbated manner. In skeletal muscle, GR inhibits PI3K/Akt signaling, resulting in increased FoxOs signaling<sup>6,36</sup>. In addition, GR antagonizes the anabolic pathway by inducing *Redd1* expression, which leads to mTORC1 inhibition<sup>37</sup>, and *Klf15*, which increases the expression of the branched AAs-degrading enzyme BCAT2, thereby strengthening the inhibition of mTOR activity in an Akt-independent manner<sup>9,38</sup>. KLF15 also represses *Murfl* and *Atrogin-1* gene expression either directly for *Murfl* or through FoxO induction for *Atrogin-1*<sup>9</sup>. Corticosterone levels are not different in *Rev-erb $\alpha$* -deficient mice<sup>39,40</sup>. However, *Rev-erb $\alpha$*  gene expression is down-regulated in skeletal muscle upon dexamethasone treatment (Figure S4). We and others have already evidenced a regulation of *Rev-erb $\alpha$*  by GR and the cross-talk between these two nuclear receptors in the liver<sup>40,41</sup>, and it may be hypothesized that *Rev-erb $\alpha$*  down-regulation, or gene ablation, is permissive to GR action on atrophy genes. This is in line with the decreased muscle mass in the *Rev-erb $\alpha$* -deficient mice in basal conditions and with the repression of FoxOs (and both proteasomal and autophagy-related genes), and of *Redd1*, *Klf15* and *Bcat2* by Rev-erb- $\alpha$ . In agreement with this concept, we demonstrate that Rev-erb- $\alpha$  pharmacological activation is able to counteract dexamethasone-mediated induction of these genes, thereby preserving muscle mass. Our study identifies Rev-erb- $\alpha$  as a new actor in the complex network that controls muscle atrophy and a promising target to preserve muscle mass beside its beneficial effect on exercise capacity.

## Methods

**Animals.** 7–12 week-old *Rev-erb $\alpha$* -deficient mice (*Rev-erb $\alpha$ <sup>-/-</sup>*) and their wild-type (*Rev-erb $\alpha$ <sup>+/+</sup>*) littermates were studied. Mice were euthanized by cervical dislocation. Skeletal muscles (Gastrocnemius, Quadriceps, Tibialis Anterior (TA) and Soleus) were weighed and snap-frozen.



To induce skeletal muscle atrophy, 7–8 weeks old wild-type mice received an intraperitoneal injection of dexamethasone at 10 mg/kg/day or vehicle (ethanol) for 3 consecutive days at 9:00 am. Each day, half of the dexamethasone-treated mice also received two injections of the SR9009 Rev-erb agonist at 100 mg/kg at 17:30 pm the previous day and 30 min prior to dexamethasone injection. Quadriceps muscles were collected and weighed.

To induce Rev-erb- $\alpha$  overexpression (Figure S2A), the *Nr1d1* coding sequence was introduced in an AAV1 vector (Penn Vector Core, University of Pennsylvania) and  $3 \times 10^{11}$  genome copies were injected intra-muscularly in the TA and gastrocnemius muscles of wild-type mice as previously described<sup>31</sup>. The contralateral limb was injected with control AAV. 6 weeks later, mice were sacrificed and muscles were snap-frozen and stored until mRNA extraction.

Mice were housed in a 12h/12h light/dark cycle and had free access to food and water. All experimental procedures were performed with the approval of the Nord-Pas-de-Calais ethics committee (CEE75) and in compliance with French and European ethical legislations.

**Myogenic Cell Culture.** TA, gastrocnemius, soleus, quadriceps, diaphragm, triceps and pectoralis muscles were collected from 7–8 weeks-old *Rev-erb $\alpha$* -deficient mice (*Rev-erb $\alpha$* <sup>−/−</sup>) and their wild-type littermates (*Rev-erb $\alpha$* <sup>+/+</sup>) and digested in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; 4.5 g/L D Glucose; Gibco) F12 medium with Collagenase D (0.15 U/mg) and Dispase II (0.8 U/mg) during 30 minutes at 37 °C. Digested muscles were then filtered on cell strainer and myogenic precursors were isolated using negative and positive selection kits (130104268 and 130104261, Miltenyi Biotec). Primary myoblasts were resuspended in DMEM F-12 and with 20% FBS, 1% gentamycin, 1 mL Ultrosor G and 5 ng/mL FGFb and seeded in 0.1% gelatin coated plates. After 3 days, differentiation was induced by the addition of F-12/DMEM (1:1) medium supplemented with 5% horse serum for 7 days.

Constitutively over-expressing Rev-erb- $\alpha$  (*REV-ERB- $\alpha$* ) and control (*pBabe*) C2C12 cell lines<sup>31</sup> were cultured in DMEM medium with 1% gentamycin and 10% FBS. At 80% of confluency, myogenic differentiation was induced by addition of 2% horse serum for 3 days.

For myotube atrophy experiments, C2C12 cells were cultured as previously described<sup>31</sup>. After 5 days of differentiation, cells were treated with dexamethasone (20  $\mu$ M)<sup>42</sup> or vehicle (ethanol), and SR9009 (10  $\mu$ M) as indicated for 3 days. For analysis of atrophy-related gene expression, C2C12 were treated with dexamethasone (1  $\mu$ M) during 2 days with or without SR9009 (10  $\mu$ M). For FoxOs nuclear translocation analysis, C2C12 were treated with dexamethasone 1  $\mu$ M or vehicle with or without SR9009 (10  $\mu$ M) overnight.

**Immunostaining.** C2C12 cells were fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.2% Triton  $\times$  100/50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS. Cells were then incubated with Myosin Heavy Chain (MF-20) (1:250, DSHB AB2147781), FoxO1 (1:250, Santa Cruz 2880 S) or FoxO3 (1:250, Santa Cruz 2497S) antibodies, followed by Alexa Fluor 488-labelled secondary antibody (ThermoFisher Scientific A-11018) and Dapi. Cells were mounted with Dako Fluorescent Mounting Medium (S3023). Images were captured with a LSM 880 confocal microscope (Zeiss).

Immunofluorescence staining was also performed on TA sections (12  $\mu$ m) after fixation with 4% paraformaldehyde and blocking with 5% horse serum in PBS. Sections were incubated with a laminin (1:250, Santa Cruz SC59854) primary antibody followed by Alexa Fluor 488-labelled secondary antibody (ThermoFisher Scientific A21208). Sections were mounted with Dako Fluorescent mounting medium (Dako S3023). Images were captured with an Axioscan (Zeiss).

**Immunostaining Analysis.** The area of muscle fibers and the diameter of primary and C2C12 myofibers were quantified using a Fiji macro<sup>43</sup> for image input and preprocessing functions. For the diameter of primary and C2C12 myofibers, between 60 and 160 fibers were analyzed for each condition, and 3 measures were taken manually for each fiber and averaged.

The Nuclear intensity of FoxO1 and FoxO3a staining was performed using Acapella™ image analysis software (version 2.7-Perkin Elmer Technologies, Waltham, USA) by using dedicated module to detect nuclei shape in Dapi following by the intensity tracking by nucleus in channel FITC. A minimum of 100 cells per condition were analyzed in two independent experiments.

**Gene Expression Analysis.** Total RNA was extracted using the guanidium thiocyanate/phenol/chloroform extraction method for frozen muscles and using trizol (15596018, Life technologies) for C2C12 cells as previously described<sup>31</sup>. DNase treatment was performed (EN0521, Thermo Scientific) and cDNA was obtained using a reverse transcription kit (High-capacity cDNA reverse transcription Kit, Life Technologies). Quantitative qPCR was performed using specific primers (Supplemental Table 1) and the Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Results were analyzed with the standard delta Cycle Threshold method and normalized to the expression of *PP1a* (*Cyclophilin A*).

**Chromatin ImmunoPrecipitation (ChIP).** ChIP experiments were performed as previously described<sup>44</sup> using the anti-Rev-erb- $\alpha$  (1:50, #13418, Cell Signalling) and normal rabbit IgG (1:250, #2729, Cell Signalling) antibodies following manufacturer's instructions. Briefly, differentiated C2C12 cells were crosslinked with 1% paraformaldehyde for 10 min. Extracted nuclei were resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM pH8.0, EDTA 10 mM, SDS 1%, protease inhibitor cocktail). Chromatin was then sheared for 20 min using a water-cooled Bioruptor (Diagenode) and diluted 10 times with the dilution buffer (Tris HCl 20 mM pH8.0, Triton X-100 1%, Glycerol 5%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, protease inhibitor cocktail from Roche). 100  $\mu$ g of DNA were used per



IP and recovered chromatin was purified using QIAquick PCR clean up kit (Qiagen). Immunoprecipitated DNA was analysed by qPCR and normalized to input samples and negative DNA region.

**Proteasome activity.** The 20S Proteasome Activity Assay kit (APT, Millipore, Billerica, MA, USA) was used to measure the proteasome activity according to the manufacturer's instructions.

**Statistics.** To compare two groups, data were analysed using the Mann-Whitney test or the two-tailed unpaired student's *t*-test after being assessed for normality. One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc analysis was used to compare more than 2 groups. Qualitative traits (i.e. area frequency distribution) were analysed with a  $\chi^2$  test. Statistical significance is shown on the graphs (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Statistical methodologies used for each data set are indicated in the figure legends. Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., USA) was used for statistical analysis.

## References

- Schiaffino, S., Dyar, K. A., Ciciliot, S., Blaauw, B. & Sandri, M. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* **280**, 4294–4314 (2013).
- Bodine, S. C. & Furlow, J. D. Glucocorticoids and Skeletal Muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* **872**, 145–176 (2015).
- Cohen, S., Nathan, J. A. & Goldberg, A. L. Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 58–74 (2015).
- Bodine, S. C. *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy *in vivo*. *Nat Cell Biol* **3**, 1014–1019 (2001).
- Bodine, S. C. *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704–1708 (2001).
- Sandri, M. *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399–412 (2004).
- Baehr, L. M., Furlow, J. D. & Bodine, S. C. Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *J. Physiol* **589**, 4759–4776 (2011).
- Sandri, M. *et al.* PGC-1 $\alpha$  protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 16260–16265 (2006).
- Shimizu, N. *et al.* Crosstalk between glucocorticoid receptor and nutritional sensor mTOR in skeletal muscle. *Cell Metab* **13**, 170–182 (2011).
- Cong, H., Sun, L., Liu, C. & Tien, P. Inhibition of atrogin-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Hum Gene Ther* **22**, 313–324 (2011).
- Milan, G. *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat. Commun.* **6**, 6670 (2015).
- Kamei, Y. *et al.* Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J. Biol. Chem.* **279**, 41114–41123 (2004).
- Sandri, M. Regulation and involvement of the ubiquitin ligases in muscle atrophy. *Free Radic. Biol. Med.* **75**(Suppl 1), S4 (2014).
- Zhao, J. *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**, 472–483 (2007).
- Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
- Braun, T. P. *et al.* Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Exp. Med.* **208**, 2449–2463 (2011).
- Lecker, S. H., Solomon, V., Mitch, W. E. & Goldberg, A. L. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Nutr.* **129**, 227S–237S (1999).
- Braun, T. P. & Marks, D. L. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Front Physiol* **6**, 12 (2015).
- Schakman, O., Kalista, S., Barbe, C., Loumaye, A. & Thissen, J. P. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2163–2172 (2013).
- Britto, F. A. *et al.* REDD1 deletion prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **307**, E983–E993 (2014).
- Bugge, A. *et al.* Rev-erb $\alpha$  and Rev-erb $\beta$  coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev* **26**, 657–667 (2012).
- Cho, H. *et al.* Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- $\alpha$  and REV-ERB- $\beta$ . *Nature* **485**, 123–127 (2012).
- Zhang, Y. *et al.* GENE REGULATION. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  couple metabolism to the clock. *Science* **348**, 1488–1492 (2015).
- Duez, H. & Staels, B. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **5**, 82–88 (2008).
- Duez, H. *et al.* Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erb $\alpha$ . *Gastroenterology* **135**, 689–698 (2008).
- Raspe, E. *et al.* Identification of Rev-erb $\alpha$  as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* **43**, 2172–2179 (2002).
- Yin, L. *et al.* Rev-erb $\alpha$ , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* **318**, 1786–1789 (2007).
- Fontaine, C. *et al.* The orphan nuclear receptor Rev-Erb $\alpha$  is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)  $\gamma$  target gene and promotes PPAR $\gamma$ -induced adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 37672–37680 (2003).
- Wang, J. & Lazar, M. A. Bifunctional role of Rev-erb $\alpha$  in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **28**, 2213–2220 (2008).
- Gerhart-Hines, Z. *et al.* The nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  controls circadian thermogenic plasticity. *Nature* **503**, 410–413 (2013).
- Woldt, E. *et al.* Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat. Med.* **19**, 1039–1046 (2013).
- Clarke, B. A. *et al.* The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* **6**, 376–385 (2007).
- Mammucari, C. *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*. *Cell Metab* **6**, 458–471 (2007).
- Brault, J. J., Jespersen, J. G. & Goldberg, A. L. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  or 1 $\beta$  overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J. Biol. Chem.* **285**, 19460–19471 (2010).
- Romanello, V. & Sandri, M. Mitochondrial Quality Control and Muscle Mass Maintenance. *Front. Physiol.* **6**, 422 (2015).
- Stitt, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* **14**, 395–403 (2004).
- Wang, H., Kubica, N., Ellis, L. W., Jefferson, L. S. & Kimball, S. R. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. *J. Biol. Chem.* **281**, 39128–39134 (2006).

38. Waddell, D. S. *et al.* The glucocorticoid receptor and FOXO1 synergistically activate the skeletal muscle atrophy-associated MuRF1 gene. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E785–797 (2008).
39. Delezie, J. *et al.* The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  is required for the daily balance of carbohydrate and lipid metabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**, 3321–3335 (2012).
40. Okabe, T. *et al.* REV-ERB $\alpha$  influences the stability and nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *J. Cell Sci.* **129**, 4143–4154 (2016).
41. Torra, I. P. *et al.* Circadian and glucocorticoid regulation of Rev-erb $\alpha$  expression in liver. *Endocrinology* **141**, 3799–3806 (2000).
42. Han, D.-S., Yang, W.-S. & Kao, T.-W. Dexamethasone Treatment at the Myoblast Stage Enhanced C2C12 Myocyte Differentiation. *Int. J. Med. Sci.* **14**, 434–443 (2017).
43. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
44. Pourcet, B. *et al.* LXR $\alpha$  regulates macrophage arginase 1 through PU.1 and interferon regulatory factor 8. *Circ. Res.* **109**, 492–501 (2011).

## Acknowledgements

We acknowledge the support from INSERM, Contrat Plan Etat Région (CPER), the Région Nord Pas-de-Calais/FEDER, the EU consortium Eurhythdia (FP7), the ANR-Labex-EGID (EGID, ANR-10-LABX-46), EFSD (European Foundation for the Study of Diabetes)-Eli Lilly, the Fondation Francophone pour la recherche sur le diabète (FFRD) together with the Fédération Française des Diabétiques (AFD), AstraZeneca, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme (MSD), Novo Nordisk & Sanofi, an 'ERC-Région Hauts de France' grant to H.D. and a grant from Fondation de France. A.M.L. was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM). We thank the BICeL facility for access to systems and technical advice.

## Author Contributions

A.M.L., Q.T., S.D., J.B., C.D., A.D., S.L., B.P., E.W., A.B., L.P., M.Z., Y.S. and H.D. performed the experiments. A.D. gave conceptual advice. A.M.L., Q.T., B.S., Y.S. and H.D. wrote the manuscript. A.M.L., Q.T., Y.S. and H.D. contributed to the study concept, research design and interpretation of the results. Y.S. and H.D. are the guarantors of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. All authors contributed to discussion, reviewed and approved the manuscript.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14596-2>.

**Competing Interests:** The authors declare that they have no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

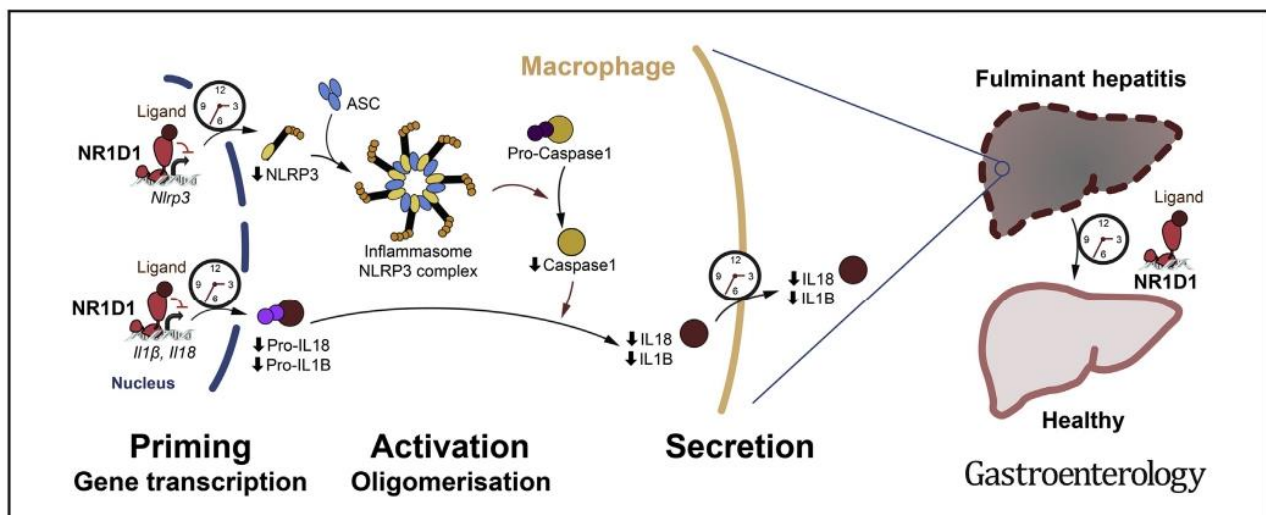


# Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1 Regulates Circadian Activity of NLRP3 Inflammasome to Reduce the Severity of Fulminant Hepatitis in Mice



Benoit Pourcet,<sup>1</sup> Mathilde Zecchin,<sup>1</sup> Lise Ferri,<sup>1</sup> Justine Beauchamp,<sup>1</sup> Sadicha Sitaula,<sup>2</sup> Cyrielle Billon,<sup>2</sup> Stéphane Delhaye,<sup>1</sup> Jonathan Vanhoutte,<sup>1</sup> Alicia Mayeuf-Louchart,<sup>1</sup> Quentin Thorel,<sup>1</sup> Joel T. Haas,<sup>1,2,3</sup> Jérôme Eeckhoutte,<sup>1</sup> David Dombrowicz,<sup>1</sup> Christian Duhem,<sup>1</sup> Alexis Boulinguez,<sup>1</sup> Steve Lancel,<sup>1</sup> Yasmine Sebti,<sup>1</sup> Thomas P. Burris,<sup>2,3</sup> Bart Staels,<sup>1</sup> and Hélène M. Duez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011 - EGID, F-59000, Lille, France; <sup>2</sup>Department of Pharmacology and Physiology, Saint Louis University School of Medicine, St Louis, Missouri; and <sup>3</sup>The Scripps Research Institute, Jupiter, Florida



**BACKGROUND & AIMS:** The innate immune system responds not only to bacterial signals, but also to non-infectious danger-associated molecular patterns that activate the NLRP3 inflammasome complex after tissue injury. Immune functions vary over the course of the day, but it is not clear whether these changes affect the activity of the NLRP3 inflammasome. We investigated whether the core clock component nuclear receptor subfamily 1 group D member 1 (NR1D1, also called Rev-erb $\alpha$ ) regulates expression, activity of the NLRP3 inflammasome, and its signaling pathway. **METHODS:** We collected naïve peritoneal macrophages and plasma, at multiple times of day, from *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice and their *Nr1d1*<sup>+/+</sup> littermates (controls) and analyzed expression NLRP3, interleukin 1 $\beta$  (IL1B, in plasma), and IL18 (in plasma). We also collected bone marrow-derived primary macrophages from these mice. Levels of NR1D1 were knocked down with small hairpin RNAs in human primary macrophages. Bone marrow-derived primary macrophages from mice and human primary macrophages were incubated with lipopolysaccharide (LPS) to induce expression of NLRP3, IL1B, and IL18; cells were incubated with LPS and adenosine triphosphate to activate the NLRP3 complex. We analyzed caspase 1 activity and cytokine secretion. NR1D1

was activated in primary mouse and human macrophages by incubation with SR9009; some of the cells were also incubated with an NLRP3 inhibitor or inhibitors of caspase 1. *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice and control mice were given intraperitoneal injections of LPS to induce peritoneal inflammation; plasma samples were isolated and levels of cytokines were measured. *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice, control mice, and control mice given injections of SR9009 were given LPS and D-galactosamine to induce fulminant hepatitis and MCC950 to specifically inhibit NLRP3; plasma was collected to measure cytokines and a marker of liver failure (alanine aminotransferase); liver tissues were collected and analyzed by quantitative polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and flow cytometry. **RESULTS:** In peritoneal macrophages, expression of NLRP3 and activation of its complex varied with time of day (circadian rhythm)—this regulation required NR1D1. Primary macrophages from *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice and human macrophages with knockdown of NR1D1 had altered expression patterns of NLRP3, compared to macrophages that expressed NR1D1, and altered patterns of IL1B and 1L18 production. Mice with disruption of *Nr1d1* developed more-severe acute peritoneal inflammation and fulminant hepatitis than control mice. Incubation of macrophage with the



## EDITOR'S NOTES

## BACKGROUND AND CONTEXT

Deregulation of NLRP3 inflammasome participates in the development of sterile inflammatory diseases. Although the precise regulation of the NLRP3 inflammasome is of utmost importance in innate inflammation, whether it is controlled by the biological clock remained unknown.

## NEW FINDINGS

NLRP3 expression and secretion of inflammasome-matured inflammatory cytokines by human and mouse macrophages oscillate diurnally under the control of Rev-erb $\alpha$ /NR1D1. Activation of NR1D1 reduced the severity of peritonitis and fulminant hepatitis in mice.

## LIMITATIONS

Whether NR1D1 activation may ameliorate NLRP3-driven acute or chronic inflammatory disease remains to be demonstrated in humans.

## IMPACT

The clock component Rev-erb $\alpha$ /NR1D1 may represent an attractive therapeutic target to treat NLRP3-dependent inflammatory diseases.

NR1D1 activator SR9009 reduced expression of NLRP3 and secretion of cytokines. Mice given SR9009 developed less-severe liver failure and had longer survival times than mice given saline (control). **CONCLUSIONS:** In studies of *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice and human macrophages with pharmacologic activation of NR1D1, we found NR1D1 to regulate the timing of NLRP3 expression and production of inflammatory cytokines by macrophages. Activation of NR1D1 reduced the severity of peritoneal inflammation and fulminant hepatitis in mice.

**Keywords:** Immune Regulation; Biological Clock; Acute Liver Failure; Rev-erb $\alpha$ .

**F**ulminant hepatitis (FH) is a life-threatening pathologic condition characterized by a fast-evolving hepatic dysfunction associated with encephalopathy and coagulopathy.<sup>1</sup> FH is triggered by numerous etiological factors, such as viral infection, absorption of toxic compounds, metabolic and genetic diseases.<sup>1</sup> However, the overdose of drugs such as acetaminophen is still the main cause of FH. Acetaminophen accumulation leads to P450-mediated overproduction of toxic metabolites provoking oxidative stress, mitochondrial membrane potential loss, and hepatocellular death. This entrains the release of danger-associated molecular pattern (DAMPs) and activation of the innate immune system, leading to secretion of a large number of pro-inflammatory mediators.<sup>1</sup> So far, no specific treatment is available besides liver transplantation, resulting in an urgent need to identify pharmacologic targets and to uncover the underlying mechanisms.

Organisms rely on a well-conserved molecular clockwork in order to anticipate changes imposed by the rotation of the Earth and gate physiological processes to the most appropriate time frame.<sup>2</sup> Immune functions vary according

to the time of day, and clock disruption leads to inflammatory diseases.<sup>3-5</sup> Indeed, mounting evidences argue for the existence of a circadian rhythmicity in several immune functions, including trafficking and abundance of blood leukocytes and their recruitment to tissues,<sup>3,6-9</sup> although the underlying mechanisms are not elucidated yet. The importance of appropriate timing of the immune response is supported by the more severe response to endotoxin, that is increased macrophage cytokine production and increased mortality upon clock dysfunction during chronic jetlag.<sup>10</sup>

The biological clock is a complex network of transcription factors and interlocked transcriptional feedback loops that orchestrate circadian rhythms of various physiological processes.<sup>2,3</sup> Clock dysfunction is associated with the development of metabolic and cardiovascular disorders, as well as cancers and, as described here, immune defects, underscoring its central role in behavior and physiology. Among the core clock components, the ligand-activated nuclear receptor and transcriptional repressor NR1D1 participates in the circadian control of hepatic glucose, lipid, and bile acid metabolism<sup>11-16</sup>; muscle mitochondrial activity<sup>17</sup>; and body temperature.<sup>18</sup> Lymphoid organs and immune cells, such as macrophages, harbor an intrinsic clockwork that drives circadian transcription of genes involved, for instance, in interleukin (IL) secretion and the Toll-like receptor (TLR)-4 inflammatory pathway, leading to marked circadian variations in the response to endotoxin or bacterial challenge.<sup>19-21</sup> Interestingly, NR1D1 has previously been linked to the immune system, as it represses *TLR4* and *Cx3cr1* expression in macrophages.<sup>22,23</sup> In addition, lipopolysaccharide (LPS)-treated peritoneal macrophages from *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice display increased *Ccl2* (*Mcp1*) expression, whereas pharmacologic activation of NR1D1 represses the expression and release of IL6.<sup>20</sup>

The innate immune system recognizes and responds not only to bacterial components but also to non-infectious, structurally diverse DAMPs, such as crystals or extracellular adenosine triphosphate (ATP),<sup>24-26</sup> mounting an immune response to clear these factors.<sup>27</sup> The NLRP3 inflammasome complex is central to this response and is activated by a 2-step mechanism. *Nlrp3* gene expression is first primed by pro-inflammatory stimuli, such as LPS or neutrophil extracellular traps.<sup>24,26</sup> DAMPs then act as secondary signals to trigger several pathways activating the NLRP3 inflammasome, including ATP-activated potassium efflux, translocation to mitochondria, reactive oxygen species production, and release of mitochondrial

**Abbreviations used in this paper:** ASC, apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase recruitment domain protein; ATP, adenosine triphosphate; BMDM, bone marrow-derived macrophage; ChIP, chromatin immunoprecipitation; DAMPs, danger-associated molecular patterns; D-GalN, D-galactosamine; FH, fulminant hepatitis; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; MDM, monocyte-derived macrophage; mRNA, messenger RNA; NLRP3, NACHT LRR and PYD domains-containing protein 3; PEC, peritoneum exudate cell; siRNA, small interfering RNA; TLR, Toll-like receptor; TNF, tumor necrosis factor; ZT, zeitgeber.

📌 Most current article

© 2018 by the AGA Institute  
0016-5085/\$36.00

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.019>



DNA, cardiolipin, and crystal-activated lysosomal cathepsins.<sup>24,25,28–31</sup> Upon activation by infection or cellular stresses, the NLRP3 inflammasome complex elicits the maturation of the pro-inflammatory cytokines IL1B and IL18.<sup>32</sup> Importantly, deregulation of NLRP3 participates in the development of IL18 and IL1B-driven auto-inflammatory diseases, including atherosclerosis, gout, and rheumatoid arthritis, where accumulation of crystals of cholesterol, uric acid, or hydroxyapatite is perceived as an endogenous sterile stress,<sup>24,33–36</sup> calling for therapeutic strategies to modulate inflammasome signaling. In addition, NLRP3 expression is increased in viral and drug-induced FH, although its actual role in these pathologic conditions is still underinvestigated.<sup>37,38</sup> Although the precise regulation of the NLRP3 inflammasome complex is of utmost importance in innate inflammation, whether it is controlled by the biological clock has not yet been demonstrated.

Here, we show that susceptibility to LPS/D-galactosamine (D-GalN)-induced FH depends on the time of challenge in mice. Interestingly, we demonstrate that expression and activation of the NLRP3 inflammasome pathway oscillate in a daily manner under the direct control of NR1D1 in primary mouse and human macrophages. Macrophages from *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice or human macrophages in which *Nr1d1* has been silenced mature and secrete higher amount of IL1B and IL18 in a NLRP3-dependent manner in response to DAMPs. The pathophysiological relevance of these observations has been tested in vivo. We demonstrate that the inflammasome is activated during peritonitis and acute hepatic liver failure. Furthermore, *NR1D1* deletion results in a higher NLRP3 inflammasome pathway activation, leading to exacerbated peritonitis and FH, whereas pharmacologic NR1D1 activation attenuates leukocyte infiltration, inflammasome activation, and liver injury, thereby delaying death and improving the rate of survival from FH. Collectively, these data identify NR1D1 as a pharmacologic target for NLRP3-dependent inflammatory disorders and, in particular, in the context of acute FH.

## Methods

See the [Supplementary Material](#).

## Results

### Diurnal Variations in the Rate and Duration of Survival After Fulminant Hepatitis Induction

FH is an acute liver injury resulting from massive hepatocyte apoptosis, hemorrhagic necrosis, and inflammation. Low doses of LPS in combination with the specific hepatotoxic agent D-GalN promote specific liver injury in mice and induce the production of inflammatory cytokines (tumor necrosis factor [TNF] $\alpha$ , IL1B, and IL6),<sup>39</sup> thus recapitulating the clinical picture of acute liver injury in humans.<sup>39</sup> For these reasons, the LPS/D-GalN-induced hepatic injury is a widely used mouse model to understand FH and its pharmacologic treatment.<sup>39–41</sup> Because the clock machinery controls the circadian behavior of the immune system, we hypothesized that the outcome of FH may

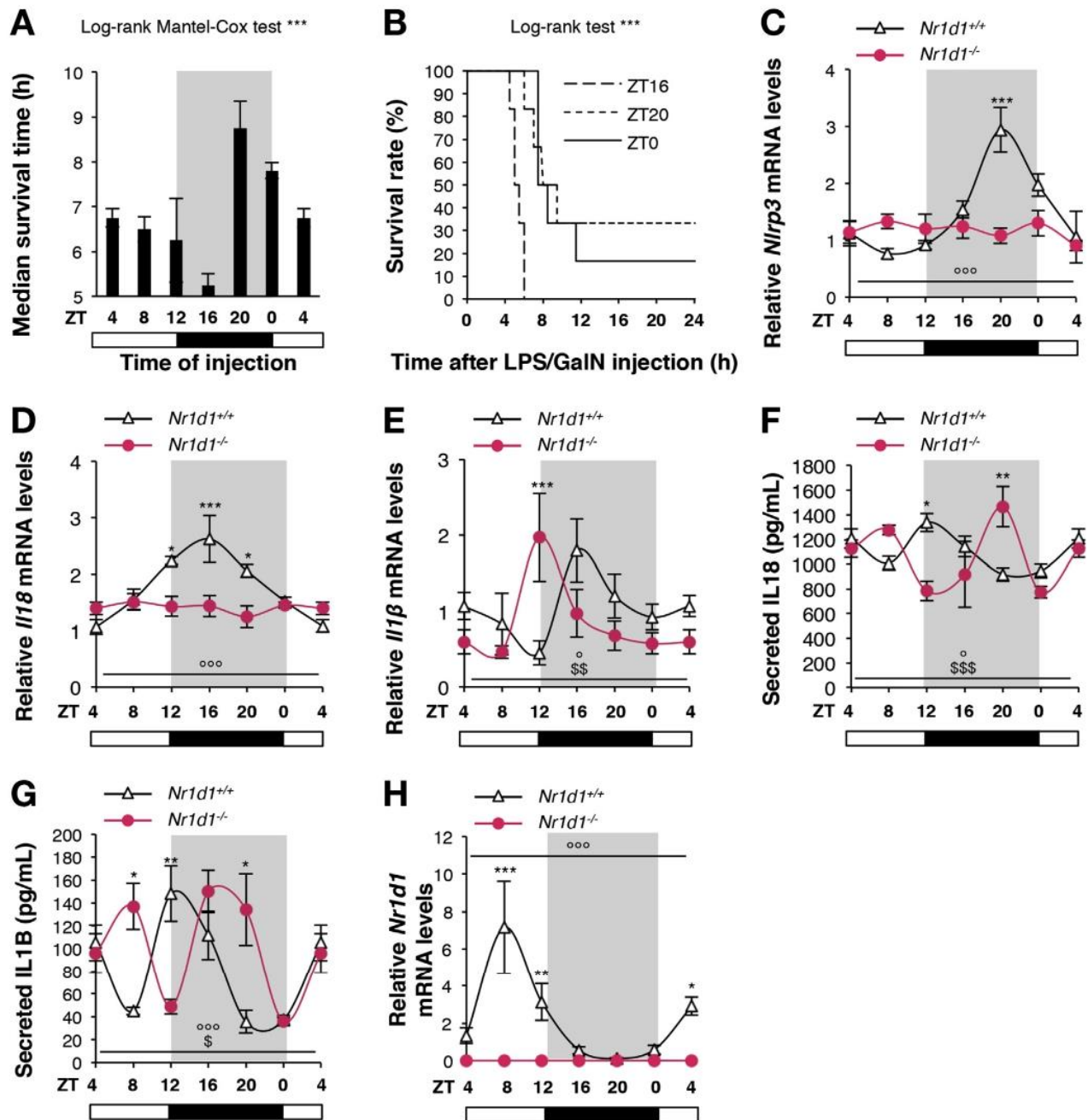
depend on the time of hepatitis induction. Mice were thus challenged with LPS/D-GalN every 4 hours and their survival duration and rate was monitored for 48 hours. Strikingly, we demonstrate that death occurs after only 5 hours for all mice challenged with LPS/D-GalN at zeitgeber (ZT) 16, while the survival duration of mice injected at ZT20 or ZT0 increases up to 8.5 hours, with a survival rate reaching 40% ([Figure 1A](#) and [1B](#)). Thus, mice display dramatic daily differences in their susceptibility to LPS/D-GalN-induced FH, indicating a role of the circadian clock therein. We then searched for the oscillating pathways involved in these inflammatory processes.<sup>39–42</sup>

### The NLRP3 Inflammasome Pathway Displays Circadian Rhythmicity

Because the NLRP3 inflammasome pathway is the central sensor of DAMPs released from necrotic tissues and may therefore play an essential role in FH pathophysiology, we next determined whether *Nlrp3*, *Il1 $\beta$* , and *Il18* gene expression, as well as cytokine levels, vary during the course of the day in macrophages isolated every 4 hours from the peritoneum of non-stimulated mice. Analysis of messenger RNA (mRNA) levels from CD11b<sup>+</sup> peritoneal exudate cells (PECs) reveals that *Nlrp3*, *Il18*, and *Il1 $\beta$*  gene expression ([Supplementary Table 1](#)) display strong daily variations, with a minimum expression peak (nadir) at ZT4–8 and a maximum expression level (zenith) at ZT16–20 ([Figure 1C–1E](#) and [Supplementary Figure 1](#)). Accordingly, IL1B and IL18 secretion also shows cyclic variations in vivo ([Figure 1F](#) and [1G](#) and [Supplementary Figure 1](#)). Accordingly, similar oscillations were observed in synchronized mouse bone marrow-derived macrophages (BMDM) ([Supplementary Figures 1](#) and [2A–2E](#)) and human monocyte-derived macrophages (MDM) ([Supplementary Figures 1](#) and [2F–2J](#)).

### NR1D1 Governs Circadian Rhythmicity of the NLRP3 Inflammasome Pathway

Interestingly, *Nlrp3* gene expression is maximal at the time *Nr1d1* reaches a nadir (ZT20) ([Figure 1C](#) vs [1H](#), [Supplementary Figure 1A](#) vs [1D](#) and [Supplementary Figure 2F](#) vs [2J](#)). Thus, we wondered whether the rhythmicity observed in *Nlrp3* inflammasome expression and IL1B and IL18 expression and secretion is under the direct control of NR1D1. Analysis of *Nr1d1*<sup>−/−</sup> PECs and synchronized BMDM revealed an altered rhythmicity of *Nlrp3* expression compared to the one in *Nr1d1*<sup>+/+</sup> PECs and synchronized BMDM ([Figure 1C](#) and [Supplementary Figure 2D](#)), demonstrating that NR1D1 is essential to drive circadian *Nlrp3* gene expression. Accordingly, oscillations in *Il1 $\beta$*  and *Il18* mRNA levels were blunted or phase-shifted in *Nr1d1*<sup>−/−</sup> PECs and synchronized BMDM compared to *Nr1d1*<sup>+/+</sup> cells ([Figure 1D](#) and [1E](#) and [Supplementary Figure 2E](#)). *Bmal1* (*Arntl*) was measured as a control for NR1D1 activity ([Supplementary Figure 2C](#) and [2H](#)). The secretion of IL1B and IL18, which is rhythmic in *Nr1d1*<sup>+/+</sup> mice ([Figure 1F](#) and [1G](#)), was found phase-delayed in *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice. Collectively, our data demonstrate that



**Figure 1.** NR1D1 controls daily variations in *Nlrp3* expression and activation, and IL1B and IL18 secretion. (A) Survival time and (B) survival rate after FH induction every for 4 hours. Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). \*\*\* $P < .001$  as determined by log-rank Mantel-Cox (A) and log-rank (B) test. (C) *Nlrp3*, (D) *Il18*, (E) *Il1β*, and (H) *Nr1d1* mRNA levels in CD11b<sup>+</sup> PECs from unstimulated *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice obtained by peritoneal lavage around the clock (ZT4  $\rightarrow$  ZT4). (F) Secreted IL18 and (G) IL1B in peritoneal lavages from unstimulated *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice around the clock (ZT4  $\rightarrow$  ZT4). Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 4-7$ ). \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$  as determined by 2-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-hoc test to compare *Nr1d1*<sup>+/+</sup> and *Nr1d1*<sup>-/-</sup>. ° $P < .05$ ; °° $P < .01$ ; °°° $P < .001$  as determined by 1-way ANOVA test to compare *Nr1d1*<sup>+/+</sup>. \$ $P < .05$ ; \$\$ $P < .01$ ; \$\$\$ $P < .001$  as determined by 1-way ANOVA test to compare *Nr1d1*<sup>-/-</sup>. Cosinor analysis is given in [Supplementary Figure 1](#). ZT0, lights on, ZT12, lights off.



NR1D1 drives circadian *Nlrp3* expression and ensuing rhythmic IL1B and IL18 secretion.

### NR1D1 Directly Regulates *Nlrp3* Gene Expression and Activation in Macrophages

NLRP3 expression is enhanced by exposure to pathogens and is activated by specific, structurally diverse molecular patterns associated with danger, such as extracellular ATP released by injured cells and the presence of microbial toxins, including nigericin or accumulated crystals (eg, cholesterol, alum).<sup>24,25</sup> We thus investigated whether NR1D1 directly controls NLRP3 expression and activation in human MDMs and mouse primary BMDMs after LPS priming. *Nlrp3* mRNA levels were significantly higher in LPS-primed mouse and human macrophages in absence of *Nr1d1* (Figure 2A and 2B). Interestingly, analysis of chromatin immunoprecipitation (ChIP) sequencing and 5'GRO sequencing data from RAW264.7 cells<sup>23</sup> indicated that NR1D1 occupies 2 sites located at -0.2 and -1.2 kb from the transcription start site, and inhibits de novo transcription from the -1.2-kb site (Supplementary Figure 3A). ChIP experiments showed that NR1D1 also occupies these 2 sites in wild-type BMDMs, as well as 2 additional response elements at -4.4 and -4.2 kb identified by in silico analysis (Figure 2C). Consistent with an active repression of these sites by NR1D1, we observed an increase of H3K27me<sub>3</sub>, a histone mark associated with a transcriptional repression<sup>43</sup> in wild-type compared to *Nr1d1*-deficient BMDMs (Figure 2D). Interestingly, the lack of a functional DNA binding domain in NR1D1 mimics the effect of *Nr1d1* deficiency on *Nlrp3* mRNA levels in LPS-treated BMDM (Figure 2E), thus emphasizing the importance of direct binding of NR1D1 to DNA in this regulatory mechanism. Interestingly, 1-hour LPS treatment strongly decreased NR1D1 binding to these sites, likely allowing a de-repression of the NLRP3 pathway in response to inflammatory stimuli, when a full response is needed to restore homeostasis (Figure 2C). Accordingly, short exposure to LPS increased *Nlrp3*, *Il1 $\beta$* , and *Il18* mRNA expression, but did not alter either *Nr1d1* or *Nr1d2* mRNA levels (Supplementary Figure 3B–3F), thus suggesting that LPS priming triggers NR1D1 removal from its response elements without affecting its expression. However, prolonged exposure to LPS decreases *Nr1d1* and *Nr1d2* gene expression (Supplementary Figure 4A and 4B, and Supplementary Figure 4E and 4F), without changing their phase in synchronized BMDMs (data not shown). It is thus likely that both phenomena (decreased expression and binding) concur in vivo. In addition, *Nlrp3* protein levels were higher in BMDMs from *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice (Figure 2F and Supplementary Figure 3G and 3H). Upon activation by DAMPs, the NLRP3 protein associates with the apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain protein (ASC) to form ASC specks,<sup>44</sup> a hallmark of cellular activation of the NLRP3 inflammasome. *Nr1d1* deficiency led to a marked elevation of the number of cells displaying ASC specks upon ATP or nigericin activation (Figure 2G and 2H), indicating that NR1D1 regulates NLRP3

inflammasome complex formation. These findings implicate NR1D1 as a negative regulator of NLRP3 expression and activation in vitro. Furthermore, *NR1D2* knockdown did not affect *Nlrp3* mRNA levels in BMDM (Figure 2I and Supplementary Figure 4A and 4B), but enhanced *NLRP3* as well as *Il1 $\beta$*  and *Il18* expression in LPS-primed human MDMs (Supplementary Figure 4C–4F), suggesting that the *Nr1d2* isotype is not involved in this process in mouse macrophages, but displays redundant, and not synergistic, activity with NR1D1 in human macrophages. Finally, *NR1D1* deletion did not affect other inflammasomes, such as AIM2 (Supplementary Figure 5A) or AIM2-mediated IL1B and IL18 maturation and secretion in LPS-primed BMDM challenged with the AIM2 activator poly(dA:dT) (Supplementary Figure 5B and 5C).

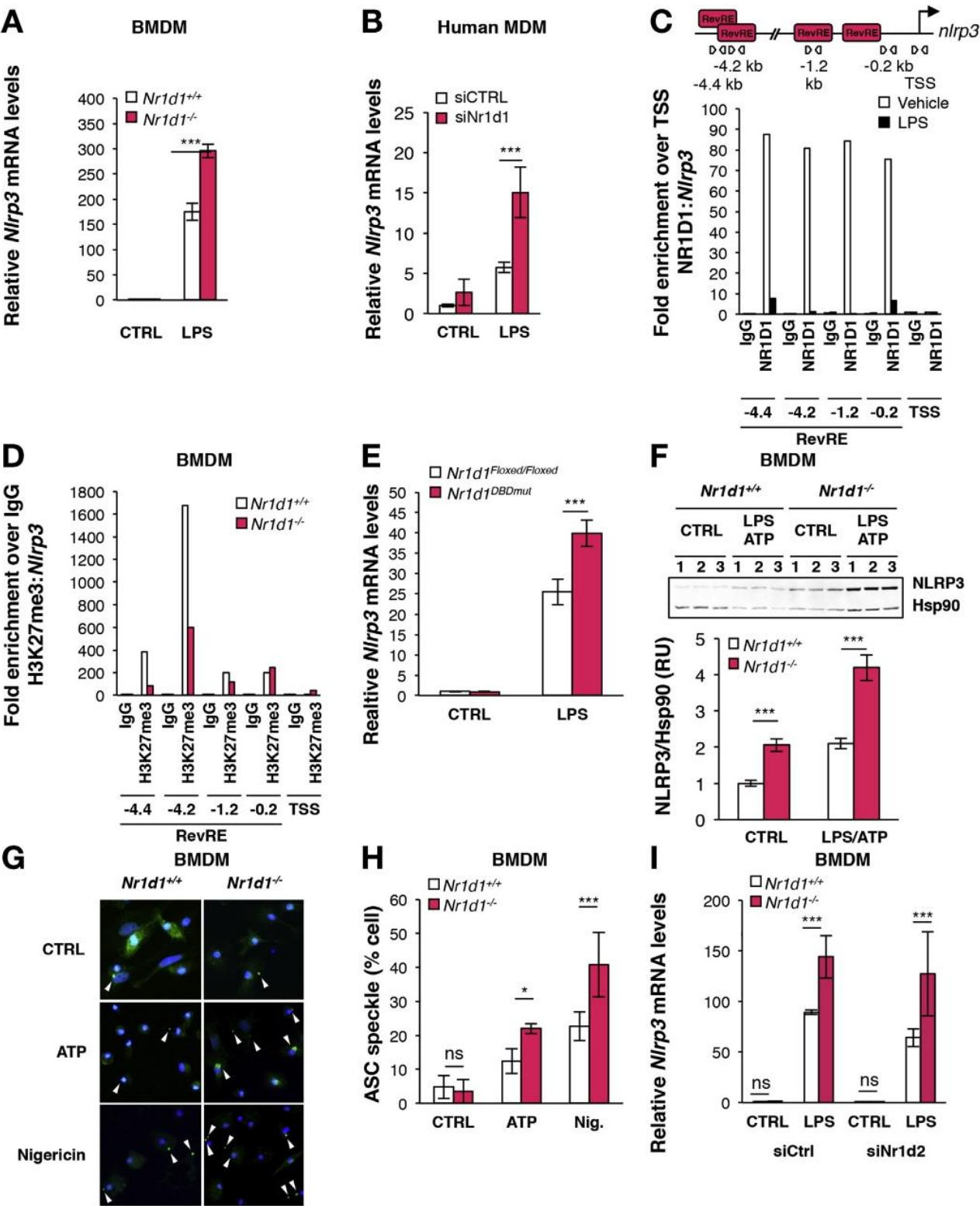
### NR1D1 Controls NLRP3-Dependent Maturation and Secretion of IL1B and IL18 in a Caspase-1-Dependent Manner

The NLRP3 inflammasome complex regulates IL18 and IL1B processing and secretion at the post-transcriptional level through the oligomerization and auto-cleavage of an inactive p45 pro-caspase-1 precursor into active p20 and p10 caspase-1 subunits responsible for the subsequent maturation of IL1B and IL18.<sup>24,25,44</sup> *Nr1d1* deficiency did not affect *caspl* gene expression (Supplementary Figure 6A) or p45 protein amount (Figure 3A and 3B and Supplementary Figure 6B and 6C), but enhanced caspase-1 maturation in LPS-primed BMDMs that were either unstimulated or ATP-stimulated to activate the NLRP3 inflammasome (Figure 3A and Supplementary Figure 6D). Consistently, *NR1D1* knockdown in human MDMs (Supplementary Figure 7A) and *NR1D1* deletion in BMDMs (Figure 3C and Supplementary Figure 7B) increased IL1B secretion after LPS priming and activation with ATP. Similarly, IL18 secretion in culture medium from activated macrophages was increased (Figure 3D and Supplementary Figure 7C). In addition, NR1D1 activation by its natural ligand hemin<sup>16</sup> decreased LPS-primed ATP-stimulated IL1B and IL18 secretion (Figure 3E and 3F and Supplementary Figure 8A) in BMDMs and human MDMs. Although IL1B and IL18 may be processed by other caspases, such as caspase-8 or caspase-11,<sup>44,45</sup> the increase in IL1B and IL18 secretion in *Nr1d1*<sup>-/-</sup> BMDMs is caspase-1- and NLRP3-dependent, because it was abolished by caspase-1 inhibition (Figure 3C and 3D and Supplementary Figure 9A and 9B) and *Nlrp3* silencing (Figure 3G and 3H). Accordingly, addition of MCC950, a specific NLRP3 inhibitor,<sup>46</sup> blunted the effect of NR1D1 activation by hemin on IL1B and IL18 secretion (Figure 3E and 3F). Altogether, these results demonstrate that NR1D1 regulates macrophage IL1B and IL18 maturation and secretion in a NLRP3-dependent manner in vitro.

### NR1D1 Also Regulates *Il1 $\beta$* and *Il18* at the Gene Expression Level

In addition to its role on NLRP3-dependent IL18 and IL1B maturation, we also assessed whether NR1D1

regulates *Il18* and *Il1β* expression at the transcriptional level in primary macrophages. *Nr1d1* deficiency in BMDMs or small interfering RNA-mediated *NR1D1* knockdown in human MDMs led to higher IL1B and IL18 mRNA and protein levels after LPS priming (Figure 4A–4D and Supplementary Figure 9C). ChIP sequencing and 5’GRO





sequencing data analysis from NR1D1-overexpressing RAW264.7 macrophages<sup>23</sup> indicate that NR1D1 binds to the *Il1 $\beta$*  promoter and inhibits its de novo transcription (Supplementary Figure 10). ChIP quantitative polymerase chain reaction analysis demonstrated that endogenous NR1D1 also binds to the *Il1 $\beta$*  promoter in BMDMs, thus showing that NR1D1 directly regulates *Il1 $\beta$*  expression (Figure 4E). In addition, impairment of NR1D1 direct DNA binding enhances *Il1 $\beta$*  gene expression (Figure 4F), which, together with the ChIP experiment results, suggests that NR1D1 directly inhibits *Il1 $\beta$*  gene transcription. Finally, NR1D2 knockdown did not affect *Il1 $\beta$*  gene expression in mouse macrophages (Figure 4G), but enhanced *Il1 $\beta$*  gene expression in human MDM (Supplementary Figure 4D), as well as IL1 $\beta$  and IL18 secretion (Supplementary Figure 4G and 4H). However, no synergistic effect with *Nr1d1* deficiency was observed, highlighting the redundant role of NR1D2 in the regulation of this pathway.

### Pharmacologic Activation of NR1D1 Inhibits the NLRP3 Inflammasome Pathway

Because *Nr1d1* deficiency enhances the NLRP3 inflammasome pathway, we hypothesized that ligand-mediated activation of NR1D1 inhibits NLRP3 expression and subsequent maturation of IL1 $\beta$ . Indeed, pharmacologic activation of NR1D1 with SR9009<sup>15</sup> down-regulated *Nlrp3* gene expression in LPS-primed BMDMs (Figure 5A) and lowered NLRP3 protein amount (Figure 5B and Supplementary Figure 8B). Similar effects were observed in SR9009- and hemin-stimulated human MDMs (Figure 5C and Supplementary Figure 8C). In addition, SR9009 and hemin activation of NR1D1 decreased *Il1 $\beta$*  and *Il18* mRNA levels (Figure 5D–5F and Supplementary Figure 8D and 8E), as well as IL1 $\beta$  and IL18 protein amount, maturation, and secretion (Figures 3E and 3F and 5G–5J) in BMDMs and human MDMs. Altogether, these results emphasize the pharmacologic potential of NR1D1 to control the inflammasome and pro-inflammatory pathways in innate immune cells.

### NR1D1 Attenuates NLRP3-Mediated Inflammation in Acute Peritonitis

We next determined whether NR1D1 regulates the NLRP3 inflammasome in vivo in an acute model of sterile

peritoneal inflammation. Mice were pretreated or not with the NLRP3 inhibitor MCC950 and challenged by intraperitoneal administration of LPS and alum to specifically activate the NLRP3 signaling pathway.<sup>47</sup> IL1 $\beta$  in the peritoneum and IL1 $\beta$  and IL18 plasma levels were higher in *Nr1d1*<sup>−/−</sup> compared to *Nr1d1*<sup>+/+</sup> mice, especially upon LPS-priming and alum activation of NLRP3 (Figure 6A–6C). Remarkably, this effect was totally abolished in the presence of MCC950 (Figure 6A–6C).

In response to infection or injection of LPS, macrophage cytokine secretion displays a circadian pattern with a higher response toward the end of the light phase compared to ZT0.<sup>8,20</sup> Accordingly, IL1 $\beta$  and IL18 secretion displayed daily variations in peritoneal exudates isolated from mice intraperitoneally challenged with LPS every 6 hours (Figure 6D and 6E). Pharmacologic activation of NR1D1 with SR10067 decreased IL1 $\beta$  and IL18 secretion in LPS-injected mice around the clock and reduced the time-of-day variations in LPS-stimulated cytokine secretion (Figure 6D and 6E) indicating that NR1D1 activation normalizes the daily fluctuations of the NLRP3 inflammasome pathway in conditions of an overstimulated inflammatory response. In addition, the higher IL1 $\beta$  secretion observed in LPS/alum-challenged *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice sacrificed at ZT8 was completely blunted when the peritonitis was induced 12 hours apart in mice that were sacrificed at ZT20 (Figure 6F), that is, when NR1D1 is nearly absent (Figure 6G), consistent with the concept that NR1D1 regulates the NLRP3 inflammasome pathway in a circadian manner. Altogether these data indicate that NR1D1 inhibits peritonitis through its action on the NLRP3 inflammasome in vivo.

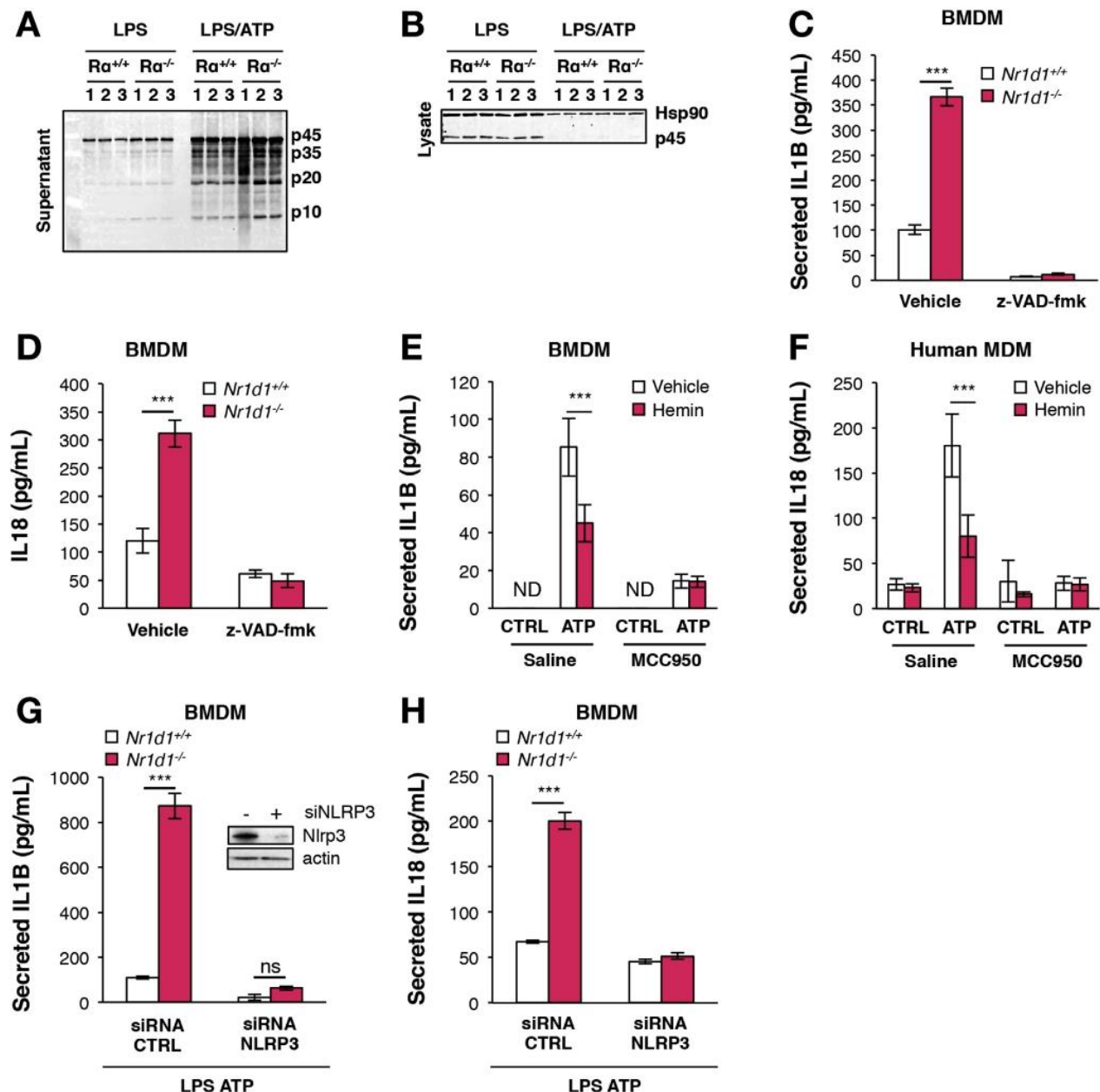
### NR1D1 Prevents NLRP3-Mediated Fulminant Hepatitis

Interestingly, the NLRP3 inflammasome is enhanced in MHV-3-induced viral FH,<sup>37</sup> and in LPS/D-GalN-induced acute liver failure.<sup>38</sup> In addition, low doses of LPS in combination with D-GalN increase NLRP3 protein and caspase-1 activity.<sup>38,42</sup> Therefore, we tested whether NR1D1 may ameliorate acute liver failure using this experimental setting.<sup>39</sup>

Strikingly, liver damage was strongly increased in LPS/D-GalN-injected *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice compared to littermate

**Figure 2.** NR1D1 directly regulates the NLRP3 inflammasome in macrophages. *Nlrp3* mRNA levels in control (CTRL) and LPS-primed (LPS) (A) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> and *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice and in (B) MDMs transfected with small interfering RNA (siRNA) against *Nr1d1* (siNr1d1) or a scrambled siRNA (siCTRL) (n = 3). Data are represented as means  $\pm$  SD. \*\*\*P < .001 as determined by 2-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Bonferroni post-hoc test. (C) ChIP analysis of NR1D1 occupancy to the *Nlrp3* promoter in control (vehicle) or LPS-primed (for 1 hour) BMDMs. The top diagram represents putative Rev-erb response elements (RevREs) unveiled by MatInspector promoter analysis. Down, ChIP analysis from 1 representative experiment. (D) ChIP analysis of H3K27me3 at the *Nlrp3* promoter in *Nr1d1*<sup>+/+</sup> and *Nr1d1*<sup>−/−</sup> BMDMs. (E) *Nlrp3* mRNA levels in BMDMs from *Nr1d1*<sup>Floxed/Floxed</sup>;LysM<sup>+/+</sup> (*Nr1d1*<sup>Floxed/Floxed</sup>) or *Nr1d1*<sup>Floxed/Floxed</sup>;LysM<sup>Cre/+</sup> (*Nr1d1*<sup>DBDmut</sup>) mice. (F) NLRP3 protein expression in control (CTRL) and LPS-primed ATP-activated (LPS ATP) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice (n = 3). Top, the Western blot and down, its quantification. \*\*\*P < .001 as determined by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. (G) ASC specks formation and (H) its quantification in LPS-primed BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> and *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice treated with ATP, nigericin, or vehicle (CTRL). Results are presented as mean percentage of cells displaying ASC specks  $\pm$  SD. \*P < .05; \*\*\*P < .001 as determined by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. (I) *Nlrp3* mRNA levels in BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> and *Nr1d1*<sup>−/−</sup> mice transfected with siRNA against *Nr1d2* (siNr1d2) or a scrambled siRNA (siCtrl) (n = 3). Data are represented as means  $\pm$  SD. \*\*\*P < .001 as determined by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test.

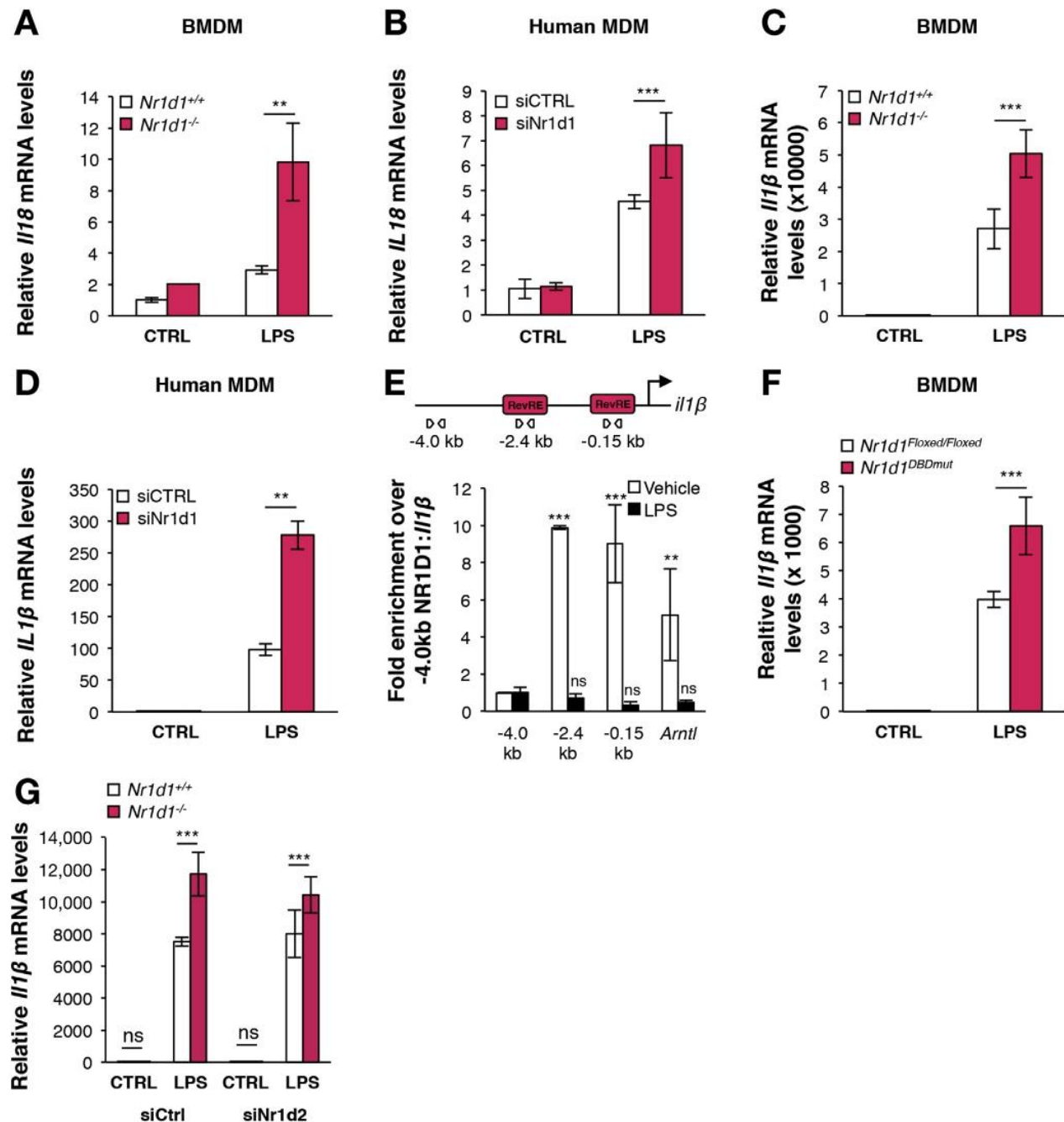




**Figure 3.** NR1D1 regulates IL18 and IL1B maturation and secretion in a NLRP3 inflammasome-dependent manner. Caspase-1 protein (sub-unit p10, p20), its intermediate maturation product (p35), and the immature form (p45) expression in supernatant (A) or lysate (B) from LPS-primed (LPS) and ATP-activated (LPS/ATP) or not (*/*) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> (*Ra*<sup>+/+</sup>) and *Nr1d1*<sup>-/-</sup> (*Ra*<sup>-/-</sup>) mice (representative of 3 independent experiments). (C) IL1B and (D) IL18 secreted by LPS-primed and ATP-activated BMDMs isolated from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice that were treated with low dose of caspase inhibitor z-VAD-fmk (z-VAD-fmk) or not (vehicle) (*n* = 3). (E) IL1B secreted by LPS-primed and ATP activated (ATP) or not (CTRL) BMDMs treated with (hemin) or its vehicle (vehicle) and with NLRP3 inhibitor MCC950 or not (saline) (*n* = 3). (F) IL18 secreted by LPS-primed and ATP-activated (ATP) or not (CTRL) MDMs treated with (hemin) or its vehicle (vehicle) and with NLRP3 inhibitor MCC950 or not (saline) (*n* = 3). (G) IL1B and (H) IL18 secreted by LPS-primed and ATP-activated BMDMs isolated from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice in which NLRP3 was silenced (small interfering RNA [siRNA] NLRP3) or not (siRNA CTRL) (*n* = 3). The top Western blot (G) shows NLRP3 protein silencing. Data are represented as means  $\pm$  SD. \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test.

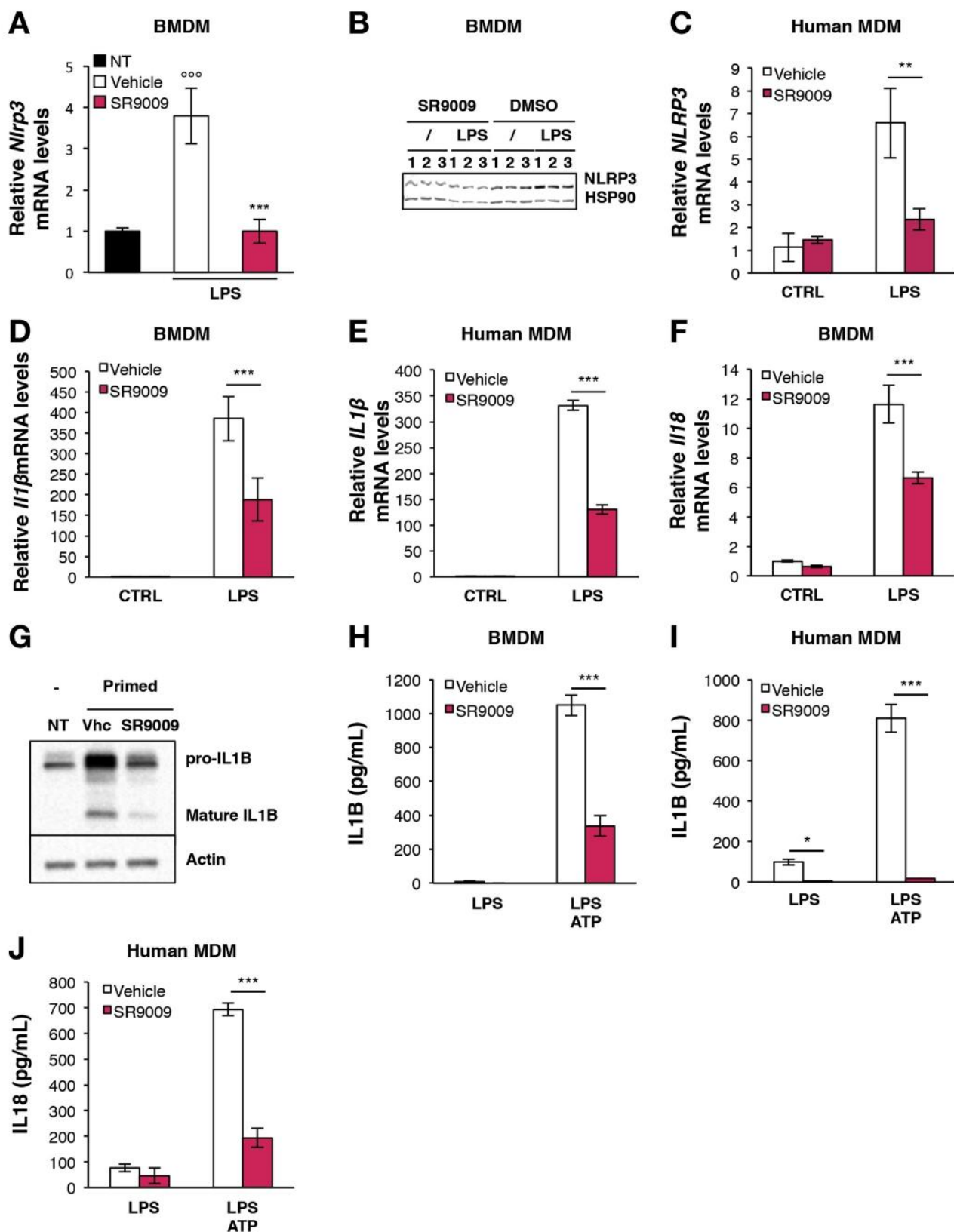
controls, while NLRP3 inhibition by MCC950 treatment protected *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice from liver failure (Figure 7A and 7B). NR1D1 deletion induced hepatic *F4/80* and *Ccl2* gene expression suggesting enhanced macrophage infiltration

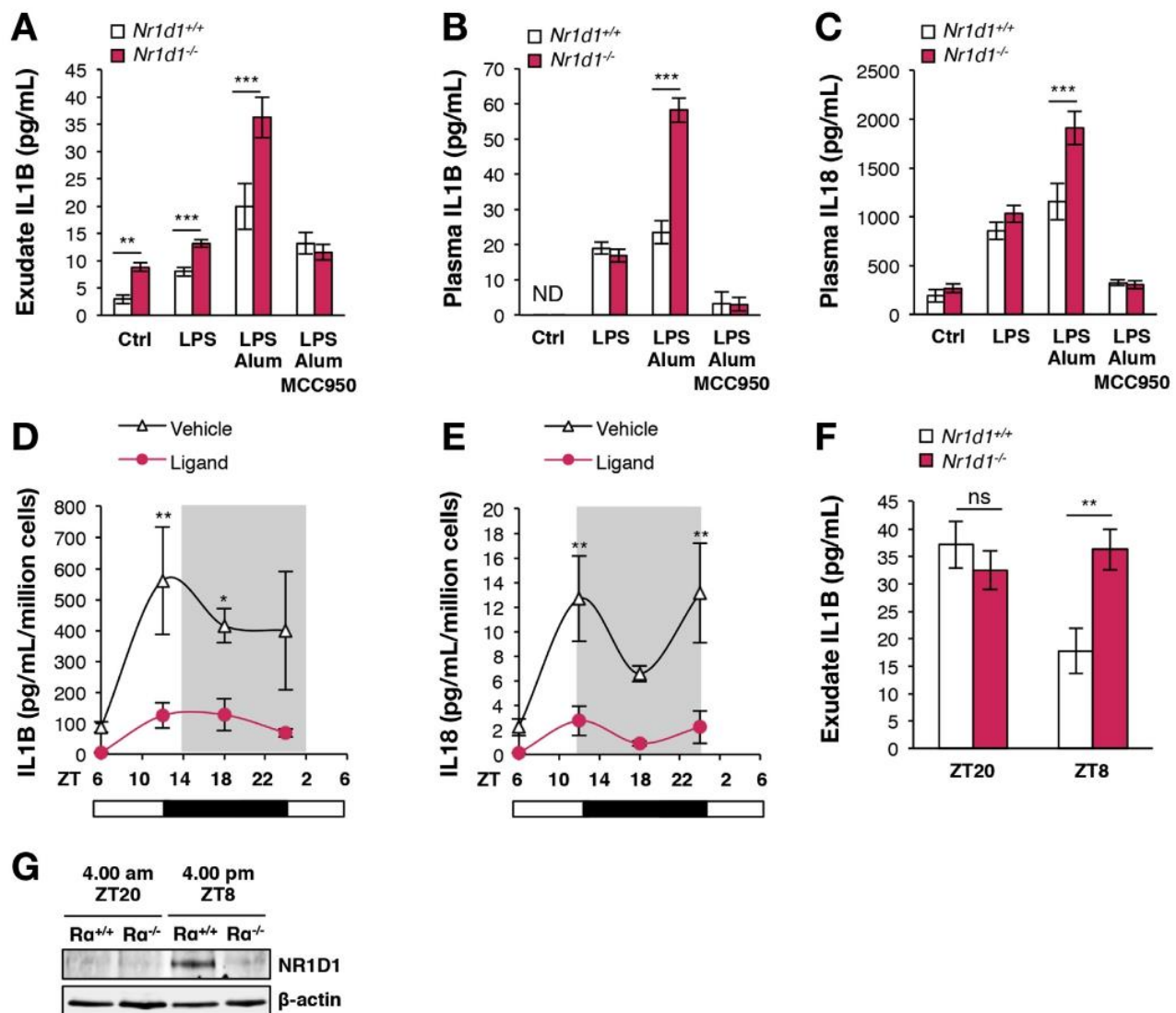
(Figure 7C and Supplementary Figure 11A). Finally, the induction of caspase-1 activity (Figure 7D), liver *Nlrp3* and *Il1 $\beta$*  gene expression, and IL1B secretion (Figure 7E and 7F and Supplementary Figure 11B) by LPS/D-GalN treatment,



**Figure 4.** NR1D1 regulates IL18 and IL1 $\beta$  expression. (A–D) *Il18* (A, B), and *Il1β* (C, D) mRNA levels in LPS-primed BMDMs isolated from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice (A, C) and in LPS-primed human MDMs transfected with small interfering RNA (siRNA) against *Nr1d1* (siNr1d1) or a scrambled siRNA (siCTRL) (B, D) (n = 3). Data are represented as means  $\pm$  SD. \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. (E) ChIP analysis of NR1D1 occupancy at the *Il1β* and *Arntl* promoter (as control) in control (vehicle) or LPS-primed (for 1 hour) BMDMs (n = 3). The top diagram represents putative Rev-erb response elements (RevREs) unveiled by MatInspector promoter analysis. Data are represented as means  $\pm$  SD. \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by an unpaired *t* test. *Il1β* mRNA levels in LPS-primed (F) BMDMs isolated from *Nr1d1*<sup>Floxed/Floxed</sup>;LysM<sup>+/+</sup> (*Nr1d1*<sup>Floxed/Floxed</sup>) or *Nr1d1*<sup>Floxed/Floxed</sup>;LysM<sup>Cre/+</sup> (*Nr1d1*<sup>DBDmut</sup>) mice and (G) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> and *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice transfected with siRNA against *Nr1d2* (siNr1d2) or a scrambled siRNA (siCtrl) (n = 3). Data are represented as means  $\pm$  SD. \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test.





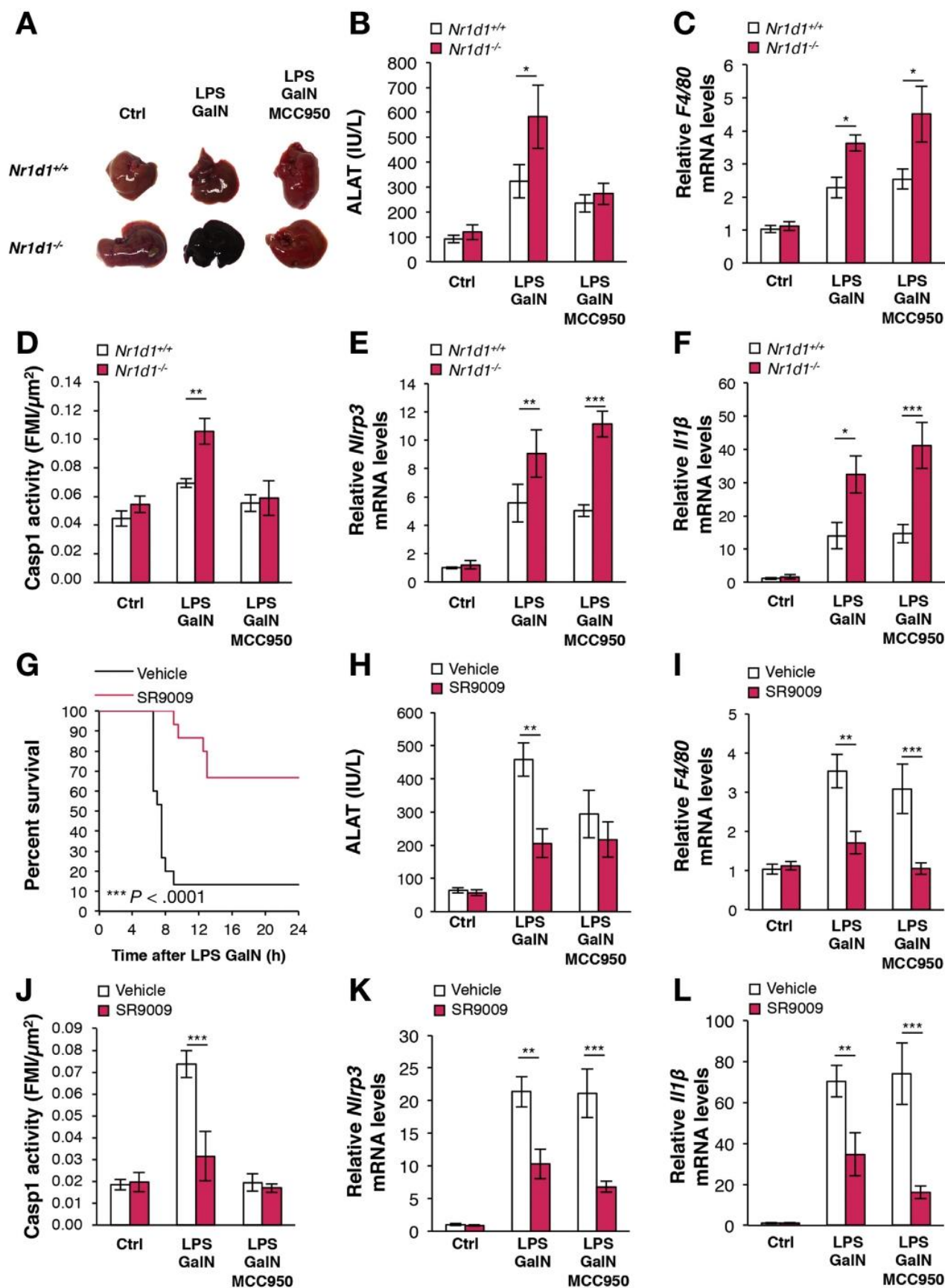


**Figure 6.** NR1D1 modulates the development of acute innate inflammation through regulation of the NLRP3 inflammasome in a peritonitis model. (A) Secreted IL1B from peritoneal lavage of *Nr1d1<sup>+/+</sup>* or *Nr1d1<sup>-/-</sup>* mice treated with LPS, LPS + Alum, LPS + Alum + MCC950 or not (Ctrl) at ZT8 (n = 6–12). (B) Plasma IL1B and (C) IL18 from *Nr1d1<sup>+/+</sup>* or *Nr1d1<sup>-/-</sup>* mice treated as in (A) (n = 6–12). (D) Secreted IL1B and (E) IL18 from peritoneal macrophages isolated around the clock from LPS-stimulated mice treated with SR10067 (ligand) or vehicle (n = 10). (F) Secreted IL1B from peritoneal lavage at ZT8 and ZT20 of *Nr1d1<sup>+/+</sup>* or *Nr1d1<sup>-/-</sup>* mice treated with LPS + Alum (n = 6–12). Data are represented as means  $\pm$  SEM. \**P* < .05; \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test. (G) NR1D1 protein expression in CD11b<sup>+</sup> PECs at ZT8 and ZT20 of *Nr1d1<sup>+/+</sup>* (*Ra<sup>+/+</sup>*) or *Nr1d1<sup>-/-</sup>* (*Ra<sup>-/-</sup>*) mice treated with LPS + Alum (n = 6–12).

was further enhanced upon *Nr1d1* deficiency. *TNF $\alpha$*  is enhanced in FH and plays an important role in the regulation of innate inflammatory responses. We thus verified

whether the *TNF $\alpha$*  pathway alters the *Nr1d1*-mediated regulation of the NLRP3 inflammasome pathway. As expected, hepatic *TNF $\alpha$*  gene expression was increased in

**Figure 5.** NR1D1 pharmacologic activation inhibits the NLRP3 inflammasome pathway in primary macrophages. (A) *Nlrp3* mRNA levels in LPS-primed (LPS) or not (NT) BMDMs treated with SR9009 (n = 3). (B) NLRP3 protein levels in LPS-primed (LPS) or not (NT) BMDMs treated with SR9009 or dimethyl sulfoxide (DMSO) (representative of 3 independent experiments). (C) *NLRP3* and (E) *IL1 $\beta$*  mRNA levels in LPS-primed human MDMs pretreated with SR9009 or not (vehicle) (n = 3). (D) *IL1 $\beta$*  and (F) *IL18* mRNA levels in LPS-primed BMDMs pretreated or not with SR9009 (n = 3). (G) Pro- and matured IL1B protein expression in LPS-primed BMDM or not (NT) and treated with SR9009 or not (Vhc). (H) IL1B secretion in LPS-primed and ATP-activated BMDMs pretreated with SR9009 or not (vehicle) (n = 3) (I) IL1B and (J) IL18 secretion in LPS-primed and ATP-activated human MDMs pretreated with SR9009 or not (Vehicle) (n = 3). Data are represented as means  $\pm$  SD. \*\*\**P* < .001 in LPS vs unstimulated vehicle condition (A); \**P* < .05; \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by 1-way analysis of variance (ANOVA) (A) or 2-way ANOVA (C–F, H–J) followed by a Bonferroni post-hoc test.





LPS/D-GalN-challenged mice. However, it was not affected by *NR1D1* deletion (Supplementary Figure 11C). In addition, although TNF $\alpha$  treatment enhances *Il1 $\beta$*  and *Nlrp3* gene expression in BMDM, *Nr1d1* deficiency did not affect the effect of TNF $\alpha$  on this pathway (Supplementary Figure 11D and 11E). We next assessed whether NR1D1 activation can inhibit FH. As expected, control mice died 6.5 hours after LPS/D-GalN injection at ZT2 and approximately 90% were dead by 9 hours. Strikingly, SR9009-treated mice lived longer compared to vehicle-treated mice and the majority of mice survived from FH (approximately 70% survival rate of SR9009 pretreated mice) (Figure 7G). The increased survival rate upon SR9009 treatment was associated with decreased LPS/D-GalN-induced hepatic hemorrhage (Supplementary Figure 11F). SR9009 pretreatment strongly decreased the induction of alanine aminotransferase, a marker of hepatic dysfunction, by LPS/D-GalN (Figure 7H) and improved liver appearance (Supplementary Figure 11G). In addition, SR9009 prevented the increase of hepatic *F4/80* (Figure 7I) and *Ccl2* (Supplementary Figure 11I) gene expression, caspase-1 activity (Figure 7J), hepatic *Nlrp3* and *Il1 $\beta$*  gene expression (Figure 7K and 7L), and IL1B blood levels (Supplementary Figure 11H) after LPS/D-GalN injection. It is noteworthy that co-treatment with MCC950 and SR9009 resulted in similar, but not additive, effects on alanine aminotransferase activity and inflammasome pathway gene expression compared to treatment with MCC950 or SR9009 alone, indicating that NLRP3 mediates the effect of NR1D1 on these parameters (Figure 7 and Supplementary Figure 11). In addition, SR9009 treatment did not alter LPS/D-GalN-induced *Tnf $\alpha$*  gene expression in liver (Supplementary Figure 11J). Finally, SR9009, but not MCC950, decreased the total number of hepatic leukocytes recruited upon LPS/D-GalN injection (Supplementary Figure 12A). More precisely, we performed fluorescence-activated cell sorting analysis, which demonstrates that SR9009 impaired the recruitment of infiltrating monocytes and macrophages (Supplementary Figure 12B–12E), as well as the hepatic recruitment of neutrophils (Supplementary Figure 12F and 12G). As expected, SR9009, but not MCC950, inhibited *Nlrp3*, *Il1 $\beta$* , and *Il18* gene expression in hepatic *F4/80*<sup>+</sup> cells isolated from LPS/D-GalN-challenged mice (Supplementary Figure 12H–12J). Our results indicate that NR1D1 activation improves mice survival during LPS/D-GalN-induced FH by decreasing CCL2-mediated hepatic infiltration of innate immune cells and by inhibiting the activation of the NLRP3 inflammasome pathway.

## Discussion

The nuclear receptors NR1D1 and NR1D2 are now considered as core components of the clock machinery. Indeed, *Nr1d1* deficiency leads to a circadian period shortening by a half hour. Although this triggers a subtle activity phase shift compared to wild-type mice after 1 subjective day, this results in a dramatic shift after a prolonged period.<sup>12,48</sup> Interestingly, whereas *NR1D2* deletion alone does not trigger any effect on the circadian activity in mice, the circadian activity of *Nr1d1*<sup>-/-</sup>*Nr1d2*<sup>-/-</sup> mice is abolished, emphasizing the redundant activity of both nuclear receptors in this context.<sup>12</sup> Because their expression itself displays daily variations, NR1D1 and NR1D2 drive oscillatory expression of their target genes involved, for instance, in hepatic lipid synthesis and storage,<sup>11,12</sup> bile acid synthesis,<sup>13</sup> and thermogenesis.<sup>18</sup> In addition to its role in the control of metabolism, *Nr1d1*'s circadian pattern also has an important impact on the daily behavior of the immune system by controlling the circadian variations in cytokine expression, such as MCP-1/CCL2 and IL-6 in mouse macrophages.<sup>20</sup> We provide here new insights on the regulatory role of NR1D1 in circadian immunity in human and mouse primary macrophages.

Our results identify NR1D1 as a novel regulator of the NLRP3 inflammasome, driving circadian rhythmicity in its expression, activation, and ensuing IL1B and IL18 maturation and secretion (Supplementary Figure 13). We demonstrate that *NR1D1* deletion or silencing in primary mouse and human MDMs results in exacerbated NLRP3-dependent IL1B and IL18 production. Our results further show that NR1D1 attenuates NLRP3-driven inflammation in vivo in models of acute peritonitis and FH and demonstrate that pharmacologic NR1D1 activation reduces NLRP3 expression and IL1B and IL18 production by macrophages, presenting a promising strategy to treat NLRP3-dependent inflammatory diseases.

Compared to other inflammasomes, NLRP3 is activated by a plethora of signals of different biological origin, such as bacterial, fungal and viral pathogens, pore-forming toxins, crystals, aggregates ( $\beta$ -amyloid) and DAMPs (ATP).<sup>24</sup> As such, NLRP3 is a key platform centralizing the detection of different signals to activate pro-inflammatory cytokine maturation and secretion. Because of this central role, a better understanding of the mechanisms that govern NLRP3 inflammasome activation is an important step toward the development of novel therapeutic strategies to combat

**Figure 7.** NR1D1 prevents the development of FH through regulation of the NLRP3 inflammasome. (A–F) *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice were pretreated with MCC950 or saline and then intraperitoneally injected with LPS plus D-GalN or phosphate-buffered saline as control (Ctrl). (A) Representative liver appearance, (B) serum alanine aminotransferase (ALT) activity, (C) liver *F4/80* mRNA levels, (D) caspase-1 activity in tissue sections (fluorescence mean intensity [FMI]) and (E) *Nlrp3* and (F) *Il1 $\beta$*  mRNA levels in liver from each group as described. Data are represented as means  $\pm$  SEM (n = 5–11). \**P* < .05; \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-hoc test. (G–L) C57/Bl6 mice were pretreated with SR9009 or vehicle and/or MCC950 and then challenged with LPS/D-GalN or phosphate-buffered saline as control (Ctrl) as indicated. (G) Kaplan-Meier survival curve of mice challenged with LPS/D-GalN at ZT2 (n = 15 per group). \*\*\**P* < .0001 as determined by log-rank test. (H) Serum ALT activity, (I) liver *F4/80* mRNA levels, (J) caspase 1 activity in tissue sections, and (K) *Nlrp3* and (L) *Il1 $\beta$*  mRNA levels in liver from each group as described. Data are represented as means  $\pm$  SEM (n = 5–6) \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test.



overactivation of the immune system. Circadian regulation of immunity has been proposed as a mechanism to prepare the organism for a higher risk of tissue damage and infection during the active phase and as a process to anticipate the regeneration of the immune system during the resting phase.<sup>3</sup> Our data demonstrate for the first time that the molecular clock controls the NLRP3 inflammasome and subsequent cytokine responses in activated macrophages, hence supporting the idea that the circadian clock not only regulates oscillations in blood leukocyte trafficking,<sup>7</sup> but is also involved in the very first step of the immune response, such as pro-inflammatory signal sensing.

The response to pro-inflammatory stimuli such as LPS depends on the time of pro-inflammatory challenge.<sup>8,20</sup> In line, our data demonstrate that FH severity depends on the induction time (Figure 1). Accordingly, treatment of mice at ZT8 leads to a more pronounced secretion of IL1B and IL18 than at ZT20 (Figure 6), which is inversely correlated with NR1D1 expression (Figure 1). Because the enhanced immune response at ZT10–ZT12 is also responsible for a higher risk of septic shock and death, a well-balanced circadian immunity appears to be essential to preserve immune homeostasis.<sup>3</sup> In this context, it is important that *Nr1d1* activity can be modulated by small synthetic molecules.<sup>49</sup> Here, we show that pharmacologic activation of NR1D1 has the potential to restrain immune responses at specific times of the day (Figure 6).

IL1B secretion has been shown to oscillate diurnally with a peak during the onset of the active phase.<sup>50</sup> Our data obtained on mouse peritoneum corroborate this finding (Figure 1G), and we additionally show that secretion of IL18, the other IL1 family member matured by the NLRP3 inflammasome pathway, also displays daily fluctuations in macrophages isolated from the peritoneum (Figure 1F). According to our data obtained from synchronized isolated human and mouse macrophages, we suggest that these oscillations are due mainly to the internal clock machinery of macrophages themselves (Figure 1 and Supplementary Figures 1 and 2). It is noteworthy that despite the fact that *Il1β* and *Il18* gene expression was not in phase at the transcriptional level (Figure 1D and 1E), IL1B and IL18 secretion oscillates with the same peaks and nadirs (Figure 1F and 1G), suggesting that the mere regulation of cytokine gene transcription is not sufficient to account for the daily fluctuations of cytokine levels, and that an additional step, namely post-translational modifications and maturation, is required to modulate this circadian pattern. In our study, *Nlrp3* expression oscillates around the clock under the control of NR1D1, supporting the idea that NLRP3 circadian rhythmicity may account for the daily pattern of IL1B and IL18 secretion.

Although the priming of *Nlrp3* expression is known as a key step of the inflammatory response,<sup>51,52</sup> the transcriptional control of *Nlrp3* is poorly understood. Here, we demonstrate that *Nr1d1* deficiency strongly alters *Nlrp3*, *Il1β*, and *Il18* expression in unstimulated, but also in LPS-challenged, peritoneal macrophages and in injured livers from LPS/D-GalN-treated mice (Figures 1 and 7). In addition, NR1D1 controls NLRP3 complex assembly, caspase-1

maturation of pro-IL1B and pro-IL18 and their secretion in response to NLRP3 priming and activation in both human and murine primary macrophages. Thus, NR1D1 acts through a 2-pronged mechanism, acting at the transcriptional level to repress *Nlrp3*, *Il1β*, and *Il18* gene expression, and by modulating IL1B and IL18 protein maturation and secretion through the activation of the inflammasome complex and caspase-1.

Aberrant activation of the NLRP3 inflammasome is implicated in the pathogenesis of numerous diseases, including type 2 diabetes, atherosclerosis, gout, rheumatoid arthritis, and kidney diseases,<sup>24,34,36,45</sup> some of which have also been linked to disruption of the clock.<sup>3</sup> Our study points to NR1D1 as a plausible link between a dysregulated clock and NLRP3-driven pathologies. Indeed, *NR1D1* deletion led to an exacerbated response to acute inflammation, such as sterile peritonitis (Figure 6A–6C) and drug-induced FH (Figure 7), for which no therapy other than liver transplantation is effective at improving patient survival. Current treatments for NLRP3-dependent diseases include IL-1–targeting strategies<sup>53</sup> and glyburide.<sup>54</sup> We now show that Rev-erb activation protects against acute liver failure and improves the survival rate in a mouse model of FH (Figure 7 and Supplementary Figure 11), identifying NR1D1 as a novel therapeutic target for the treatment of FH. It is noteworthy that, compared to MCC950, which inhibits NLRP3, NR1D1 targets not only the NLRP3 inflammasome, but also *Ccl2* expression (Supplementary Figure 12), macrophage infiltration (Figure 7, Supplementary Figure 12), and likely LPS signaling through TLR4 regulation,<sup>22</sup> and therefore may lead to a stronger efficiency compared to the mere inhibition of the NLRP3 pathway and IL1 maturation by MCC950. In conclusion, NR1D1 represents an interesting target to control the DAMP-mediated NLRP3-dependent inflammatory process in a circadian manner.

## Supplementary Material

Note: To access the supplementary material accompanying this article, visit the online version of *Gastroenterology* at [www.gastrojournal.org](http://www.gastrojournal.org), and at <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.019>.

## References

- Cardoso FS, Marcelino P, Bagulho L, et al. Acute liver failure: an up-to-date approach. *J Crit Care* 2017;39: 25–30.
- Bass J. Circadian topology of metabolism. *Nature* 2012; 491:348–356.
- Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, et al. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 2014;40: 178–186.
- Early JO, Curtis AM. Immunometabolism: Is it under the eye of the clock? *Semin Immunol* 2016;28: 478–490.
- Man K, Loudon A, Chawla A. Immunity around the clock. *Science* 2016;354:999–1003.



6. Gibbs J, Ince L, Matthews L, et al. An epithelial circadian clock controls pulmonary inflammation and glucocorticoid action. *Nat Med* 2014;20:919–926.
7. Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, et al. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 2008;452:442–447.
8. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, et al. Circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* 2013;341:1483–1488.
9. **Scheiermann C, Kunisaki Y**, Lucas D, et al. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity* 2012;37:290–301.
10. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, et al. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol* 2010;185:5796–5805.
11. Bugge A, Feng D, Everett LJ, et al. Rev-erbalpha and Rev-erbbeta coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev* 2012;26:657–667.
12. Cho H, Zhao X, Hatori M, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB-alpha and REV-ERB-beta. *Nature* 2012;485:123–127.
13. Duez H, van der Veen JN, Duhem C, et al. Regulation of bile acid synthesis by the nuclear receptor Rev-erbalpha. *Gastroenterology* 2008;135:689–698.
14. Raspe E, Duez H, Mansen A, et al. Identification of Rev-erbalpha as a physiological repressor of apoC-III gene transcription. *J Lipid Res* 2002;43:2172–2179.
15. **Solt LA, Wang Y**, Banerjee S, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 2012;485:62–68.
16. Yin L, Wu N, Curtin JC, et al. Rev-erbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways. *Science* 2007;318:1786–1789.
17. **Woldt E, Sebti Y, Solt LA**, et al. Rev-erb-alpha modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med* 2013;19:1039–1046.
18. Gerhart-Hines Z, Feng D, Emmett MJ, et al. The nuclear receptor Rev-erbalpha controls circadian thermogenic plasticity. *Nature* 2013;503:410–413.
19. Bellet MM, Deriu E, Liu JZ, et al. Circadian clock regulates the host response to *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:9897–9902.
20. **Gibbs JE, Blaikley J**, Beesley S, et al. The nuclear receptor REV-ERBalpha mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:582–587.
21. **Keller M, Mazuch J**, Abraham U, et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:21407–21412.
22. Fontaine C, Rigamonti E, Pourcet B, et al. The nuclear receptor Rev-erbalpha is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol Endocrinol* 2008;22:1797–1811.
23. Lam MT, Cho H, Lesch HP, et al. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* 2013;498:511–515.
24. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 2014;157:1013–1022.
25. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:821–832.
26. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, et al. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015;349:316–320.
27. Naik E, Dixit VM. Modulation of inflammasome activity for the treatment of auto-inflammatory disorders. *J Clin Immunol* 2010;30:485–490.
28. Munoz-Planillo R, Kuffa P, Martinez-Colon G, et al. K(+) efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* 2013;38:1142–1153.
29. Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011;12:222–230.
30. Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, et al. The adaptor MAVS promotes NLRP3 mitochondrial localization and inflammasome activation. *Cell* 2013;153:348–361.
31. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 2011;469:221–225.
32. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 2013;13:397–411.
33. **Duewell P, Kono H**, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010;464:1357–1361.
34. Masters SL, Latz E, O'Neill LA. The inflammasome in atherosclerosis and type 2 diabetes. *Sci Transl Med* 2011;3:81ps17.
35. Sheedy FJ, Grebe A, Rayner KJ, et al. CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nat Immunol* 2013;14:812–820.
36. Vande Walle L, Van Opdenbosch N, Jacques P, et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature* 2014;512:69–73.
37. **Guo S, Yang C**, Diao B, et al. The NLRP3 inflammasome and IL-1beta Accelerate immunologically mediated pathology in experimental viral fulminant hepatitis. *PLoS Pathog* 2015;11:e1005155.
38. Seo MJ, Hong JM, Kim SJ, et al. Genipin protects d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury through suppression of the necroptosis-mediated inflammasome signaling. *Eur J Pharmacol* 2017;812:128–137.
39. Furuya S, Kono H, Hara M, et al. Interleukin 17A plays a role in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatic injury in mice. *J Surg Res* 2015;199:487–493.
40. Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, et al. Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. *Hepatology* 2001;33:1441–1450.



53. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:633–652.
54. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol* 2009;187:61–70.

Received December 8, 2016. Accepted December 19, 2017.

Address requests for reprints to: Hélène M. Duez, PhD or Benoît Pourcet, PhD, Institut National de La Santé et de la Recherche Médicale UMR1011, Institut Pasteur de Lille, 01 rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille, France. e-mail: [helene.duez@pasteur-lille.fr](mailto:helene.duez@pasteur-lille.fr) or [benoit.pourcet@pasteur-lille.fr](mailto:benoit.pourcet@pasteur-lille.fr); fax: +33 3 20 87 73 60.

**Acknowledgments**

The authors thank Sami Lasri and Emmanuelle Vallez for their technical assistance. We also thank John Walker for overseeing the chemical synthesis of SR909 and SR10067 and the BiCel Facility for access to systems and technical advice. Author contributions: BP, MZ, and HMD conceived the project, designed and performed experiments, analyzed the results and wrote the manuscript. LF and JB performed key experiments, analyzed the results and read the manuscript. SS, CB, and TPB designed and performed key experiments, analyzed the results, and read the manuscript. SD, JV, AM-L, QT, DD, CD, AB, YS, and SL performed experiments and read the manuscript. JH performed cosinor analysis. JE analyzed ChIP sequencing and 5'GRO sequencing databases and read the manuscript. SD was in charge of the mouse colonies and read the manuscript. BS discussed the experiments and read the manuscript. B. Pourcet and M. Zecchin contributed equally to this work.

**Conflicts of interest**  
The authors disclose no conflicts.

This work was supported by research grants from Région Nord Pas-de-Calais (to BP), Fondation pour la Recherche Médicale FRM (FDT20170739031) (to MZ), Fédération Francophone de Recherche sur le Diabète, sponsored by Fédération Française des Diabétiques, AstraZeneca, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme, Novo Nordisk & Sanofi (to HMD), Fondation de France (to HMD), Région Nord-Pas-de-Calais (CPER) starting grant (to HMD), the European Commission (FP7-HEALTH) consortium Eurhythmia (grant number 278397) (to BS and HMD), the European Genomic Institute for Diabetes (ANR-10-LABX-46) (to HMD and BS), an unrestricted ITMO/Astra Zeneca grant (to BS), and from the American Heart Association (to SS; 14PRE1826000) and the National Institutes of Health (to TPB; MH093429). Grants were received from ALMAvasCal (ANR-16-CE14-0001-01) and the Foundation Leducq (LEAN) to BS. BS is a recipient of an Advanced ERC grant (694717).



## Supplementary Experimental Procedures

### Mice

The wild-type C57/Bl6 8-week-old female mice used for pharmacologic investigations were purchased from Charles River (Orléans, France). *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice were obtained from B. Vennström and backcrossed for 8 generations with sv129 mice. *Nr1d1*<sup>DBDmut</sup> floxed mice were obtained from the Institut Clinique de la Souris (Illkirch, France) and characterized elsewhere.<sup>1</sup> Myeloid-specific *Nr1d1*<sup>DBDmut</sup> mice were generated by breeding C57/Bl6 *Nr1d1*<sup>DBDmut</sup> fl/fl mice with LysM<sup>Cre/+</sup> mice from the Jackson Laboratory (<https://www.jax.org/>). Mice were housed in a 12-hour:12-hour light to dark cycle and fed a chow diet ad libitum. All animal procedures conducted at Lille were approved by the local ethics committee (CEE75). Mouse experimentation performed in wild-type mice at St Louis University were approved by the St Louis University Institutional Animal Care and Use Committee.

### Circadian Rhythm

*Nr1d1*<sup>-/-</sup> and *Nr1d1*<sup>+/+</sup> mice were sacrificed around the clock every 4 hours (ZT0 light on, ZT4, ZT8, and ZT12; light off, ZT16, ZT20, and ZT24). Peritoneal lavage was performed with 1× phosphate-buffered saline (PBS) (4 mL Dulbecco's PBS 10×, 14200-067; Gibco, Life Technology, Gaithersburg, MD) and then cells were recovered by centrifugation at 600g for 10 minutes. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for IL1B and IL18 was performed using the supernatant. Exudates were concentrated using Amicon 3K (Merck Millipore, Billerica, MA) and CD11b<sup>+</sup> PECs were purified using CD11b magnetic beads according to the manufacturer protocol (130-041-801, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). RNA from CD11b<sup>+</sup> cells were extracted and analyzed as described here.

### Bone Marrow-Derived Macrophages

Bone marrow hematopoietic stem cells were isolated from tibia and femur of mice. They were cultured during 1 week in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) without phenol red (ref 31053-028; Gibco, Life Technology) supplemented with gentamycin (0.4%), L-glutamine (1%; Sigma-Aldrich, Lyon, France), 20% L929-conditioned medium containing macrophage colony-stimulating factor and 20% fetal bovine serum (FBS). If applicable, cells were pretreated overnight either with hemin (H9039; Sigma-Aldrich) (6 μmol/L) or SR9009 (cat 554726; Merck Millipore) (10 μmol/L) and then co-treated with LPS.

For RNA analysis, macrophages were cultured 3 hours with LPS (isotype 0111:B4; Sigma-Aldrich) (100 ng/mL) or 3, 6, or 24 hours with recombinant murine TNFα (315-01A, Peprotech, Rocky Hill, NJ) (50 ng/mL) in DMEM containing 10% FBS. For enzyme-linked immunosorbent assay, macrophages were first primed with LPS (500 ng/mL) in DMEM containing 10% FBS during 3 hours and then activated for 2 hours with ATP pH7 (A2383, Sigma-Aldrich) (5 mmol/L) in

optiMEM + Glutamax (reduced serum medium, 51985-034; Gibco, Life Technology). When applicable, macrophages were treated with MCC950 (CRID3, CP-456773 sodium salt, P20280; Sigma Aldrich) (100 nmol/L), Z-VAD-fmk (20 μmol/L) or z-YVAD-fmk (20 μmol/L) 30 minutes before ATP treatment. For AIM2 inflammasome, cells were treated with poly(dA:dT)/LyoVec (tlrl-patc; Invivogen, San Diego, CA) (2 μg/mL) during 24 hours. The supernatants were collected, cleared by centrifugation, and analyzed by ELISA using mouse IL1B (BMS6002TWO, Platinum ELISA Affymetrix; eBioscience, San Diego, CA) and mouse IL18 (BMS618/3, Platinum ELISA Affymetrix; eBioscience) kits according to the manufacturer's instructions.

### Knockdown of NLRP3 in Bone Marrow-Derived Macrophages

Experiment were performed as described previously.<sup>2</sup> Briefly, 2 × 10<sup>6</sup> differentiated BMDMs were electroporated with *nlrp3* siRNA or control (CTRL) siRNA (smart-pool; Dharmacon, Lafayette, CO) using Nucleofector V (Lonza, Basel, Switzerland).

### Knockdown of NR1D2 in Bone Marrow-Derived Macrophages

Experiment were performed as described previously.<sup>2</sup> Briefly, 2 × 10<sup>6</sup> differentiated BMDMs were electroporated with *rev-erbβ* siRNA or control (CTRL) siRNA (4390817; Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA) using Nucleofector V (Lonza).

### Human Monocyte-Derived Macrophages

Human peripheral blood mononuclear cells were isolated from blood of healthy donors by Ficoll density gradient centrifugation. After 7 days of culture in RPMI 1646 (31870-025; Gibco, Life Technology) with gentamycin (40 μg/mL), L-glutamine (2 mmol/L) (Sigma-Aldrich), 10% of human serum and macrophage colony-stimulating factor (30 ng/mL) (216-MC/CF; R&D Systems, Minneapolis, MN), monocytes were differentiated into macrophages. If applicable, cells were pretreated overnight either with hemin (H9039; Sigma-Aldrich) (6 μmol/L) or SR9009 (cat 554726; Merck Millipore) (10 μmol/L) and then co-treated with LPS.

For RNA analysis, macrophages were cultured with LPS only (100 ng/mL) (L2654, *Escherichia coli* 026:B6; Sigma-Aldrich) in DMEM during 3 hours.

For ELISA, macrophages were first primed 2 hours with LPS (500 ng/mL) in DMEM and then activated for 1 hour with ATP (A2383; Sigma-Aldrich) (5 mmol/L) in optiMEM + Glutamax (reduced serum medium, 51985-034; Gibco, Life Technology). Macrophages were treated with MCC950 (CRID3, CP-456773 sodium salt, P20280; Sigma Aldrich) (100 nmol/L) 30 minutes before ATP treatment. The supernatants were collected, cleared by centrifugation, and analyzed using human IL1B (BMS224/2, Platinum ELISA Affymetrix; eBioscience) and human IL18 (BMS267/2, Platinum ELISA Affymetrix; eBioscience and ultrasensitive kit 7625; MBL, Woburn, MA) kits according to the manufacturer's instructions.



### Knockdown of NR1D1 in Monocyte-Derived Macrophages

NR1D1 was silenced using a siRNA against NR1D1 gene NR1D1 (ref: 1027310; Life Technology) (100 nM) in RPMI containing the transfecting Dharmafect 4 (T-2004-03; Dharmacon) (100 µg/mL).

### Knockdown of NR1D2 in Monocyte-Derived Macrophages

NR1D2 was silenced using siRNA against NR1D2 gene NR1D2 (43 90 380; Ambion by Life Technologies) (20 nmol/L) in RPMI containing the transfecting Dharmafect 4 (T-2004-03; Dharmacon) (100 µg/mL).

### Synchronized Cells

BMDMs or MDMs were synchronized during 2 hours in 50% horse serum. Cells were washed with their respective prewarmed medium, and incubated for 24 hours in their respective medium (RPMI 10% human serum for MDMs and DMEM 10% fetal calf serum for BMDMs) and stopped every 4 hours from 24 hours to 48 hours after synchronization. Cells were primed with LPS (L2654, *E coli* 026:B6; Sigma-Aldrich) (200 ng/mL) for 3 hours before washing and adding TRIzol (Ambion, Life Technology).

### Messenger RNA Analysis

RNAs were isolated from cells using TRIzol reagent were reverse transcribed (4368814; Applied Biosystem) and complementary DNAs were quantified by quantitative polymerase chain reaction (#600882; Stratagene, San Diego, CA) on a MX3005 apparatus (Stratagene) using specific primers (see [Supplementary Table 1](#)). Gene expression was normalized to cyclophilin gene expression and expressed as described in the figure legends.

### Chromatin Immunoprecipitation Assay

ChIP experiments were performed as described previously<sup>2</sup> using the anti-NR1D1 (1/50, #13418; Cell Signaling, Danvers, MA), the anti-H3K27me3 (1/100, ab6002; Abcam, Cambridge, MA) and normal rabbit IgG (1/250, #2729; Cell Signaling) antibodies following manufacturer's instructions.

### Protein Precipitation

Proteins from conditioned medium were precipitated overnight at 4°C using sodium deoxycholate (0.02%) and trichloroacetate (20%). After centrifugation, protein-containing pellets were washed twice in acetone and resuspended with 60 µL Laemmli buffer.

### Western Blot

Fifty micrograms proteins in Laemmli buffer were separated using 10% polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. After saturation in 5% bovine serum albumin, membranes were incubated with the primary antibody directed against NR1D1 (1/1000, Clone 4F6; Abgent, San Diego, CA), CASP1 (1/1000, Casper1 AG-20B-0042; Adipogen San Diego, CA),

NLRP3 (1/1000, Cryo-2; Adipogen), IL1B (1/1000, GTX74034; Genetex, Irvine, CA), Hsp90 (1/1000, sc-1616; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), or actin (1/1000, sc-1616; Santa Cruz Biotechnology) in Tris-buffered saline/bovine serum albumin solution (2.5%). Then, appropriate horseradish peroxidase-coupled secondary antibody diluted (d1/10000) in 10% skim milk (1.15363.0500; Merck Millipore) were used.

### Confocal Microscopy

BMDMs were permeabilized with 0.1% Triton-X100 and blocked using UV Block buffer (cat TA-125-UBI; Microm Microtech, Brignais, France). Primary antibodies against IL18 (1/200, cat 5180R-100; BioVision, Milpitas, CA), CASP1 (1/200, 14-9382; eBioscience), or NLRP3 (1/200, ab4207; Abcam) were incubated overnight. Next, the fluorophore-conjugated secondary antibody (1/500, Alexa antibodies; Thermo Fisher Scientific Waltham, MA) was added. Nuclei were stained with NucBlue fixed cell stain ready probes reagent (4'6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific; cat R37606) according to the manufacturer's instructions. Samples were examined with a LSM880 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY) and fluorescence intensity was quantified using Fiji software.

### ASC Speck Analysis

Macrophages were plated in 24-well plates and stimulated with LPS (200 ng/mL) for 4 hours. For the last 30 minutes, BMDM were activated with either ATP (5 mM) or nigericin (20 µmol/L). BMDM were then fixed with 4% paraformaldehyde (Thermo Fisher Scientific, cat 28908), permeabilized with PBS-Triton-X100 0.1% and blocked using UV Block buffer. Primary antibodies against ASC (1/500, ADI-905-173; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) were incubated overnight, before the fluorophore-conjugated secondary antibody (1/500, Alexa antibodies, Thermo Fisher Scientific) was added. Nuclei were stained with NucBlue fixed cell stain ready probes reagent (4'6-diamidino-2-phenylindole) (Thermo Fisher Scientific, cat R37606) according to the manufacturer's instructions. Samples were examined with a Nikon Ti epifluorescence microscope (Carl Zeiss) using 40× magnification. ASC specks were then quantified in at least 200 cells.

### Peritonitis

Nr1d1<sup>-/-</sup> and Nr1d1<sup>+/+</sup> male mice were intraperitoneally injected first with the NLRP3 inhibitor MCC950 (CRID3, CP-456773 sodium salt, PZ0280; Sigma Aldrich) (50 mg/kg) or saline. After 30 minutes, mice received an intraperitoneal injection of LPS (isotype 0111:B4; Sigma-Aldrich) (100 µg or 3.5 mg/kg). Two hours later, mice were then injected with alum (product no. 77161; Thermo Scientific) (700 µg). Blood was collected from retro-orbital route and plasma was separated from cellular fraction by centrifugation. Peritoneal lavages were performed after 4 hours with sterile ice-cold PBS 1× (Dulbecco's PBS 10×, 14200-067; Gibco, Life Technology) (4 mL). Samples were concentrated with Amicon 3K (Merck Millipore); plasma and exudate IL1B and IL18 protein amounts were then quantified by ELISA.



### Fulminant Hepatitis

To analyze the circadian behavior of survival rate and time upon LPS/D-GalN injection, 8-week-old C57/Bl6 female mice were challenged with intraperitoneal injection of LPS (isotype 0111:B4; Sigma-Aldrich) (15  $\mu$ g/kg) and D-GalN hydrochloride (Sigma-Aldrich) (575 mg/kg) every 4 hours (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20, and ZT4) and monitored for their survival duration and rate every 30 minutes for 48 hours.

To investigate the effect of NR1D1 on FH parameters, *Nr1d1*<sup>-/-</sup> and *Nr1d1*<sup>+/+</sup> male mice were intraperitoneally injected at ZT1.5 first with the NLRP3 inhibitor MCC950 (CRID3, CP-456773 sodium salt, PZ0280; Sigma Aldrich) (50 mg/kg) or saline. After 30 minutes at ZT2, mice received an intraperitoneal injection of LPS (isotype 0111:B4; Sigma-Aldrich) (15  $\mu$ g/kg) and D-GalN hydrochloride (Sigma-Aldrich) (575 mg/kg). For Rev-erb pharmacologic activation experiment with SR9009, 8-week-old C57/Bl6 female mice were pretreated with an intraperitoneal injection of the SR9009 Rev-erb agonist (100 mg/kg) (Merck-Millipore) or 15% cremaphor (Sigma-Aldrich) as vehicle at ZT11 on the day (day 0) preceding the induction of the acute hepatic injury. Then, at day 1, mice were intraperitoneally co-injected at ZT1.5 with either SR9009 (100 mg/kg) or 15% cremaphor and with the NLRP3 inhibitor MCC950 (CRID3, CP-456773 sodium salt, PZ0280; Sigma Aldrich) (50 mg/kg) or saline. After 30 minutes at ZT2, mice received an intraperitoneal injection of PBS as control, or LPS (isotype 0111:B4; Sigma-Aldrich) (15  $\mu$ g/kg) and D-GalN hydrochloride (Sigma-Aldrich) (575 mg/kg). To determine the survival rate, mice were monitored every 30 minutes after LPS/D-GalN injection for 48 hours. In other experiments, mice were sacrificed 5 hours after LPS/D-GalN administration, blood was collected from retro-orbital route and plasma were separated from cellular fraction by centrifugation to determine plasma alanine aminotransferase activity (Thermo Fisher). Livers were pictured and harvested for further analysis. The median lobe was embedded in cryogenic OCT medium (NEG50, 6502G, Richard-Allan Scientific) and stored at -80°C for further analysis. Ten-micrometer sections were stained with FAM-FLICA according to the manufacturer indications (Immunocytochemistry Technologies, Bloomington, MN) and caspase-1 activity was quantified in 3 different tissue sections of each mouse with a LSM 880 confocal laser-scanning microscope at a 40 $\times$  magnification (Carl Zeiss). mRNAs from the right posterior lobe were extracted using the Chomczynski and Sacchi methods.<sup>3</sup> The left lobe was fixed in formaldehyde 4% and embedded in paraffin. Three-micrometer sections were stained with H&E and were visualized using Nikon Eclipse Ti at 20 $\times$  magnification to evaluate hemorrhage.

### Pharmacologic Treatment Experiments

Bone marrow hematopoietic cells were isolated from mice as indicated. For RNA analysis, BMDMs were either pretreated with the SR9009 Rev-erb agonist (10  $\mu$ mol/L) for 12 hours and treated with LPS (100 ng/mL) for 3 hours or were cultured with LPS (100 ng/mL) in DMEM

containing 10% FBS for 3 hours and treated with SR9009 (10  $\mu$ mol) or vehicle (DMSO) for 12 hours. For protein analysis and Western blotting, BMDM were primed with interferon-gamma (100 ng/mL) and LPS (10 ng/mL) for 12 hours and treated with SR9009 (10  $\mu$ mol/L) or vehicle (DMSO) for 12 hours. For ELISA, BMDMs were primed with LPS (100 ng/mL) for 3 hours in DMEM containing 10% FBS, followed by treatment with Rev-erb agonist SR9009 (10  $\mu$ mol/L) or vehicle (DMSO) for 12 hours. Macrophages were then treated with MCC950 (100 nM) in optiMEM (reduced serum medium, 31985088; Life Technologies) for 1 hour and activated with ATP (5 mmol/L) for 2 hours. The supernatants were collected and cleared by centrifugation. ELISA for mouse IL1B (BMS6002TWO, Platinum ELISA Affymetrix; eBioscience) and mouse IL18 (BMS618/3, Platinum ELISA Affymetrix; eBioscience) were performed according to the manufacturer's instructions.

For peritonitis experiments, 12-week-old male C57Bl/6 mice (n = 10 per group) were intraperitoneally injected with the SR10067 Rev-erb agonist (25 mg/kg) or vehicle at 5 AM (ZT23). Mice were then intraperitoneally injected with LPS 1 hour after SR10067 injection at ZT0 and every 6 hours after that at ZT6, ZT12, and ZT18. Mice were sacrificed 4 hours after LPS injection (ZT4, ZT10, ZT16, and ZT22) and peritoneal lavage was performed with sterile PBS 1 $\times$  (10 mL). Exudate cells were cultured in DMEM containing 10% FBS and supernatant were collected after 2 hours (time indicated on the figure axis). Supernatant were cleared by centrifugation and ELISA was performed according to the manufacturer's instructions (SMLB00C, R&D Systems; 7625). SR9009 and SR10067 were synthesized as described previously.<sup>4,5</sup>

### Fluorescence-Activated Cell Sorting Analysis

Eight-week-old C57/Bl6 female mice were pretreated with an intraperitoneal injection of the SR9009 Rev-erb agonist as described. The next morning, mice were intraperitoneally co-injected at ZT2 with either SR9009 (100 mg/kg) or 15% cremaphor and with the NLRP3 inhibitor MCC950 (CRID3, CP-456773 sodium salt, PZ0280; Sigma Aldrich) (50 mg/kg) or saline. After 30 minutes, mice received an intraperitoneal injection of PBS as control or LPS (isotype 0111:B4, Sigma-Aldrich) (15  $\mu$ g/kg) and D-GalN hydrochloride (Sigma-Aldrich) (575 mg/kg). Five hours later, livers were collected, weighted, minced, and digested in RPMI containing collagenase type D (11 088 882, 0.233 U/mg; Roche, Indianapolis, IN) (1 mg/mL) during 20 minutes at 37°C while thoroughly agitated. After adding EDTA (2 mM), livers were mechanically homogenized using a 21-G needle and a 70- $\mu$ m cell strainer. Cellular fraction was then washed using PBS + bovine serum albumin 0.5%. Liver homogenates were resuspended in a 40% Percoll (17-0891-01, density 1.129 g/mL; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and loaded on an 80% Percoll phase. After centrifugation, the cell ring was harvested and washed. The red blood cells were eliminated by an incubation in RBC lysis buffer. Cells were filtered through a 40- $\mu$ m cell trainer and counted. Cells were labeled by the following antibodies

(BD Bioscience, San Diego, CA and BioLegend, San Diego, CA), used to identify and quantify immune cells by FACS (BD LSRFortessa X20; BD Bioscience): CD45.2, CCR2, CD115, Ly6C, and F4/80. Alive cells were stained using Zombie UV Fixable Viability Kit (423107; BioLegend).

### *In Silico Analysis*

Retrieval of putative RevRE in sequences of *Il1 $\beta$*  and *Nlrp3* promoters has been performed using MatInspector (Genomatix, Munich, Germany). Sequencing data (ChIP sequencing and 5'GRO sequencing) were obtained from Gene Expression Omnibus (GSE45914) and analyzed with Integrated Genome Browser.<sup>6</sup>

### *Statistical Analysis*

Statistical analysis was performed on GraphPad Prism software using Student *t* test for comparisons between 2 groups, and 1-way or 2-way analysis of variance with Bonferroni post-hoc multiple comparisons for assessment of more than 2 groups and cosinor analysis for circadian experiment. Survival rate and time were compared by Kaplan-Meier analysis, a log-rank Mantel-Cox and a log-rank test were performed to analyze the survival time and rate, respectively, as indicated in the figure legends.

### References

1. Zhang Y, Fang B, Emmett MJ, et al. Gene regulation. Discrete functions of nuclear receptor Rev-erb $\alpha$  couple metabolism to the clock. *Science* 2015; 348:1488–1492.
2. Pourcet B, Feig JE, Vengrenyuk Y, et al. LXR $\alpha$  regulates macrophage arginase 1 through PU.1 and interferon regulatory factor 8. *Circ Res* 2011;109: 492–501.
3. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006;1:581–585.
4. Banerjee S, Wang Y, Solt LA, et al. Pharmacological targeting of the mammalian clock regulates sleep architecture and emotional behaviour. *Nat Commun* 2014; 5:5759.
5. Solt LA, Wang Y, Banerjee S, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. *Nature* 2012;485:62–68.
6. Lam MT, Cho H, Lesch HP, et al. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature* 2013;498: 511–515.



**A**

PEC mRNA

		<i>Nr1d1<sup>+/+</sup></i>	<i>Nr1d1<sup>-/-</sup></i>
<i>Nr1d1</i>	MESOR	1.99 (1.21, 2.77)	NSR
	Amplitude	2.77 (1.6, 3.94)	NSR
	Accrophase	9:12 (7:48, 10:42)	NSR
<i>Nlrp3</i>	MESOR	1.54 (1.34, 1.73)	NSR
	Amplitude	0.946 (0.653, 1.24)	NSR
	Accrophase	20:26 (19:22, 21:30)	NSR
<i>Il1<math>\beta</math></i>	MESOR	1.08 (0.64, 1.52)	0.88 (0.41, 1.35)
	Amplitude	0.31 (0, 0.33)	0.52 (0.15, 1.18)
	Accrophase	3:54 (20:31, 11:17)	21:06 (17:10, 2:02)
<i>Il18</i>	MESOR	1.86 (1.77, 1.94)	NSR
	Amplitude	0.71 (0.6, 0.82)	NSR
	Accrophase	23:41 (23:02, 0:20)	NSR

**B**

PEC Protein

		<i>Nr1d1<sup>+/+</sup></i>	<i>Nr1d1<sup>-/-</sup></i>
IL-1b	MESOR	80.8 (65.3, 96.8)	86.6 (69.7, 103)
	Amplitude	34.9 (15.0, 56.6)	47.4 (20.9, 74.1)
	Accrophase	15.1 (13.7, 16.4)	6.85 (5.59, 8.00)
	Period (hrs)	13.93 (11.6, 16.3)	11.92 (10.92, 12.91)
IL18	MESOR	1104 (1027, 1180)	1099 (1019, 1180)
	Amplitude	138.8 (41.1, 247.6)	257.3 (129.9, 384.8)
	Accrophase	14.45 (12.95, 16.5)	18.94 (18.1, 19.8)
	Period (hrs)	12.76 (10.87, 16.5)	11.98 (11.1, 12.8)

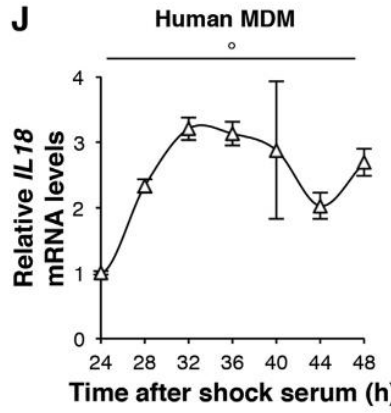
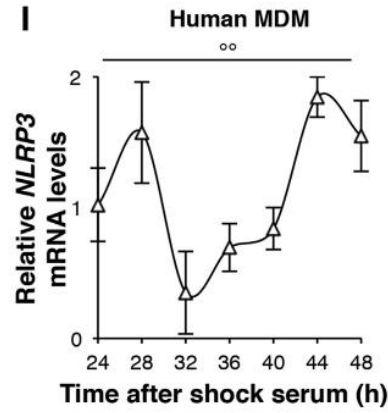
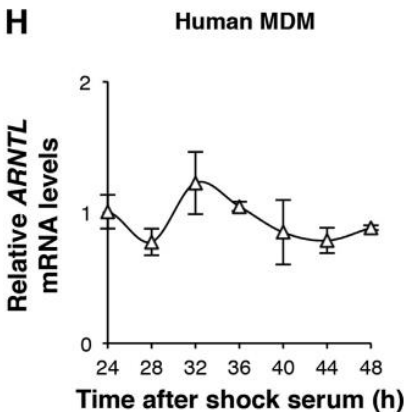
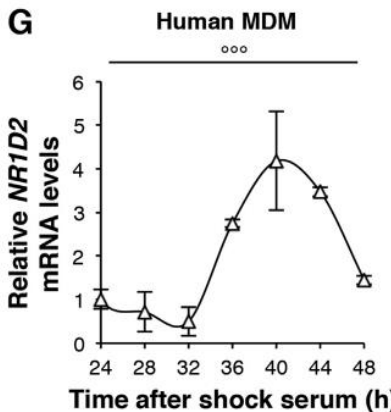
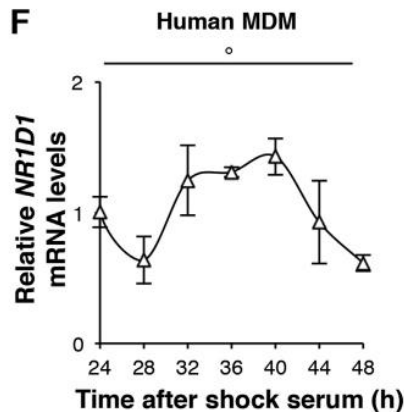
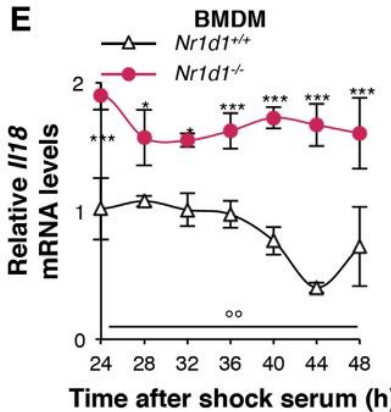
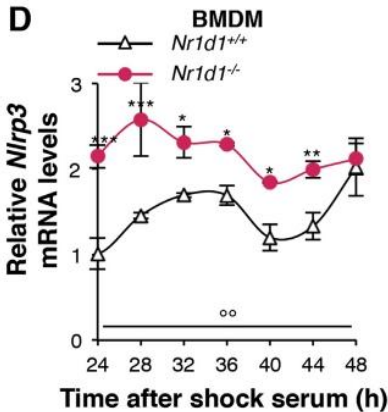
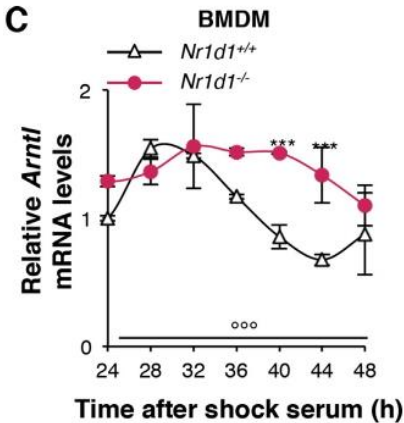
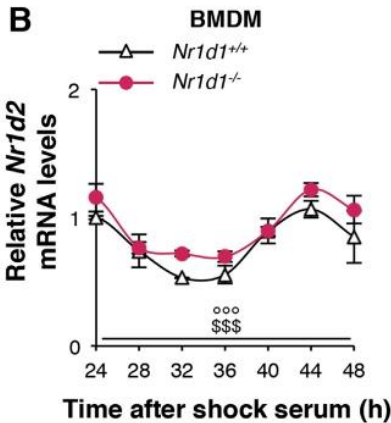
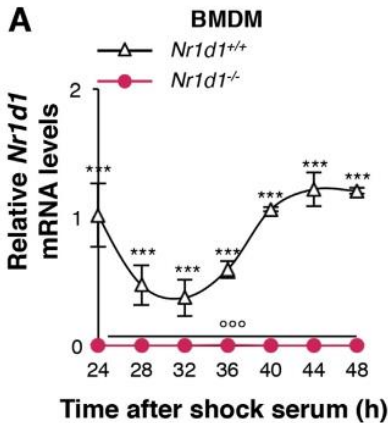
**C**Synchronised BMDM  
mRNA

		<i>Nr1d1<sup>+/+</sup></i>	<i>Nr1d1<sup>-/-</sup></i>
<i>Nr1d1</i>	MESOR	0.81 (0.7, 0.92)	NSR
	Amplitude	0.48 (0.32, 0.64)	
	Accrophase	19:58 (18:46, 21:10)	
<i>Nr1d2</i>	MESOR	0.78 (0.71, 0.85)	0.9 (0.82, 0.98)
	Amplitude	0.27 (0.16, 0.37)	0.27 (0.15, 0.39)
	Accrophase	20:47 (19:17, 22:16)	21:11 (19:32, 22:51)
<i>Nlrp3</i>	MESOR	1.49 (1.26, 1.70)	2.18 (2.05, 2.32)
	Amplitude	0.21 (-0.02, 0.40)	0.3 (0.1, 0.51)
	Accrophase	8:30 (4:44, 13:12)	5:58 (3:44, 8:13)
<i>Arntl</i>	MESOR	1.1 (1.07, 1.21)	1.4 (1.32, 1.48)
	Amplitude	0.45 (0.34, 0.54)	0.1916 (0.09, 0.30)
	Accrophase	6:58 (6:07, 7:52)	12:08 (9:51, 14:35)
<i>Il18</i>	MESOR	0.88 (0.77, 0.99)	NSR
	Amplitude	0.26 (0.09, 0.43)	
	Accrophase	6:55 (4:38, 9:21)	

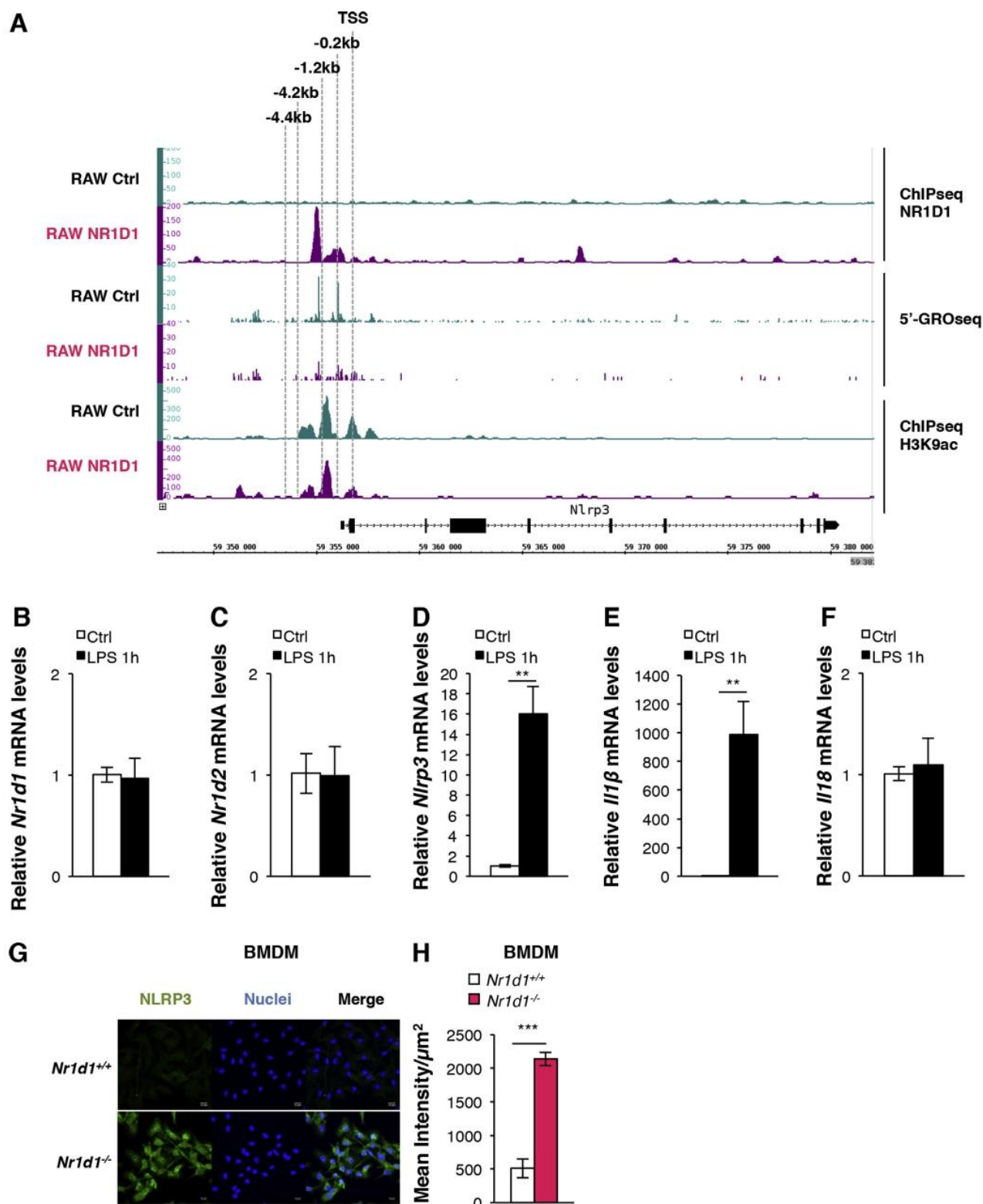
**D**Synchronised human MDM  
mRNA

			R <sup>2</sup> for model
<i>NR1D1</i>	MESOR	1.07 (0.86, 1.28)	0,6393
	Amplitude	0.36 (0.08, 0.63)	
	Accrophase	1:29 (23:15, 4:43)	
<i>NR1D2</i>	MESOR	2.11 (1.68, 2.53)	0,883
	Amplitude	1.97 (1.35, 2.59)	
	Accrophase	16:42 (15:36, 17:47)	
<i>NLRP3</i>	MESOR	1.02 (0.79, 1.25)	0,5176
	Amplitude	0.53 (-0.09, 1.15)	
	Accrophase	22:22 (17:32, 3:13)	
<i>ARNTL</i>	MESOR	0.95 (0.86, 1.04)	0,298
	Amplitude	0.14 (0, 0.27)	
	Accrophase	8:41 (4:57, 13:58)	
<i>IL18</i>	MESOR	2.61 (2.24, 2.99)	0,3459
	Amplitude	0.65 (0.19, 1.13)	
	Accrophase	10:55 (7:43, 14:42)	

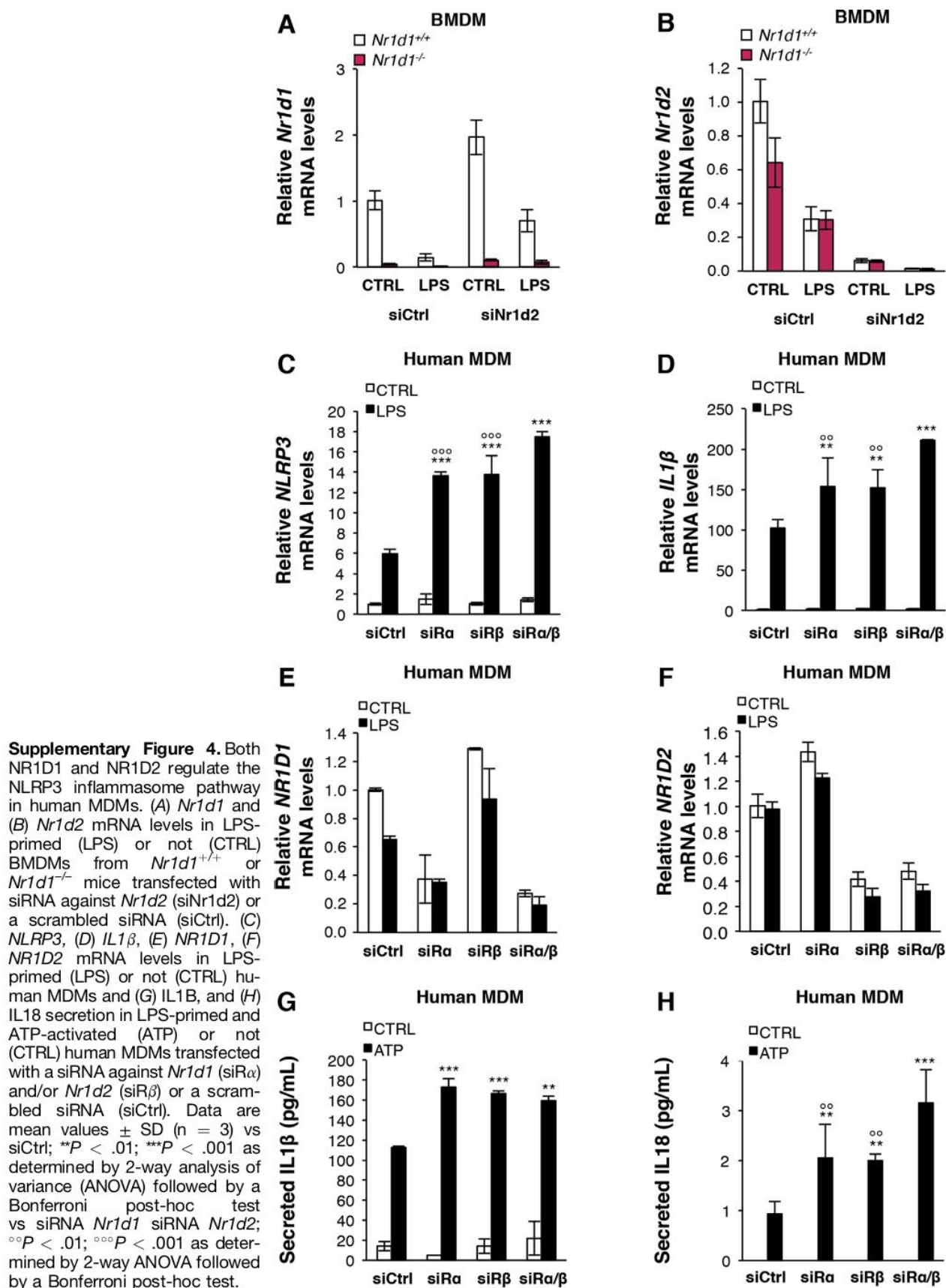
**Supplementary Figure 1.** Cosinor analysis of mRNA and cytokine oscillation (A) CD11b<sup>+</sup> PEC mRNA (B) CD11b<sup>+</sup> PEC cytokines (C) synchronized BMDM mRNA and (D) synchronized human MDM mRNA.



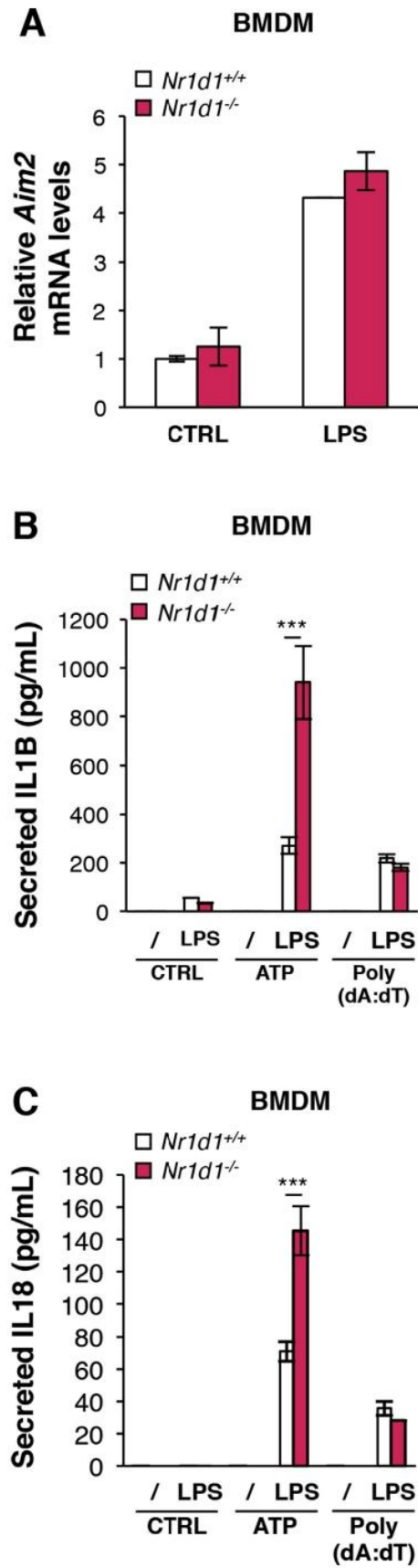
**Supplementary Figure 2.** Gene expression of the NLRP3 inflammasome pathway displays circadian oscillations in synchronized mouse BMDMs and human MDMs. (A) *Nr1d1*, (B) *Nr1d2*, (C) *Arntl*, (D) *Nlrp3*, and (E) *Il18* mRNA levels in BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice that were synchronized in vitro by serum shock. Data are means ± SD (n = 3). \**P* < .05; \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-hoc test to compare *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice. °°*P* < .01, °°°*P* < .001 as determined by one-way ANOVA to assess variation over time in *Nr1d1*<sup>+/+</sup> cells, and \$\$\$*P* < .001 as determined by 1-way ANOVA to assess variation over time in *Nr1d1*<sup>-/-</sup> cells, (F) *NR1D1*, (G) *NR1D2*, (H) *ARNTL*, (I) *NLRP3*, and (J) *IL 18* mRNA levels in human MDMs that were synchronized by serum shock. Data are mean ± SD (n = 3). °*P* < .05; °°*P* < .01; °°°*P* < .001 as determined by 1-way ANOVA to assess variation over time in human MDMs.



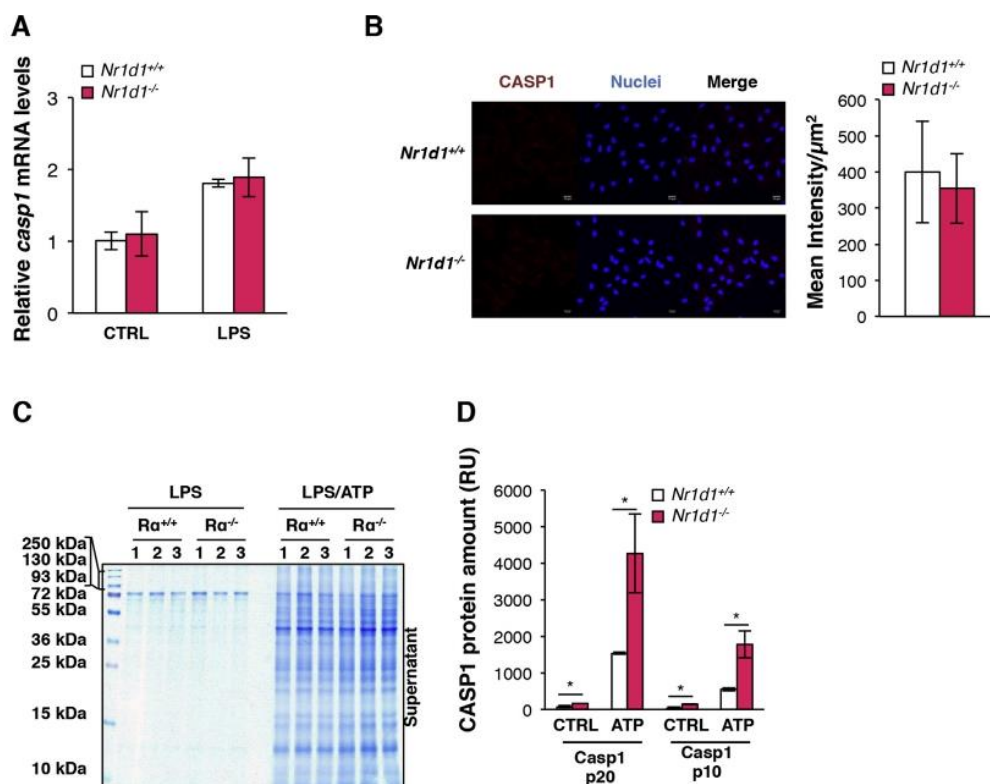
**Supplementary Figure 3.** NR1D1 regulates *Nlrp3* expression. (A) Analysis of ChIP sequencing and 5'-GRO sequencing data from Lam et al<sup>23</sup> (reference in main text) showing that NR1D1 binds to and represses transcription from the *Nlrp3* promoter in rev-erb $\alpha$  (NR1D1) overexpressing RAW264.7 macrophages. (B) *Nr1d1*, (C) *Nr1d2*, (D) *Nlrp3*, (E) *Il1 $\beta$* , and (F) *Il18* mRNA levels in BMDMs treated with LPS during 1 hour (LPS 1h) or not (Ctrl) ( $n = 3$ ). \*\* $P < .001$  as determined by unpaired  $t$  test. (G) Quantification of NLRP3 protein expression from NLRP3 immunofluorescence in LPS-primed BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice ( $n = 3$ ). Data are mean values  $\pm$  SD (at least 150 cells per slide). \*\*\* $P < .001$  as determined by unpaired 2-tailed  $t$  test.



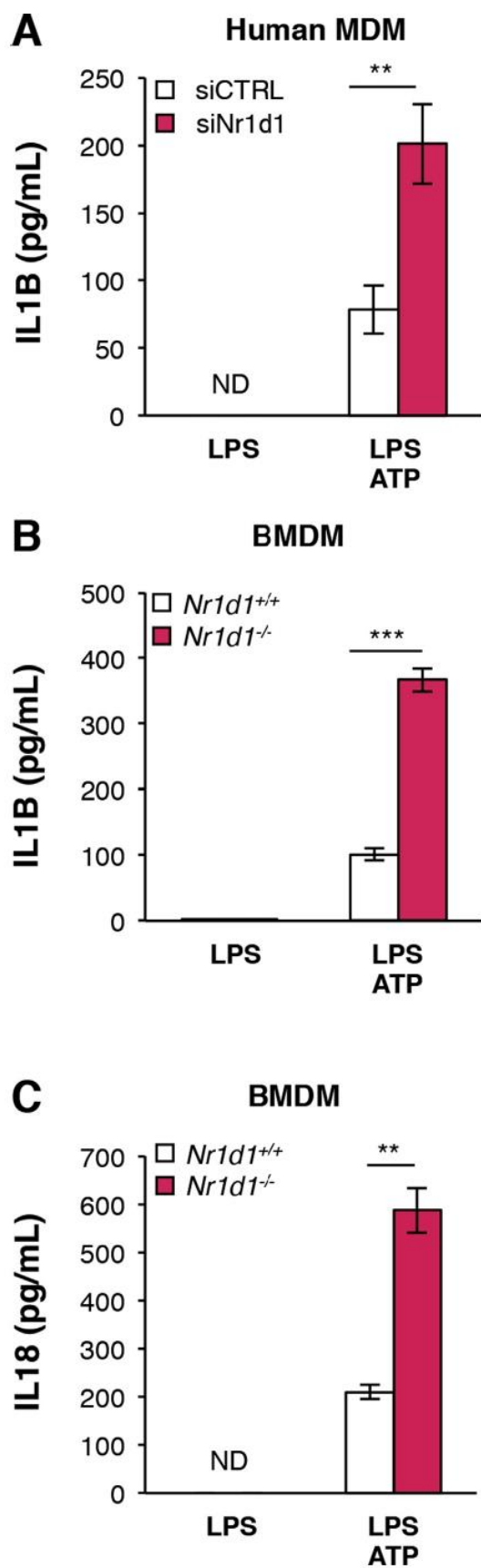




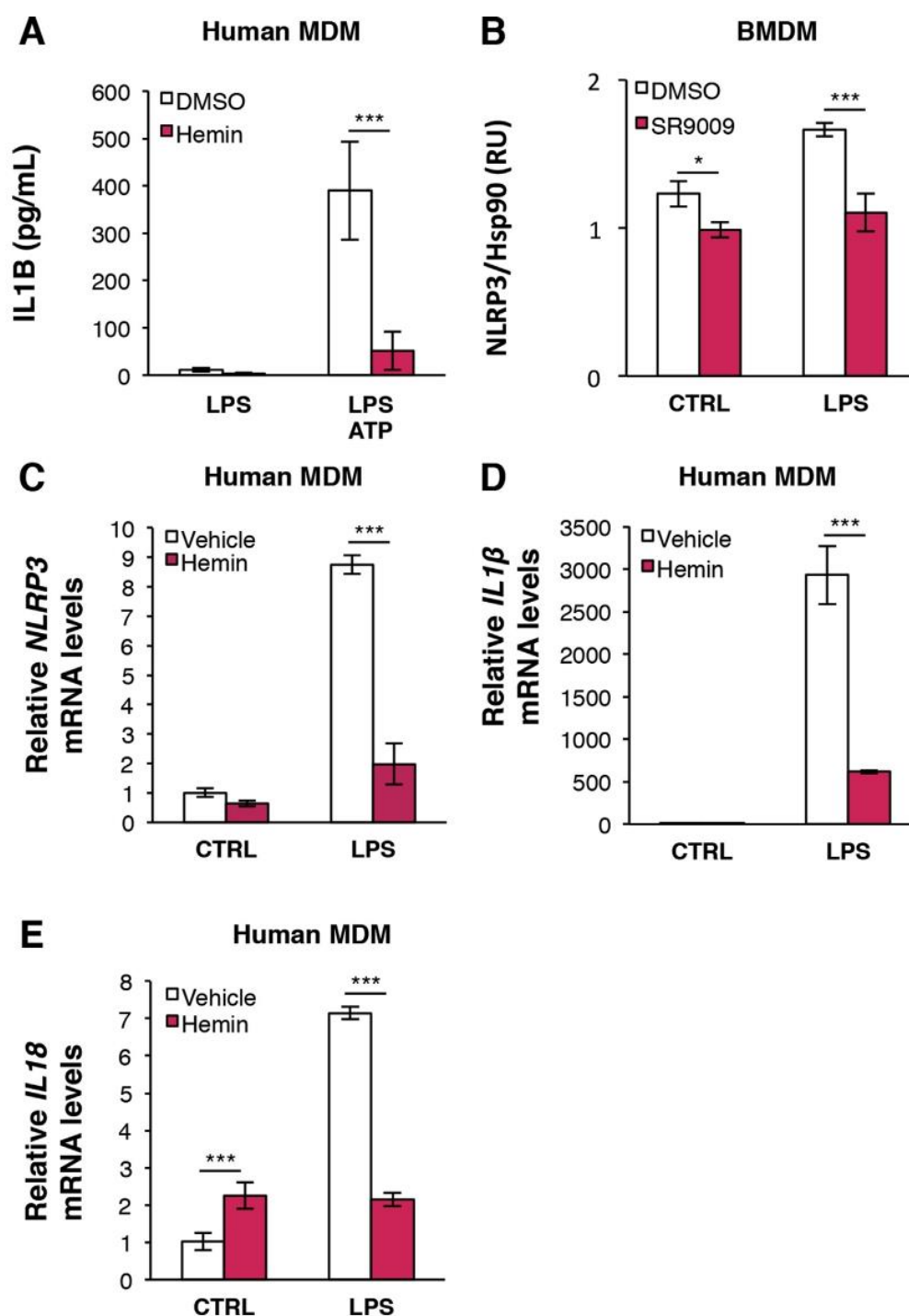
**Supplementary Figure 5.** NR1D1 does not regulate the AIM2 inflammasome. (A) *Aim2* mRNA levels in LPS-primed (LPS) or not (CTRL) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice. (B) IL1B and (C) IL18 secretion in LPS-primed (LPS) or not (/) and activated with ATP (ATP) or Poly(dA:dT) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice. Data are mean values  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\* $P < .001$  as determined by 2-way analysis of variance and Bonferroni post-hoc test.



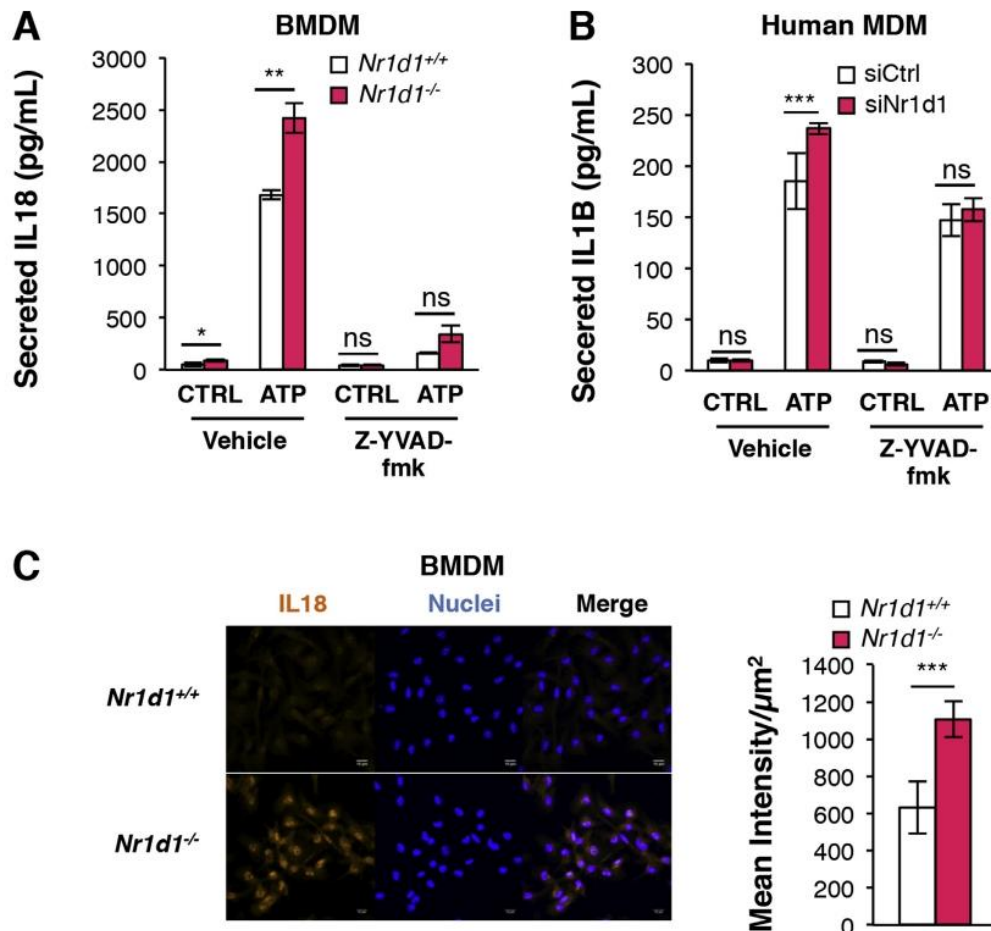
**Supplementary Figure 6.** NR1D1 deficiency leads to increased caspase-1 maturation, but not expression, in primary macrophages. Caspase-1 (CASP1) mRNA (A) and protein (B) levels in control (CTRL) or LPS-primed (LPS) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice (n = 3). Immunofluorescence quantification on at least 150 cells per slide. (C) Total proteins were visualized in the acrylamide gel after a Coomassie blue staining as a loading control for Figure 3A in BMDM isolated from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> (*Rα*<sup>+/+</sup>) and *Nr1d1*<sup>-/-</sup> (*Rα*<sup>-/-</sup>) mice. (D) Western blot quantification of secreted mature caspase-1 p20 and p10 protein fragments from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice BMDMs treated with LPS (CTRL) or with LPS and ATP (ATP). Data are means  $\pm$  SD (n = 3). \**P* < .05, as determined by 2-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test.



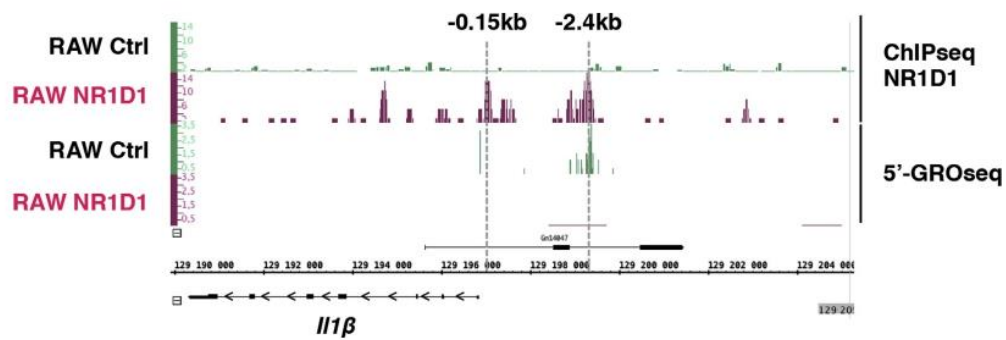
**Supplementary Figure 7.** NR1D1 deficiency increases IL1B and IL18 secretion in primary macrophages. (A) IL1B secretion in LPS-primed (LPS) and ATP-activated (LPS ATP) human MDMs in which Nr1d1 has been silenced (siNr1d1). (B) IL1B and (C) IL18 secretion in LPS-primed (LPS) and ATP-activated (LPS ATP) BMDMs from *Nr1d1*<sup>+/+</sup> or *Nr1d1*<sup>-/-</sup> mice. Data are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$  as determined by 2-way analysis of variance and Bonferroni post-hoc test.



**Supplementary Figure 8.** NR1D1 pharmacologic activation down-regulates the NLRP3 inflammasome pathway. (A) IL1B secretion in LPS-primed (LPS) and ATP-activated (LPS ATP) human MDMs treated with hemin or not (vehicle). (B) NLRP3 protein quantification of Figure 5B in LPS-primed (LPS) or not (CTRL) BMDMs treated with SR9009 or DMSO as control. (C) *NLRP3* (D) *IL1β*, and (E) *IL18* mRNA levels in LPS-primed (LPS) or not (CTRL) human MDMs treated with hemin or not (vehicle). Data are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\*\* $P < .001$  as determined by 2-way analysis of variance and Bonferroni post-hoc test.

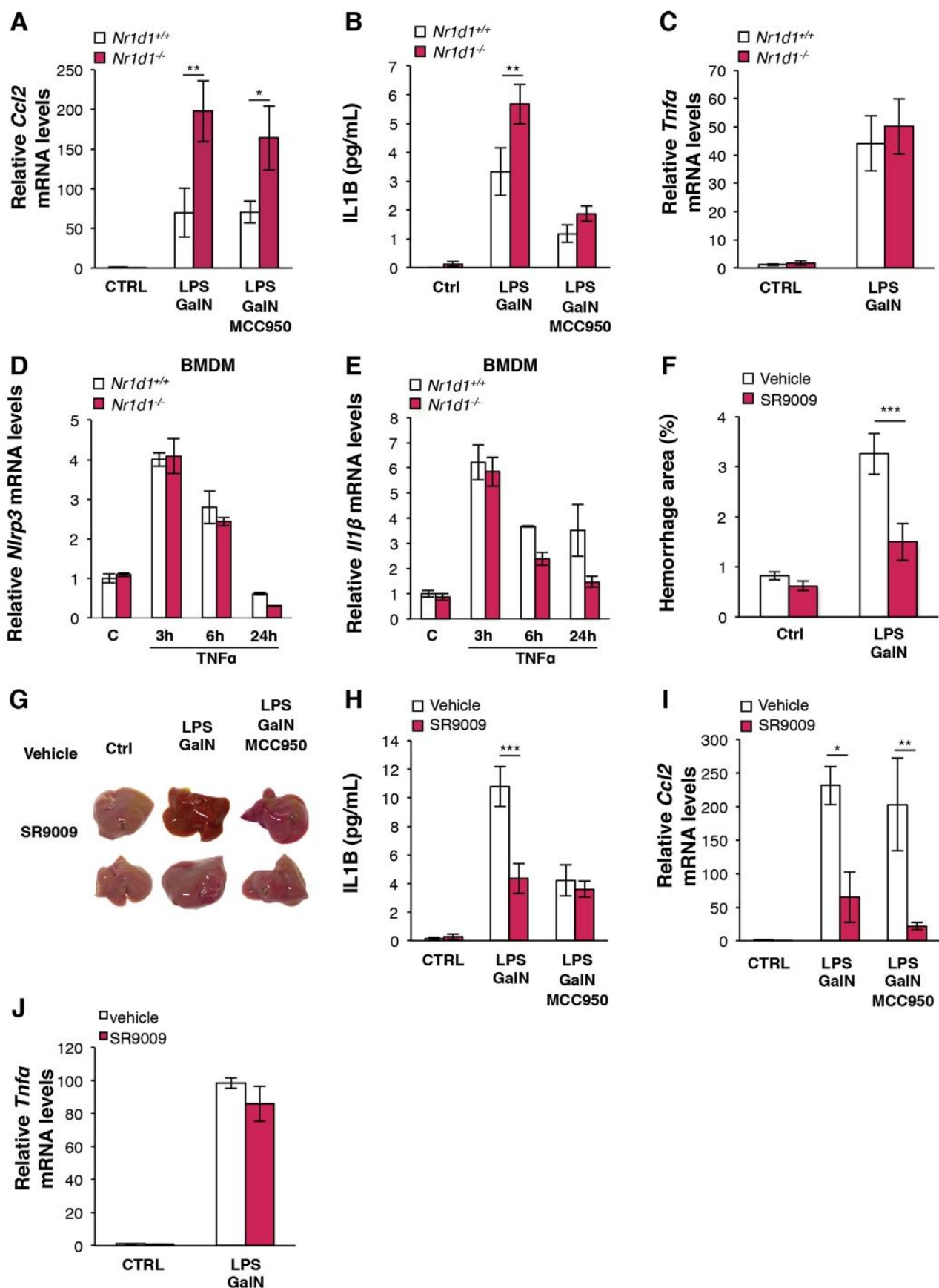


**Supplementary Figure 9.** NR1D1 controls IL1B and IL18 secretion in a caspase 1-dependent manner. (A) IL18 secretion in LPS-primed (CTRL) and ATP-activated (ATP) BMDMs from  $Nr1d1^{+/+}$  or  $Nr1d1^{-/-}$  mice. (B) IL1B secretion in LPS-primed (CTRL) and ATP-activated (ATP) in human MDMs in which Nr1d1 has been silenced (siNr1d1). These samples were treated with a caspase 1 inhibitor Z-YVAD-fmk or not (vehicle). Data are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$  as determined by 2-way analysis of variance and Bonferroni post-hoc test. (C) Intracellular IL18 protein in LPS-primed BMDMs from  $Nr1d1^{+/+}$  or  $Nr1d1^{-/-}$  mice ( $n = 3$ ). Quantification of intracellular IL18 from 150 cells/slide. Data are means  $\pm$  SD. \*\*\* $P < .001$  as determined by unpaired 2-tailed Student  $t$  test.



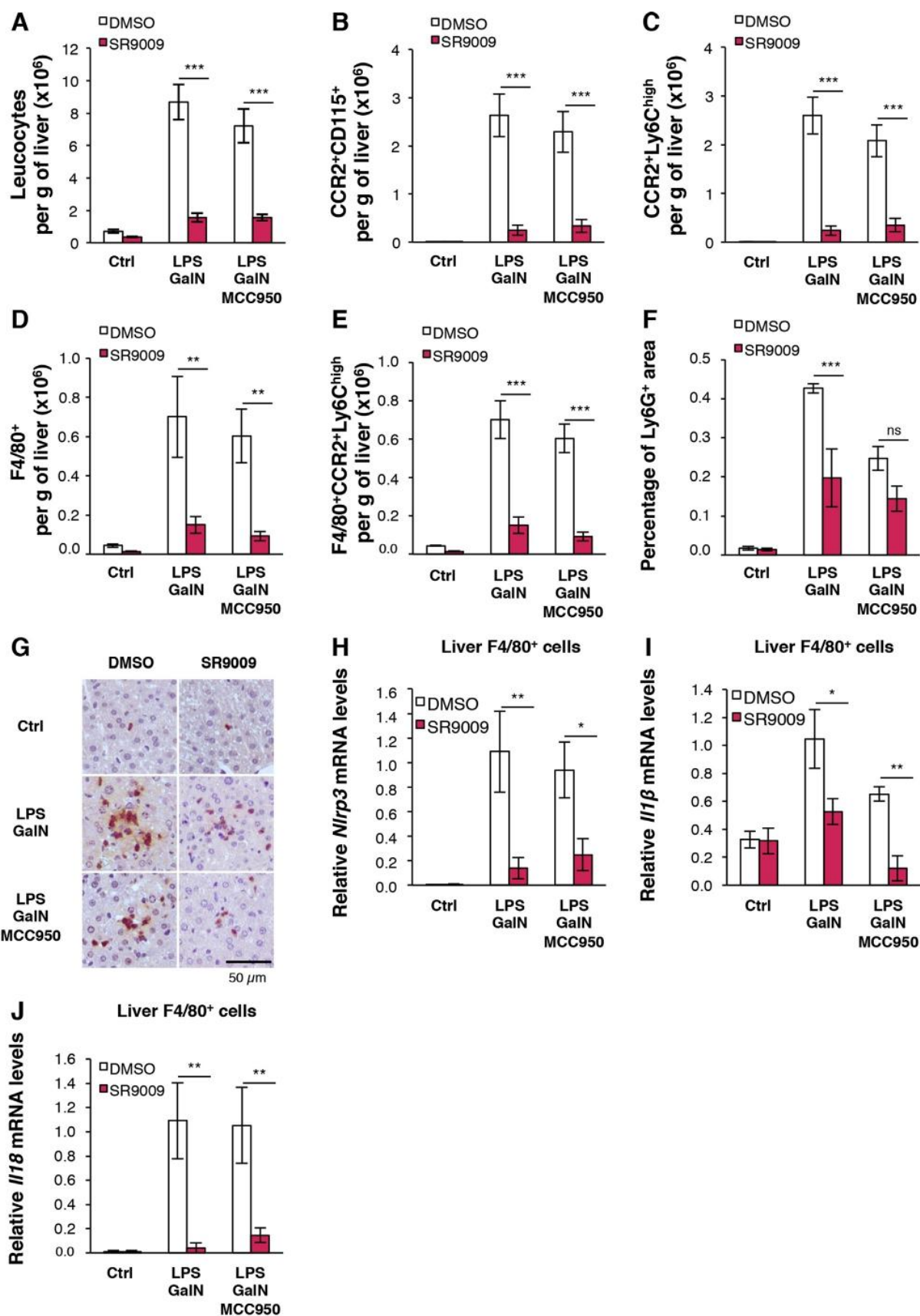
**Supplementary Figure 10.** NR1D1 binds to the *il1β* promoter and inhibits de novo transcription. Analysis of ChIP sequencing and 5'-GRO sequencing data from Lam et al<sup>23</sup> (reference in main text) showing that NR1D1 binds to and represses transcription from the *il1β* promoter in *rev-erbα* overexpressing RAW264.7 macrophages.

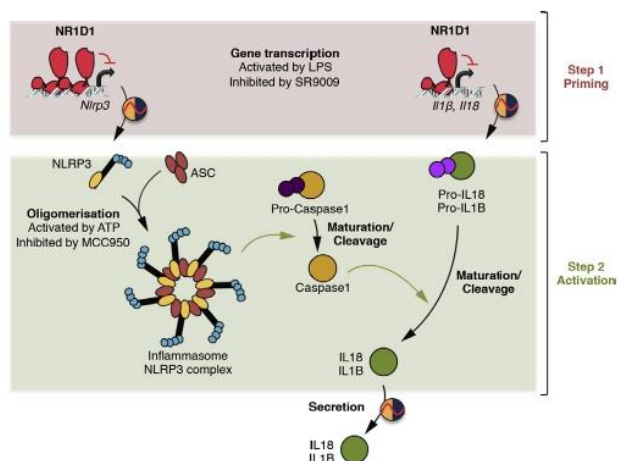






**Supplementary Figure 11.** NR1D1 prevents the development of FH in an NLRP3-dependent manner. (A) Liver *Ccl2* and (C) *Tnfα* mRNA levels, and (B) secreted IL1B in blood sampled from *Nr1d1<sup>+/+</sup>* and *Nr1d1<sup>-/-</sup>* mice pretreated with MCC950 or saline and then injected with LPS/GalN. Data are means ± SEM (n = 5–6). \**P* < .05; \*\**P* < .01 as determined by 2-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-hoc test. *Nlrp3* (D) and *Il1β* mRNA (E) levels in BMDMs from *Nr1d1<sup>+/+</sup>* and *Nr1d1<sup>-/-</sup>* mice primed with TNFα during 3, 6, or 24 hours. Data are means ± SD (n = 3). (F) Hemorrhage area in liver, (G) representative liver appearance, (H) secreted IL1B in blood samples, and (I) liver *Ccl2* and (J) *Tnfα* mRNA levels from mice pretreated with SR9009 or vehicle and MCC950 or saline, and then intraperitoneally challenged with LPS plus D-GalN. Data are means ± SEM (n = 5–6). \**P* < .05; \*\**P* < .01; \*\*\**P* < .001 as determined by 2-way analysis of variance and Bonferroni post-hoc test.





**Supplementary Figure 13.** Scheme depicting how NR1D1 regulates the NLRP3 inflammasome pathway.

**Supplementary Figure 12.** NR1D1 pharmacologic activation reduces leukocytes recruitment to the liver in FH. C57/Bl6 mice were pretreated with SR9009/DMSO and/or MCC950/vehicle and then challenged with LPS/GalN or PBS as control (Ctrl). Immune cells were isolated on a Percoll gradient, counted and analyzed by fluorescence-activated cell sorting analysis. (A) Leukocytes, (B) monocytes (CCR2<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>), (C) infiltrating monocytes (CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>), (D) macrophages (F4/80<sup>+</sup>), and (E) recruited macrophages (F4/80<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>) number per gram of liver. (F) Quantification and (G) representative neutrophil staining (Ly6G<sup>+</sup>) on liver sections. Data are means  $\pm$  SEM (n = 6). \*\*P < .01; \*\*\*P < .001 as determined by 2-way analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-hoc test. (H) *Nlrp3* (I) *Il1 $\beta$* , and (J) *Il18* mRNA levels in F4/80<sup>+</sup> cells. Data are means  $\pm$  SEM (n = 6). \*P < .05; \*\*P < .01 as determined by 2-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test.

**Supplementary Table 1.** Quantitative Polymerase Chain Reaction Primers and Chromatin Immunoprecipitation Primers Used in This Study

Gene name	Sense/antisense	Sequence
<i>mI18</i>	Forward	TCTGACATGGCAGCCATTGT
	Reverse	CAGGCCTGACATCTTCTGCAA
<i>mI1<math>\beta</math></i>	Forward	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG
	Reverse	CCTGAAGCTCTTGTGATGTGC
<i>mCaspase-1</i>	Forward	ACCCTCAAGTTTTGCCCTTT
	Reverse	GATCCTCCAGCAGCAACTTC
<i>mNLRP3</i>	Forward	CCCTTGAGACACAGGACTC
	Reverse	GAGGCTGCAGTTGTCTAATTCC
<i>mNr1d1</i>	Forward	TGGCCTCAGGCTTCCACTATG
	Reverse	CCGTTGCTTCTCTCTTGGG
<i>mNr1d2</i>	Forward	AGTAGGTGGATGTTCTCAGACTGAGA
	Reverse	ATGGAGACTTGCTCATAGGACACAC
<i>mARNTL</i>	Forward	CCAACCGTGGCTCCAACCTT
	Reverse	CTAGGTGCTTGTGCTTGTGT
<i>mAIM2</i>	Forward	AGGCAGTGGGAACAAGACAG
	Reverse	GAAAACTTCCTGACGCCACC
<i>mTNF<math>\alpha</math></i>	Forward	GTCTACTGAACCTCGGGGTGA
	Reverse	CTCCTCCACTTGGTGGTTTG
<i>mCcl2</i>	Forward	GCCAACTCTCACTGAAGCC
	Reverse	GCTGGTGAATGAGTAGCAGC
<i>mF4/80</i>	Forward	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC
	Reverse	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
<i>hNLRP3</i>	Forward	CATGAGTGCTGCTTCGACAT
	Reverse	CGACTCCTGAGTCTCCCAAG
<i>hIL1B</i>	Forward	GACCTGAGCACCTTCTTCCCTTC
	Reverse	GCAGTTCAGTGATCGTACAGGTGC
<i>hIL18</i>	Forward	GCTGAAGATGATGAAAACCTGGA
	Reverse	GAGGCCGATTTCTTGGTCA
<i>hNR1D1</i>	Forward	CTGCAAGGGCTTTTCCGT
	Reverse	ATGCCGACGATGGAGCAAT
<i>hNR1D2</i>	Forward	ACAAGCAAATCGAGTGACCTG
	Reverse	CTCCATAGTGGAATCCTGACGC
<i>hARNTL</i>	Forward	TGCCACCAATCCATACACAGAA
	Reverse	TCCATCTGCTGCCCTGAGA
<i>Cyclophilin</i>	Forward	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC
	Reverse	ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTTGC
ChIP arntl	Forward	GGAAAGTAGGTTAGTGGTGCGAC
	Reverse	CAAGTCCGGCGCGGGTAAACAGG
ChIP NLRP3 -4.4 kb	Forward	TAGGAAGCATGGGGATTGTC
	Reverse	GAACAAAGTGGTGTATACTGTTCTGA
ChIP NLRP3 -4.2 kb	Forward	GAGCACTGCCTGTTCTCCA
	Reverse	TGTTCTGAGGAGGAATTGTGC
ChIP NLRP3 -1.2 kb	Forward	GTTACAGTCTTGAAGCCACA
	Reverse	CCAGATAGCAGCCTTGGGTA
ChIP NLRP3 -0.2 kb	Forward	ATGCACACAATTCCACCTGA
	Reverse	CAGAGCACCAAGGTGAGGAC
ChIP NLRP3 TSS	Forward	CACGAGTCCTGGTGACTTTG
	Reverse	GAGCCATGGAAGAAAAGTTCC
ChIP <i>I1<math>\beta</math></i> -4.0 kb	Forward	ATGTCCCTGCCCTGATTGT
	Reverse	CCAAAGAAATTTGGGGAAGA
ChIP <i>I1<math>\beta</math></i> -2.4 kb	Forward	GGGGTGTGGCATAGTGATGA
	Reverse	AGTGCCCGTCACCATCCT
ChIP <i>I1<math>\beta</math></i> -0.15 kb	Forward	GGAAGAGGCTATTGCTACCC
	Reverse	CCATTTCCACCACGATGAC

h, human; m, mouse.



METHODOLOGY

Open Access

# MuscleJ: a high-content analysis method to study skeletal muscle with a new Fiji tool



Alicia Mayeuf-Louchart<sup>1\*</sup> , David Hardy<sup>2</sup>, Quentin Thorel<sup>1</sup>, Pascal Roux<sup>3</sup>, Lorna Gueniot<sup>2</sup>, David Briand<sup>2</sup>, Aurélien Mazeraud<sup>2</sup>, Adrien Bouglé<sup>2</sup>, Spencer L. Shorte<sup>3</sup>, Bart Staels<sup>1</sup>, Fabrice Chrétien<sup>2</sup>, Hélène Duez<sup>1</sup> and Anne Danckaert<sup>2,3\*</sup>

## Abstract

**Background:** Skeletal muscle has the capacity to adapt to environmental changes and regenerate upon injury. To study these processes, most experimental methods use quantification of parameters obtained from images of immunostained skeletal muscle. Muscle cross-sectional area, fiber typing, localization of nuclei within the muscle fiber, the number of vessels, and fiber-associated stem cells are used to assess muscle physiology. Manual quantification of these parameters is time consuming and only poorly reproducible. While current state-of-the-art software tools are unable to analyze all these parameters simultaneously, we have developed MuscleJ, a new bioinformatics tool to do so.

**Methods:** Running on the popular open source Fiji software platform, MuscleJ simultaneously analyzes parameters from immunofluorescent staining, imaged by different acquisition systems in a completely automated manner.

**Results:** After segmentation of muscle fibers, up to three other channels can be analyzed simultaneously. Dialog boxes make MuscleJ easy-to-use for biologists. In addition, we have implemented color in situ cartographies of results, allowing the user to directly visualize results on reconstituted muscle sections.

**Conclusion:** We report here that MuscleJ results were comparable to manual observations made by five experts. MuscleJ markedly enhances statistical analysis by allowing reliable comparison of skeletal muscle physiology-pathology results obtained from different laboratories using different acquisition systems. Providing fast robust multi-parameter analyses of skeletal muscle physiology-pathology, MuscleJ is available as a free tool for the skeletal muscle community.

**Keywords:** Skeletal muscle fiber, Histology, Image automated quantification, In situ cartography, Fiber typing, Satellite cells, Stem cells, Vessels

## Background

The plasticity of skeletal muscle refers to its ability to adapt to environmental changes and its potential for regeneration. During embryonic development, Pax7-positive muscle progenitor cells enter the myogenic program by activating the expression of myogenic regulatory factors (MRF) and give rise to primary myofibers [1]. During fetal and post-natal periods, proliferative Pax7-positive cells contribute to skeletal muscle growth while some of them adopt quiescence. These adult muscle stem cells are

named satellite cells due to their peripheral position under the basal lamina and the sarcolemma of muscle fiber. They are required for skeletal muscle regeneration after injury [2]. Myofibers express different myosin isoforms that are related to specific properties of ATP hydrolysis and, therefore, muscle fiber contraction. Two classes of muscle fibers can be distinguished: slow-type oxidative fibers, which are more resistant to fatigue, consume more oxygen, and express type I myosin; and fast-type glycolytic fibers, which generate more force, express type II myosin (type IIA, IIX, IIB). During adult life, external signals, e.g., hormones or exercise, can switch the fiber type initially established during development and post-natal development [3]. Environmental changes can also affect skeletal muscle mass by adapting myofiber diameters, which can result in perturbations of skeletal muscle function. This is

\* Correspondence: alicia.mayeuf-louchart@pasteur-lille.fr; anne.danckaert@pasteur.fr

<sup>1</sup>Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, University of Lille, U1011 - EGID, 1 rue du Pr. Calmette, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup>Experimental Neuropathology Unit, Infection and Epidemiology Department, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.



observed, for example, in aging-induced atrophy or in steroid-induced hypertrophy [4]. Understanding the mechanisms underlying skeletal muscle plasticity is essential for the development of novel therapies targeting skeletal muscle dystrophies, sarcopenia, cachexia, and metabolic disorders.

Strategies to dissect the molecular mechanisms of such processes are usually based on the invalidation or overexpression of specific genes, modulation of metabolism, or activation of pharmacological targets in different animal models. Because different cell types are present in skeletal muscle, most of these experiments use histological techniques to specifically analyze the morphology of myofibers. Fiber typing, which aims to establish the proportion of each fiber type (I, IIA, IIX, IIB), is often performed in studies related to skeletal muscle metabolism. Atrophy and hypertrophy are assessed by measuring skeletal muscle cross-sectional area (CSA). Concerning skeletal muscle regeneration, one important characteristic is the presence of nuclei located in the center of fibers (centronuclei), resulting from the fusion of newly formed myoblasts with each other or with existing myofibers [5]. This is distinguished from undamaged fibers, which, in mice, display peripheral nuclei. Consequently, the number of centronuclei per fiber and CSA of regenerated fibers are readouts of skeletal muscle regeneration efficiency. In addition, the number of fiber-associated satellite cells informs on their potential to perform successive rounds of degeneration/regeneration. These experiments and analyses are time consuming, and different semi-automatic and automatic tools have been developed over the years based on different software and strategies [6–10]. Among them, TREAT-NMD SOP DMD\_M.1.2.001 (2008) is an automated image analysis method running on the commercial CellR Software (Olympus) that allows determination of fiber diameter and detection of centronuclei in segmented fibers. Another application, Semi-automatic Muscle Analysis using Segmentation of Histology (SMASH), is developed in the MATLAB environment. It provides fiber properties and typing, centronucleated fiber detection as well as quantification of inter-fiber objects (e.g., capillaries), after semi-automatic fiber segmentation on immunofluorescent images, which requires manual adjustments [8]. Finally, the recently developed open source MyoVision software provides the number of fibers per section, CSA, minimum Feret diameter, fiber type, and number of myonuclei [7]. However, none of these methods are designed to provide either the number of nuclei in centronucleated fibers, the CSA of different types of fibers (e.g., centronucleated fibers vs normal fibers or type I fibers vs type IIA fibers), nor the number of fiber-associated satellite cells. In addition, the diversity of the available software makes it time-consuming to master each of them for studying different parameters in one

study. Consequently, while many tools have been developed to automate histological analysis of skeletal muscle, most quantification is still performed manually using the well-known and open source Fiji (Fiji is just ImageJ) platform [11]. In this study, we present a new, complete high-content skeletal muscle analysis tool developed on this software that we named MuscleJ. It presents a number of advantages over existing methods as it groups most parameters frequently studied in fluorescence by the skeletal muscle community.

The tool we developed uses images coming from acquisition of immunofluorescent staining. It can perform segmentation of skeletal muscle fibers and quantification of centronucleated fibers and the number of centronuclei per fiber. It calculates fiber CSA and discriminates the CSA of regenerated centronucleated fibers from uninjured fibers. In addition, it quantifies myonuclei and fiber-associated Pax7-positive satellite cells and vessels. Finally, it also quantifies up to three different intramyofiber labelings, which could correspond to different myosins for the establishment of the fiber typing, or other parameters depending on the antibodies used or research question. It is completely automated, and the only requirement is working with high-quality images obtained by microscopy. In addition, we have implemented, for the first time, optional cartographies offering the possibility to get a rapid overview of the results on reconstituted skeletal muscle section images. This allows visualizing the number of vessels and satellite cells per fiber or the repartition of centronucleated fibers in the section, representing the extent of an injury. The cartography showing the fiber CSA is also useful to rapidly visualize skeletal muscle atrophy or hypertrophy. Furthermore, the speed of this complete automated method makes it possible to significantly increase the amount of fibers analyzed and, therefore, improve statistical power of the analyses.

## Methods

### Mice and tissue preparation

Seven- to twelve-week-old wild-type mice were used. Mice were euthanized by cervical dislocation, and skeletal muscles (tibialis anterior and gastrocnemius) were snap-frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for cryosectioning.

To induce skeletal muscle injury, mice were first anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) and 15  $\mu\text{l}$  of notexin (12.5  $\mu\text{mol}$  in 0.9% NaCl, Latoxan, France) was injected in the tibialis anterior.

### Immunofluorescent staining

Immunofluorescent staining was carried out on skeletal muscle (tibialis anterior and gastrocnemius) frozen sections (7 to 12  $\mu\text{m}$ ). For satellite cell staining, sections

were incubated for 6 min in a methanol bath at  $-20^{\circ}\text{C}$  followed by 10 min in a bath at  $100^{\circ}\text{C}$  containing antigen retrieval buffer (Vector #3300) diluted 1:10 in PBS1X. Sections were blocked in PBS 1X- 3% BSA or 5% horse serum. Primary and secondary antibodies are described in Table 1.

### Image acquisition

All images were acquired using the Axio Scan. Z1 (Zeiss). The acquisition settings are summarized in Table 2. However, other acquisition systems have been tested (Additional file 1: Table S1), such as an Apotome widefield (Apotome Axio Observer Z1, Zeiss), a confocal microscope (LSM 700 AxioObserver, Zeiss), and a spinning disk confocal (Cell Voyager CV1000, Yokogawa, Japan).

### Image analysis

The automated image analysis workflow was implemented in Fiji (NIH, Bethesda, MD, USA) [11] environment as a macro. Analysis was performed on different Windows/Mac OS computers with the following minimum requirements:

RAM: 16 GB  
System type: 64 bits operating system  
Fiji version: from 1.51e, presently tested on 1.51n  
Java version: Java 1.8.0–66 (64 bits)

Used plugins: Bio-Formats plugins for Fiji (release 5.5.3)  
Main used Fiji functions: the main used functions accessible from internal libraries have been listed in Additional file 1: Table S2

### Method validation

Comparison between control and regenerated skeletal muscle, 3 weeks after myotoxin intramuscular injection, was used to validate the detection of centronucleated fibers by MuscleJ, as was first described in [5]. Five independent experts with strong experience in skeletal muscle biology from two independent labs received a random set of images. Using Fiji software, and following specific instructions, they manually quantified fiber size, number of centronucleated fibers, fiber typing, and number of vessels and satellite cells. These results were compared to those obtained from MuscleJ. A second validation was performed by two independent experts to manually track individual fibers and determine their CSA, as well as the number of nuclei, in each centronucleated fiber on Fiji.

### Statistics

Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.®, USA) was used for statistical analysis. Data were analyzed by Mann–Whitney test or Student's *t* test after being assessed for normality of sample distribution. Inter-condition sample variability was tested by Kruskal–Wallis one-way analysis of variance.

**Table 1** List of antibodies and conditions in which they were used

	Primary antibody	Secondary antibody
Fiber/nuclei (from 2 labs)	Laminin Laminin $\alpha$ -2 (4H8-2) Santa Cruz #59854 (1/250) ON $4^{\circ}\text{C}$	Donkey anti-rat IgG Alexa Fluor 488 ThermoFisher #A-21208 (1/500) 45 min RT
	Hoechst	Hoechst 33342 ThermoFisher #H3570 (1/1500) 45 min RT
	Laminin Anti-laminin Ab (produced in Rabbit) L9393 thermoscientific (1/100) ON $4^{\circ}\text{C}$	Pierce donkey anti-rabbit IgG (H+L) cross adsorbed secondary Ab DyLight 650 (prod#Sa5-1041) (1/200) 1 h RT
	Hoechst	Hoechst 33342 ThermoFisher #H3570 (1/1000) 1 h RT
Satellite cell	Laminin Anti-laminin Ab (produced in rabbit) L9393 thermoscientific (1/100) ON $4^{\circ}\text{C}$	Pierce donkey anti-rabbit IgG (H+L) cross adsorbed secondary Ab DyLight 650 (prod#Sa5-1041) (1/200) 1 h RT
	Pax7 Monoclonal mouse anti-Pax7(supernatant), Developmental Studies Hybridoma Bank (1/20) ON $4^{\circ}\text{C}$	Biotinylated horse anti-mouse IgG (H + L) (Vector Laboratories, #BA-2000) = amplification (1/200) 1 h RT + Streptavidin-DTAF (Beckman Coulter, #PN IM0307) (1/1000) 1 h RT
Vessels	Laminin Anti-laminin Ab (produced in rabbit) L9393 thermoscientific (1/100) ON $4^{\circ}\text{C}$	Pierce donkey anti-rabbit IgG (H + L) cross adsorbed secondary Ab DyLight 488 (prod#Sa5-10038)
	CD31 BD Pharmingen 550,274 purified rat anti-mouse CD31 (1/50) ON $4^{\circ}\text{C}$	Pierce donkey anti-rat IgG (H + L) cross adsorbed secondary Ab DyLight 550 (Prod#Sa5-10027) (1/200) 1 h RT
Fiber type	Type I BA-D5 (mouse IgG2b) DSHB (1/100) 1 h $37^{\circ}\text{C}$	Anti-mouse IgG2b 647 nm life technology A21242 (1/250) 30 min $37^{\circ}\text{C}$
	Type IIA SC-71 (mouse IgG1) DSHB (1/100) 1 h $37^{\circ}\text{C}$	Anti-mouse IgG1 568 nm life technology A21124 (1/250) 30 min $37^{\circ}\text{C}$
	Type IIB BF-F3 (mouse IgM) DSHB (1/100) 1 h $37^{\circ}\text{C}$	Anti-mouse IgM 488 nm life technology A21042 (1/250) 30 min $37^{\circ}\text{C}$
	Laminin anti-laminin (rabbit) DSHB(1/100) 1 h $37^{\circ}\text{C}$	Anti-rabbit 4+A2:D1905nm abcam ab175651 (1/250) 30 min $37^{\circ}\text{C}$



**Table 2** Acquisition settings of tested images for the developed analysis feature

Acquisition		Analysis			
		centro-nucleated fibers	Vessels	Satellite cells	Fiber type
Image dimensions	Z-Stack	No	No	No	No
	Channels	2	3	3	4
	Scaling xy (per pixel)	0.325 $\mu\text{m} \times 0.325 \mu\text{m}$	0.325 $\mu\text{m} \times 0.325 \mu\text{m}$	0.38 $\mu\text{m} \times 0.38 \mu\text{m}$	0.325 $\mu\text{m} \times 0.325 \mu\text{m}$
Acquisition information	Microscope	AxioScan.Z1	AxioScan.Z1	LSM 700	AxioScan.Z1
	Objective	20x	20x	40x	20x
Channel 1	Reflector	DAPI	DAPI	DAPI	DAPI
	Excitation wavelength	353	353	404	353
	Emission wavelength	465	465	444	465
Channel2	Reflector	FITC	Cy3	Cy3	Cy3
	Excitation wavelength	495	548	561	548
	Emission wavelength	519	561	575	561
Channel 3	Reflector		FITC	FITC	FITC
	Excitation wavelength		495	488	495
	Emission wavelength		519	517	519
Channel 4	Reflector				Cy5
	Excitation wavelength				650
	Emission wavelength				673

Qualitative traits (i.e., fiber type distribution) were analyzed by a chi-square ( $\chi^2$ ) test. Statistical significance is shown on the graphs (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Concordance matrix between the experts and MuscleJ classes as fiber type or CNF classes have been processed to calculate classification accuracy by feature. Statistical tests used for each data set are indicated in the figure legends.

### Tutorial

A step by step tutorial is given in Additional file 1: Tutorial.

### Results

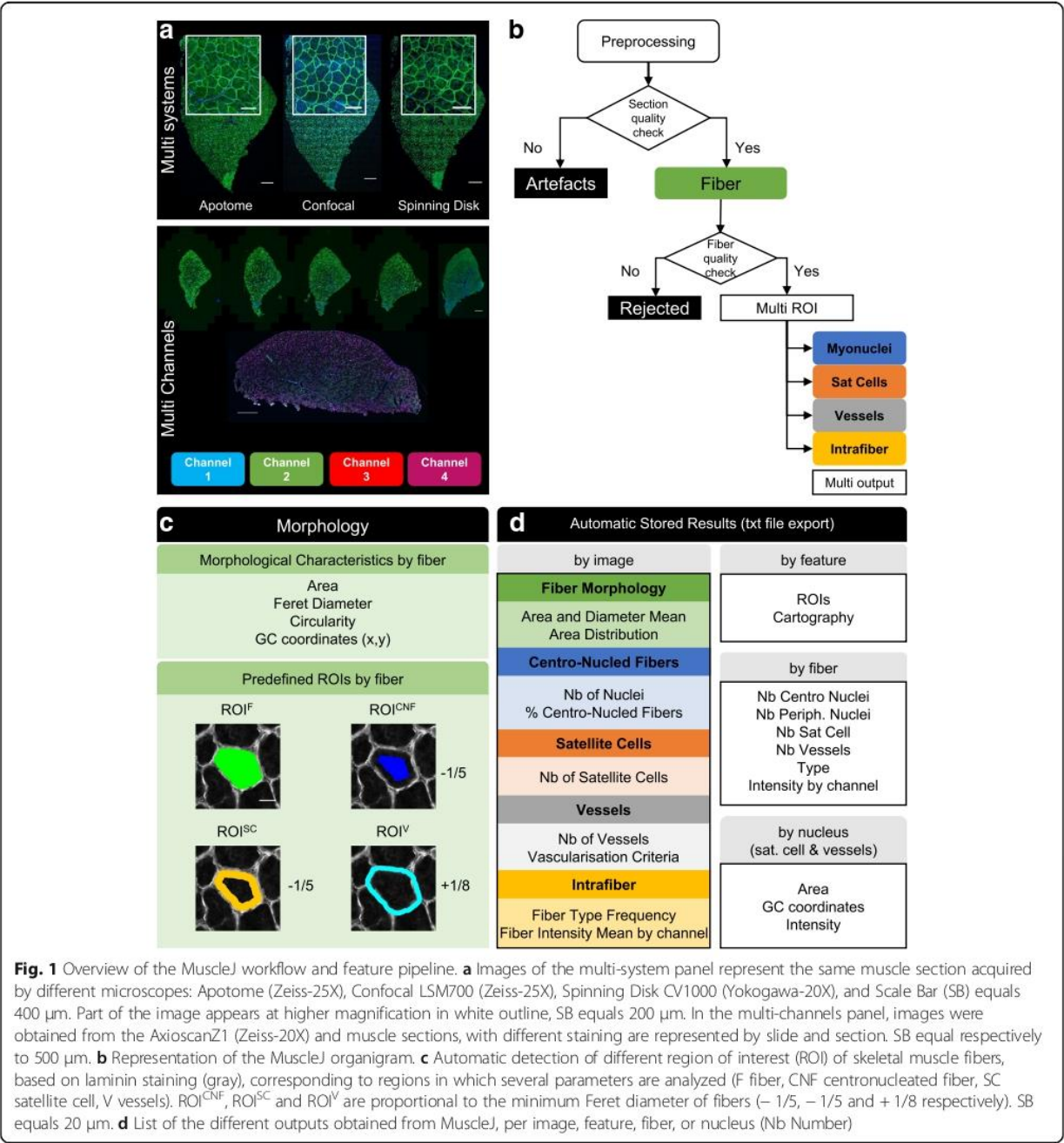
#### Overview of the MuscleJ algorithm: multi systems and multi channels (Fig. 1a)

Different acquisition systems were used to obtain images from muscle sections stained with DAPI and a laminin antibody. Among them, the Apotome (Zeiss), confocal LSM700 (Zeiss), and spinning disk CV1000 (Yokogawa, Japan) can produce reconstituted images of entire muscle sections after generation of mosaics. However, acquisition with these systems is time consuming. Conversely, the AxioScan.Z1, which was also used to generate widefield muscle images, offers the advantage of giving high quality images faster. Therefore, we used this system for the majority of this study to generate high-content data. However, MuscleJ is designed to

analyze images coming from a variety of systems. Image pretreatment depends on the scanned surface, the number of z slices acquired, and the number of channels. Up to four channels can be treated simultaneously. MuscleJ adapts the process to these different parameters automatically, leading to better recognition of muscle fiber outlines and fluorescent signals of interest.

#### MuscleJ organigram (Fig. 1b)

The first step of the program is preprocessing. In this stage, all muscle fibers of the section are segmented. A ratio comparing the area of the entire muscle section with the sum of all segmented fiber areas is automatically established during this step and serves to determine the quality of images. The percentage of accepted artefact is indicated by the user in the initial dialog box. MuscleJ then controls the decision to continue the analysis or exclude the image as an artifact, as illustrated in the Additional file 1: Figure S1A. This function, which works as a quality control, avoids the analysis of a partial or non-representative part of the section. After validation, fiber morphology is processed in the images. A second quality check occurs to eliminate poorly segmented fibers (associated with poor staining) that would otherwise represent bias in the analysis. For that, MuscleJ measures the CSA of all fibers of the section and eliminates those bigger than the average of fiber CSA plus three times the standard deviation. However, MuscleJ is adaptable to different physiological/phenotypical conditions. This was confirmed



**Fig. 1** Overview of the MuscleJ workflow and feature pipeline. **a** Images of the multi-system panel represent the same muscle section acquired by different microscopes: Apotome (Zeiss-25X), Confocal LSM700 (Zeiss-25X), Spinning Disk CV1000 (Yokogawa-20X), and Scale Bar (SB) equals 400  $\mu$ m. Part of the image appears at higher magnification in white outline, SB equals 200  $\mu$ m. In the multi-channels panel, images were obtained from the AxioscanZ1 (Zeiss-20X) and muscle sections, with different staining are represented by slide and section. SB equal respectively to 500  $\mu$ m. **b** Representation of the MuscleJ organigram. **c** Automatic detection of different region of interest (ROI) of skeletal muscle fibers, based on laminin staining (gray), corresponding to regions in which several parameters are analyzed (F fiber, CNF centronucleated fiber, SC satellite cell, V vessels). ROI<sup>CNF</sup>, ROI<sup>SC</sup> and ROI<sup>V</sup> are proportional to the minimum Feret diameter of fibers ( $-1/5$ ,  $-1/5$  and  $+1/8$  respectively). SB equals 20  $\mu$ m. **d** List of the different outputs obtained from MuscleJ, per image, feature, fiber, or nucleus (Nb Number)

by an analysis performed on Mdx mice, a model presenting a wide range of fiber sizes. In this model, both small and large fibers are correctly quantified on the same muscle section, by MuscleJ (Additional file 1: Figure S2).

For segmented fibers, different regions of interest (ROI) are automatically saved and used for the analyses selected in the initial dialog box. Specific ROIs are created with the detection of myonuclei, satellite cells, vessels, or intramyofiber staining, and results are then automatically saved as tables and graphs in appropriate formats.

**Data analysis with MuscleJ (Fig. 1c, d)**

Each muscle fiber is segmented by MuscleJ after a pretreatment consisting of background reduction and contrast enhancement. This leads to precise segmentation of the laminin signal, which stains the basal lamina of fibers. At this stage, different parameters are obtained, including the



CSA, circularity, and the minimal and maximal Feret diameters as well as the position of each fiber within the section by gravity center (GC) determination. A mask of this ROI corresponding to the fiber and named ROI<sup>F</sup> (region of interest of fiber) is created and saved (in green, Fig. 1c). It will be used for all other functions. Therefore, a high-quality laminin staining is essential for MuscleJ analysis. Three other ROIs are defined by MuscleJ. For detection of centronucleated fibers (CNF), we defined a mask corresponding to one fifth of the minimal Feret diameter for the creation of the ROI<sup>CNF</sup> (region of interest of centronucleated fiber), which represents the region in which the presence of myonuclei are considered as central (Fig. 1c). The space existing between the ROI<sup>F</sup> and ROI<sup>CNF</sup>, which we named ROI<sup>SC</sup> (region of interest of satellite cell), corresponds to the space occupied by satellite cells and non-central myonuclei (Fig. 1c). Finally, we defined the ROI<sup>V</sup> (region of interest of vessel) as the space outside of the fiber corresponding to one of eighth of the minimal Feret diameter of the ROI<sup>F</sup> (Fig. 1c). This mode of calculation for the establishment of the different ROIs has the advantage to be proportional to the fibers and can be therefore used for any fiber size. With the four ROIs predefined by MuscleJ, a precise and complete phenotype can be assigned to each fiber.

For each feature requested by the user (Fig. 1d), a specific algorithm is applied and allows fine and reproducible analysis on high numbers of fibers. For centronucleated fiber detection, the first step is detection of nuclei in the DAPI channel, followed by their localization in the ROI<sup>CNF</sup>. Each fiber with nuclei in this region of interest is recorded as a centronucleated fiber, and the number of centronuclei in the ROI<sup>CNF</sup> is also quantified and saved. Another output from this analysis is the number of peripheral myonuclei, i.e., nuclei in the ROI<sup>SC</sup> located between the ROI<sup>F</sup> and the ROI<sup>CNF</sup>. For the analysis of satellite cells, a first segmentation of Pax7-positive cells is made over the entire section as well as the nuclei segmentation in the DAPI channel. For each Pax7-positive cell, a new function called by MuscleJ checks if the overlap between Pax7-positive detected cells and nuclei is sufficient (90% minimum) to consider them Pax7/DAPI double-positive satellite cells. A final check is made to ensure that these Pax7/DAPI-positive cells are correctly positioned between the fiber and the basal lamina in the corresponding ROI<sup>SC</sup>. In the same way, the detection of vessels is first realized by detecting CD31-positive cells, followed by checking their position in the ROI<sup>V</sup>. Two vascularization criteria are also provided by MuscleJ. The first corresponds to the number of CD31-positive cells per square millimeter, and the second to the percentage of the section occupied by the vessels. Morphological characteristics of vessels and satellite cells (area, intensity and gravity center coordinates) are also saved in a separate file

and can be used for further analysis. The minimum distance between satellite cells and vessels can thus be calculated.

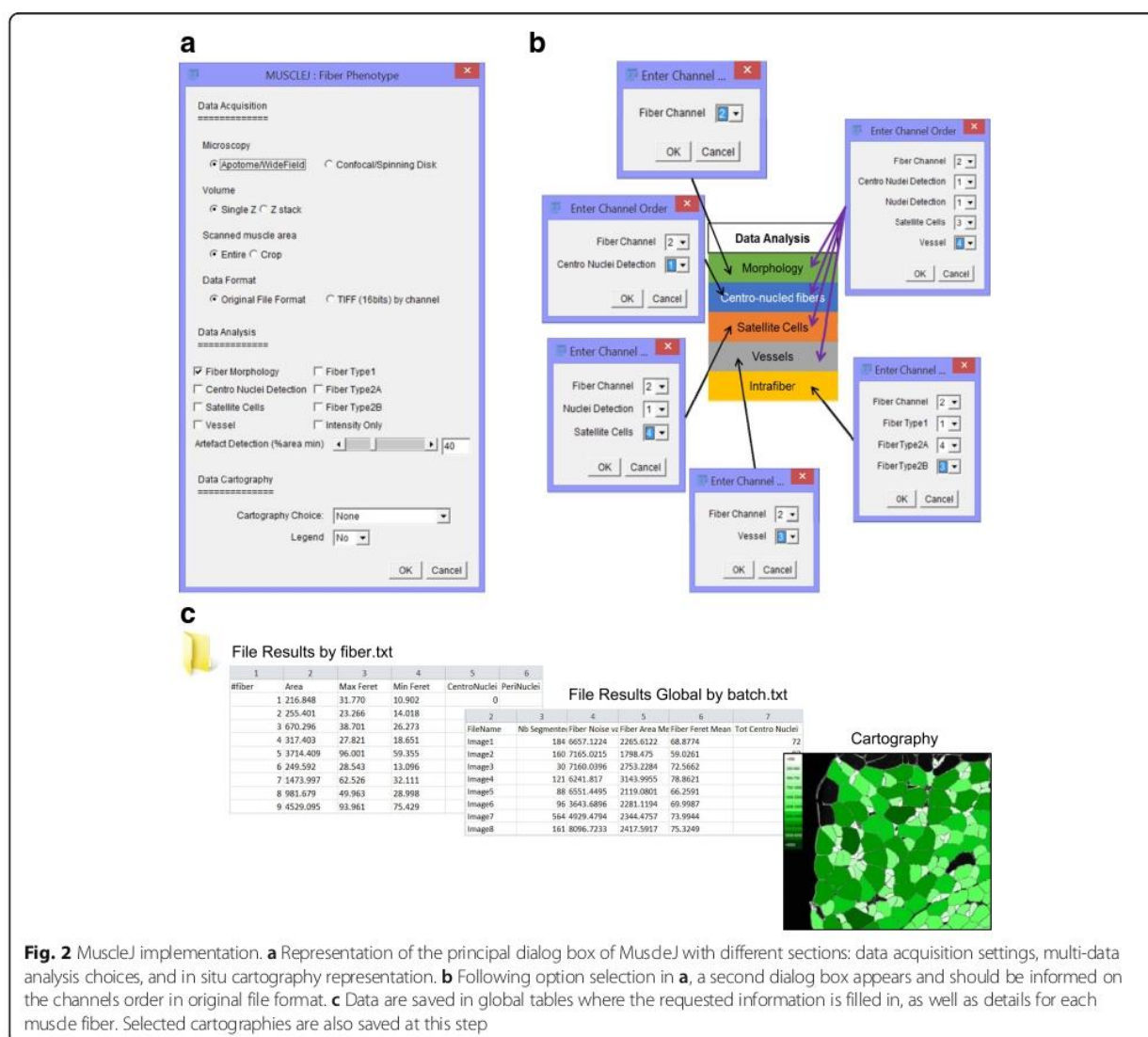
Finally, the function allowing the detection of intrafiber staining, e.g., those detected for fiber typing, is based on analysis of the intensity histogram of the respective channels. A threshold resulting from the specific signal-to-noise ratio is generated and then applied to ROI<sup>F</sup> in order to discriminate positive and negative fibers. Each specific threshold is indicated in the summary table of results at the end of the process.

During a batch run, a table for each analyzed section is created and saved in a readable file format (txt file format), thus storing fiber phenotype details (Fig. 1d). In parallel, the ROIs defined after morphometry analysis are saved and readable by ROI Manager (Fiji function). At the end of the process, a new table summarizes results by section, allowing a data analysis overview (Fig. 1d). All these results and ROIs are saved in the folder previously designated by the user including reconstructed cartographies, if selected. Thus, the ROIs may be reused for further analysis.

#### MuscleJ feature dialog boxes (Fig. 2)

The first dialog box, named “MuscleJ Fiber Phenotype,” allows selection of different options (Fig. 2a). Concerning the “data acquisition,” users can choose the type of microscope used for image acquisition, select if a z-stack was performed, and the file format of images to be processed. Original format or TIF (16 bit) files can be used by MuscleJ. When the “z-stack” option is selected, an automatic Maximum Intensity Projection is performed by MuscleJ. The second part, related to “data analysis,” concerns the selection of different image parameters to be analyzed. Finally, the last section of the dialog box is the selection of “data cartographies” that can be performed on images with the option of specific legends directly on in situ cartographies.

When this first dialog box is accepted, a second one appears and requests information about channel order in the original file or in a series of individual channels for the TIF format, in correspondence with the options chosen in the previous dialog box (Fig. 2b and Additional file 1: Tutorial). After asking for the path where the images are to be read and results to be saved (Fig. 2c), the batch is executed for processing of a set of images, with the corresponding characteristics previously selected. Results are saved in the output folder that will contain four new folders: a folder named “Artefacts” containing images not accepted by the quality check, a folder named “Cartography” where Jpeg images of cartographies are saved, a folder named “Results by file” containing results of all the individual text files of each image of the batch (by fiber), and a folder named “ROI”



**Fig. 2** MuscleJ implementation. **a** Representation of the principal dialog box of MuscleJ with different sections: data acquisition settings, multi-data analysis choices, and in situ cartography representation. **b** Following option selection in **a**, a second dialog box appears and should be informed on the channels order in original file format. **c** Data are saved in global tables where the requested information is filled in, as well as details for each muscle fiber. Selected cartographies are also saved at this step

where the ROI\_CNF, ROI\_F, ROI\_SC, ROI\_V for each fiber of each image of the batch are saved. These ROI can be applied in the future for further analyses. In addition, a text file named “RunGlobalResult\_xx” is generated containing a summary of all the results of the batch based on the analysis performed (i.e., FM fiber morphology, SC satellite cell detection, V vessel detection).

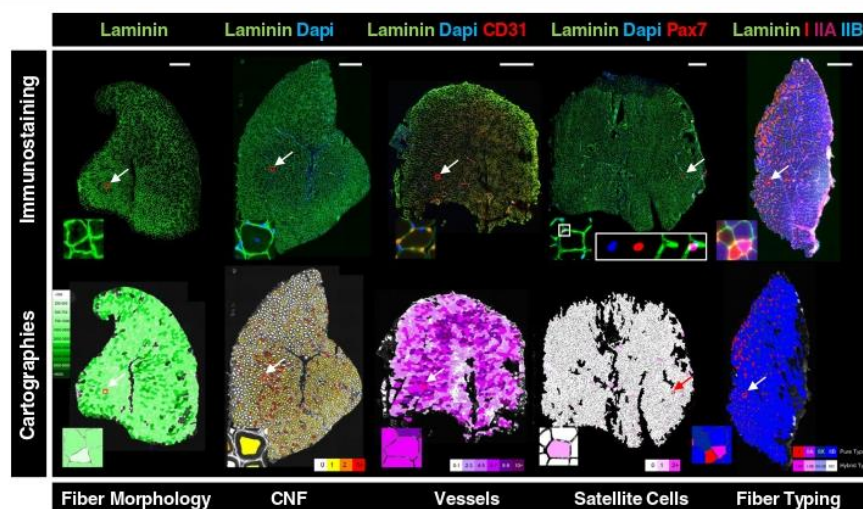
### Implementation of in situ cartography to score skeletal muscle phenotypes (Fig. 3)

To visually represent MuscleJ’s analysis, various in situ cartographies were implemented in the tool (Fig. 3). The first is CSA of fibers, where a green scale represents the distribution of different fiber CSA, from the smallest (in light green) to the largest (in dark green). The second corresponds to the number of centronuclei per fiber,

with a white to red scale in which fibers without centronuclei are represented in white and the fibers with more than three centronuclei are represented in red. Cells with one and two centronuclei are represented with yellow and orange respectively. These cartographies can be used to localize muscle injury (Additional file 1: Figure S3), and cross-correlation analysis between different cartographies can also be performed.

The number of fiber-associated vessels (CD31-positive) can also be quantified per fiber and represented on a dedicated cartography where a purple scale defines six predefined classes of fibers: those associated with 0 to 1, 2 to 3, 4 to 5, 6 to 7, 8 to 9, and more than 9 vessels per fiber, from light to dark purple, allowing a precise analysis of the distribution vessel numbers per fiber. The number of satellite cells can also be quantified from





**Fig. 3** Scoring of skeletal muscle phenotypes. The upper panel represents entire skeletal muscle sections obtained from immunofluorescent staining with different antibodies (laminin, Pax7, CD31, myosin I, myosin IIA, myosin IIB) and Dapi. SB equals 500  $\mu$ m (20 $\times$ , AxioscanZ1). The lower panel represents cartographies made by MuscleJ of the respective stainings. Arrows indicate selections of enlarged fibers in boxes. For satellite cell, each channel is represented separately. The first cartography, colored with a green scale represents the cross-section area (CSA) of skeletal muscle fibers. The number of centronuclei, vessels per fiber (CD31<sup>+</sup>), satellite cells (Pax7<sup>+</sup>) per fiber and the fiber typing are represented by red, pink, violet, and purple-blue scales respectively. Color scales can directly be incorporated in the saved cartographies

images of co-staining with laminin, DAPI, and the specific marker of satellite cells, Pax7. Results are given per fiber, and a pink scale cartography was implemented for this parameter in order to directly distinguish on skeletal muscle sections, the fibers which are not associated with satellite cells (in white), from those containing one (in light pink) or more than one satellite cells (in dark pink).

Finally, MuscleJ was also designed to quantify up to three intrafiber stainings. Here we demonstrate fiber typing as an example. In this case, four different fiber types (type I, type IIA, type IIB, and a deduced type IIX) can be analyzed from three different stainings with specific antibodies. Type IIX fibers correspond to unlabeled fibers. Fibers that are positive for two stainings are named “hybrid fibers” (I-IIA, I-IIB, IIA-IIB), while fibers having more than two stainings are considered as “not determined” (ND) in results. A cartography is also associated with this intrafiber quantification allowing to easily represent results of these quantifications. MuscleJ gives the signal intensity for each fiber in each channel in the table of results.

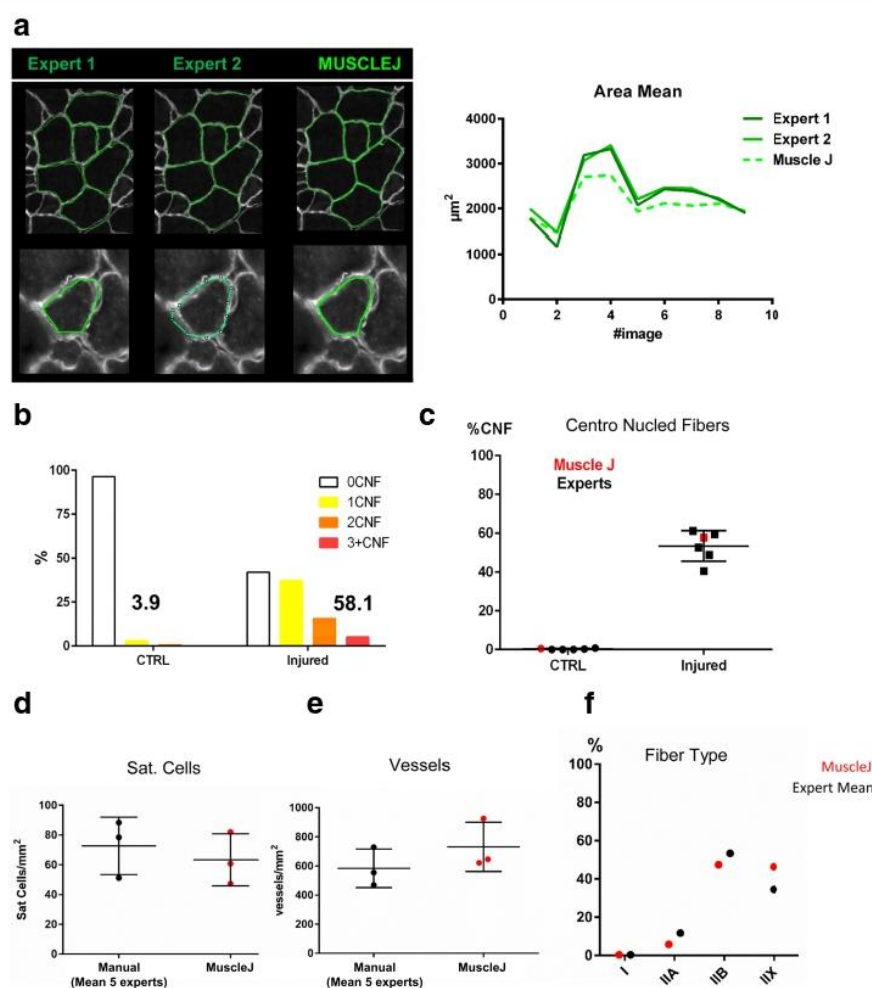
#### Validation of MuscleJ compared to benchmark methods used by different experts (Fig. 4)

To validate the measured characteristics of fibers, two independent experts from two different laboratories manually surrounded each fiber labeled by laminin (Fig. 4a). Our results show similar relative results between experts and MuscleJ for the different images. One clear difference was an overestimation of the fiber CSA by the experts. This was

likely due to the imprecision of the hand-drawing of fiber edges, notably for small fibers. MuscleJ has the advantage of outlining all fibers in a precise, reproducible manner.

The centronuclei detection functionality of MuscleJ was first validated by comparing the number of centronuclei from uninjured and regenerated muscle, 3 weeks after a notexin-induced injury. The results show that while only 3.9% of fibers have centronuclei in control conditions, MuscleJ detects the presence of 58.1% of fibers with centronuclei in injured muscles, the rest being non-regenerated fibers (Fig. 4b). Five independent experts from two different labs performed quantification of the same images and show similar results as those obtained with MuscleJ (Fig. 4c and Additional file 1: Figure S4A).

Other functionalities of MuscleJ (satellite cells, vessels, and intrafiber stainings) were also tested by these five experts (Fig. 4d–f). For satellite cells and vessels, the results were not different between the experts and MuscleJ, thus validating MuscleJ for analysis of such parameters. For the detection of intracellular staining, the results obtained by the experts were also consistent with those obtained using MuscleJ for type I and type IIA fibers. However, a Chi-square test indicates significantly different results for the distribution of type IIB and type IIX fibers (Fig. 4f), highlighting the difficulty of manually tracking such labelling (Additional file 1: Figure S4B–C). Consequently, comparison between different conditions with MuscleJ is more reliable than manual quantifications.



**Fig. 4** Method validation by feature. **a** The left panel represents the manual drawing of skeletal muscle fibers by two independent experts. The right panel is a graph representing the cross-section area (CSA) mean by expert compared to MuscleJ. **b** The percentage of fibers with no, one, two, or three and more centronuclei was quantified by MuscleJ on control skeletal muscle sections (left, CTRL,  $n = 4$ ) and sections from injured skeletal muscle (right,  $n = 5$ ). **c** Manual expertise by five independent experts compared to MuscleJ for the quantification of the percentage of centronucleated fibers. **d, e** Results obtained for manual quantification compared to MuscleJ for the number of satellite cells by  $\text{mm}^2$  (**d**), vessels by  $\text{mm}^2$  (**e**) and fiber type distribution. **f** For **d, e**, and **f**, each black dot represents the mean of manual quantification by five independent experts per image. Mann-Whitney test was used to compare manual and MuscleJ data for Sat. Cells and Vessels by  $\text{mm}^2$  (respectively,  $p = 0.70$  and  $p = 0.40$ )

For all of these experiments, each expert recorded the time spent on each image. Upon comparison to the time required for image analysis by MuscleJ, we found that automated quantification was 10 to 30 times faster than manual quantification (Additional file 1: Figure S4D).

## Discussion

Histological characterization is of central interest in most studies of fundamental and clinical aspects of skeletal muscle pathophysiology. For these analyses, a variety of different tools have been developed using different software, but to date, there is no single tool capable of automatically analyzing all parameters simultaneously. As

a result, each laboratory often develops its own strategy to quantify parameters of interest. Manual quantifications, mainly performed with Fiji, are often described in scientific articles. However, manual approaches are subject to technical and observer bias, questioning the reproducibility of results obtained by different laboratories and different image acquisition systems. In this study, we propose a high-content analysis tool developed on the free, open-source Fiji software, which we named MuscleJ. It allows quantification of many important skeletal muscle parameters, based on immunofluorescent staining of skeletal muscle sections and can be applied to all high-quality images obtained from a variety of microscopes.



As other available software, e.g., SMASH and Myovision, MuscleJ allows to analyze fiber morphology by measuring the number of skeletal muscle fibers, their CSA, and minimum and maximum Feret diameter after fiber segmentation based on laminin staining (Additional file 1: Table S3). In addition to laminin, up to three different intrafiber stainings can be quantified. Here, we highlight fiber typing based on myosin type I, type IIA and type IIB immunostainings. However, the use of other antibodies against specific proteins located within the fiber can also be analyzed in terms of number of positive fibers and intensity of the signal.

Another functionality of MuscleJ, also done by SMASH, is the identification of myonuclei localized in a central position within the fiber. The number of centronuclei per fiber can be now quantified by MuscleJ. Aberrant positioning of nuclei in the fiber is a feature shared by many muscle disorders [12–14]. This is also an important parameter for characterization of regenerating fibers as it is a readout of regeneration efficiency. Running MuscleJ on muscle sections co-labeled with laminin and DAPI returns the number of regenerated fibers and the number of nuclei in each fiber. Importantly, it can also report their respective CSA, and the combination of these different parameters is sufficient to show potential defects in the muscle regeneration process.

In addition, our tool presents unique functionality not currently available. We have developed the automatic detection of Pax7-positive muscle stem cells localized under the basal lamina of fibers, as well as CD31-positive endothelial cells of vessels in skeletal muscle. Both parameters are often quantified in muscle studies [15–17]. Analysis of CD31-positive cells, also performed by SMASH, offers here the possibility for combined analysis of satellite cells or intrafiber staining.

Combined analysis performed by MuscleJ is an original feature of this tool that is based on the possibility to track each individual fiber which is automatically numbered and saved in the ROI folder. Therefore, it is possible to establish correlations between the morphology, number of associated satellite cells and vessels, and number of centronuclei or intrafiber signals by fibers, depending on the antibodies used (see the “Possible analysis combinations” in the Additional file 1: Tutorial). In addition, the capacity of MuscleJ to quickly analyze all these parameters makes it possible to increase the amount of muscle sections to be analyzed and consequently improve statistical power.

Another original feature of MuscleJ is the optional *in situ* cartographies. Five different cartographies have been designed. The first one represents the number of centronuclei per fiber by a color code from white to red, where white fibers are normal fibers and red fibers correspond to those containing more than three nuclei in a central position. There are many advantages of this option,

including the capability to directly visualize the extent of an injury induced by myotoxin injection or comparison of the degenerative state of different skeletal muscles (Additional file 1: Figure S2). The second cartography depicts the CSA of muscle fibers by a gradual color code ranging from pale to dark green. This tool offers a number of perspectives in studies focusing on skeletal muscle mass regulation where atrophy and hypertrophy are examined as an endpoint. The spatial information brought by this option can be used, for example, to determine the effect of local intramuscular injection of different treatments on fiber CSA. The three other cartographies present the number of satellite cells or vessels associated to fibers and the fiber type distribution. These cartographies can be optionally included in each analysis, depending on the box checked in MuscleJ when it is launched. The user should be aware that including additional analyses can greatly increase the running time of the program.

The high-content tool we developed is based on the analysis of different immunofluorescent stainings. Many studies, notably in the clinical diagnostic field, also use immunohistochemical staining to assess specific parameters, such as fibrosis by Sirius Red, metabolism by COX and SDH staining, glycogen content by PAS staining, and lipid content by Oil RedO. In the future, we plan to develop MuscleJ with new functions in order to detect and quantify these parameters. In addition, we will also add the possibility to analyze skeletal muscle of other species (human, horse, pig...) as our current algorithm has only been validated in mice. We plan to also develop the capacity of MuscleJ to align serial skeletal muscle sections labeled by immunofluorescent and immunohistochemistry for specific markers. Finally, a plugin will be developed to further improve the interactive user interface and will be deposited on an appropriate open source web site for scientific community.

## Conclusions

MuscleJ has been designed to allow characterization of many parameters currently analyzed in fundamental and clinical studies in the skeletal muscle field. We have developed this tool on the free publicly accessible software Fiji, in order to offer the capacity to the muscle community to use it freely on high quality images obtained from a range of different microscopes. Using MuscleJ significantly reduces the time of analysis and renders possible the comparison of experiments performed at different times and in different laboratories around the world by providing highly reproducible analyses. The easy-to-use interface is highly intuitive and facilitates its usage. We expect that MuscleJ will become the tool of reference for all skeletal muscle histological analysis in the future.



## Additional file

**Additional file 1:** Supplementary tables, figures and tutorial. (PDF 2355 kb)

## Abbreviations

ATP: Adenosine triphosphate; CNF: Centronucleated fibers; COX: Cytochrome oxidase; CSA: Cross-section area; MDX: Mouse model of Duchenne muscular dystrophy; MRF: Myogenic regulatory factor; Nb: Number; ND: Not determined; PAS: Periodic acid Schiff; Pax7: Paired box protein 7; ROI: Region of interest; ROI<sup>MF</sup>: Region of interest of centronucleated fibers; ROI<sup>I</sup>: Region of interest of fibers; ROI<sup>SC</sup>: Region of interest of satellite cells; ROI<sup>V</sup>: Region of interest of vessels; Sat Cell: Satellite cells; SMASH: Semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology; TIF: Tagged image format

## Acknowledgements

We thank Dr. Meryem Tardivel and Antonino Bongiovanni of the BiCel-Campus HU Facility for access to systems and technical advice. We thank Dr. Mylène Fefeu and Emmanuel Parot for performing manual expertise and for advice and comments on the manuscript and Antoine Prémont for critical testing of MusDel. We thank Anthony Yasmann for critical reading of the tutorial and Dr. Joel Haas for critical reading of the manuscript.

## Funding

This work was supported by research grants from the Association Française contre les Myopathies AFM (to AML, FC and DH), Fédération Francophone de Recherche sur le Diabète FFRD, sponsored by Fédération Française des Diabétiques (AFD), AstraZeneca, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme (MSD), Novo Nordisk & Sanofi, (to HD), Fondation de France (to HD), the "European Genomic Institute for Diabetes" (EGID, ANR-10-LABX-46) (to HD and BS), the Fondation des Gueules Cassées (DH and FC), and an ERC-Région Hauts de France funding (to HD). BS is a holder of an ERC advanced grant no. 694717 "Bile acid, immune-metabolism, lipid and glucose homeostasis". The PBI (AD, PR, and SLS) is part of the France Bioimaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INSB-04-01, "Investments for the future").

## Availability of data and materials

All relevant data are within the paper and its additional files. A set of analyzed data and Fiji macro can be downloaded from GitHub site on request to the corresponding authors while waiting for the development of the plugin.

## Authors' contributions

AM-L and AD contributed to the study concept and research design and wrote the manuscript. AM-L, DH, PR, QT, LG, DB, AB, and AD conducted the experiments and acquired and analyzed the data. AM and AD performed the bioinformatics development. S-LS, BS, FC, and HD gave conceptual advice and contributed to the critical revision of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

Experimental procedures were performed with the approval of the Nord-Pas-de-Calais ethics committee (CEEA75- 2017122019046377), the Institut Pasteur Ethics Committee (C2EA 89 - CETEA), and in compliance with French and European ethical legislations. Protocols were also reviewed by the Institut Pasteur, the competent authority, for compliance with the French and European regulations on Animal Welfare and with Public Health Service recommendations. This project has been reviewed and approved (# 2013-0044) by the Institut Pasteur Ethics Committee (C2EA 89 - CETEA).

## Consent for publication

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Publisher's Note

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

## Author details

<sup>1</sup>Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, University of Lille, U1011 - EGID, 1 rue du Pr. Calmette, F-59000 Lille, France. <sup>2</sup>Experimental Neuropathology Unit, Infection and Epidemiology Department, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France. <sup>3</sup>UTechS PBI (Imagopole)-Citech, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France.

Received: 26 March 2018 Accepted: 20 July 2018

Published online: 06 August 2018

## References

- Buckingham M, Mayeuf A. Skeletal muscle development. In: Hill JA, Olson EN, editors. *Muscle: fundamental biology and mechanisms of disease*. Boston: Academic Press; 2012. p. 749-62.
- Montarras D, L'honoré A, Buckingham M. Lying low but ready for action: the quiescent muscle satellite cell. *FEBS J*. 2013;280:4036-50.
- Schiaffino S. Fibre types in skeletal muscle: a personal account. *Acta Physiol Oxf Engl*. 2010;199:451-63.
- Blaauw B, Schiaffino S, Reggiani C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. *Compr Physiol*. 2013;3:1645-87.
- Gutiérrez JM, Ownby CL, Odell GV. Skeletal muscle regeneration after myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin from the snake *Bothrops asper* (Fer-de-Lance). *Toxicol Off J Int Soc Toxinol*. 1984;22: 719-31.
- Bergmeister KD, Gröger M, Aman M, Willensdorfer A, Manzano-Szalai K, Salminger S, et al. A rapid automated protocol for muscle fiber population analysis in rat muscle cross sections using myosin heavy chain immunohistochemistry. *J Vis Exp JoVE*. 2017; <https://doi.org/10.3791/55441>.
- Wen Y, Murach KA, Vechetti IJ, Fry CS, Vickery CD, Peterson CA, et al. MyoVision: software for automated high-content analysis of skeletal muscle immunohistochemistry. *J Appl Physiol Bethesda Md*. 1985. 2017; [jap.00762.2017](https://doi.org/10.1152/jap.00762.2017)
- Smith LR, Barton ER. SMASH - semi-automatic muscle analysis using segmentation of histology: a MATLAB application. *Skelet Muscle*. 2014;4:21.
- Kostrominova TY, Reiner DS, Haas RH, Ingemannson R, McDonough PM. Automated methods for the analysis of skeletal muscle fiber size and metabolic type. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;306:275-332.
- Sertel O, Dogdas B, Chiu CS, Gurcan MN. Microscopic image analysis for quantitative characterization of muscle fiber type composition. *Comput Med Imaging Graph Off J Comput Med Imaging Soc*. 2011;35:616-28.
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676-82.
- Roman W, Gomes ER. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Semin Cell Dev Biol*. 2017; <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.005>.
- Jungbluth H, Gautel M. Pathogenic mechanisms in centronuclear myopathies. *Front Aging Neurosci*. 2014;6:339.
- Folker ES, Baylies MK. Nuclear positioning in muscle development and disease. *Front Physiol*. 2013;4:363.
- Latroche C, Weiss-Gayet M, Muller L, Gitiaux C, Leblanc P, Liot S, et al. Coupling between myogenesis and angiogenesis during skeletal muscle regeneration is stimulated by restorative macrophages. *Stem Cell Rep*. 2017; 9:2018-33.
- Hardy D, Besnard A, Latil M, Jouvion G, Briand D, Thépenier C, et al. Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice. *PLoS One*. 2016;11:e0147198.
- Gayraud-Morel B, Chrétien F, Flamant P, Gomès D, Zammit PS, Tajbakhsh S. A role for the myogenic determination gene *Myf5* in adult regenerative myogenesis. *Dev Biol*. 2007;312:13-28.

## Endospanin-2 enhances skeletal muscle energy metabolism and running endurance capacity

Steve Lancel, ... , Bart Staels, Yasmine Sebt

JCI Insight. 2018;3(9):e98081. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98081>.

Research Article Metabolism Muscle biology

Metabolic stresses such as dietary energy restriction or physical activity exert beneficial metabolic effects. In the liver, endospanin-1 and endospanin-2 cooperatively modulate calorie restriction-mediated (CR-mediated) liver adaptations by controlling growth hormone sensitivity. Since we found CR to induce endospanin protein expression in skeletal muscle, we investigated their role in this tissue. In vivo and in vitro endospanin-2 triggers ERK phosphorylation in skeletal muscle through an autophagy-dependent pathway. Furthermore, endospanin-2, but not endospanin-1, overexpression decreases muscle mitochondrial ROS production, induces fast-to-slow fiber-type switch, increases skeletal muscle glycogen content, and improves glucose homeostasis, ultimately promoting running endurance capacity. In line, *endospanin-2<sup>-/-</sup>* mice display higher lipid peroxidation levels, increased mitochondrial ROS production under mitochondrial stress, decreased ERK phosphorylation, and reduced endurance capacity. In conclusion, our results identify endospanin-2 as a potentially novel player in skeletal muscle metabolism, plasticity, and function.

Find the latest version:

<https://jci.me/98081/pdf>





# Endospanin-2 enhances skeletal muscle energy metabolism and running endurance capacity

Steve Lancel,<sup>1,2,3,4</sup> Matthijs K.C. Hesselink,<sup>5</sup> Estelle Woldt,<sup>1,2,3,4</sup> Yves Rouillé,<sup>6</sup> Emilie Dorchies,<sup>1,2,3,4</sup> Stephane Delhaye,<sup>1,2,3,4</sup> Christian Duhem,<sup>1,2,3,4</sup> Quentin Thorel,<sup>1,2,3,4</sup> Alicia Mayeuf-Louchart,<sup>1,2,3,4</sup> Benoit Pourcet,<sup>1,2,3,4</sup> Valérie Montel,<sup>7</sup> Gert Schaart,<sup>5</sup> Nicolas Beton,<sup>8</sup> Florence Picquet,<sup>7</sup> Olivier Briand,<sup>1,2,3,4</sup> Jean Pierre Salles,<sup>8</sup> Hélène Duez,<sup>1,2,3,4</sup> Patrick Schrauwen,<sup>5</sup> Bruno Bastide,<sup>7</sup> Bernard Bailleul,<sup>1,2,3,4</sup>, Bart Staels,<sup>1,2,3,4</sup> and Yasmine Sebti<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Université de Lille, U1011 - EGID, F-59000 Lille, France. <sup>2</sup>Inserm, U1011, F-59000 Lille, France. <sup>3</sup>CHU Lille, F-59000 Lille, France. <sup>4</sup>Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France. <sup>5</sup>School for Nutrition, Toxicology and Metabolism, Departments of Human Biology and Human Movement Sciences, Maastricht University Medical Center, NL-6200 MD Maastricht, the Netherlands. <sup>6</sup>Center of Infection and Immunity of Lille (CIIL), Inserm, U1019, CNRS UMR-8204, Institut Pasteur de Lille, Université de Lille, France. <sup>7</sup>UREPSS, Université de Lille, EA 7369, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France. <sup>8</sup>INSERM UMR1043 (CPTP), Université de Toulouse, Paul Sabatier, Hôpital des Enfants, CHU de Toulouse, Toulouse, France.

Metabolic stresses such as dietary energy restriction or physical activity exert beneficial metabolic effects. In the liver, endospanin-1 and endospanin-2 cooperatively modulate calorie restriction-mediated (CR-mediated) liver adaptations by controlling growth hormone sensitivity. Since we found CR to induce endospanin protein expression in skeletal muscle, we investigated their role in this tissue. In vivo and in vitro endospanin-2 triggers ERK phosphorylation in skeletal muscle through an autophagy-dependent pathway. Furthermore, endospanin-2, but not endospanin-1, overexpression decreases muscle mitochondrial ROS production, induces fast-to-slow fiber-type switch, increases skeletal muscle glycogen content, and improves glucose homeostasis, ultimately promoting running endurance capacity. In line, *endospanin-2*<sup>-/-</sup> mice display higher lipid peroxidation levels, increased mitochondrial ROS production under mitochondrial stress, decreased ERK phosphorylation, and reduced endurance capacity. In conclusion, our results identify endospanin-2 as a potentially novel player in skeletal muscle metabolism, plasticity, and function.

## Introduction

Besides its role in locomotion, skeletal muscle also controls whole body energy metabolism and expenditure. Skeletal muscle is a highly plastic tissue composed of slow and fast fibers that exhibit different oxidative and glycolytic metabolic capacities adapting to environmental conditions such as nutrient availability and physical activity. The adaptations of skeletal muscle to physiological stimuli involve changes in mass, myofiber composition, and mitochondrial properties associated with appropriate metabolic modifications. Mitochondria not only produce energy necessary for myofiber contractions, but they are also major producers of ROS. Pathophysiological conditions, such as obesity, type 2 diabetes, and aging, have been associated with impaired skeletal muscle oxidative metabolism and increased ROS production (1, 2). Conversely, calorie restriction (CR) or exercise both protect from age-related pathologies, notably by decreasing skeletal muscle oxidative stress (3). Activation of autophagy, a key stress response pathway, is also implicated in the beneficial effects of exercise and CR, notably by preventing the accumulation of damaged cellular components (4–6).

Endospanin-1, also named Leptin receptor overlapping transcript (LEPROT), and endospanin-2, also named LEPROT-like 1 (LEPROTL1) (7, 8), belong to a gene family derived from a unique ancestor gene encoding vacuolar protein sorting 55 (VPS55) in *Saccharomyces cerevisiae* (9). The endospanins and VPS55 tetraspan membrane proteins are located in the trans-Golgi network and endosomes and participate in the intracellular trafficking of various proteins, such as cell surface receptors in mammals or vacuolar carboxypeptidase Y in yeast, to the vacuole/lysosome (9–12), suggesting a phylogenetically conserved role of

**Authorship note:** BB, BS, and YS are co-senior authors.

**Conflict of interest:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

**Submitted:** October 13, 2017

**Accepted:** March 28, 2018

**Published:** May 3, 2018

**Reference information:**

JCI Insight. 2018;3(9):e98081. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98081>.

these proteins in protein trafficking. We have previously demonstrated that endospinin-1 and endospinin-2 cooperate to decrease cell-surface abundance of the growth hormone (GH) receptor in the liver in periods of reduced nutrient availability, therefore decreasing plasma IGF1 levels (12). Moreover, endospinin expression is induced in liver and chondrocytes during CR, mediating an FGF-21-dependent reduction in GH sensitivity (13). Altogether, these observations identify a key role for these proteins in CR-induced metabolic adaptations. Since we found CR to also induce their protein expression in skeletal muscle, we investigated their role in this tissue. Here, using both gain- and loss-of-function models, we demonstrate that endospinin-2, but not endospinin-1, triggers ERK phosphorylation in skeletal muscle through autophagy activation, which results in decreased oxidative stress, fast-to-slow fiber-type switch, and enhanced glucose metabolism and glycogen storage. Finally, we show that endospinin-2 overexpression promotes running endurance capacity, while endospinin-2 downregulation induced the opposite phenotype. These findings identify endospinin-2 as a critical regulator of skeletal muscle plasticity, function, and metabolic flexibility.

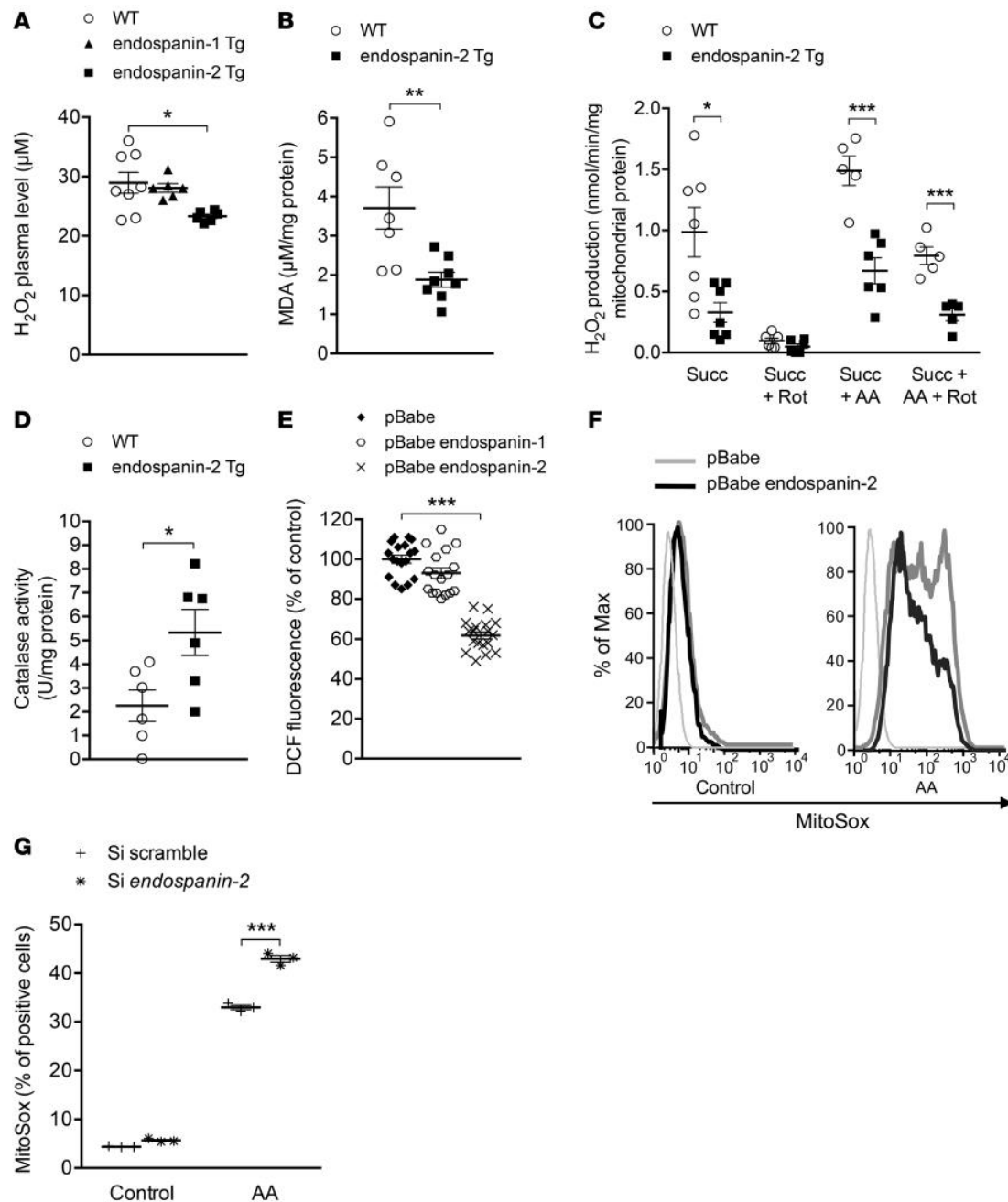
## Results

**CR induces endospinin expression in skeletal muscle.** Since CR enhances endospinin expression in the liver and the tibial growth plate in mice (12, 13), we assessed total endospinin expression upon CR in skeletal muscle using antibodies targeting the conserved C-terminus of both endospinin-1 and -2. After 4 weeks of CR, endospinin protein levels increased in skeletal muscle of WT mice (Supplemental Figure 1A; supplemental material available online with this article; <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98081DS1>), whereas their mRNA levels remained unchanged (Supplemental Figure 1B). In line, 4 weeks of CR also increased Tg endospinin-2 and endospinin-1 protein but not their mRNA levels in skeletal muscle of endospinin-1 and endospinin-2 Tg mice (Supplemental Figure 1, C–F). These results indicate that CR upregulates endospinin protein expression through posttranslational mechanisms.

**Endospinin-2 decreases mitochondrial oxidative stress.** Given the role of CR to preserve skeletal muscle from oxidative damage by decreasing mitochondrial superoxide emission and increasing antioxidant defences (3, 14), we assessed whether overexpression of endospinins modulate oxidative stress levels.  $H_2O_2$  plasma levels were 20% lower in endospinin-2 Tg, but not in endospinin-1 Tg mice, when compared with WT littermates (Figure 1A). Since other biochemical and functional parameters (data not shown) were also unchanged in endospinin-1 Tg compared with WT littermate mice, we further focused on endospinin-2 Tg mice only. In line with the decrease of plasma  $H_2O_2$ , levels of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation, were 50% lower in glycolytic muscles from endospinin-2 Tg compared with WT mice (Figure 1B). To determine whether mitochondria are implicated in this oxidative stress reduction, ROS production was measured in isolated mitochondria incubated under stress conditions. Succinate-driven ROS production through reverse electron flow from complex II to complex I was 65% lower in skeletal muscle mitochondria of endospinin-2 Tg mice (Figure 1C). Moreover, complex III ROS production measured after addition of the respective complex I and III chain inhibitors, rotenone, and antimycin A was 60% lower in glycolytic muscle mitochondria from endospinin-2 Tg compared with WT mice (Figure 1C). In addition, endospinin-2 Tg glycolytic muscle exhibited a 2.8-fold higher catalase activity (Figure 1D). To study whether endospinin-2 regulates mitochondrial ROS production in a cell-autonomous manner, C2C12 muscle cells were stably infected with endospinin-1 or endospinin-2 coding retroviruses. In line with the *in vivo* results, intracellular  $H_2O_2$  levels measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), a hydrogen peroxide-sensitive fluorescent probe, revealed significantly lower (~30%) ROS production in C2C12 myotubes overexpressing endospinin-2, but not endospinin-1, compared with control infected cells (Figure 1E). To confirm that endospinin-2 directly modulates mitochondrial superoxide generation, experiments were performed using MitoSox, a superoxide-specific probe selectively targeted to mitochondria (15). While antimycin A-driven mitochondrial superoxide production was markedly lower in C2C12 myotubes overexpressing endospinin-2 (Figure 1F), endospinin-2 silencing increased antimycin A-stimulated superoxide production (Figure 1G). These mitochondrial ROS production modifications were not related to changes in mitochondrial mass or respiration (Supplemental Figure 2). Interestingly, mRNA and protein expression of UCP3 were lower in endospinin-2 Tg glycolytic muscle (Supplemental Figure 3A) and in endospinin-2-overexpressing C2C12 cells (Supplemental Figure 3B), likely reflecting an adaptive response to reduced mitochondrial ROS production.

Altogether, these data indicate that endospinin-2 regulates skeletal muscle mitochondrial ROS production.





**Figure 1. Endospain-2, but not endospain-1, decreases mitochondrial oxidative stress in vivo and in vitro.** (A) Plasma  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels of endospain-1 Tg mice, endospain-2 Tg mice, and their WT littermates ( $n = 7-8$  per genotype). (B) Malondialdehyde (MDA) levels in quadriceps from endospain-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 7-8$  per genotype). (C) Mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  production measured on isolated mitochondria and expressed per mg of mitochondrial protein. Mitochondrial substrates and inhibitors were sequentially added: 10 mM succinate (Succ), 1  $\mu\text{M}$  rotenone (Rot), 2.5  $\mu\text{M}$  antimycin A (AA). All experiments were done on quadriceps from endospain-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 6$  per genotype). (D) Catalase activity in quadriceps from endospain-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 6$  per genotype). (E) Intracellular ROS analysis using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) on differentiated endospain-1, endospain-2, or control pBabe C2C12 cells ( $n = 6$  per condition). (F) Representative histograms of flow cytometry experiments, using superoxide-specific probe MitoSox, illustrating the increase in mean fluorescence intensity and percentage of positive cells following AA pretreatment on differentiated endospain-2 or control (pBabe) retrovirus-infected C2C12 cells. (G) C2C12 were transfected with control and *endospain-2* siRNAs (mRNA levels decreased by 85%), and percentage of positive cells for MitoSox was evaluated by flow cytometry in absence or presence of AA ( $n = 6$  per condition). Results are expressed as means  $\pm$  SEM and were analyzed by unpaired *t* test, except for E, which was analyzed by 1-way ANOVA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ .

*Endospalin-2 activates the ERK pathway.* The ERK pathway is involved in survival processes in response to cellular stresses and also plays an important role in the regulation of mitochondrial function (16, 17). Since, ERK stimulates Stat3 translocation to mitochondria by enhancing Stat3 phosphorylation on Serine 727, hence downregulating ROS production (18–20), we next assessed ERK phosphorylation levels in endospalin-2 Tg muscles. Interestingly, basal ERK1/2 phosphorylation levels were higher in endospalin-2 Tg mice (Figure 2A), associated with higher Ser 727 Stat3 phosphorylation (Figure 2B). Moreover, p-ERK, total ERK, and Stat3 were more abundant in purified skeletal muscle mitochondria from endospalin-2 Tg compared with WT littermate mice (Figure 2C and Supplemental Figure 4A). Mitochondrial ERK localization and activity have been associated with mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening desensitization under stress conditions (21). Interestingly, endospalin-2 overexpression increased the resistance to mPTP opening of isolated skeletal muscle mitochondria, demonstrating higher resistance to cellular stress (Figure 2D). ERK phosphorylation was also upregulated in endospalin-2–overexpressing C2C12 cells (Figure 2E). In line with these results, the protection from antimycin A–induced superoxide production observed in endospalin-2–overexpressing C2C12 cells was abolished by the addition of U0126, an inhibitor of ERK phosphorylation (Figure 2F and Supplemental Figure 4B), suggesting that ERK signaling participates in the endospalin-2–induced decrease of oxidative stress. Together, these data indicate that endospalin-2 regulates mitochondrial ROS production through activation of the ERK pathway.

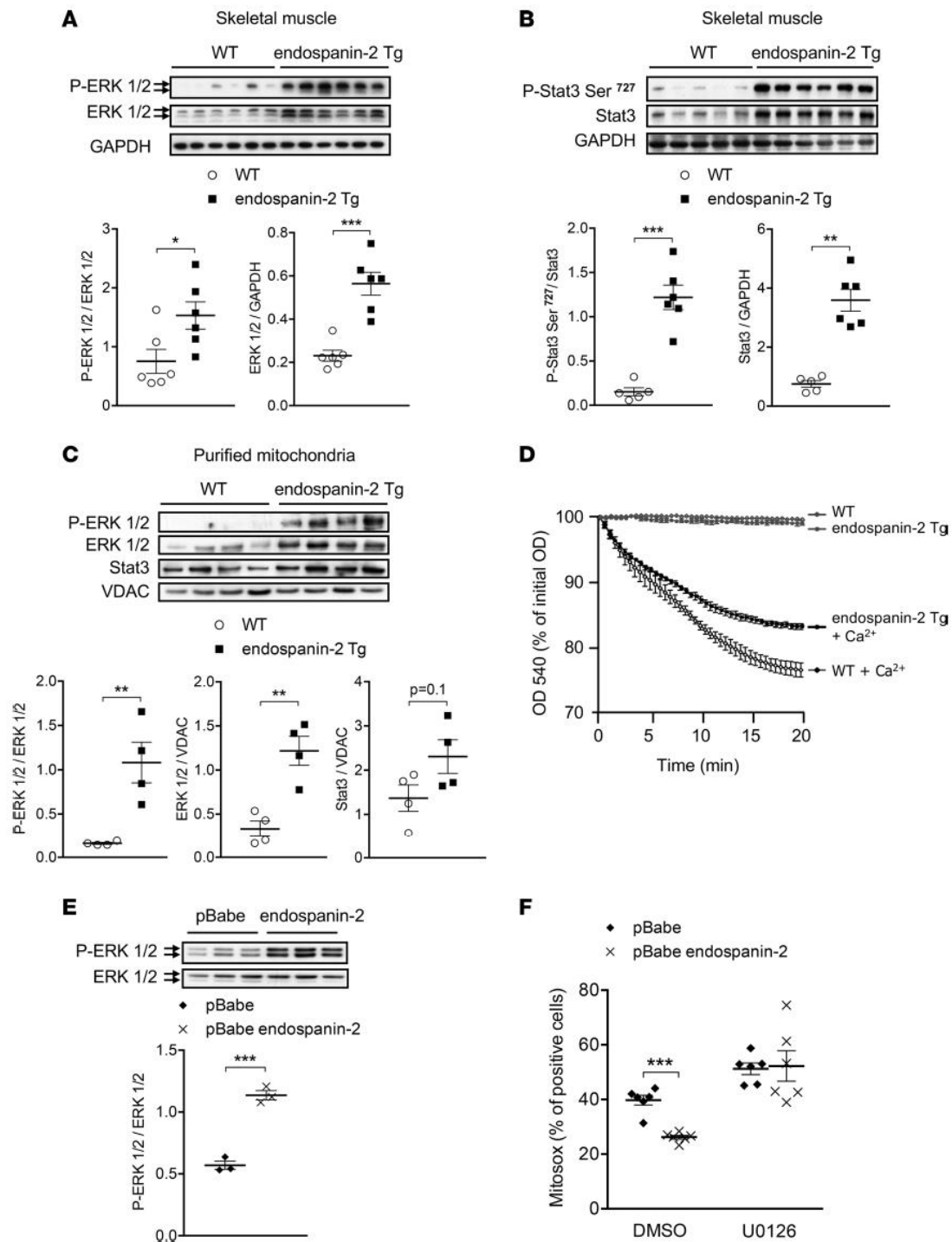
To determine whether *endospalin-2* deficiency leads to a mirror phenotype, *endospalin-2*<sup>−/−</sup> mice were generated (Supplemental Figure 5, A and B). Opposite to endospalin-2 Tg mice, *endospalin-2*<sup>−/−</sup> mice displayed higher lipid peroxidation levels (Figure 3A) and increased mitochondrial ROS production under mitochondrial stress conditions (Figure 3B). Consistently, the ERK phosphorylation level was lower in *endospalin-2*<sup>−/−</sup> skeletal muscle (Figure 3C). By contrast, AAV-mediated skeletal muscle–specific endospalin-2 overexpression in vivo (Supplemental Figure 5C) resulted in a significant decrease in mitochondrial ROS production (Figure 3D) associated with higher basal ERK phosphorylation levels in skeletal muscle (Figure 3E). Altogether, these results demonstrate that skeletal muscle endospalin-2 activates the ERK pathway and regulates mitochondrial ROS production.

*Endospalin-2 triggers ERK phosphorylation through autophagy activation.* Endospalin-2 Tg mice displayed reduced skeletal muscle mass of the predominant glycolytic muscles (i.e., *extensor digitorum longus* [EDL], quadriceps, and gastrocnemius) compared with WT mice (Figure 4A). Interestingly, this reduction in muscle mass is associated with autophagy activation, a highly conserved cell survival process, linked to dietary restriction and exercise-conveyed skeletal muscle adaptations (22, 23). Indeed, protein levels of Ulk1, Atg5, Beclin, and the LC3-II/I ratio were increased in glycolytic muscles of endospalin-2 Tg mice (Figure 4B and Supplemental Figure 6A). The increase in autophagy was confirmed in vivo by electron microscopy analysis, revealing autophagosome structures in endospalin-2 Tg mouse glycolytic muscles (Figure 4C). By contrast, autophagy markers were not increased in the oxidative soleus muscle of endospalin-2 Tg mice compared with WT mice (Supplemental Figure 6B).

During autophagy, cytoplasmic material and organelles are sequestered within autophagosomes to be delivered to lysosomes for degradation. Since Vps55, the yeast endospalin homologue, promotes targeting of endocytosed proteins to the vacuole/lysosome (9), a key organelle in macroautophagy, we investigated whether cellular endospalin-2 is colocalized with autophagosomes upon modulation of autophagy. In basal conditions, endospalin-2 localized around the nucleus (Figure 4D and Supplemental Figure 6C), likely in the endosomal compartment (11). Interestingly, starvation of endospalin-2–overexpressing C2C12 cells — followed by treatment with chloroquine, a lysosomal inhibitor inducing accumulation of LC3-II–positive autophagosomes — resulted in endospalin-2 colocalization with LC3-II and the lysosome (Figure 4D and Supplemental Figure 6C). These results indicate that endospalin-2 traffics with autophagic structures to the lysosome upon autophagy activation.

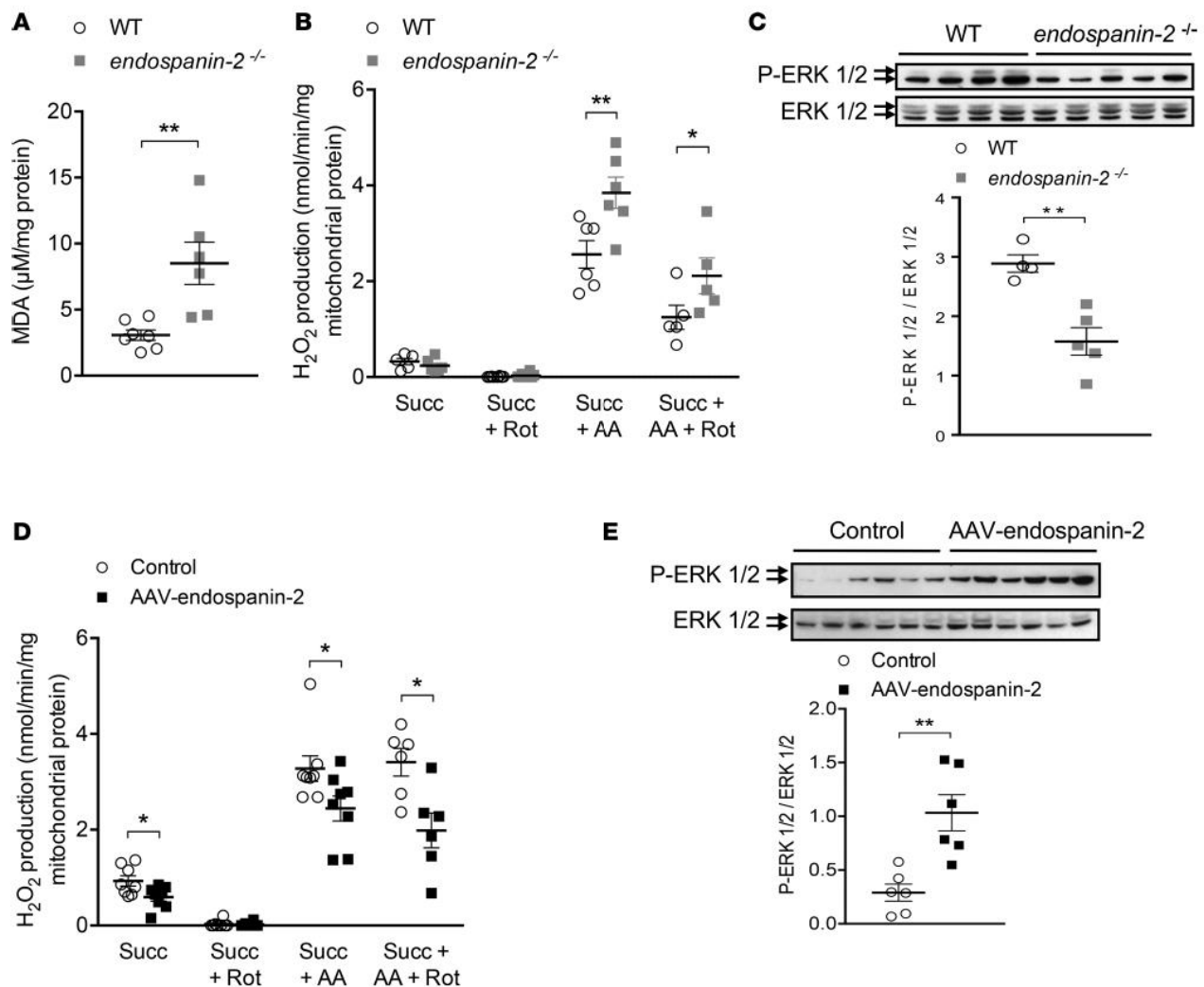
Interestingly, autophagy has been recently shown to promote ERK phosphorylation (24). To determine whether endospalin-2 increases ERK phosphorylation through autophagy activation, C2C12 myotubes overexpressing endospalin-2 and control cells were treated with either the PI3K inhibitors wortmannin or chloroquine, which inhibit the autophagy process at early and late stages, respectively. In line with previous observations (24), blocking autophagosome formation by wortmannin decreased ERK phosphorylation, while chloroquine-induced autophagosome accumulation promoted ERK phosphorylation (Figure 4E). More importantly, the difference in ERK phosphorylation observed between endospalin-2–overexpressing and control C2C12 cells was abolished upon inhibition of autophagy by wortmannin and chloroquine (Figure 4E).





**Figure 2. Endospalin-2 activates the ERK cellular stress pathway.** Western blot analysis of (A) phosphorylated ERK 1/2, total ERK1/2, and (B) phosphorylated Stat3 on serine 727 residue and total stat3 protein levels in quadriceps from endospalin-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 6$  per genotype). (C) Western blot analysis of phosphorylated ERK1/2, total ERK1/2, and total Stat3 protein levels on purified mitochondria (see extended experimental procedures and Supplemental Figure 4A) from endospalin-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 4$  per genotype). (D) mPTP opening sensitivity assessed by monitoring OD 540 nm after 75  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup> pulse on isolated mitochondria from endospalin-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 6$  per genotype). (E) Western blot analysis of phosphorylated ERK 1/2 and total ERK1/2 protein levels on differentiated endospalin-2 or control (pBabe) retrovirus-infected C2C12 cells ( $n = 3$  per condition). (F) Percentage of positive cells for MitoSOX  $\pm$  antimycin A evaluated by flow cytometry on differentiated cells treated or not with U0126, an inhibitor of ERK phosphorylation ( $n = 5$  per condition). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  by unpaired  $t$  test.

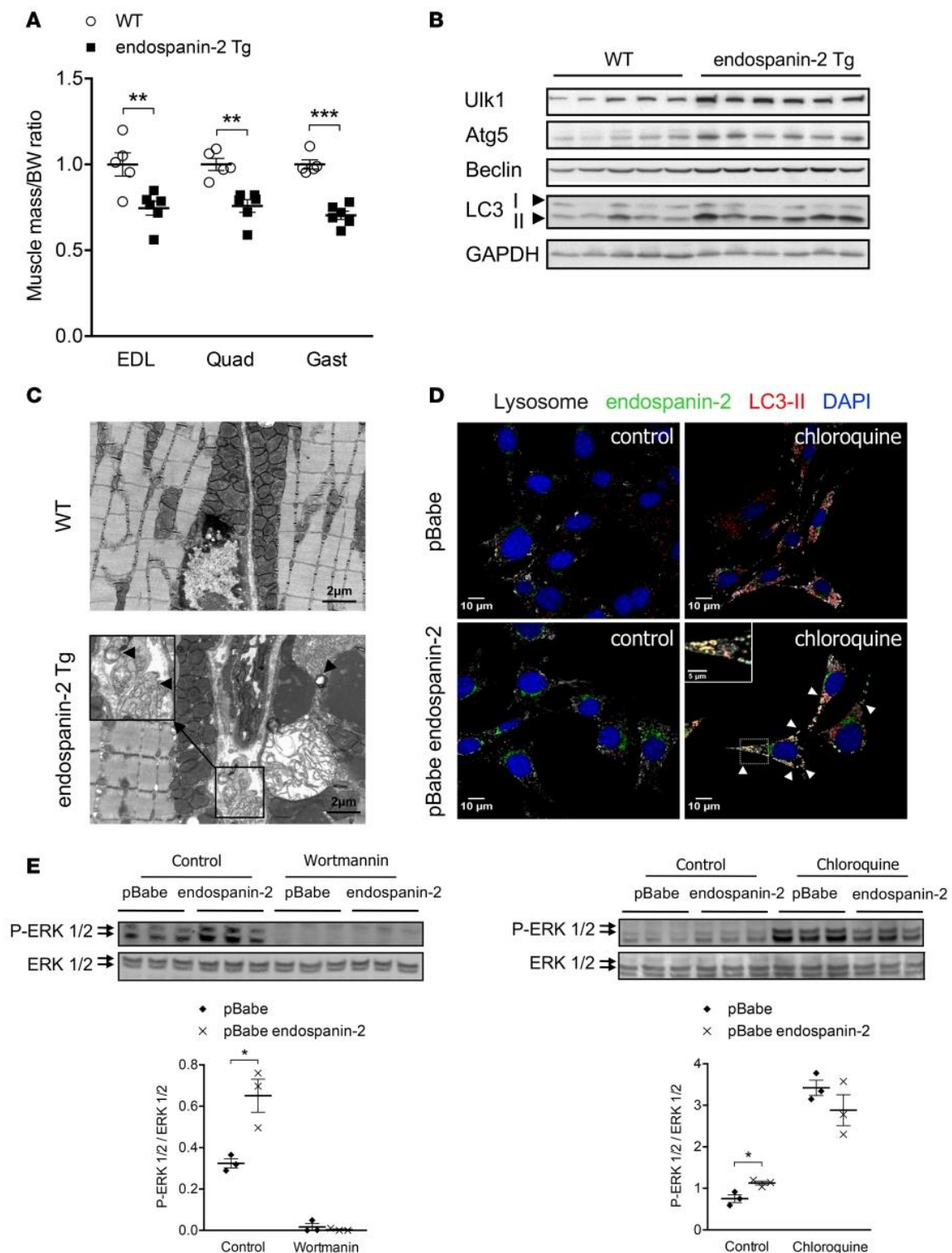




**Figure 3. *Endospainin-2*<sup>-/-</sup> mice display increased oxidative stress and decreased ERK phosphorylation.** (A) Skeletal muscle MDA levels in *Endospainin-2*<sup>-/-</sup> mice and their WT littermates ( $n = 6-8$  per genotype). (B) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production evaluated on isolated quadriceps muscle mitochondria from *endospainin-2*<sup>-/-</sup> and their WT littermates ( $n = 6-7$  per genotype). (C) Western blot analysis of phosphorylated ERK 1/2 and total ERK 1/2 protein levels in the quadriceps from *endospainin-2*<sup>-/-</sup> mice and their WT littermates ( $n = 4-5$  per genotype). (D) Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production evaluated on mitochondria isolated from gastrocnemius muscle from mice intramuscularly injected with an *endospainin-2*-expressing or a control AAV vector and treated with mitochondrial substrates and inhibitors (10 mM succinate [Succ], 1 μM rotenone [Rot], 2.5 μM antimycin A [AA]) ( $n = 8-10$  per group). (E) Western blot analysis of phosphorylated ERK1/2 and total ERK1/2 protein levels in gastrocnemius from mice intramuscularly injected with an *endospainin-2*-expressing or a control AAV vector ( $n = 6$  per group). Results are expressed as means ± SEM; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  by unpaired  $t$  test.

These data indicate that *endospainin-2* regulates ERK phosphorylation through autophagy modulation.

*Endospainin-2 regulates skeletal muscle plasticity and function.* Considering that oxidative stress level, autophagy activation, and the ERK pathway regulate skeletal muscle plasticity and function (25–27), immunofluorescence analysis of the myosin heavy chain (MHC) isoforms was performed on EDL sections of *endospainin-2* Tg and WT littermate mice. EDL from *endospainin-2* Tg mice exhibited a lower proportion of glycolytic MHC2b and a higher proportion of MHC2x fibers compared with muscles from WT mice (Figure 5A). Moreover, the fiber-type switch was observed at both the mRNA and protein levels (Supplemental Figure 7, A and B). Although the total fiber number remained unchanged (Supplemental Figure 7C), the MHC2b fiber cross-section area (CSA) was significantly lower, while the MHC2x and hybrid fiber CSA was higher in EDL of *endospainin-2* Tg compared with WT mice (Figure 5B). This fiber-type switch was not observed in the soleus oxidative muscle of *endospainin-2* Tg compared with WT mice (Supplemental Figure 7D). Moreover, skeletal muscle fiber type and mass were not yet modified in young *endospainin-2*



**Figure 4. Endospanin-2 regulates ERK pathway through autophagy activation.** (A) Muscle mass relative to body weight of endospanin-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 6$  per genotype). (B) Western blot analysis of Ulk1, Atg5, Beclin, and LC3-I and LC3-II proteins levels in EDL muscle from endospanin-2 Tg mice compared with WT littermates ( $n = 5-6$ /genotype). (C) Representative images of electron microscopy analysis on EDL sections from endospanin-2 Tg mice compared with their WT littermate ( $n = 5-6$  per genotype). Black arrowheads represent autophagosomal structures. (D) Representative images of immunofluorescence staining depicting colocalisation of lysosome (gray), LC3-II (red), and endospanin-2 (green) in endospanin-2-overexpressing C2C12 treated with chloroquine (50  $\mu$ M) compared with control cells ( $n = 3$  per condition). (E) Western blot analysis of phosphorylated ERK 1/2 and total ERK1/2 protein levels in endospanin-2 or control (pBabe) retrovirus-infected C2C12 cells cultured in nutrient-free medium (HBSS) treated with chloroquine (50  $\mu$ M), wortmannin (100 nM), or their respective vehicle for 4 hours ( $n = 3$  per condition). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  by unpaired  $t$  test.



Tg mice compared with WT and endospinin-1 Tg mice (Supplemental Figure 7, E and F), suggesting that the endospinin-2-induced skeletal muscle phenotype is unlikely to be established during development.

By contrast, glycolytic muscles of endospinin-1 Tg mice did not display any phenotype and displayed no modification in fiber-type composition (Supplemental Figure 7, A and B) or mass (data not shown) compared with WT mice.

To investigate whether the fiber-type transition in endospinin-2 Tg mice is associated with changes in skeletal muscle function, the fatigue index was evaluated on dissected EDL from endospinin-2 Tg and WT mice. Consistent with the fast-to-slow fiber type, ex vivo endospinin-2 Tg EDL muscle was significantly more resistant to fatigue than EDL from WT mice (Figure 5C). Since metabolic challenges also impact skeletal muscle metabolism, we measured skeletal muscle glycogen level, an easily mobilized source of glucose upon sudden energy needs. Periodic acid–Schiff (PAS) staining (Figure 5D and Supplemental Figure 8A) and biochemical measurement of glycogen (Supplemental Figure 8B) revealed a significantly higher glycogen content in glycolytic muscles of endospinin-2 Tg mice compared with WT littermates. Given these findings, we also assessed whether endospinin-2 overexpression affects glucose homeostasis. Despite no changes in plasma insulin level (Supplemental Figure 8C), fasting plasma glucose was lower in endospinin-2 Tg mice (Supplemental Figure 8D), and this was associated with improved glucose tolerance (Figure 5E and Supplemental Figure 8E). Moreover, insulin-stimulated p-Akt levels were more strongly induced in skeletal muscle of endospinin-2 Tg mice compared with WT mice, indicating that skeletal muscle of endospinin-2 Tg mice are more sensitive to insulin than WT mice (Figure 5F and Supplemental Figure 8F). By contrast, *endospinin-2*<sup>−/−</sup> mice did not display any difference in glucose homeostasis compared with their WT littermates (Supplemental Figure 8G).

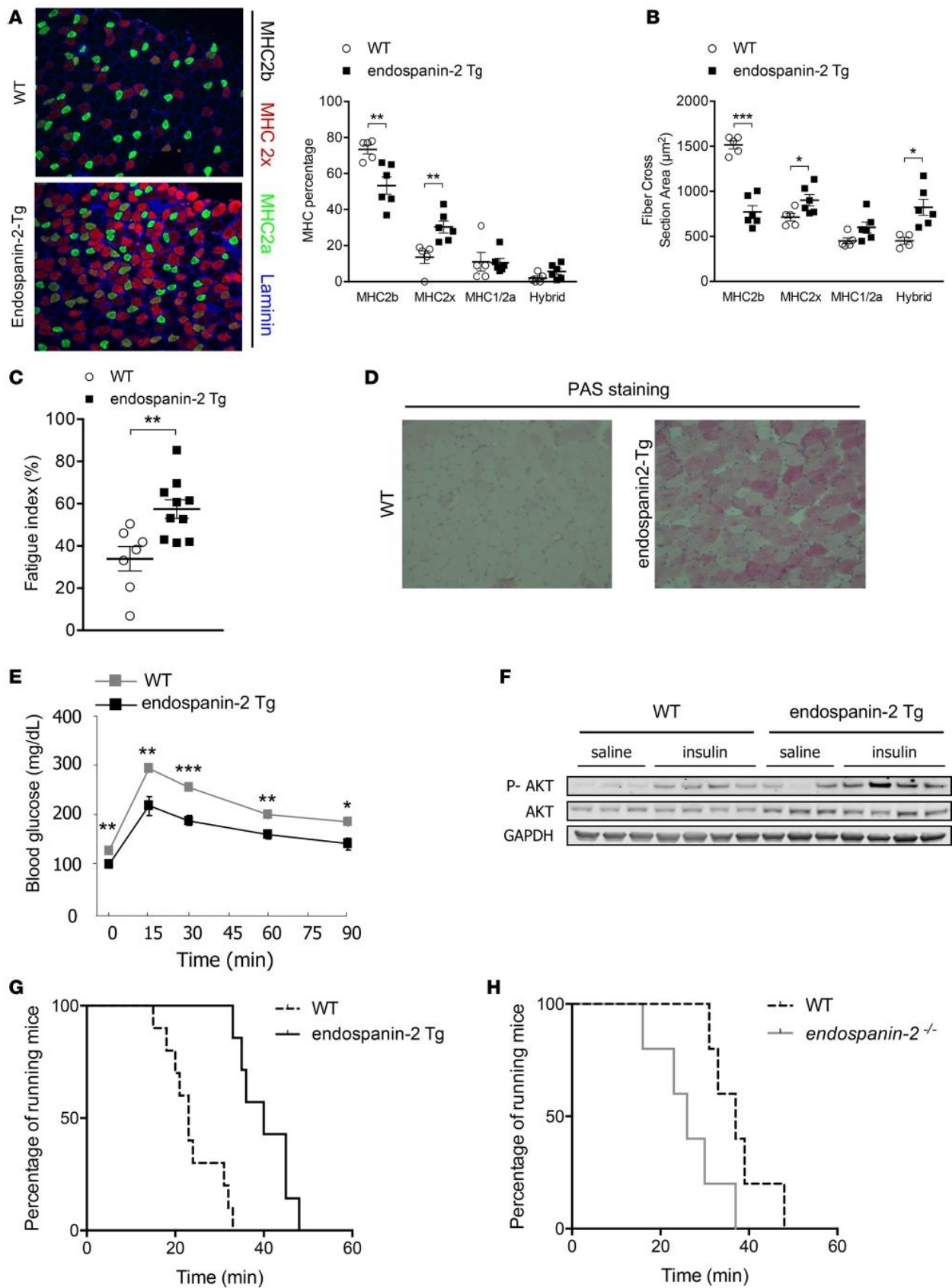
Finally, when submitted to an endurance exercise test to exhaustion at 70% of maximal oxygen consumption ( $\text{VO}_{2\text{max}}$ ), endospinin-2 Tg mice ran much longer and covered a greater distance than WT or endospinin-1 Tg mice (Figure 5G and Supplemental Figure 8H), while *endospinin-2*<sup>−/−</sup> mice displayed lower exercise capacity (Figure 5H and Supplemental Figure 8I) and reduced spontaneous locomotor activity in a free wheel exercise compared with their WT littermates (Supplemental Figure 8J). Altogether, these data show that endospinin-2 plays a regulatory role in skeletal muscle metabolic flexibility and function.

## Discussion

Dietary energy restriction is a metabolic stress that induces beneficial adaptations of skeletal muscle, resulting in improved health (28). We and others have previously shown that endospinin-1 and endospinin-2 cooperatively control CR-induced metabolic adaptations in the liver by modulating hepatic GH sensitivity (12, 13). In this study, we show that endospinin-2, but not endospinin-1, modulates skeletal muscle function and plasticity. By activating autophagy, endospinin-2 triggers ERK phosphorylation, which leads to decreased mitochondrial ROS production, fast-to-slow fiber-type switch, and enhanced running capacity. Selective AAV-mediated overexpression of endospinin-2 in skeletal muscle reduces oxidative stress and decreases ERK phosphorylation, highlighting that endospinin-2 exerts a direct action in this tissue. Moreover, endospinin-2 Tg mice display increased skeletal muscle glycogen content, increased skeletal muscle insulin sensitivity, and improved glucose homeostasis, suggesting that endospinin-2 promotes skeletal muscle metabolic flexibility to sustain energy production during physical activity. Overall, we show that endospinin-2 overexpression mimicks the beneficial adaptations of skeletal muscle to metabolic challenges (29–32).

CR and/or exercise-mediated antioxidant activities preserve cellular and mitochondrial functions (14). Using both loss- and gain-of-function experiments, we show that endospinin-2 increases oxidative stress resistance, as illustrated by decreased mitochondrial ROS production and increased antioxidant enzyme expression. In line, skeletal muscle UCP3 expression is decreased in endospinin-2 Tg mice, which likely reflects an adaptive response to reduced mitochondrial ROS production (33). Indeed, UCP3 expression is reduced upon endurance training and is negatively correlated with energy efficiency (34).

To decipher the mechanism of action of endospinin-2, which is a tetraspan membrane protein, we assessed signaling pathways of cytosolic-to-mitochondrial signaling. Interestingly, the transient stress induced by resistance exercise activates the ERK pathway (35, 36). Moreover, ERK activation induces fast-to-slow fiber-type transition (27), whereas ERK inhibition decreases slow fiber-type isoforms in vitro (37). Our results demonstrate that overexpression or downregulation of endospinin-2 in vivo and in vitro modulates basal ERK activation. Since in vivo endospinin-2 overexpression is also associated with a fast-to-slow fiber-type switch, higher resistance to fatigue, and enhanced endurance capacity, ERK signaling is





**Figure 5. Endospalin-2 regulates skeletal muscle plasticity and endurance capacity.** (A) Representative images of immunofluorescence staining of myosin heavy chain (MHC) and percentage fiber typing of MHC2a (green), MHC2x (red), MHC2b (black), and hybrid (2a and 2x) on EDL sections from endospalin-2 Tg mice compared with their WT littermates ( $n = 5$ –6 per genotype). Individual muscle fibers were visualized in blue (laminin staining). (B) Evaluation of cross-sectional areas of MHC2b, -2x, -2a, hybrid fibers, and total fiber number of EDL from endospalin-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 5$ –6 per genotype). (C) Fatigue index evaluated ex vivo on EDL muscle from endospalin-2 Tg mice compared with their WT littermates ( $n = 8$  per genotype). (D) Representative images of PAS staining detecting glycogen content on EDL sections from endospalin-2 Tg mice compared with their WT littermates ( $n = 5$ –6 per genotype). (E) I.p. glucose tolerance test (1 g/kg body weight) of endospalin-2 Tg mice and their WT littermates ( $n = 6$ –7 per genotype). (F) Western blot analysis of p-AKT and AKT in quadriceps muscle from endospalin-2 Tg mice and their WT littermates under basal and insulin-stimulated conditions ( $n = 3$ –4 per genotype). (G) Kaplan-Meier curves illustrating the endurance capacity of endospalin-2 Tg mice compared with their WT littermates ( $n = 7$ –9 per genotype). (H) Kaplan-Meier curves illustrating the endurance capacity of *endospalin-2*<sup>-/-</sup> mice compared with their WT littermates ( $n = 5$  per genotype).

likely to mediate the endospalin-2–induced skeletal muscle adaptations. Active ERK phosphorylates Stat3 on Serine 727, leading to Stat3 translocation to mitochondria, where it directly modulates the mitochondrial complex I to lower ROS production (20, 38, 39). Increased amounts of total and phosphorylated ERK and total Stat3 were found in skeletal muscle mitochondria from endospalin-2 Tg mice. Moreover, in vitro inhibition of ERK phosphorylation by U0126 reversed the endospalin-2–induced decrease in superoxide production, demonstrating that the reduction in mitochondrial ROS production by endospalin-2 requires activation of the ERK pathway. In addition, mitochondrial localization of ERK is also associated with decreased mitochondrial PTP opening sensitivity (21), which reduces cell susceptibility to apoptosis. Our data show that endospalin-2 reduces mPTP opening susceptibility. Thus, activation of the ERK pathway provides a mechanism through which endospalin-2 initiates a protective response conferring higher resistance to cellular stress associated with decreased mitochondrial ROS production.

Metabolic stress activates autophagy, a highly conserved cell survival process, to minimize damages and to provide energy for short-term survival. This process is essential for dietary restriction and exercise-conveyed skeletal muscle adaptations (22, 23). Indeed, deficiency in skeletal muscle autophagy results in impaired metabolic adaptations to exercise, decreased endurance capacity, and exacerbated age-related skeletal muscle dysfunctions (5, 40). Western blot and electron microscopy analysis of endospalin-2–overexpressing skeletal muscles revealed activated autophagy in glycolytic, but not in oxidative muscle, suggesting that endospalin-2 preserves skeletal muscle function by inducing glycolytic muscle–selective autophagy, a process resembling starvation- and/or exercise-induced autophagy (41). Interestingly, exercise did not further increase autophagy markers in endospalin-2 Tg mice skeletal muscle (data not shown), indicating that endospalin-2 Tg mice display a constitutive increase in autophagy, as observed upon exercise. Moreover, chloroquine treatment delocalizes endospalin-2 from the endosomal compartment to the lysosome, where it colocalizes with LC3-II–positive autophagosomes. Interestingly, autophagic structures serve as cellular platforms promoting ERK phosphorylation (24). Our results show that inhibition of autophagy, either at early or late stages, abolished the altered ERK phosphorylation levels in endospalin-2–overexpressing C2C12 cells, indicating that endospalin-2 regulates ERK phosphorylation levels through autophagy activation. Interestingly, global phosphorylated protein analysis in yeast found a physical interaction between Vps55 (the endospalins yeast homologue) and the serine/threonine kinase ATG1 (the Ulk1 yeast homologue), a key protein involved in the initiation of autophagy following starvation (42). Moreover, Vps55 mutants display decreased oxidative and chemical stress resistance (43), as well as decreased sporulation capacity in response to starvation (44). Altogether, our results indicate that endospalin-2, by modulating autophagosome trafficking to the lysosome, activates autophagy and triggers ERK phosphorylation to increase cellular stress resistance.

In conclusion, our data show that endospalin-2 expression is induced in skeletal muscle during CR and that endospalin-2 overexpression, by activating autophagy-mediated ERK phosphorylation, decreases mitochondrial oxidative stress and modulates skeletal muscle function. This study supports a prominent role of endospalin-2 in skeletal muscle plasticity and metabolic flexibility, resulting in enhanced running capacity.

## Methods

Supplemental Methods are available online with this article.

**Mice.** We used Tg human endospalin-1 and endospalin-2 male mice on a C57Bl/6 background, which overexpress human endospalin-1 (or LEPROT) and endospalin-2 (or LEPROTL1) in all tissues, including skeletal muscle, as previously described (12). *Endospalin-2*–KO (or *Leprotl1*) mice were generated using



leprot1<sup>tm1a(EUCOMM)hmg</sup> ES cells (European Conditional Mouse Mutagenesis). Mice were backcrossed with C57BL/6J for 10 generations, and heterozygotes were inbred (see Supplemental informations). Male and female mice were used at 15–20 weeks of age. All mice were housed in a 12-hour/12-hour light/dark cycle, and the *ad libitum*-fed (AL-fed) group had free access to water and regular chow diet (A03; Usine d'Alimentation Rationnelle), but CR mice were fed at 70% of the food intake of their AL-fed littermates during 4 weeks.

**Cell culture.** Mouse C2C12 myoblasts (CRL-1772, American Type Culture Collection) were cultured in DMEM (4.5 g/l D Glucose; Gibco) supplemented with 10% FBS and 1% gentamycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. C2C12 cells allowed to reach 90% of confluence were differentiated into myotubes by adding DMEM supplemented with 2% horse serum (HS) during 5 days. Cell lines constitutively overexpressing endospinin-1 and endospinin-2 were generated as previously described (45). Endospinin-1 and endospinin-2 overexpression was verified by quantitative PCR (qPCR) and Western blot on endospinin-1 and endospinin-2 C2C12 cells compared with pBabe control cells. For autophagy experiments, cells were cultured in HBSS and either treated with wortmannin (Merck, 100 nM) or chloroquine (Merck, 50  $\mu$ M) or their respective vehicle for 4 hours.

**Mitochondrial ROS production in plasma and isolated mitochondria.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from plasma and skeletal muscle mitochondria was measured fluorimetrically using Amplex Red (Molecular Probes, Invitrogen). Mitochondria (30  $\mu$ g of mitochondrial proteins/well) were incubated in mitochondrial respiration medium (Mir05) in the presence of the respiratory chain complex II substrate succinate (Merck, 10 mM), with or without complex I and III inhibitors — i.e., rotenone (Merck, 1  $\mu$ M) and antimycin A (Merck, 2.5  $\mu$ M), respectively. Reactions were set up in triplicate in the presence of 50  $\mu$ M of Amplex Red and 0.1 unit/ml horseradish peroxidase in a 96-well plate. Fluorescence (excitation wavelength  $\lambda_{ex}$ =545 nm, emission wavelength  $\lambda_{em}$ =590 nm) was kinetically followed during 30 minutes at 37°C, using a Tecan Infinite F500 apparatus (Tecan Systems). For quantification, 2 wells containing 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added on each plate. All results were expressed in nmol of produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per mg of mitochondrial proteins per minute.

**Mitochondrial swelling assay.** Mitochondrial swelling consecutive to PTP opening was monitored by the decrease of 90° light scatter at 540 nm in a spectrophotometer as described (46). Briefly, a mitochondrial pellet was suspended in swelling buffer (0.4 mg/ml), and 200  $\mu$ l/well was added in a 96-well plate. A PTP opening was induced by the addition of 75  $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>.

**MHC immunofluorescence.** Conventional immunofluorescence for MHC subtyping was performed on transverse cryosections of EDL and Soleus muscle. MHC2a, visualized in green, was stained using a monoclonal antibody (N2.261, Developmental Studies Hybridoma Bank) directed against human neonatal MHC human neonatal slow type 1 and type 2a. MHC2x, visualized in red, was stained using a mouse IgM polyclonal antibody directed against rabbit MHC type 2x (6H1, Developmental Studies Hybridoma Bank). Individual muscle fibers were visualized using a primary antibody against the basement membrane marker laminin (rabbit polyclonal antibody, L-9393, Merck), which was visualized in blue. The following secondary antibodies were used: for the myosin 1/2a a goat anti-mouse IgG1 AlexaFluor 488 (A-21121, Thermo Fisher Scientific), for the myosin 2x a goat anti-mouse IgM AlexaFluor 555 (A-21426, Thermo Fisher Scientific), for the laminin a goat anti-rabbit IgG AlexaFluor 350 (A-11069, Thermo Fisher Scientific).

**Maximal exercise stress test and endurance capacity.** Mice were acclimated to the treadmill by performing a 10 m/min run 2 days prior to the experiment. The day of the exercise stress test, mice were placed onto the treadmill enclosed in a metabolic chamber connected to an O<sub>2</sub> sensor (Oxymax, Columbus Instruments). Basal VO<sub>2</sub> (VO<sub>2b</sub>) was measured after a 30-minute resting period, and then mice started running at 10 m/min in a 0% incline. Speed was incremented by 4 m/min every 3 minutes until exhaustion in order to determine their VO<sub>2max</sub>. Exhaustion was reached when mice remained on the electrical shocker plate for 5 seconds. Speed corresponding to VO<sub>2max</sub> was determined and considered as the maximal running speed ( $v_{max}$ ). Two days later, mice ran at a speed equivalent to 70% of their  $v_{max}$  until exhaustion in order to determine their maximal endurance capacity. Time to exhaustion and total run distance were determined.

**Daily wheel-running activity.** To analyze daily wheel-running activity, mice were placed into individual cages containing running wheels for 1 week (Campden, Phymep). Wheel revolution was recorded daily and averaged.

**Statistics.** Values are means  $\pm$  SEM of the indicated number of measurements. Statistical significance was determined using 2-tailed unpaired Student's *t* test or 1-way ANOVA with *P* < 0.05.

**Study approval.** Experimental protocols were performed with the approval of the Nord Pas de Calais ethics committee (CEEA75) and in compliance with French and European ethical legislations.

## Author contributions

SL, YS, BS, and B. Bailleul were responsible for the study design, data analysis, and interpretation of data, and they cowrote the manuscript; YS, SL, MKCH, EW, FP, QT, AML, BP, OB, YR, HD, and B. Bastide performed the experiments and data analysis; ED, SD, CD, QT, VM, NB, and GS gave technical and material support; JPS, PS, and B. Bailleul were involved in data analysis. All authors have discussed the results, commented on the manuscript, and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

This research was supported by the European Genomic Institute for Diabetes (EGID, ANR-10-LABX-46) and European Commission, Lille Métropole Communauté Urbaine (to YS), Région Nord Pas-de-Calais/FEDER (to BS), CPER 2011-R3-P12A (to B. Bailleul), a joint Société Francophone du Diabète (SFD)/Menarini research fellowship (to B. Bailleul), EFSD/Lilly research grant and CPER emerging team (to HD), Eurhythdia (to BS and HD), ERC Région Haut de France (to HD), and Pfizer France and Ipsen Beaufour (to JPS). BS hold an ERC advanced grant (no. 694717).

Address correspondence to: Yasmine Sebt or Bart Staels, UMR1011 INSERM, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 1, rue Calmette, 59019 Lille, France. Phone: 33.3.20.87.71.25; Email: yasmine.sebt@pasteur-lille.fr (YS). Phone: 33.3.20.87.73.88; Email: Bart.Staels@pasteur-lille.fr (BS).

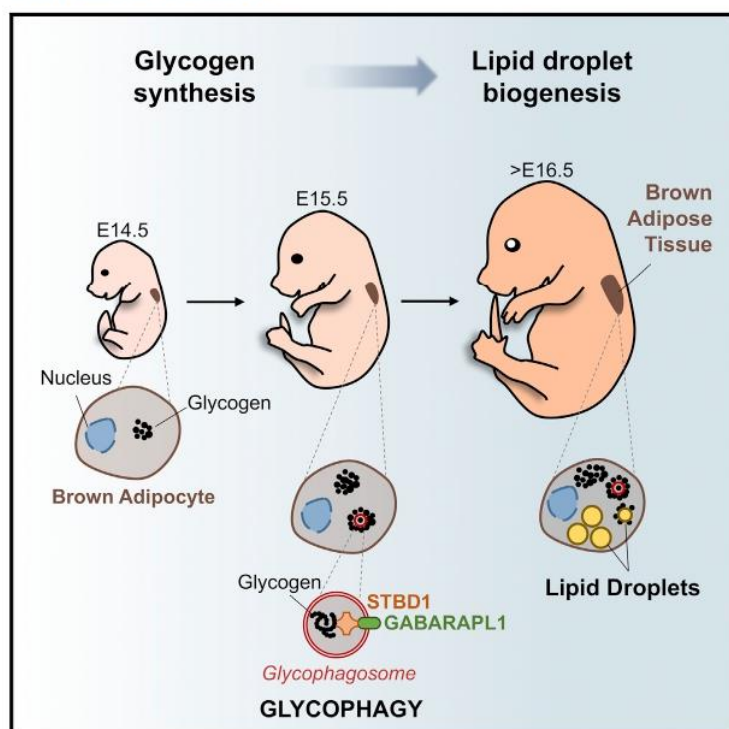
- Hoeks J, Schrauwen P. Muscle mitochondria and insulin resistance: a human perspective. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):444–450.
- Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;8(2):92–103.
- Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ, Sohal RS. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(9):1089–1097.
- Jia K, Levine B. Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in *C. elegans*. *Autophagy.* 2007;3(6):597–599.
- Lira VA, et al. Autophagy is required for exercise training-induced skeletal muscle adaptation and improvement of physical performance. *FASEB J.* 2013;27(10):4184–4193.
- Rubinstein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell.* 2011;146(5):682–695.
- Bailleul B, Akerblom I, Strosberg AD. The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(14):2752–2758.
- Huang Y, et al. Cloning and characterization of a novel human leptin receptor overlapping transcript-like 1 gene (LEPROTL1). *Biochim Biophys Acta.* 2001;1517(2):327–331.
- Belgareh-Touzé N, Avaro S, Rouillé Y, Hoflack B, Haguenaer-Tsapis R. Yeast Vps55p, a functional homolog of human obesity receptor gene-related protein, is involved in late endosome to vacuole trafficking. *Mol Biol Cell.* 2002;13(5):1694–1708.
- Couturier C, et al. Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(49):19476–19481.
- Séron K, et al. Endospansins regulate a postinternalization step of the leptin receptor endocytic pathway. *J Biol Chem.* 2011;286(20):17968–17981.
- Touvier T, et al. LEPROT and LEPROTL1 cooperatively decrease hepatic growth hormone action in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3830–3838.
- Wu S, Grunwald T, Kharitonov A, Dam J, Jockers R, De Luca F. Increased expression of fibroblast growth factor 21 (FGF21) during chronic undernutrition causes growth hormone insensitivity in chondrocytes by inducing leptin receptor overlapping transcript (LEPROT) and leptin receptor overlapping transcript-like 1 (LEPROTL1) expression. *J Biol Chem.* 2013;288(38):27375–27383.
- Lanza IR, et al. Chronic caloric restriction preserves mitochondrial function in senescence without increasing mitochondrial biogenesis. *Cell Metab.* 2012;16(6):777–788.
- Robinson KM, Janes MS, Beckman JS. The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. *Nat Protoc.* 2008;3(6):941–947.
- Alonso M, et al. Mitochondrial extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) are modulated during brain development. *J Neurochem.* 2004;89(1):248–256.
- Baines CP, et al. Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ Res.* 2002;90(4):390–397.
- Chung J, Uchida E, Grammer TC, Blenis J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 1997;17(11):6508–6516.
- Gough DJ, Koetz L, Levy DE. The MEK-ERK pathway is necessary for serine phosphorylation of mitochondrial STAT3 and Ras-mediated transformation. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e83395.
- Szczepanek K, et al. Mitochondrial-targeted Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the generation of reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2011;286(34):29610–29620.



21. Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS, Bernardi P. Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(2):726–731.
22. Morselli E, et al. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis*. 2010;1:e10.
23. He C, et al. Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis. *Nature*. 2012;481(7382):511–515.
24. Martinez-Lopez N, Athonvarangkul D, Mishall P, Sahu S, Singh R. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat Commun*. 2013;4:2799.
25. Lecarpentier Y. Physiological role of free radicals in skeletal muscles. *J Appl Physiol*. 2007;103(6):1917–1918.
26. Dupont E, Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Stevens L. Electrostimulation during hindlimb unloading modulates PI3K-AKT downstream targets without preventing soleus atrophy and restores slow phenotype through ERK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):R408–R417.
27. Murgia M, Serrano AL, Calabria E, Pallafacchina G, Lomo T, Schiaffino S. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat Cell Biol*. 2000;2(3):142–147.
28. Gaman L, Stoian I, Atanasiu V. Can aging be slowed?: Hormetic and redox perspectives. *J Med Life*. 2011;4(4):346–351.
29. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol*. 2001;90(5):1900–1908.
30. Chen D, Steele AD, Lindquist S, Guarente L. Increase in activity during calorie restriction requires Sirt1. *Science*. 2005;310(5754):1641.
31. de Lange P, et al. Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation. *FASEB J*. 2006;20(14):2579–2581.
32. Manabe Y, et al. Exercise training-induced adaptations associated with increases in skeletal muscle glycogen content. *FEBS J*. 2013;280(3):916–926.
33. Echtay KS, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature*. 2002;415(6867):96–99.
34. Schrauwen P, Hesselink M. Uncoupling protein 3 and physical activity: the role of uncoupling protein 3 in energy metabolism revisited. *Proc Nutr Soc*. 2003;62(3):635–643.
35. Goodyear LJ, Chang PY, Sherwood DJ, Dufresne SD, Moller DE. Effects of exercise and insulin on mitogen-activated protein kinase signaling pathways in rat skeletal muscle. *Am J Physiol*. 1996;271(2 Pt 1):E403–E408.
36. Kramer HF, Goodyear LJ. Exercise, MAPK, and NF-kappaB signaling in skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2007;103(1):388–395.
37. Higginson J, et al. Blockades of mitogen-activated protein kinase and calcineurin both change fibre-type markers in skeletal muscle culture. *Pflugers Arch*. 2002;445(3):437–443.
38. Sarafian TA, et al. Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress in vitro. *PLoS ONE*. 2010;5(3):e9532.
39. Szczepanek K, Chen Q, Larner AC, Lesnfsky EJ. Cytoprotection by the modulation of mitochondrial electron transport chain: the emerging role of mitochondrial STAT3. *Mitochondrion*. 2012;12(2):180–189.
40. Carnio S, et al. Autophagy impairment in muscle induces neuromuscular junction degeneration and precocious aging. *Cell Rep*. 2014;8(5):1509–1521.
41. Ogata T, Oishi Y, Higuchi M, Muraoka I. Fasting-related autophagic response in slow- and fast-twitch skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;394(1):136–140.
42. Ptacek J, et al. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. 2005;438(7068):679–684.
43. Higgins VJ, Alic N, Thorpe GW, Breitenbach M, Larsson V, Dawes IW. Phenotypic analysis of gene deletant strains for sensitivity to oxidative stress. *Yeast*. 2002;19(3):203–214.
44. Deutschbauer AM, Williams RM, Chu AM, Davis RW. Parallel phenotypic analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(24):15530–15535.
45. Woldt E, et al. Rev-erb- $\alpha$  modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat Med*. 2013;19(8):1039–1046.
46. Zamzami N, Maise C, M  tivier D, Kroemer G. Measurement of membrane permeability and the permeability transition of mitochondria. *Methods Cell Biol*. 2007;80:327–340.

# Glycogen Dynamics Drives Lipid Droplet Biogenesis during Brown Adipocyte Differentiation

## Graphical Abstract



## Authors

Alicia Mayeuf-Louchart, Steve Lancel, Yasmine Sebt, ..., Stéphane D. Vincent, Bart Staels, Hélène Duez

## Correspondence

alicia.mayeuf-louchart@pasteur-lille.fr

## In Brief

Lipid droplet formation is a major feature of brown adipocyte differentiation. Mayeuf-Louchart et al. characterize the different steps of brown adipocyte differentiation in the mouse embryo and report the essential role of glycogen production and degradation by glycophagy for lipid droplet biogenesis.

## Highlights

- Brown adipocytes are functionally differentiated at E17.5 in the mouse embryo
- Lipid droplets are formed within glycogen clusters
- Glycogen production is crucial for lipid droplet biogenesis during BAT differentiation
- Glycophagy-mediated glycogen degradation drives lipid droplet formation



Mayeuf-Louchart et al., 2019, Cell Reports 29, 1410–1418  
November 5, 2019 © 2019 The Authors.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.073>

CellPress



# Glycogen Dynamics Drives Lipid Droplet Biogenesis during Brown Adipocyte Differentiation

Alicia Mayeuf-Louchart,<sup>1,11,\*</sup> Steve Lancel,<sup>1</sup> Yasmine Sebti,<sup>1,10</sup> Benoît Pourcet,<sup>1,10</sup> Anne Loyens,<sup>2</sup> Stéphane Delhaye,<sup>1</sup> Christian Duhem,<sup>1</sup> Justine Beauchamp,<sup>1</sup> Lise Ferri,<sup>1</sup> Quentin Thorel,<sup>1</sup> Alexis Boulinguez,<sup>1</sup> Mathilde Zecchin,<sup>1</sup> Julie Dubois-Chevalier,<sup>1</sup> Jérôme Eeckhoutte,<sup>1</sup> Logan T. Vaughn,<sup>3</sup> Peter J. Roach,<sup>4</sup> Christian Dani,<sup>5</sup> Bartholomew A. Pederson,<sup>3</sup> Stéphane D. Vincent,<sup>6,7,8,9</sup> Bart Staels,<sup>1</sup> and Hélène Duez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGiD, 59000 Lille, France

<sup>2</sup>Univ. Lille, UMR-S 1172-JPArc Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert Neurosciences et Cancer, Lille, France

<sup>3</sup>Indiana University School of Medicine-Muncie and Ball State University, Muncie, IN 47306, USA

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN 46202, USA

<sup>5</sup>Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV Faculté de Médecine, Nice, France

<sup>6</sup>Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

<sup>7</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France

<sup>8</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1258 Illkirch, France

<sup>9</sup>Université de Strasbourg, Illkirch, France

<sup>10</sup>These authors contributed equally

<sup>11</sup>Lead Contact

\*Correspondence: [alicia.mayeuf-louchart@pasteur-lille.fr](mailto:alicia.mayeuf-louchart@pasteur-lille.fr)

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.073>

## SUMMARY

Browning induction or transplantation of brown adipose tissue (BAT) or brown/beige adipocytes derived from progenitor or induced pluripotent stem cells (iPSCs) can represent a powerful strategy to treat metabolic diseases. However, our poor understanding of the mechanisms that govern the differentiation and activation of brown adipocytes limits the development of such therapy. Various genetic factors controlling the differentiation of brown adipocytes have been identified, although most studies have been performed using *in vitro* cultured pre-adipocytes. We investigate here the differentiation of brown adipocytes from adipose progenitors in the mouse embryo. We demonstrate that the formation of multiple lipid droplets (LDs) is initiated within clusters of glycogen, which is degraded through glycophagy to provide the metabolic substrates essential for *de novo* lipogenesis and LD formation. Therefore, this study uncovers the role of glycogen in the generation of LDs.

## INTRODUCTION

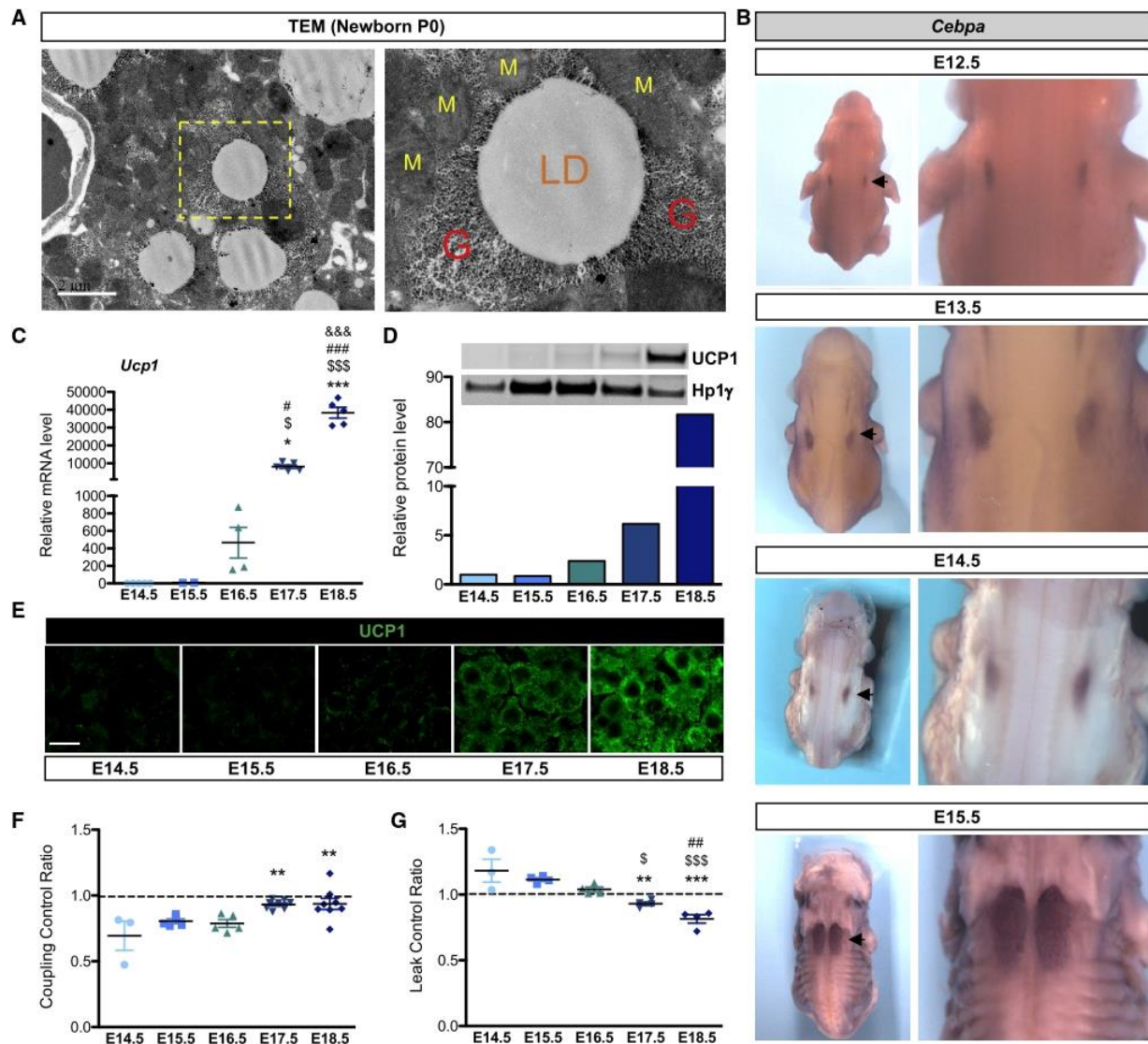
In the early 1960s, transmission electron microscopy (TEM) analysis of brown adipose tissue (BAT) of mouse and rat neonates showed the presence of glycogen (Napolitano and Fawcett, 1958; Revel et al., 1960). However, its role in brown adipocyte formation and/or activation has remained unexplored ever since. Recent studies have however described a transient increase in the amount of glycogen in BAT during re-acclimation after cold

exposure and during refeeding after fasting, reviving the unresolved question of the role of glycogen in this tissue (Camean et al., 2013, 2016; Jakus et al., 2008). Because cellular mechanisms during physiopathological events in the adult often recapitulate those occurring during embryonic development, deciphering embryonic development has led to a better understanding of adult cell biology in many fields. Brown adipocytes share common progenitors with skeletal muscle (Atit et al., 2006; Lepper and Fan, 2010; Seale et al., 2008) and PRDM16 was identified as a master regulator of the BAT differentiation program (An et al., 2017; Seale et al., 2007, 2008). However, how brown adipocytes form and differentiate during embryogenesis still remains unknown. Here, we uncover a glycogen-dependent cellular mechanism essential for lipid droplet (LD) formation during brown adipocyte development *in vivo*.

## RESULTS AND DISCUSSION

Using TEM, we confirmed the presence of glycogen granules in brown adipocytes of mouse neonates (P0). Notably, these glycogen granules are mainly located in the close vicinity of LDs and mitochondria (Figure 1A). To determine at which embryonic stage brown fat appears, we performed *in situ* hybridization on whole mount mouse embryos harvested at different developmental stages, using classical adipocyte markers (*Cebpa*, *Pparg*, and *Fabp4*). As shown in Figures 1B, S1A, and S1B, two independent adipocyte populations are detected in the upper back of embryos as early as at embryonic day 12.5 (E12.5) stage. These two adipose deposits enlarge and meet to form the well-known interscapular BAT at E15.5 (Figures 1B, S1A, and S1B). Surprisingly, while they already express the common adipogenic genes, the specific brown differentiation marker UCP1 is only expressed from E16.5 at mRNA (Figure 1C) and





**Figure 1. BAT Is Functionally Differentiated at E17.5 in the Mouse Embryo**

(A) TEM of BAT, at P0 (M, mitochondria; LD, lipid droplet; G, glycogen; scale bar [SB], 2  $\mu$ m). Yellow box is enlarged in the right panel.

(B) Whole mount *in situ* hybridization of *Cebpa*. Arrows indicate interscapular BAT.

(C) qRT-PCR analysis of transcripts of *Ucp1* normalized to *Ppia* in embryonic BAT.

(D) UCP1 western blot and quantification normalized to HP1 $\gamma$  in embryonic BAT (representative results of three independent experiments).

(E) Immunostaining with anti-UCP1 antibody (green) on embryonic BAT sections (SB, 10  $\mu$ m).

(F) Coupling control ratio (CCR) of oxygen consumption calculated from respiration data (Figure S1D) by dividing state 4 (oligomycin) by state 3.

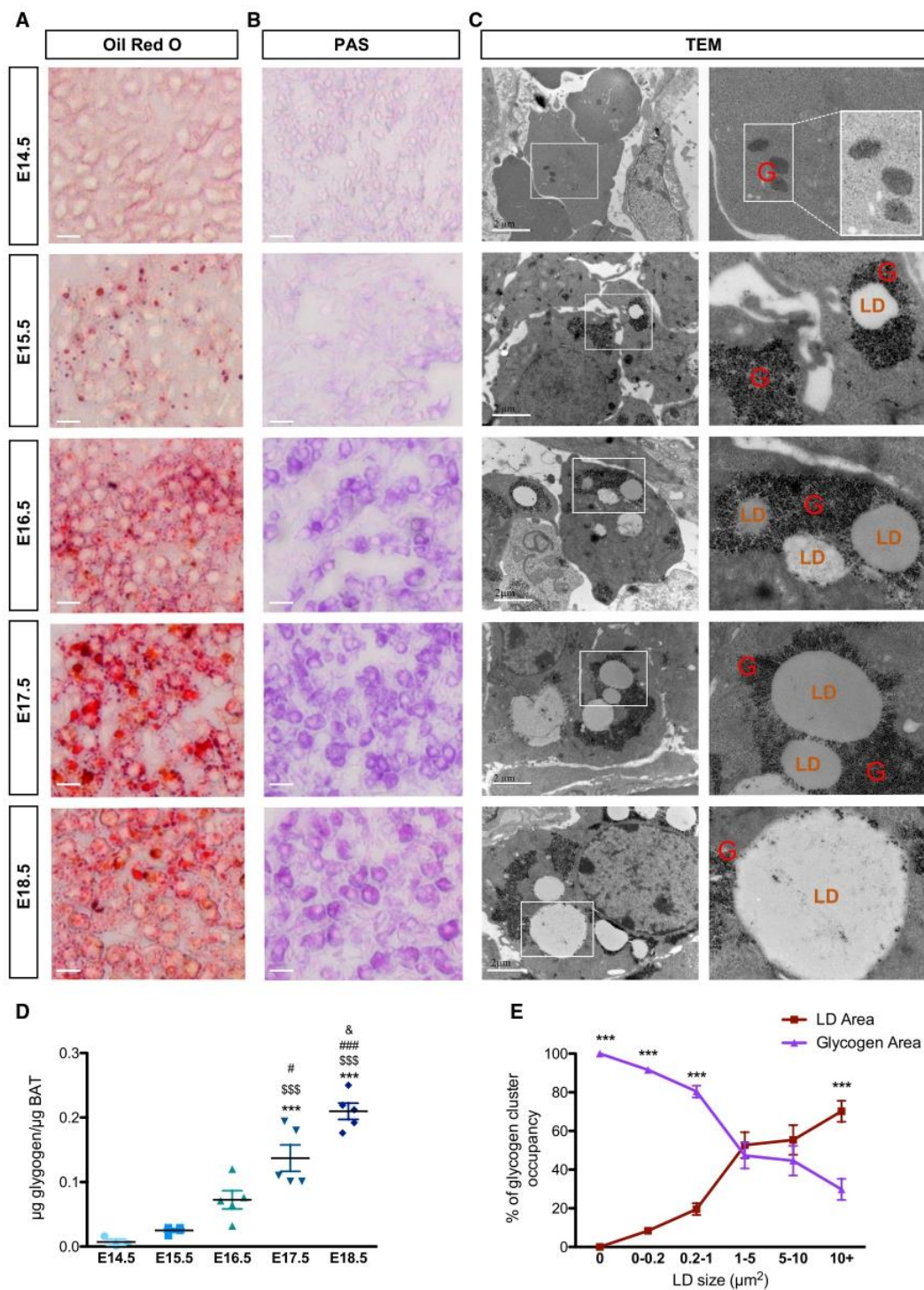
(G) Leak control ratio (LCR) calculated from respiration data (Figure S1F) by dividing state 2<sub>GDP</sub> by state 2. All respiratory experiments were performed on embryonic BAT tissue.

Results in (C), (F), and (G) are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, and \*\*\* $p$  < 0.001 by one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* analysis, \*compared to E14.5, \$ to E15.5, # to E16.5, and & to E17.5

protein (Figures 1D and 1E) levels. Since BAT identity is not only defined by the presence of the UCP1 protein, we assessed mitochondrial function in BAT isolated at different embryonic stages. While the ATP synthase inhibitor oligomycin reduces oxygen consumption in adipocytes isolated between E14.5 and E16.5,

it has no effect on adipocytes isolated at E17.5 and E18.5, indicating that oxygen consumption becomes uncoupled from ATP synthesis at E17.5 (Figures 1F and S1C–S1E). Addition of the UCP1 inhibitor guanosine diphosphate (GDP) (Porter et al., 2016) reduces oxygen consumption in adipocytes isolated





**Figure 2. LDs Form within Glycogen Clusters**

(A and B) Oil Red O (A) and PAS (B) staining on embryonic BAT sections (SB, 10  $\mu\text{m}$ ).

(C) TEM pictures of BAT. White boxes are enlarged in the right panels (LDs, lipid droplets; G, glycogen; SB, 2  $\mu\text{m}$ ).

(legend continued on next page)



from E17.5 and E18.5 embryos but not at earlier stages, confirming the functional uncoupling of BAT at E17.5 (Figures 1G and S1F–S1H). Together these results demonstrate that the functional differentiation of brown preadipocytes is initiated between E16.5 and E17.5 in the mouse embryo.

Brown adipocytes are characterized by the presence of multi-locular LDs, but the mechanisms of LD generation are still not fully understood. During brown adipocyte differentiation, LDs first appear at E15.5, as illustrated by Oil Red O staining and TEM (Figures 2A and 2C). Lipidomic analysis of embryonic brown adipocytes from E15.5 and E18.5 is further associated with the accumulation of fatty acids and triglycerides and profound modifications of the phospholipid profile (Figure S2). Notably, the increase of phosphatidylethanolamine (PE), observed between E15.5 to E18.5, has been previously associated with an increase of LD size (Cohen et al., 2017).

The presence of glycogen is detected as early as E14.5 in developing BAT as shown using periodic acid Schiff (PAS) staining and TEM (Figures 2B and 2C). Unexpectedly, glycogen granule clusters are first formed before the appearance of LDs. Strikingly, the initiation of LD formation observed from E15.5 occurs within these granule clusters, while *de novo* formation of LDs was undetectable in areas free of glycogen granules. At all stages of differentiation, we observed the formation of new clusters of glycogen (Figure 2C). This is associated with an increase of the total amount of glycogen in the embryonic BAT (Figure 2D). However, the glycogen content in each individual glycogen cluster decreases when the LD size increases (Figure 2E). These results show that LDs form individually within clusters of glycogen granules in differentiating brown adipocytes.

To determine which pathways are involved in the interaction of LD formation and glycogen dynamics, a transcriptional analysis was performed on BAT isolated from E14.5 to E16.5. Many differentially expressed genes were identified, with E15.5 representing a stage of intermediate expression (Figure 3A; Table S1). We identified four different kinetic expression profiles among both downregulated and upregulated genes (Figure S3A). One pattern identified genes whose changes in expression occur specifically between E14.5 and E15.5 and not thereafter. These genes are involved either in skeletal muscle differentiation (downregulated) (Figure S3B) or in BAT differentiation (upregulated) (Figure S3C). This indicates that final cell fate decisions of common brown adipocytes/skeletal muscle progenitors take place between E14.5 and E15.5. Changes in expression of skeletal muscle and BAT transcriptional regulators were analyzed, the latter being potentially linked to downregulation of microRNAs (miRNAs) with predicted target genes that are closely related to the BAT differentiation program (Arias et al., 2016; Brandão et al., 2017; Chen et al., 2017) (Figure S3D). Other genes showed a linear kinetic of expression changes between E14.5 and E16.5, consistent with changes being triggered by remodeling of the transcriptional regulatory landscape described above. This includes genes

involved in functions required for BAT differentiation such as fatty acid metabolism and lipid storage (Figures 3A and S3A). Strikingly, genes involved in glucose metabolic processes were also identified in those analyses, suggesting that these pathways precondition the acquisition of BAT functionality (Figure 3A). In keeping with this, gene set enrichment analysis (GSEA) analyses revealed an enrichment for genes involved in glycogen metabolism (in addition to genes related to BAT differentiation and lipid metabolism) among those induced between E14.5 and E16.5 (Figure 3A). Accordingly, qRT-PCR analysis showed that *Glycogen synthase 1* (*Gys1*) and *Glycogenin* (*Gyg*), which encode enzymes of the glycogen synthesis pathway, were significantly increased during brown adipocyte differentiation (Figures 3B and 3C). The same observation was made at mRNA and protein levels (Figures 3D and 3E) for glycogen phosphorylase (*Pygl*), an enzyme involved in glycogen degradation and, thus, indicative of an important glycogen turnover during brown adipocyte differentiation. Glucose-1-phosphate produced by glycogen degradation can be converted into glucose-6-phosphate and used as a substrate for *de novo* lipogenesis. The upregulation of Stearoyl-CoA desaturase (*Scd1*) mRNA encoding the enzyme that catalyzes the rate-limiting step in the formation of monounsaturated fatty acids, as well as other lipogenic genes such as *Diacylglycerol O-Acyltransferase 1* and *2* (*Dgat1* and *Dgat2*) and *fatty acid synthase* (*Fasn*), further indicates that *de novo* lipogenesis initiates between E14.5 and E16.5 (Figures 3F and S4A). The increase of Perilipin 5 (*Plin5*) expression at E15.5 indicates initiation of lipid storage in the brown adipocyte (Figure 3G). Lipid formation requires the tricarboxylic acid (TCA) cycle to produce citrate from acetyl-CoA and oxaloacetate, a reaction catalyzed by citrate synthase whose gene expression and activity are also highly upregulated during brown adipocyte development (Figures 3H, 3I, and S4B). Interestingly, a recent study has demonstrated that peridroplet mitochondria of adult BAT contribute to the expansion of LDs due to higher TCA cycle capacity and citrate synthase activity, hence increasing their lipogenic potential (Benador et al., 2018). Consistently, our results point to an increased expression of genes related to the TCA cycle and citrate synthase activity in differentiating brown adipocytes, and our TEM experiments indicate close proximity between LD/glycogen clusters and mitochondria during the formation of LDs (Figures S4C and S4D). Altogether, these data strongly suggest that degradation of accumulated glycogen is required to support *de novo* lipogenesis for LD formation or expansion.

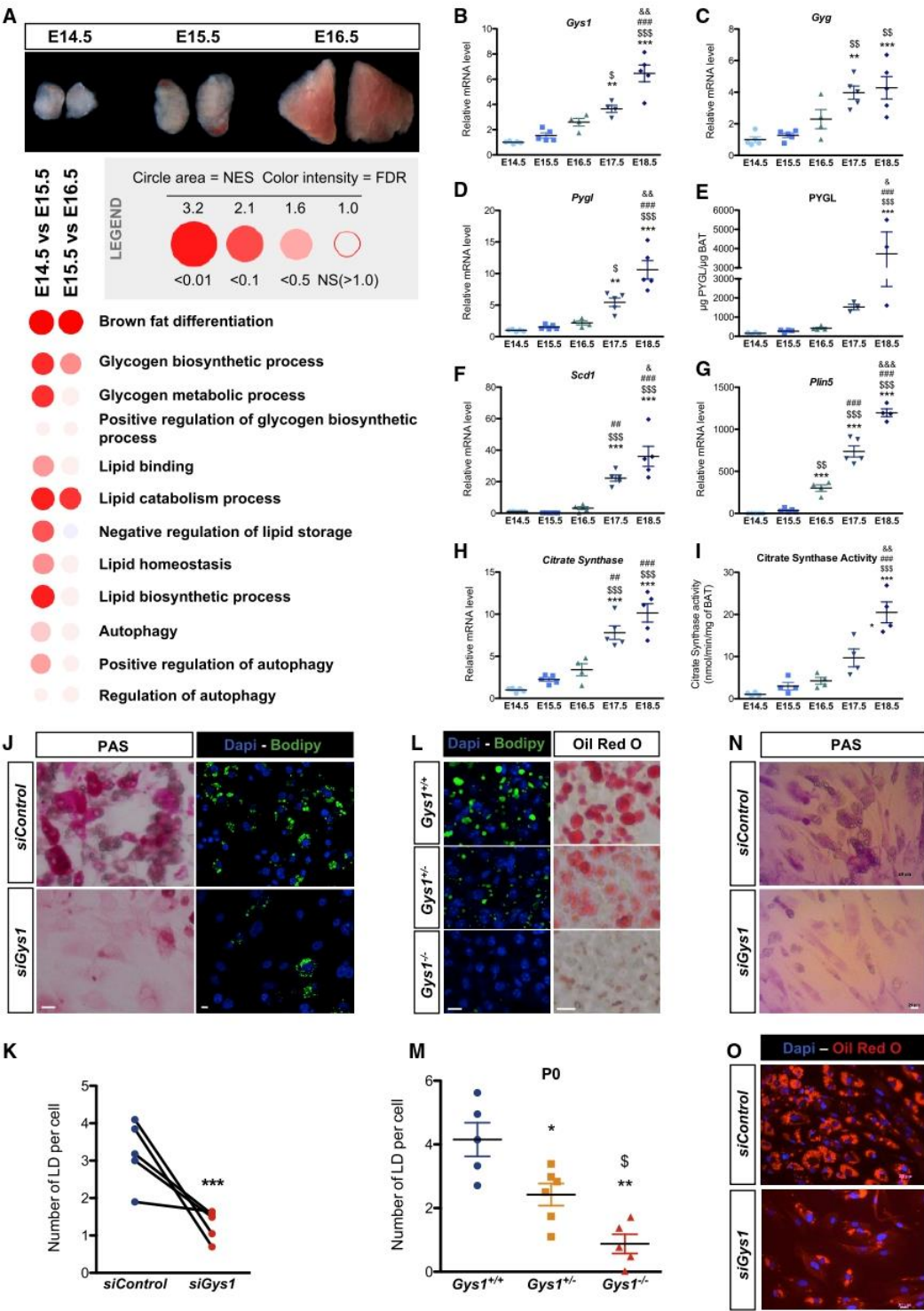
To confirm the importance of glycogen in the formation of LDs, preadipocytes isolated from BAT at E14.5 were differentiated *ex vivo* (Figures 3J, S5A, and S5B). As *in vivo*, accumulation of glycogen during brown adipocyte differentiation preceded LD biogenesis (Figures S5A and S5B). Interestingly, blocking glycogen production using *Gys1* small interfering RNA (siRNA) strongly diminishes LD formation (Figures 3J and 3K). These

(D) Glycogen content in BAT of embryos at different stages. Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  by one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* analysis, \*compared to E14.5, \$ to E15.5, # to E16.5, and & to E17.5.

(E) Quantification of glycogen clusters based on TEM images of BAT at E18.5. Results indicate the occupancy of glycogen and LDs, within each individual cluster, per size of LD ( $n = 100$  clusters).

Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0.001$  by two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* analysis.





**Figure 3. Glycogen Is Required for LD Formation**

(A) Bubble GSEA Unlimited Map (GUM) representation of GSEA transcriptomic analyses. The legend is indicated in the gray box (NES, normalized enrichment score; FDR, false discovery rate).

(legend continued on next page)

results were confirmed *in vivo* in *Gys1* knockout mice, which display severely diminished LD biogenesis in the BAT at the end of the fetal period (E18.5 and P0) (Figures 3L, 3M, and S5C). Finally, we tested the role of glycogen production during differentiation of human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells into brown adipocytes (Rodriguez et al., 2005; Elabd et al., 2009). Interestingly, these human cells accumulate glycogen prior the formation of LDs during differentiation (Figure S5D). In addition, siRNA knockdown (KD) of *GYS1* in hMADS decreases glycogen accumulation and impairs LD biogenesis during differentiation into brown adipocytes (Figures 3N and 3O). Altogether, these results reveal an essential role for glycogen in LD biogenesis during both mouse and human brown adipocyte differentiation.

Our transcriptomic analysis also identified autophagy-related gene expression during brown adipocyte differentiation (Figure 3A). It was recently reported that glycogen can be degraded by glycophyagy, an autophagy-related mechanism (Jiang et al., 2011). The interaction of GABARAPL1, a protein associated with glycophyagosome membranes, with STBD1, which targets glycogen particles, promotes the trafficking of glycogen and its degradation through glycophyagy (Delbridge et al., 2015). TEM experiments revealed the presence of glycophyagosomes between E15.5 and E17.5 in brown adipocytes (Figures 4A and S6A). GABARAPL1 and STBD1 are expressed during brown adipocyte differentiation (Figures S6B and S6C) and TEM immunogold analysis shows that both proteins are found to be associated with clusters of glycogen granules (Figure 4A).

The functional relevance of auto/glycophyagy during brown adipocyte differentiation was tested first using the autophagy inhibitors wortmannin and chloroquine. Because of the deleterious effects of such compounds in pregnant mice, we developed an alternative strategy based on the isolation of BAT from E14.5 embryos and culturing *ex vivo* for 24–72 h (Figure S7A). Harvested BAT forms a 3D spheroid under basal conditions (DMEM 10% fetal bovine serum [FBS]) and recapitulates *in vivo* BAT embryonic development as demonstrated by the increased expression of the genes involved in the brown adipose differentiation program, lipid storage, and glycogen metabolism (Figure S7B). BAT explants were incubated with autophagy inhibitors. Incubation with wortmannin, an inhibitor of the initiation of autophagosomes, induced a strong accumulation of glycogen in brown adipocytes, while treatment with

chloroquine, which decreases auto/glycophyagosome-lysosome fusion (Mauthe et al., 2018), induces an accumulation of glycophyagosomes (Figure 4B). In both conditions, the degradation of glycogen is impaired, as shown by the increase of PAS staining in these BAT explants. As a consequence, the number of LDs is significantly reduced (Figures 4B and 4C), hence highlighting the importance of a functional autophagy process for LD formation. However, in these experiments, we cannot exclude that wortmannin and chloroquine affect LD biogenesis independently of glycogen dynamics.

In order to assess more specifically the role of glycophyagy in the formation of LDs, expression of *Stbd1* was knocked down in primary embryonic brown adipocytes. *Stbd1*-KD cells displayed a significant reduction of the total LD number at day 6 (D6) of differentiation (Figures 4D and 4E). At an earlier stage (D4), quantification of the number of neo-formed LDs within glycogen clusters by co-labeling with 2-NBDG-glucose and LipidTOX (Figures 4F and 4G) corroborated that downregulation of glycophyagy negatively affects LD biogenesis during brown adipocyte differentiation.

Most studies to date related to LD biogenesis were performed on white adipocytes in which the current model of LD biogenesis is based on budding from endoplasmic reticulum (ER) membranes (Walther et al., 2017). However, the role of glycogen dynamics in white adipocytes was never studied. Interestingly, glycogen also transiently accumulates in 3T3L1 cells during their differentiation into white adipocytes, and precedes LD formation (Figures S8A and S8B). Furthermore, inguinal white adipose tissue (iWAT) at E16.5 and E17.5 shows the presence of glycogen and glycophyagosomes during its development (Figures S8C and S8D). However, the spatial organization of glycogen and LDs is different in iWAT compared to BAT as LDs are not always associated with glycogen (Figure S8C). In fact, while in the iWAT the ER is in close proximity with LDs, TEM experiments did not allow us to detect ER membranes associated with LDs in BAT. In addition, in contrast to BAT, the formation of LDs in the iWAT of *Gys1*<sup>−/−</sup> embryos is not impaired, suggesting that different mechanisms control LD biogenesis in the two different adipose tissue depots (Figures S8E and S8F). Although further studies will be necessary to identify the specific mechanisms allowing LD biogenesis in brown adipocytes, our results shed light on the essential role of glycophyagy and glycogen dynamics during LD biogenesis.

(B, C, D, F, G, and H) qRT-PCR analysis of transcripts of *Gys1* (B), *Gyg* (C), *Pygl* (D), *Scd1* (F), *Plin5* (G), and *citrate synthase* (H) normalized to *Ppia* in embryonic BAT.

(E) ELISA of PYGL in BAT between E14.5 and E18.5.

(I) Measure of citrate synthase activity in BAT.

(J) PAS staining (left panels) and BODIPY and DAPI staining (right panels) (SB, 10  $\mu$ m) of primary brown preadipocytes treated at day 0 with *siGys1* or a control siRNA (*siControl*) and analyzed at day 6.

(K) Quantification of the number of LDs per nuclei, on images presented in (J) ( $n = 5$  independent experiments, nine images analyzed per condition). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \*\*\* $p < 0.001$ , by paired *t* test.

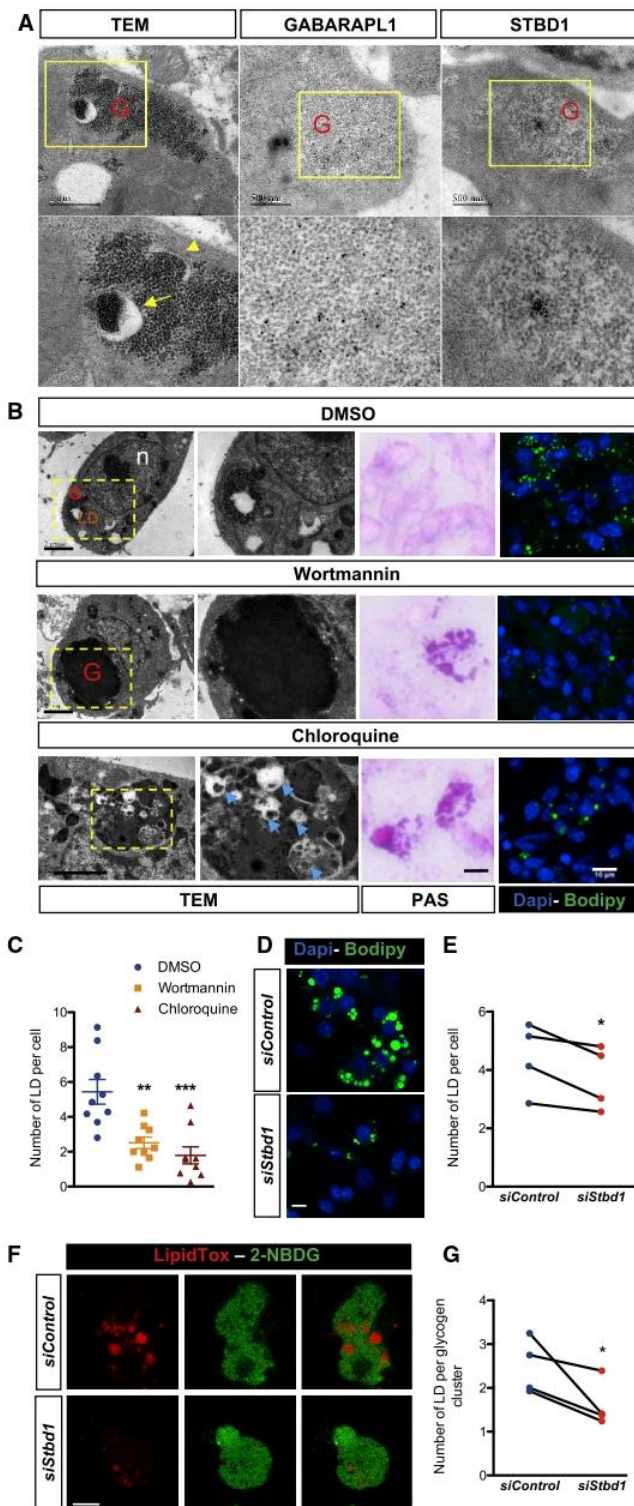
(L) BODIPY and DAPI staining (left panels) and Oil Red O staining (right panels) on *Gys1*<sup>+/+</sup>, *Gys1*<sup>+/−</sup>, and *Gys1*<sup>−/−</sup> mouse embryos at P0 (SB, 10  $\mu$ m).

(M) Quantification of the number of LDs per nuclei from BODIPY-DAPI stainings represented in (L) ( $n > 5$  embryos, three images analyzed per condition). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  by one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* analysis, \*compared to *Gys1*<sup>+/+</sup> and <sup>#</sup> compared to *Gys1*<sup>+/−</sup>.

(N and O) PAS (N) and Oil Red O (O) staining of hMADS cells treated with *siControl* or *siGys1* and differentiated into brown adipocytes (day 15, SB, 20  $\mu$ m).

(B–I) Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$  by one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* analysis, \*compared to E14.5, <sup>#</sup> to E15.5, <sup>#</sup> to E16.5, and <sup>&</sup> to E17.5.





**Figure 4. Glycophagy Is Essential for LD Biogenesis**

(A) Representative picture showing the presence of glycophagosomes within glycogen granules, obtained by TEM on BAT at E18.5 (SB, 1  $\mu$ m) (left panel). Arrow indicates glycophagosome and arrowhead shows the initiation of glycophagosome formation; TEM immunogold on BAT, at E16.5, with GABARAPL1 (middle panels) and STBD1 antibody (right panels). The lighter appearance of glycogen is due to the immunogold treatments. Yellow boxes are enlarged in the lower panels (G, glycogen).

(B) TEM pictures (left panels) (SB, 2  $\mu$ m), PAS staining (middle panels) (SB, 10  $\mu$ m), and BODIPY staining (right panels) (SB, 10  $\mu$ m) of embryonic explants 24 h after treatment with DMSO, wortmannin, or chloroquine (G, glycogen; n, nucleus; LD, lipid droplet; glycophagosomes with blue arrows).

(C) Quantification of the number of LDs per nuclei, on explant sections 24 h after treatment with wortmannin or chloroquine. Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \*\* $p$  < 0.01 and \*\*\* $p$  < 0.001 by one-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* analysis, \*compared to DMSO.

(D) BODIPY and DAPI staining (SB, 10  $\mu$ m) of primary brown preadipocytes treated at day 0 with siControl or siStbd1 and analyzed at day 6 of BAT differentiation.

(E) Quantification of the number of LDs per nuclei, on images presented in (D) ( $n$  = 4 independent experiments, nine images analyzed per condition). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $p$  < 0.05, by paired  $t$  test.

(F) 2-NBDG and LipidTOX staining (SB, 10  $\mu$ m) of primary brown preadipocytes treated at day 0 with siControl or siStbd1 and analyzed at day4 of BAT differentiation. 2-NBDG was administrated overnight and washed 3 h prior to the experiment to label the glycogen.

(G) Quantification of the number of LDs per glycogen cluster, on images presented in (F) ( $n$  = 4 independent experiments, nine images analyzed per condition). Results are expressed as means  $\pm$  SEM; \* $p$  < 0.05, by paired  $t$  test.

## STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY**
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
  - Mice
  - *Ex Vivo* BAT Explant Culture
  - 3T3L1 Cells and Primary White and Brown Preadipocytes
  - Human Cells
- **METHOD DETAILS**
  - Transfection of siRNA
  - 2-NBDG Uptake and Life Dyes Stainings
  - Histology
  - Immunostaining
  - Whole Mount *In Situ* Hybridization
  - Transcriptomic Analysis
  - Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
  - High Resolution Respirometry
  - Glycogen Measurement
  - Transmission Electron Microscopy (TEM) and Immunogold Experiments
  - Lipidomic
  - Protein Extraction and Immunoblotting
- **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**
- **DATA AND CODE AVAILABILITY**

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.073>.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr. Margaret Buckingham who encouraged A.M.-L. to initiate this work in her laboratory, in the Pasteur Institute (Paris, France), for her advice and critical reading of the manuscript. We thank J.S. Annicotte for advice. We thank Thomas Decoussemaker, Hélène Mirland, and Anthony Hoeslandt for technical help. Lipidomic analyses were performed on the Toulouse INSERM Metatoul-Lipidomique Core Facility-MetaboHub ANR-11-INBS, and we thank Justine Bertrand-Michel (MetaToul, Toulouse, France) for lipidomic analysis. We thank Elisabeth Werkmeister and Sophie Salomé-Desnoullez of the BICeL Facility for access to systems and technical advice. We thank the Institut Curie, PSL Research University, Translational Research Department, Genomics platform (75248 Paris, France) for microarray experiments. We acknowledge support from INSERM; the ANR-Labex-EGID (EGID, ANR-10-LABX-46); the Région Hauts-de-France/FEDER (Chonoregeneration); the Fondation de France and the Fondation Francophone pour la recherche sur le diabète (FFRD) sponsored by the Fédération Française des Diabétiques (AFD), AstraZeneca, Eli Lilly, Merck Sharp & Dohme (MSD), and Novo Nordisk & Sanofi. A.M.-L. was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). B.S. is a recipient of an Advanced ERC grant (694717). B.A.P. (DK078370) and P.J.R. (DK27221) were supported by NIH funding.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.M.-L. designed the research. A.M.-L., S.L., S.D., Q.T., J.B., C. Duhem, and L.T.V. performed experiments. A.L. conducted and analyzed transmission

electron microscopy experiments. B.P., J.D.-C., J.E., and S.D.V. carried out transcriptomic analyses. B.A.P. and P.J.R. provided *Gys1* KO mouse embryos. C. Dani conducted hMADS cell experiments. A.M.-L., S.L., Y.S., B.P., and A.L. were involved in data analysis. A.M.-L. and H.D. wrote the manuscript. S.L., Y.S., B.P., A.L., A.B., L.F., M.Z., S.D.V., B.S., and H.D. gave conceptual advice and contributed to the critical revision of the manuscript.

## DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: March 27, 2019

Revised: August 2, 2019

Accepted: September 25, 2019

Published: November 5, 2019

## REFERENCES

- An, Y., Wang, G., Diao, Y., Long, Y., Fu, X., Weng, M., Zhou, L., Sun, K., Cheung, T.H., Ip, N.Y., et al. (2017). A Molecular Switch Regulating Cell Fate Choice between Muscle Progenitor Cells and Brown Adipocytes. *Dev. Cell* 41, 382–391.e5.
- Arias, N., Aguirre, L., Fernández-Quintela, A., González, M., Lasa, A., Miranda, J., Macarulla, M.T., and Portillo, M.P. (2016). MicroRNAs involved in the browning process of adipocytes. *J. Physiol. Biochem.* 72, 509–521.
- Atit, R., Sgaier, S.K., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., Joyner, A.L., Niswander, L., and Conlon, R.A. (2006). Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev. Biol.* 296, 164–176.
- Barrans, A., Collet, X., Barbaras, R., Jaspard, B., Manent, J., Vieu, C., Chap, H., and Perret, B. (1994). Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J. Biol. Chem.* 269, 11572–11577.
- Benador, I.Y., Veliou, M., Mahdavi, K., Petcherski, A., Wikstrom, J.D., Assali, E.A., Acín-Pérez, R., Shum, M., Oliveira, M.F., Cinti, S., et al. (2018). Mitochondria Bound to Lipid Droplets Have Unique Bioenergetics, Composition, and Dynamics that Support Lipid Droplet Expansion. *Cell Metab.* 27, 869–885.e6.
- Bligh, E.G., and Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Brandão, B.B., Guerra, B.A., and Mori, M.A. (2017). Shortcuts to a functional adipose tissue: The role of small non-coding RNAs. *Redox Biol.* 12, 82–102.
- Carmean, C.M., Bobe, A.M., Yu, J.C., Volden, P.A., and Brady, M.J. (2013). Refeeding-induced brown adipose tissue glycogen hyper-accumulation in mice is mediated by insulin and catecholamines. *PLoS ONE* 8, e67807.
- Carmean, C.M., Huang, Y.H., and Brady, M.J. (2016). Glycogen Repletion in Brown Adipose Tissue upon Refeeding Is Primarily Driven by Phosphorylation-Independent Mechanisms. *PLoS ONE* 11, e0156148.
- Chen, Y., Pan, R., and Pfeifer, A. (2017). Regulation of brown and beige fat by microRNAs. *Pharmacol. Ther.* 170, 1–7.
- Cohen, B.-C., Raz, C., Shamay, A., and Argov-Argaman, N. (2017). Lipid Droplet Fusion in Mammary Epithelial Cells is Regulated by Phosphatidylethanolamine Metabolism. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 22, 235–249.
- Curtis, M., Kenny, H.A., Ashcroft, B., Mukherjee, A., Johnson, A., Zhang, Y., Helou, Y., Battle, R., Liu, X., Gutierrez, N., et al. (2019). Fibroblasts Mobilize Tumor Cell Glycogen to Promote Proliferation and Metastasis. *Cell Metab.* 29, 141–155.e9.
- Delbridge, L.M.D., Mellor, K.M., Taylor, D.J.R., and Gottlieb, R.A. (2015). Myocardial autophagic energy stress responses—macroautophagy, mitophagy, and glycophyagy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308, H1194–H1204.
- Elabd, C., Chiellini, C., Carmona, M., Galitzky, J., Cochet, O., Petersen, R., Pénicaud, L., Kristiansen, K., Bouloumié, A., Casteilla, L., et al. (2009). Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 27, 2753–2760.



- Ernst, J., and Bar-Joseph, Z. (2006). STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. *BMC Bioinformatics* 7, 191.
- Jakus, P.B., Sandor, A., Janaky, T., and Farkas, V. (2008). Cooperation between BAT and WAT of rats in thermogenesis in response to cold, and the mechanism of glycogen accumulation in BAT during reacclimation. *J. Lipid Res.* 49, 332–339.
- Jiang, S., Wells, C.D., and Roach, P.J. (2011). Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 420–425.
- Kaimal, V., Bardes, E.E., Tabar, S.C., Jegga, A.G., and Aronow, B.J. (2010). ToppCluster: a multiple gene list feature analyzer for comparative enrichment clustering and network-based dissection of biological systems. *Nucleic Acids Res.* 38, W96–W102.
- Lai, L., Hennessey, J., Bares, V., Son, E.W., Ban, Y., Wang, W., Qi, J., Jiang, G., Liberzon, A., and Ge, S.X. (2016). GSKB: A gene set database for pathway analysis in mouse. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/082511>.
- Lepper, C., and Fan, C.-M. (2010). Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. *Genesis* 48, 424–436.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.-J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., and Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435–1455.
- Napolitano, L., and Fawcett, D. (1958). The fine structure of brown adipose tissue in the newborn mouse and rat. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4, 685–692.
- Pederson, B.A., Chen, H., Schroeder, J.M., Shou, W., DePaoli-Roach, A.A., and Roach, P.J. (2004). Abnormal cardiac development in the absence of heart glycogen. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7179–7187.
- Porter, C., Herndon, D.N., Chondronikola, M., Chao, T., Annamalai, P., Bhattarai, N., Saraf, M.K., Capek, K.D., Reidy, P.T., Daquinag, A.C., et al. (2016). Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metab.* 24, 246–255.
- Revel, J.P., Napolitano, L., and Fawcett, D.W. (1960). Identification of glycogen in electron micrographs of thin tissue sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 575–589.
- Rodriguez, A.-M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.-Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breitmayer, J.-P., Groux, H., et al. (2005). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* 201, 1397–1405.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell Metab.* 6, 38–54.
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., Scimè, A., Devarakonda, S., Conroe, H.M., Erdjument-Bromage, H., et al. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961–967.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 15545–15550.
- Walther, T.C., Chung, J., and Farese, R.V., Jr. (2017). Lipid Droplet Biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 33, 491–510.

## STAR★METHODS

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
<b>Antibodies</b>		
Alexa Fluor 488 anti-rabbit secondary antibody	Life Technology	Cat#A21206 RRID:AB_2535792
Alexa Fluor 546 anti-rabbit secondary antibody	Life Technology	Cat#A10040 RRID:AB_2534016
Alexa Fluor 647 anti-rabbit secondary antibody	Life Technology	Cat#A31573 RRID:AB_2536183
Alexa Fluor 546 anti-mouse secondary antibody	Life Technology	Cat#A11018 RRID:AB_2534085
Alexa Fluor 488 anti-mouse secondary antibody	Life Technology	Cat#A21202 RRID:AB_141607
Alexa Fluor 647 anti-mouse secondary antibody	Life Technology	Cat#A21237 RRID:AB_2535806
GABARAPL1 polyclonal antibody	Proteintek	Cat#11010-1-AP RRID:AB_2294415
PERILIPIN 1 monoclonal antibody (D1D8)	Cell Signaling	Cat#9349 RRID:AB_10829911
STBD1 polyclonal antibody	Proteintek	Cat#11842-1-AP RRID:AB_2197523
UCP1 polyclonal antibody	Abcam	Cat#10983 RRID:AB_2241462
<b>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</b>		
2-NBDG	Invitrogen	Cat#N13195
3, 3', 5-Triiodo-L-thyronine sodium salt	Sigma	Cat#T-6397
Maleic acid	Sigma	Cat#110-16-7
Blocking Reagent	Sigma	Cat#11096176001
BODIPY® 493/503	ThermoFisher	Cat#D-3922
Bolt 4-12% Bis tris plus	Invitrogen	Cat#NW04125 Box
Bolt LDS sample buffer(4x)	Novex	Cat#B0007
Bolt MES SDS Running Buffer (20x)	Novex	Cat#B0002
Bovine serum albumin	Sigma	Cat#A6003-100 g
Chloroquine	Sigma	Cat#C6628
Collagenase D	Roche	Cat#11088882001
Dako fluorescence mounting medium	Dako	Cat#53023
Dexamethasone	Sigma	Cat#D-4902; Cat#D1756
DharmaFECT 1 Transfection Reagent 1,5ml	Dharmacon	Cat#T-2001-03
DIG RNA Labeling Mix	ROCHE	Cat#11 277 073 910
Dimethyl sulfoxide	Sigma	Cat#D5879-100ML
Disapse II (neutral protease,grade II)	Sigma	Cat#49442078001
DMEM	Sigma	Cat#D6046-500 ml
DMEM	GIBCO	Cat#41965-039 500ML
DMEM/F12	GIBCO	Cat#31331-028
DNase1 RNase free	ThermoFisher	Cat#EN0521
EDTA	Sigma	Cat#60-00-4

(Continued on next page)



**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Eosin solution alcoholic	Sigma	Cat#HT1101128-4L
Ethanol absolute anhydrous	Carloerba	Cat#4146072
Fetal bovine serum	Hyclone	Cat#SV30160.03
Gentamicin (10mg/ml)	GIBCO	Cat#15710-080
Ham's F12	Lonza	Cat#BE 12-615F-500 ml
HCS LipidTOX	Invitrogen	Cat#H34477
Hematoxylin solution	Sigma	Cat#HHS128-4L
Horse serum	GIBCO	Cat#16050-122
Iblot2 NC Regular Stacks	Invitrogen	Cat#IB23001
Insulin	Sigma	Cat#I-9278
Insulin from bovine pancreas	Sigma	Cat#I5500
Isobutyl-methylxanthine	Sigma	Cat#I-7018
Isopentane	VWR	Cat#24872.298
LiCl	Sigma	Cat#CAS: 7447-41-8
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen	
Methanol	Sigma	Cat#67-56-1
M-Glas	Merk	Cat#HX43534573
Na2HPO4; 12H2O	VWR	Cat#10039-32-4
NaH2PO4; 2H2O	VWR	Cat#13472-35-0
Neg-50	ThermoFisher	Cat#6502P
Oil Red O	Sigma	Cat#O0625
OptiMEM	GIBCO	Cat#51985-026
Picric acid	Sigma	Cat#88-89-1
RIPA	Sigma	Cat#R0278-500ML
Rosiglitazone	Cayman	Cat#7140
SVF	HyClone	Cat#SV30160.03 (lot RB35939)
TBS (x10)	Euromedex	Cat#ET220
Transferrin	Sigma	Cat#T-2252
Trizma base	Sigma	Cat#77-86-1
Tween20	Sigma	Cat#P1379-1L
Wortmannin	Sigma	Cat#W1628
Xylene	Carloerba	Cat#492301
<b>Critical Commercial Assays</b>		
Brilliant2 SYBR Green QPCR mastermix	Agilent technologies	Cat#600828
BSA standard for protein assay	Interchim	Cat#UC36859A
Glycogen assay kit	Sigma	Cat#MAK016-1KT
High capacity cDNA reverse transcription kit	ThermoFisher	Cat#4368813
Mouse PYGL elisa kit	Fine-test	Cat#EM1324
Periodic Acid-Schiff (PAS) kit	Sigma	Cat#395B
Protein quantitation kit BC assays	Interchim	Cat#UP40840A
Quick-RNA FFPE kit Zymo	Ozyme	Cat#ZR1008
RNeasy Microkit	Quiagen	Cat#74004
<b>Deposited Data</b>		
Raw and analyzed data	This paper	GEO: GSE122395
<b>Experimental Models: Cell Lines</b>		
hMADS cells	<a href="#">Rodriguez et al., 2005</a>	N/A
3T3-L1	ATCC	CL-173

(Continued on next page)

**Continued**

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse C57BL6/JRj	Janvier Labs	SC-C57J
Mouse: <i>Gys1</i> <sup>-/-</sup>	Pederson et al., 2004	N/A
Oligonucleotides		
Primers for RTqPCR, see Table S2	This paper	N/A
Primers for <i>in situ</i> hybridization probes, see specific Table	This paper	N/A
esiRNA targeting mouse <i>Gys1</i>	Sigma	EMU175981-50UG
MISSION® siRNA Universal Negative Control #1	Sigma	SIC001-10NMOL
ON-TARGETplus Non-targeting siRNA #1	Dharmacon	D-001810-01-20
ON-TARGETplus SMARTpool Human <i>Gys1</i> siRNA	Dharmacon	L-Human-XX-0005
Software and Algorithms		
ImageJ	Schneider et al., 2012	<a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>
GraphPad Prism 5.0	N/A	N/A
Partek Genomics Suite 7.0	Partek	N/A
MassHunter B.06.00	Agilent	N/A

**LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY**

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Alicia Mayeuf-Louchart ([Alicia.mayeuf-louchart@pasteur-lille.fr](mailto:Alicia.mayeuf-louchart@pasteur-lille.fr)).

This study did not generate new unique reagents.

**EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**

**Mice**

Mice were housed in a pathogen-free animal facility with a 12h light/dark cycle (light from 7AM to 7PM) and fed *ad libitum*. Embryos were obtained from pregnant C57BL6/J mice and dated taking Embryonic day (E) 0.5 as the day after the vaginal plug. *Gys1* knock out mice (C57BL6 background) were described in Pederson et al. (2004). Mice were euthanized by cervical dislocation and embryos immediately processed or fixed in formalin. For experiments in adult mice, 8-weeks-old C57BL6/J males were used. Experimental procedures were performed with the approval of the Nord-Pas-De-Calais Ethics Committee (CEEA75), the Institut Pasteur Ethics Committee (C2EA89-CETEA) and in compliance with French and European ethical legislations. For *Gys1* KO, procedures were approved by the Ball State University Animal Care and Use Committee.

**Ex Vivo BAT Explant Culture**

The BAT of embryos at E14.5 was microdissected under binocular loupe and explants were cultured 24h to 72h on 30 mm Millicell inserts (0.4µm, Merck, PICMORG50) in DMEM 10%SVF. Chloroquine (20µM) or wortmannin (100nM) was added to the medium. After culture, explants were flash frozen in liquid nitrogen or fixed during 2h in 4% PFA before inclusion in Tissue-Tek in nitrogen vapor. Cryosections (7µm, Micron HM560) were collected on Superfrost Plus slides and stored at -20°C.

**3T3L1 Cells and Primary White and Brown Preadipocytes**

Interscapular brown preadipocytes were isolated from embryos at E14.5 and inguinal white preadipocytes from embryos at E16.5. Two BAT depots were digested in 200µl DMEM/F12, 0.2% BSA, Collagenase D 0.25 U, Dispase II 0.5 U for 15 min at 37°C and stopped by addition of 600µl DMEM/F12, 20% FBS. Cells were plated in well slides and the medium (DMEM/F12, 20% FBS) was changed 1 hour later. Brown adipocyte differentiation was induced by adding a medium containing DMEM/F12, 10% FBS, 125nM indomethacin, 0.5mM IBMX, 1nM triiodothyronine, 1mM Rosiglitazone, 1mM dexamethasone, 850nM insulin. The medium was replaced at day 2 by DMEM/F12, 10% FBS, 850nM insulin, 1nM triiodothyronine, 1mM Rosiglitazone and changed every 2 days. White adipocyte differentiation of primary white preadipocytes and 3T3L1 cells was induced by adding a medium containing DMEM/F12, 10% FBS, 0.5mM IBMX, 1mM dexamethasone and 850nM insulin. The medium was replaced at day 2 by DMEM/F12, 10% FBS, 850nM insulin, 1nM triiodothyronine, 1mM Rosiglitazone and changed every 2 days.

**Human Cells**

hMADS cells were obtained from the stroma of human adipose tissue of a 4-month old male donor (hMADS3) as described previously (Rodriguez et al., 2005). Proliferation medium is composed of DMEM (low glucose) containing 10% fetal calf serum (FCS), 100 U/ml



penicillin and streptomycin. Cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator in air supplemented with 5% CO<sub>2</sub> in air. Media were changed every other day.

Adipocyte differentiation was induced on the day when cells reached confluency (Day 0). Adipogenic medium was composed of DMEM/Ham's F12 media supplemented with 10 µg/ml transferrin, 0.86 µM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 1 µM dexamethasone, 100 µM isobutyl-methylxanthine and 0.1 µM rosiglitazone. Dexamethasone and isobutyl-methylxanthine were omitted three days later. Rosiglitazone was maintained for beige adipogenic differentiation or omitted at day 10 for white adipogenic differentiation as previously described (Elabd et al., 2009). Analysis of the differentiation was performed at day 15.

## METHOD DETAILS

### Transfection of siRNA

Mouse cells were transfected before the induction of differentiation with 50nM of siRNA Control, *Gys1* or *Stbd1* using Dharmafect1 (Dharmacon) during 24 h, following the instructions of the manufacturer. Primary cells were transfected 6 hours after isolation from embryos.

Transfections of hMADS cells were performed with Lipofectamine RNAiMAX reagent according to the procedure provided by the vendor (Life Technology). Cells were transfected 3 days before reaching confluency, then at day 5 and at day 10 after adipogenic induction.

### 2-NBDG Uptake and Life Dyes Stainings

Primary cells were incubated overnight with 50µM 2-NBDG (Invitrogen) at day 3 or day 4 of differentiation to visualize glycogen as described in Curtis et al. (2019). Cells were washed during 3 hours prior observation or fixation 5 min in 4% PFA.

HCS LipidTOX (Invitrogen, 1:200) was added in the culture medium for 30 min. Cells were rinsed 3 times in PBS prior to observation with microscopy (Spinning disk SR, Nikon).

### Histology

Freshly dissected BAT and explants were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 2h and washed 3 times in 1X PBS. They were equilibrated in 7%, 15% and 30% sucrose (diluted with 1X PBS) before inclusion in Tissue-Tek in nitrogen Azote vapor. Eight µm cryosections (Micron HM560) were collected on Superfrost Plus slides and stored at -20°C. For hematoxylin & eosin staining, sections were incubated in PBS and then distilled water before incubation in hematoxylin for 1 min, followed by tap water (3 min), 90% ethanol (30 s), eosin (45 s), 90% ethanol (1 min), 100% ethanol (3 minutes) and xylene (3 minutes) before mounting on Mercoglass. For neutral lipid staining, sections were washed in distilled water and immersed 30 minutes into freshly prepared Oil Red O solution (40% of Oil Red O stock solution (5 mg Oil Red O/ml of 60% triethylphosphate) in distilled water). Sections were then washed in tap water and mounted with mowiol. For glycogen staining, the Periodic Acid-Schiff (PAS) kit (Sigma #395B) was used and sections treated following the manufacturer's instructions.

For lipid droplet visualization in hMADS cells, cells were fixed and stained with 0.5% Oil Red O in isopropanol and visualized by fluorescence microscopy using an aqueous mounting medium containing DAPI.

### Immunostaining

Frozen sections were rinsed in 1X PBS and incubated 15 min in 0.5% Triton X-100 (diluted with 1X PBS). They were washed in 1X PBS and blocked 45 min in 5% horse serum (diluted in 1X PBS) before overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in the same blocking buffer. Sections were washed in 1X PBS and then incubated 45 min with Alexa fluor secondary antibodies (Life technologies), Dapi, and/or Bodipy in the blocking buffer at room temperature. They were washed in 1X PBS and mounted with Dako Mounting Medium. Samples were examined with a LSM880 confocal laser-scanning microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY) and the number of lipid droplets was quantified using Fiji software.

### Whole Mount In Situ Hybridization

The design of RNA probes is based on the insertion of the sequence encoding the T7 promoter (TAATACGACTCACTATAGGGC) upstream of the reverse primers. A classical PCR with a pair of primers is first carried out, followed by *in vitro* transcription with this matrix. The list of primers used for the identification of brown adipocytes in the embryo was as follows:

	Fw	Rev
<i>Pparg</i>	CACAATGCCATCAGGTTTGG	TAATACGACTCACTATAGGGCGTGAAGGCTCATGTCTGTCT
<i>Cebpa</i>	GGAGTTGACCACTGACAATG	TAATACGACTCACTATAGGGCCATTCTCCATGAACCTACCC
<i>Fabp4</i>	GTGTGATGCCTTTGTGGGAAC	TAATACGACTCACTATAGGGCACTCTTGTGGAAGTCACGCC



Ten  $\mu$ g of DNA obtained by PCR or by digestion of plasmids containing the sequence encoding the antisense probe under the control of T7, T3 or SP6 promoters, was purified by gel extraction (QIAGEN) and *in vitro* transcription was carried out with the DIG RNA labeling Mix kit (Roche), following the instructions of the manufacturer. Probes were then precipitated in ethanol, 4M LiCl overnight and were resuspended in 100  $\mu$ l of hybridization buffer (50% Formamid, 1.3X SSC pH5, 5mM EDTA pH8, 50  $\mu$ g/ml yeast RNA/0.2% Tween20/ 0.5% CHAPS- 100  $\mu$ g/ml heparin). This stock solution was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

After dissection, embryos were fixed in 4% PFA for 24h, at  $4^{\circ}\text{C}$ . They were transferred progressively into 100% methanol and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Progressive rehydration was performed in PTW (0.1% Tween-20 in 1X PBS) before proteinase K treatment (10  $\mu$ g/ml in PTW). Embryos were then post-fixed 20 minutes in PTW/4% formaldehyde/0.1% glutaraldehyde solution. They were progressively equilibrated in hybridization buffer and incubated for 1h at  $68^{\circ}\text{C}$ . Hybridization buffer containing RNA probes (1  $\mu$ g/ml) was pre-warmed at  $68^{\circ}\text{C}$  before overnight incubation with embryos at  $68^{\circ}\text{C}$ . Three rinses were then carried out in MABT (100 mM maleic acid/150 mM NaCl pH7.5/0.1% Tween20). Embryos were blocked for 1 h in MABT/2% Blocking Reagent (BBR) (Roche), 1 h in MABT/2% BBR/2% fetal calf serum (FCS) and incubated overnight in MABT/2% de BBR/2% FCS/anti-DIG antibody (Roche) (1/20,000). They were then rinsed for 3 days in MABT and incubated 2 times for 15 minutes in NTMT solution before visualization with BM purple (Roche). Reactions were stopped by the addition of Tris 0.1% pH7.5 solution and embryos were stored in 4% PFA.

### Transcriptomic Analysis

For each condition, 3 BATs from independent embryos were pooled. RNAs extraction was performed with RNeasy Microkit (Quiagen) and Affymetrix Mouse Gene 2.1 ST was used for the generation of transcriptomic data.

Raw transcriptomic data from Affymetrix microarrays were normalized using the Partek® Flow® software (version 7.0 Copyright ©; 2018 Partek Inc., St. Louis, MO, USA), using background correction by Robust Multi-array Average (RMA), quantile normalization and summarization via median-polish. RMA values from different probes matching to the same gene were averaged. Genes with different temporal expression profiles were identified using the Short Time-series Expression Miner (STEM v1.3.11) (Ernst and Bar-Joseph, 2006). Parameters were set at 2 for “max unit change in model profiles between time points,” 1 for “minimum absolute expression change” and FDR for “Correction method.” Pathway enrichment analyses were performed using ToppCluster (Kaimal et al., 2010).

GSEA was performed using the GSEA software (v3.0) developed at the Broad Institute (Subramanian et al., 2005). We used 1000 gene-set permutations and the following settings: “weighted” as the enrichment statistic and “Diff\_of\_Classes” as the metric for ranking genes. High-throughput GSEA analyses were performed using BubbleGUM (GSEA Unlimited Map v1.3.19) <sup>2</sup> with similar parameters. The “MousePath\_GO\_gmt.gmt” set of genes from the Gene Set Knowledgebase (GSKB) was used (Lai et al., 2016).

### Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

RNAs of embryonic BAT and explants were obtained using RNeasy Microkit (Quiagen). cDNA were obtained with a reverse transcription Kit (High-capacity cDNA reverse transcription Kit, Life Technologies) and quantitative qPCR was performed using Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies). Results were analyzed with the standard delta Cycle Threshold (CT) method and normalized to the expression of *Ppia* (Cyclophilin A) or *36B4*. The list of primers used is given in Table S2.

### High Resolution Respirometry

Freshly isolated BATs (3-5mg) were placed into the chambers of the high resolution respirometer O2K (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) to measure the oxygen consumption either linked to ATP production or UCP1 uncoupling. In the first protocol, chambers were filled with MiRO5 media (0.5mM EGTA, 3mM  $\text{MgCl}_2$  3, 60mM lactobionic acid, 20 mM taurine, 10mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20mM HEPES, 110mM D-sucrose, 1g/L BSA essential fatty acid free, pH 7.0) at  $37^{\circ}\text{C}$ . After permeabilization with digitonin (2  $\mu$ g/mL), leak respiration was obtained. Then state 2 respiration was obtained by sequential addition of octanoyl-carnitine (0.2mM), pyruvate (5mM), malate (2mM) and glutamate (10mM). Coupling between respiratory chain and ATP synthase was obtained by the injection of 1mM ADP, leading to state 3 (I). Respiratory control ratio (RCR), which is the ratio state 3 (I) to state 2, was calculated. A RCR = 1 indicates the absence of coupling between respiration and ATP synthesis. Subsequent addition of succinate (10mM), maximizing complex II activity, gave state 3 (I+II) respiration. Finally, oligomycin (2.5  $\mu$ M) was added to inhibit FoF1 ATPase and measurement of state 4o was achieved. This allowed the calculation of the coupling control ratio (CCR), which is the state 4o to state 3 (I+II) ratio, as previously described (Porter et al., 2016). The lower the ratio, the higher the coupling. In the second protocol, tissues were placed in the uncoupling buffer, consisting in 120mM KCl, 5mM HEPES, 1mM EGTA and 0.1% BSA. After permeabilization, carboxyatractyloside (5  $\mu$ M, inhibitor of the Adenine Nucleotide Transporter), oligomycin (2.5  $\mu$ M) were added in both chambers. Then, one received pyruvate (5mM) and malate (2mM), the other received rotenone (0.5  $\mu$ M, complex I inhibitor) and succinate (10mM). Once a steady state was obtained, GDP (3mM) was added in order to measure oxygen consumption when UCP1 is inhibited. The ratio comparing the oxygen consumption in the presence and in the absence of GDP, called Leak Control Ratio, was informative for an effective uncoupling mediated by UCP1 (uncoupling when ratio < 1).

### Glycogen Measurement

The dosage of glycogen was done using the Glycogen Assay Kit (#MAK016, Sigma) according to the manufacturer's instructions.



### Transmission Electron Microscopy (TEM) and Immunogold Experiments

Embryonic BAT and explants were fixed in 2% PFA, 0.2% picric acid, 1% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer at 4°C, for 3 days to 1 week. Samples were washed in 0.1M PO<sub>4</sub> and post-fixed in 1% osmic acid in 0.1M PO<sub>4</sub> buffer for 1 h at RT. Dehydration was then performed by serial incubation in 50%, 70%, 80%, 95% and 100% ethanol before incubation in propylene oxide for 30 minutes. Samples were impregnated by incubation in propylene oxide/araldite (1:1 v/v) for 60 to 90 min, then propylene oxide/araldite (1:2 v/v) 1h and in 100% araldite overnight at 4°C. The samples were finally incubated in Araldite which was allowed to polymerize for 24h at 56°C. Ultrathin sections (85nm) were cut with a ultracut Leica EM UC. Sections were contrasted 8 min with uranyl acetate 2% and 8 min with lead citrate (Reynolds).

For immunogold experiments, sections were permeabilized in 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and rinsed before incubation in Tris 0.1M, NaCl 0.15M, BSA 1% pH 7.5. Blocking was performed in 0.1M Tris, 0.15M NaCl, 1% BSA, 1% NGS, pH7.5 for 30 min and the primary antibody was added in this buffer and incubated 48 hours at 4°C. Sections were washed in 0.1M Tris, 0.15M NaCl 1% BSA, 1% NGS and then in 0.1M Tris, 0.5M NaCl, 1% BSA 1% NGS. Sections were then incubated with Gold 18nm Goat anti-rabbit diluted 1/20 in 0.1M Tris containing 0.5M NaCl, 1% BSA, 1% NGS for 1h at RT. Sections were washed in 0.1M Tris, 0.5M NaCl, 1% BSA, 1% NGS and then in distilled water before contrasted 8 min with 2% uranyl acetate and 8 min with lead citrate (Reynolds). Finally, sections were rinsed and dried.

All pictures were taken with the Zeiss EM 900 microscope and a GATAN camera (Orion SC 1000). For quantification of the percentage of glycogen cluster occupancy, areas of 100 glycogen clusters and their respective inner lipid droplets were quantified by Fiji (NIH, Bethesda, MD, USA) from E18.5 embryos TEM images.

### Lipidomic

Lipids corresponding to a few mg of adipose tissue were extracted using a method adapted from Bligh and Dyer (1959) in dichloromethane/methanol (2% acetic acid) / water (2.5:2.5:2 v/v/v), in the presence of the internal standards (Cer d18:1/15:0 16 ng; PE 12:0/12:0 180 ng; PC 13:0/13:0 16 ng; SM d18:1/12:0 16 ng; PI 16:0/17:0 30 ng; PS 12:0/12:0 156.25 ng, 4 µg of stigmaterol, 4 µg of cholesteryl heptadecanoate and 8 µg of glyceryl trionadecanoate). The solution was centrifuged at 1500 rpm for 3 min. The organic phase was collected and dried under nitrogen, then dissolved in 20 µL of ethyl acetate for neutral lipid analysis and then in 50 µL of MeOH for main phospholipids and sphingolipids profiling. The extract was then stored at -20°C prior to analysis.

Phospholipids were profiled using an Agilent 1290 UPLC system coupled to a G6460 triple quadrupole spectrometer (Agilent Technologies) and using Agilent MassHunter Work-station Quantitative Analysis (version B.06.00) for data acquisition and analysis. A Kinetex HILIC column (Phenomenex, 50 × 4.6 mm, 2.6µm) was used for LC separations. The column temperature was controlled at 40°C. The mobile phase A was acetonitrile; and B was 10 mM ammonium formate in water at pH 3.2. The gradient was as follows: from 10% to 30% B over 10 min; 100% B for 2 min; and then back to 10% B for 1 min re-equilibrium prior to the next injection.

The flow rate of mobile phase was 0.3 mL/min and the injection volume was 5 µL. An electrospray source was employed in positive (for PE and PC analysis) and negative ion mode (for PI and PS analysis). The collision gas was nitrogen. Needle voltage was set at +4000 V. Several scan modes were used. First, to obtain the naturally different specie's mass, we analyzed cells lipid extracts with a precursor ion scan of 184 m/z and 241 m/z to PC and PI, respectively; and a neutral loss scan of 141 and 87 to PE and PS, respectively. The collision energy optimums for PE, PC, SM, PI, PS were 20 eV, 30 eV, 45 eV, and 22 eV respectively. Data were treated using QqQ Quantitative (vB.05.00) and Qualitative analysis software (vB.04.00).

1 µL of the lipid extract was analyzed by gas-liquid chromatography on a FOCUS Thermo Electron system using an Zebron-1 Phenomenex fused silica capillary columns (5 m X 0.32mm i.d., 0.50 µm film thickness)(Barrans et al., 1994). Oven temperature was programmed from 200°C to 350°C at a rate of 5°C per min and the carrier gas was hydrogen (0.5 bar). The injector and the detector were at 315°C and 345°C respectively.

### Protein Extraction and Immunoblotting

Embryonic BAT was homogenized in protein lysis buffer RIPA (Sigma). Fifty µg of proteins was run on a 4%–12% acrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane with the iBlot 2 system (Invitrogen). Immunoblotting was performed with antibodies described in the key resources table. The LI-COR Biosciences apparatus was used to acquire and analyze the pictures.

### QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Results are expressed as means ± standard error of the mean (s.e.m). To determine significance, Mann-Whitney Test was used to compare two groups for samples lower than 8 and one-way Anova were made to compare more than 2 groups with Bonferroni correction.  $p < 0.05$  was considered significant. Concerning primary cell experiments, paired t test were used to compare the results of treated cells with siRNA Control or Gys 1, obtained from the same preparation of a pool of embryos, in independent experiments.

### DATA AND CODE AVAILABILITY

The transcriptomic datasets generated during this study are available with GEO accession GSE122395 at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE122395>