



École Gradué Biologie Santé de Lille

Université de Lille

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Thèse soutenue publiquement par

Raphaël ROMIEN FERRARI

Le 18 décembre 2025

**Altérations mitochondriales et musculaires à distance du sepsis :
implication du Receptor for Advanced Glycation Endproducts
(RAGE)**

DISCIPLINE : Biologie, médecine et santé

SPECIALITE : Sciences de la vie et de la santé

Devant le jury composé de :

Professeure Yasmine Sebti

Docteure Lydie Combaret

Docteur Arnaud Mansart

Docteure Delphine Sauce

Professeur Steve Lancel

Présidente du jury

Rapporteure

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de thèse

Résumé

Le sepsis se traduit par une dysfonction d'organe potentiellement mortelle qui est induite par une réponse dysrégulée de l'hôte à une infection. La majorité des patients développent une faiblesse musculaire à l'issue du séjour en réanimation et persiste plusieurs années en étant associée à un risque de mortalité augmenté. Le muscle squelettique est un déterminant majeur dans la santé globale, son altération dégrade la qualité de vie des patients, réduit les capacités physiques et l'autonomie. Cependant, les séquelles musculaires à long terme demeurent encore insuffisamment étudiées sur le plan cellulaire et moléculaire. A la phase aiguë, deux axes majeurs d'altération dominent : la dysfonction mitochondriale (défauts bioénergétiques, altérations des voies de contrôle qualité) et l'inflammation (notamment via l'activation de l'inflammasome et de cytokines inflammatoires). Il reste à déterminer si, et de quelle manière, ces perturbations persistent et évoluent à long terme après le sepsis. Par ailleurs, chez les survivants du sepsis, il est observé une activation du Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE), un récepteur impliqué dans l'inflammation lié au vieillissement (inflammaging) et à la dysfonction mitochondriale. Nous émettons dès lors l'hypothèse que le sepsis puisse induire à long terme, un vieillissement accéléré, dépendant de l'activation chronique du RAGE.

Dans un modèle de sepsis murin, les souris survivantes 3 mois après le sepsis présentent une faiblesse musculaire qui se traduit par une diminution de la résistance à la fatigue, sans atrophie apparente des fibres oxydatives. Cette altération est associée à une dysfonction mitochondriale indépendante de la biomasse mitochondriale et liée à la persistance de dommages oxydatifs et nitrosatifs au sein du muscle. Parallèlement, l'augmentation d'une protéine chaperonne mitochondriale, Hsp60, est augmentée, indiquant un stress mitochondrial. Son rôle comme Damaged Associated Molecular Pattern (DAMP) pourrait établir un lien direct entre la dysfonction mitochondriale et l'inflammation. D'autant, que chez les souris survivantes du sepsis, il a été mis en évidence l'activation de deux voies inflammatoires, la voie NLRP3/Caspase-1 et la voie RAGE. L'inhibition du RAGE chez des souris soumis au même protocole de sepsis prévient partiellement le développement des altérations à long terme précédemment observées.

En conclusion, les altérations à long terme après le sepsis semblent suivre le même schéma qu'à la phase aiguë en impliquant la dysfonction mitochondriale et l'inflammation, qui sont

associées au maintien de la faiblesse musculaire. L'implication et les effets de l'inhibition du RAGE semblent prometteurs pour prévenir ces perturbations du muscle. Pour confirmer cette hypothèse, il sera nécessaire d'analyser en détail le lien entre la dysfonction mitochondriale et l'inflammation pour établir une stratégie thérapeutique adaptée.

Abstract

Sepsis is defined as a potentially life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. The majority of patients develop muscle weakness at the end of their ICU stay, which persists for several years and is associated with an increased risk of mortality. Skeletal muscle is a major determinant of overall health; its impairment degrades patients' quality of life and reduces physical capacities and autonomy. However, long-term muscular sequelae remain insufficiently studied at the cellular and molecular levels. In the acute phase, two major axes of alteration predominate: mitochondrial dysfunction (bioenergetic defects, alterations in quality-control pathways) and inflammation (notably through activation of the inflammasome and inflammatory cytokines). It remains to be determined whether, and how, these disturbances persist and evolve in the long term after sepsis. Moreover, in sepsis survivors, activation of the Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) has been observed; this receptor is implicated in aging-related inflammation (inflammaging) and mitochondrial dysfunction. We therefore hypothesize that sepsis may induce, in the long term, an accelerated aging process that depends on chronic activation of RAGE.

In a murine sepsis model, mice surviving 3 months after sepsis exhibit muscle weakness associated with decreased fatigue resistance, without apparent atrophy of oxidative fibers. This alteration is associated with mitochondrial dysfunction independent of mitochondrial biomass and rather linked to the persistence of oxidative and nitrosative damage within the muscle. In parallel, increased levels of the mitochondrial chaperone protein Hsp60 are observed, indicating mitochondrial stress. Its role as a DAMP could establish a direct link between mitochondrial dysfunction and inflammation. Moreover, in sepsis-surviving mice, activation of two inflammatory pathways has been demonstrated: the NLRP3/caspase-1 axis and the RAGE pathway. RAGE inhibition in mice subjected to the same sepsis protocol partially prevents the development of the previously observed long-term alterations.

In conclusion, long-term post-sepsis alterations appear to follow the same pattern as in the acute phase, involving mitochondrial dysfunction and inflammation, which are associated with the maintenance of muscle weakness. The implication of RAGE and the effects of its inhibition appear promising for preventing these muscular disturbances. To confirm this hypothesis, it will be necessary to analyze in detail the link between mitochondrial dysfunction and inflammation in order to establish an appropriate therapeutic strategy.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à la Docteure Lydie Combaret et au Docteur Arnaud Mansart, rapporteurs de cette thèse, pour le temps consacré à l'évaluation du manuscrit ainsi que pour leurs remarques et conseils qui ont contribué à sa finalisation.

Je remercie également la Professeure Yasmine Sebti et la Docteure Delphine Sauce pour avoir accepté de participer à mon jury et pour la richesse de leurs échanges scientifiques.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance au Professeur Steve Lancel, mon directeur de thèse, pour la transmission de ses connaissances, la rigueur et ses conseils éclairés tout au long de ce travail. Je vous remercie pour la confiance totale que vous avez su m'accorder durant ces années et qui a permis de m'épanouir pleinement dans ce projet et au sein de cette équipe.

Je remercie le Professeur Phillipe Amouyel, directeur de l'unité, pour son appui sur ce travail de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur Eric Boulanger, directeur de l'équipe 5 de l'unité U1167, qui m'a accepté dans son équipe et qui m'a donné l'opportunité de réaliser mon stage de Master 2 à l'époque. L'aventure a en réalité commencé dès le master Biologie du Vieillissement quand j'ai pu découvrir votre passion pour la recherche.

Je remercie le Professeur Yasmine Sebti et le Professeur Gilles Gouspillou quant à l'intérêt qu'ils ont porté tout au long de mon projet avec leurs encouragements. Ces réunions offraient un moment privilégié pour prendre du recul sur le travail réalisé et envisager les suites possibles.

Je remercie les professeurs Sebastien Préau et Raphaël Favory concernant les échanges captivants et enrichissants sur le monde de la clinique et leurs commentaires constructifs liés à mon projet.

Je remercie le professeur Marie Frimat pour l'intérêt qu'elle a porté à mon sujet de recherche. Nos discussions ont toujours été enrichissantes et accompagnées de réflexions judicieuses permettant de faire progresser mon travail.

Je remercie le Docteur², Alexandre Pierre, doctorant pendant les deux premières années de ma thèse qui m'a transmis une grande partie des compétences que je maîtrise aujourd'hui. Toujours engagé et attentif aux résultats, il a fait en sorte que chaque discussion soit source d'idées et d'hypothèses à explorer.

Merci à Jérémy Lemaire pour son aide et son implication tout au long de mon projet. Les innombrables pauses cafés et bars afterwork étaient l'occasion de s'évader un moment pour parler d'autre chose et de décompresser. Tu es maintenant le dernier responsable de la perpétuation de la tradition des memes.

Merci également à Arthur Dubech pour les nombreuses pauses cafés brainstorming et son aide dans mon projet, ainsi que les EDL niquel chrome ! Merci également pour l'ambiance impeccable façon DJ set du limousin.

Je tiens à remercier Sarah Ducastel, pour ses échanges toujours enrichissants et variés, ainsi que pour sa bonne humeur communicative, contribuant à instaurer une atmosphère de travail chaleureuse et stimulante.

Merci aux collègues et ex-collègues de bureau, Fabien Foquet pour sa sérénité et toujours là pour donner un coup de main avec bienveillance et bonne humeur, Claire Vincent pour son énergie débordante et son enthousiasme, ainsi que Gaëlle Grolaux, Ophélie Not, Thomaz Nogueira, Hieu Nguyen, Anaëlle Cesbron et Hugo Bonvalet pour les moments conviviaux au laboratoire.

Je remercie profondément l'ensemble des membres du laboratoire, ainsi que l'équipe Drug design et de pharma, en particulier le Docteur Michael Howsam pour les échanges scientifiques, en anglais ou pour ses conseils avisés, le Docteur Chantal Fradin et le Professeur Frédéric Tessier pour les échanges scientifiques enrichissants.

Je souhaite remercier chaleureusement les Professeurs Emmanuel Moyse et Bernard Mignotte, responsables de mon Master 2, qui ont su me donner ma chance à l'époque, sortant d'un autre Master 2 à l'expérience négative. C'est en partie grâce à vous si j'ai pu réaliser tout ce chemin et trouver une expérience épanouissante dans la recherche. Je vous exprime toute ma reconnaissance.

Je souhaite remercier Benji et Louise, des amis en or, même à distance, je vous remercie pour l'écoute et l'attention dont vous avez su faire preuve à mon égard. Un sacré trio depuis des années, il en existe peu des amis comme vous.

Merci à mes amis, Axelle, Slimane, Jérôme, Elena, Léa et Julie même si on n'a pu se voir que quelques fois, trop peu, ces moments étaient importants pour redonner un coup de fouet et de boost afin de replonger motivé dans la thèse.

A ma grand-mère pour son amour et sa présence précieuse.

À mes grands-parents, qui veillent sur moi et dont les souvenirs m'inspirent chaque jour. Leur exemple et l'affection dont ils ont su faire preuve marquant profondément et durablement ma vie.

Merci également aux compagnons à quatre pattes, pour leur insouciance et les moments de réconfort qu'ils m'ont offert, de vrais soupapes de bonheur.

À mes parents, merci de tout cœur pour vos encouragements en toutes circonstances et pour l'amour dont vous avez toujours fait preuve. Ce travail doit beaucoup à votre soutien indéfectible et à votre présence constante tout au long de ces années.

Enfin, je souhaite exprimer toute ma gratitude à Lucie, ton soutien et ta joie de vivre ont été des moteurs pour maintenir le cap de la thèse. Face à chaque imprévu, tu as toujours une solution en tête, avec toi on ne peut pas être pris au dépourvu, et c'est une véritable force au quotidien. Tu étais toujours là pour proposer des idées pour une échappée (merci les balades à la mer entre autres !), afin de se changer les idées et se ressourcer. Tu as tout mon amour.

Table des matières

<i>Liste des abréviations</i>	14
<i>Partie I - Introduction</i>	18
<i>1. Le sepsis comme potentiel inducteur d'un vieillissement musculaire accéléré</i>	18
<i>2. Fonction et structure du muscle squelettique</i>	20
2.1 Fonctions.....	20
2.2 Structure.....	22
2.3 La cellule musculaire	22
2.4 Les différentes de types de fibres musculaires	25
2.5 La contraction musculaire	27
2.5.1 Le cycle « cross-bridge »	27
2.5.2 Flux calcique.....	28
2.6 Cellules souches musculaires.....	29
2.7 Cellules non-musculaires	31
2.8 Matrice extracellulaire (MEC)	31
<i>3. Métabolisme énergétique du muscle squelettique.....</i>	32
3.1 Glycolyse.....	32
3.2 β -oxydation.....	33
3.3 Les mitochondries : centrales énergétiques du muscle.....	34
3.3.1 Structure et organisation	34
3.3.2 Cycle de KREBS	36
3.3.3 La phosphorylation oxydative (OXPHOS)	38
3.3.4 Stress oxydatif et nitrosatif.....	39
3.3.5 Fuite de protons	40
3.3.6 Défenses antioxydantes.....	40
3.3.7 Biogénèse mitochondriale	41
3.3.8 Mécanismes de contrôle qualité de la mitochondrie	41
a. UPRmt	41
b. Dynamique mitochondriale	43
i. La fusion	43
ii. La fission.....	45
c. Autophagie et mitophagie	46
<i>4. Vieillesse et muscle squelettique</i>	48

4.1	Les piliers biologiques du vieillissement	48
4.2	La sarcopénie.....	50
4.3	La sénescence cellulaire.....	51
4.3.1	Arrêt du cycle cellulaire.....	51
4.3.2	La fibrose musculaire	52
4.4	La dysfonction mitochondriale.....	54
4.4.1	Altérations bioénergétiques	55
4.4.2	Dynamique mitochondriale	56
4.4.3	Autophagie/mitophagie.....	56
4.5	L'inflammaging.....	57
4.5.1	Le récepteur RAGE.....	57
4.5.2	L'inflammasome Nlrp3	58
4.5.3	L'Il-6.....	60
4.5.4	Le Tnf- α	63
5.	<i>Altérations à court terme après le sepsis.....</i>	64
5.1	Altérations du phénotype musculaire.....	64
5.1.1	Atrophie musculaire	64
5.1.2	Altérations fonctionnelles	65
5.2	Dysfonction mitochondriale aigüe	66
5.2.1	Bioénergétique et Biogénèse.....	66
5.2.2	L'autophagie	66
5.2.3	La dynamique mitochondriale.....	68
5.3	Inflammation musculaire post-sepsis	69
5.3.1	Voie de l'inflammasome NLRP3	69
5.3.2	Voie RAGE	69
5.3.3	Voie Il-6	70
5.3.4	Voie TNF- α	71
6.	<i>Altérations à moyen et long terme après le sepsis.....</i>	71
6.1	Conséquences connues à long terme après le sepsis.....	72
6.1.1	Données sur le muscle	72
6.1.2	Au niveau de l'organisme.....	73
	<i>Partie II – Hypothèses et objectifs.....</i>	75
	<i>Partie III - Matériels et méthodes</i>	77
1.	<i>Modèle de sepsis murin.....</i>	77

2.	<i>Préparation des solutions de selles hétérologues.....</i>	79
3.	<i>Suivi de la composition corporelle.....</i>	80
4.	<i>Tapis de course</i>	80
5.	<i>Contractilité ex-vivo</i>	81
6.	<i>Analyse de la CSA musculaire.....</i>	81
7.	<i>Culture cellulaire de myoblastes - C2C12.....</i>	82
8.	<i>Respirométrie haute résolution sur fibres perméabilisées de muscle</i>	82
9.	<i>Respirométrie haute résolution sur cellules musculaires.....</i>	84
10.	<i>Western-blot.....</i>	85
11.	<i>Expression génique par qPCR.....</i>	86
12.	<i>Expression génique par quantigene</i>	87
13.	<i>Quantification de l'ADNmt.....</i>	87
14.	<i>Tableau et caractéristiques des anticorps utilisés</i>	88
15.	<i>Tableau et caractéristiques des amorces qPCR.....</i>	89
16.	<i>Analyses statistiques</i>	90
	Partie IV - Résultats.....	91
1.	<i>Caractérisation du modèle de sepsis murin à long terme.....</i>	91
2.	<i>Les souris survivantes du sepsis à long terme ne présentent pas d'atrophie des fibres oxydatives.....</i>	94
3.	<i>Le muscle squelettique des souris survivantes du sepsis présente une régulation à la hausse de voies associées à la fibrose</i>	98
4.	<i>La résistance à la fatigue du muscle oxydatif est diminuée chez les souris survivantes du sepsis.....</i>	99
5.	<i>Les souris survivantes du sepsis développent une dysfonction mitochondriale à long terme</i>	101
6.	<i>La dysfonction mitochondriale observée en FAO ne provient pas d'une dérégulation du métabolisme des acides gras.....</i>	106
7.	<i>Le sepsis n'entraîne pas de diminution des complexes respiratoires à long terme après le sepsis.....</i>	107
8.	<i>Les souris survivantes du sepsis présentent une augmentation des marqueurs associés à la voie mtUPR et à l'apoptose.....</i>	109
9.	<i>Présence d'une inflammation persistante médiée par les voies de NLRP3 et du RAGE à long terme après le sepsis</i>	111

<i>10. Les altérations musculaires à long terme après le sepsis ne sont pas associées à la sénescence.....</i>	113
<i>11. Reproduction des altérations musculaires dans un modèle in-vitro par traitement chronique au LPS.....</i>	114
<i>12. La mortalité et les paramètres de la composition corporelle des souris Ager^{-/-} post-sepsis ne varient pas.....</i>	116
<i>13. Le sepsis n'entraîne pas d'atrophie musculaire chez les souris Ager^{-/-}.....</i>	118
<i>14. Les souris Ager^{-/-} post-sepsis ne développent pas de dysfonction mitochondriale</i>	120
<i>15. Les souris Ager^{-/-} ne développent pas d'inflammation médiée par la Caspase-1, ni de stress mitochondrial et nitrosatif</i>	122
<i>Partie V - Discussion.....</i>	124
<i>Partie VI - Conclusion.....</i>	133

FIGURE 1. CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS TYPES DE CELLULES MUSCULAIRES DANS LE CORPS.	21
FIGURE 2. ORGANISATION DU MUSCLE SQUELETTIQUE.....	22
FIGURE 3. ORGANISATION ET STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE.	24
FIGURE 4. STRUCTURE ET ORGANISATION DES SARCOMERES.	25
FIGURE 5. CLASSIFICATION DES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES MUSCULAIRES EN FONCTION DE LEUR METABOLISME, DE LEUR CAPACITE CONTRACTILE ET DU NOMBRE DE MITOCHONDRIES.	27
FIGURE 6. ILLUSTRATION DES DIFFERENTES ETAPES DU CYCLE « CROSS-BRIDGE ».	28
FIGURE 7. SCHEMA DES DIFFERENTES ETAPES DE LA REGENERATION MUSCULAIRE.....	30
FIGURE 8. ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TRANSPORTEURS ET ENZYMES NECESSAIRES AU METABOLISME D'OXYDATION DES ACIDES GRAS.	34
FIGURE 9. ILLUSTRATION DE LA STRUCTURE ET DES DIFFERENTS TYPES DE POPULATIONS MITOCHONDRIALES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	36
FIGURE 10. SCHEMA DU CYCLE DE KREBS (TCA CYCLE) ET DE LA CHAINE DE TRANSFERT D'ELECTRON.....	37
FIGURE 11. SCHEMA DE LA CHAINE DE TRANSFERT D'ELECTRON.	39
FIGURE 12. ROLE D'HSP60 DANS L'INDUCTION DE L'APOPTOSE ET DE L'INFLAMMATION.	43
FIGURE 13. SCHEMA DE LA FUSION MITOCHONDRIALE.	45
FIGURE 14. SCHEMA DE LA FISSION MITOCHONDRIALE.....	46
FIGURE 15. SCHEMA ILLUSTRANT LES DIFFERENTES ETAPES DU PROCESSUS D'AUTOPHAGIE.	47
FIGURE 16. ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES DE VIEILLISSEMENT, PHYSIOLOGIQUE/ROBUSTE, PATHOLOGIQUE ET L'ETAT DE FRAGILITE.	49
FIGURE 17. SCHEMA REPRESENTANT LES 12 GRANDS PILIERS DU VIEILLISSEMENT.....	50
FIGURE 18. SCHEMA ILLUSTRANT LES DEUX VOIES CONDUISANT A L'ARRET DU CYCLE CELLULAIRE VIA P16 ET P21/53.....	52
FIGURE 19. ROLES DES DIFFERENTES MMPS IMPLIQUEES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE.	54
FIGURE 20. RAGE EST IMPLIQUE DANS LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE ET L'INFLAMMAGING.	58
FIGURE 21. VOIE DE SIGNALISATION DE NLRP3 EST DE SES PRINCIPAUX ACTIVATEURS.	60
FIGURE 22.VOIE DE SIGNALISATION DE L'IL-6/JAK2/STAT3.....	62
FIGURE 23. IMAGES AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE PRESENTANT DES MITOCHONDRIES ABERRANTES/ENDOMMAGEES A LA SUITE DU SEPSIS.....	67
FIGURE 24. SYNTHESE SCHEMATIQUE DE L'HYPOTHESE DE TRAVAIL.	76
FIGURE 25. MODELE DE SEPSIS MURIN PAR INJECTION DE SELLES HETEROLOGUES.....	77
FIGURE 26. MURINE SEPSIS SCORE (MSS).	79
FIGURE 27. PROTOCOLE DE RESPIROMETRIE HAUTE RESOLUTION SUR FIBRES PERMEABILISEES MUSCULAIRES.....	84
FIGURE 28. PROTOCOLE DE RESPIROMETRIE HAUTE RESOLUTION SUR CELLULES MUSCULAIRES.	85
FIGURE 29. SUIVIS DE LA MORTALITE ET CLINIQUE DES SOURIS SURVIVANTES AU SEPSIS PENDANT 3 MOIS ET LES 10 PREMIERS JOURS CHEZ LA SOURIS.	92

FIGURE 30. LE SEPSIS N'INDUIT PAS DE CHANGEMENTS DE LA COMPOSITION CORPORELLE A LONG TERME APRES LE SEPSIS.	93
FIGURE 31. LE POIDS HUMIDE DES SOURIS SURVIVANTES AU SEPSIS N'EST PAS IMPACTE A LONG TERME.....	94
FIGURE 32. LES FIBRES MUSCULAIRES OXYDATIVES NE SONT PAS IMPACTEES PAR L'ATROPHIE.	96
FIGURE 33. LE METABOLISME ET LA REGULATION MUSCULAIRE NE SONT PAS AFFECTES A LONG TERME APRES LE SEPSIS.....	97
FIGURE 34. AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DES GENES ASSOCIES A LA FIBROSE CHEZ LES SOURIS SURVIVANTES AU SEPSIS.	98
FIGURE 35. LES SOURIS SURVIVANTES DU SEPSIS PRESENTENT UNE REDUCTION DE LA RESISTANCE A LA FATIGUE.	100
FIGURE 36. LES SOURIS SURVIVANTES DU SEPSIS DEVELOPPENT UNE DYSFONCTION MITOCHONDRIALE DANS LE MUSCLE OXYDATIF SIMILAIRE AU VIEILLISSEMENT.	102
FIGURE 37. LE MUSCLE GLYCOLYTIQUE N'EST PAS IMPACTE PAR LE SEPSIS ET LE VIEILLISSEMENT.	103
FIGURE 38. LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE PERSISTANTE A LONG TERME APRES LE SEPSIS CHEZ LA SOURIS ENTRAINE UN STRESS NITROSATIF.....	105
FIGURE 39. LES ENZYMES ET LES TRANSPORTEURS DU METABOLISME DES ACIDES GRAS NE SONT PAS IMPLIQUES DANS LA REDUCTION DE LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE.	106
FIGURE 40. LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE N'EST PAS IMPACTEE PAR LE SEPSIS A LONG TERME.	108
FIGURE 41. LE SEPSIS INDUIT UNE HAUSSE DE LA VOIE UPRMT ET DE LA CASPASE 3 CLIVEE.	110
FIGURE 42. LE SEPSIS INDUIT UNE INFLAMMATION CHRONIQUE A LONG TERME MEDIEE PAR LES VOIES NLRP3 ET RAGE.....	112
FIGURE 43. ABSENCE DE L'EXPRESSION DE MARQUEURS DE LA SENESCENCE DANS LE MUSCLE A LONG TERME APRES LE SEPSIS.....	113
FIGURE 44. UN TRAITEMENT AU LPS CHRONIQUE ET A FAIBLE DOSE ENTRAINE UNE DYSFONCTION MITOCHONDRIALE ET UNE ACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE DES VOIES DE L'INFLAMMATION ET DE LA FIBROSE.	115
FIGURE 45. LES SOURIS AGER ^{-/-} POSSEDENT UNE MORTALITE SIMILAIRE AUX SOURIS WT.	116
FIGURE 46. LA COMPOSITION CORPORELLE DES SOURIS AGER ^{-/-} RESTE INCHANGE SUR LE LONG TERME.	117
FIGURE 47. LES SOURIS SURVIVANTES DU SEPSIS AGER ^{-/-} NE PRESENTENT PAS D'ATROPHIE MUSCULAIRE. .	119
FIGURE 48. LES SOURIS AGER ^{-/-} NE DEVELOPPENT PAS DE DYSFONCTION MITOCHONDRIALE A LONG TERME APRES LE SEPSIS.....	121
FIGURE 49. LES SOURIS AGER ^{-/-} NE DEVELOPPENT PAS D'INFLAMMATION MEDIEE PAR LA VOIE CASPASE-1, DE STRESS NITROSATIF ET MITOCHONDRIAL A LONG TERME APRES LE SEPSIS.....	122
FIGURE 50. REPRESENTATION DES MECANISMES HYPOTHETIQUES DE LA DYSFONCTION MITOCHONDRIALE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE A LONG TERME APRES LE SEPSIS CHEZ LA SOURIS.	128
FIGURE 51. SCHEMA RECAPITULATIF DES ALTERATIONS MUSCULAIRES A LONG TERME APRES LE SEPSIS ET LEURS INTERACTIONS.....	134

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADNn : ADN nucléaire

ARN : Acide ribonucléique

ASC : Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD

ATG : Autophagy-related

ATP : Adénosine Triphosphate

Ca²⁺ : Calcium

CDK : Cyclin-Dependent Kinase

CLP : Cecal Ligation and Puncture

CPT : Carnitine Palmitoyltransferase

CoQ : Coenzyme Q

CSA : Cross-sectionnal area

DAMP : Damaged Associated Molecular Pattern

DRP1 : Dynamine-related protein 1

EDL : Extensor digitorum longus

ETC : Electron transport chain

FAD : Flavin Adenine Dinucleotide (oxydée)

FADH² : Flavin Adenine Dinucleotide (réduite)

FAPs : fibro-adipogenic progenitors

FAT : Fatty Acid Translocase

FATP : Fatty Acid Transport Protein

FGF : Fibroblast Growth Factor

FoxO : Forkhead box O

GADPH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

GLUT4 : Glucose Transporter Type 4

GP130 : Glycoprotein 130

HMGB1 : High Mobility Group B1

HSP : Heat Shock Protein

ICUAW : Intensive Care Unit Acquired Weakness

IFN : Interferon gamma

Il : Interleukine

Il-6R : Interleukin-6 receptor

IMF : Inter-myofibrillaires

IP : Intra-péritonéal

IRA : Insuffisance rénale aigüe

JAK2 : Janus kinase 2

LAMP : Lysosome-associated membrane protein

LC3 : Microtubule-associated protein 1 light chain 3

LPS : Lipopolysaccharides

MCU : Mitochondrial Calcium Uniporter

MEC : Matrice ExtraCellular

MFF : Mitochondrial Fission Factor

MFN : Mitofusin

MID : Mitochondrial Dynamics protein

MMP : Matrix metalloproteinase

MnSOD : Manganese Superoxide Dismutase

MRC : Medical Research Council

Mrf4 : Myogenic Regulatory Factor 4

mtROS : ROS mitochondriaux

MyoD : Myogenic differentiation

MyoG : Myogenin

Myf5 : Myogenic Factor 5

MSS : Murine sepsis score

NAD⁺ : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (oxydé)

NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide (réduit)

ND1 : NADH déshydrogénase 1

NF-κB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NOS : Oxyde Nitric Synthase

Pai-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

Pax7 : Paired Box 7

PE : Phosphatidyléthanolamine

PDH : Pyruvate déshydrogénase

PPIA : Peptidyl-prolyl cis-trans isomérase

PINK 1 : PTEN-induced putative kinase 1

pRB : Protéine du rétinoblastome

PRR : Pattern Recognition Receptor

OPA1 : Optic atrophy protein 1

PAMP : Pathogen-associated molecular patterns

PGC-1α : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-Alpha

RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts

ROS : Reactives Oxygen Species

RMN : Nuclear Magnetic Resonance

RNS : Reactive Nitrogen Species

RS : Réticulum Sarcoplasmique

RT : Température ambiante

RyR : ryanodine

SASP : secretory associated senescence phenotype

SDH : Succinate Déshydrogénase

SERCA : Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPases

SOCS3 : Suppressor of Cytokine Signaling 3

SOD : Superoxide Dismutase

SS : Sous-sarcolemmales

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

STAT3-Y705 : STAT3 phosphorylée sur la tyrosine 705

SOFA : Sequential Organ Failure Assessment

TA : Tibialis anterior

TCA : Tricarboxylic Acid cycle

TD-NMR : Time-domain nuclear magnetic resonance

TFEB : Transcription factor EB

Tgf- β : Transforming growth factor beta

TLR : Toll Like Receptor

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

ULK1 : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

UPS : Ubiquitin proteasome systeme

UPR : Unfolded Protein Response

USI : Unité de Soins Intensifs

WT : Wild-Type

Partie I - Introduction

1. Le sepsis comme potentiel inducteur d'un vieillissement musculaire accéléré

En 2017, près de 49 millions de personnes étaient atteintes par le sepsis et 11 millions en sont décédées ^{1,2}. Le sepsis est une réponse immunitaire disproportionnée suite à une infection et qui est potentiellement mortelle ³. Le choc septique, une forme grave du sepsis, est associé à des altérations circulatoires, cellulaires et métaboliques plus profondes et une mortalité plus importante ³. Le sepsis représente un problème de santé majeur puisque la mortalité dans le cas d'un choc septique est supérieure à 50% en unité de soins intensifs (USI) ¹. De plus, il représente plus de 5% des coûts hospitaliers avec 20 milliards de dollars aux Etats-Unis en 2011 ³. Les progrès des soins attribués aux patients en USI, par la détection et la prise en charge précoces, ont eu pour conséquence d'augmenter le nombre de survivants du sepsis ⁴. Cependant, cela amène de nouveaux défis sur la prise en charge de ces nouveaux survivants. Ils présentent une perte de masse maigre et une inflammation chronique ⁴. Une majorité va développer une faiblesse musculaire acquise en USI, appelée ICUAW (Intensive Care Unit Acquired Weakness) ^{5,6}. Celle-ci peut persister dans le temps et être observée plusieurs années après le passage en USI ⁷. L'ICUAW peut affecter les muscles périphériques et respiratoires ⁶. Il se caractérise notamment, par une atrophie musculaire qui résulte en une activation du catabolisme des protéines musculaires ⁶. Cependant la faiblesse musculaire ne s'explique pas uniquement par une diminution de sa masse. Des défauts d'excitabilité causés par la dysfonction des canaux sodiques et une perte de l'homéostasie calcique sont observés, impactant la fonction contractile ⁶. La fonction bioénergétique est aussi fortement altérée et se traduit par des altérations de la mitochondrie, centrale énergétique du muscle, qui apparaissent sous formes de stress oxydatif et d'une production d'ATP moins efficace. Le processus impliqué dans le recyclage des protéines présente aussi des anomalies, par une atteinte de l'autophagie chez les patients atteints de sepsis ⁶. La compréhension de l'ICUAW est une question importante puisqu'il est associé à un mauvais pronostic à long terme ⁶. Pour les survivants du sepsis cela se traduit par une qualité de vie considérablement réduite, une fréquence des chutes plus importante, des incapacités physiques, etc. Ces handicaps peuvent persister et s'installer de manière définitive sans totale récupération ⁶. Malgré l'impact majeur du sepsis chez ces survivants à long terme, les mécanismes sous-jacents de l'ICUAW restent encore trop peu étudiés. Néanmoins, les

altérations musculaires associées au sepsis à la phase aiguë fournissent une base de connaissances solides pour orienter les futures recherches sur les conséquences à long terme. Durant la phase aiguë du sepsis, la dysfonction mitochondriale occupe une place importante dans la faiblesse musculaire. Elle peut être identifiée par une diminution de la fonction respiratoire mitochondriale et des défauts bioénergétiques ^{8,9}. Différents mécanismes impliqués dans le contrôle qualité de la mitochondrie pourraient l'expliquer, parmi eux figurent la dynamique mitochondriale et l'autophagie. Ces mécanismes permettent à la mitochondrie de fonctionner de façon optimale en éliminant les unités endommagées ^{9,10}. Ainsi, une dérégulation de ces mécanismes aboutit à une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles qui est responsable de la libération de plusieurs molécules délétères, comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou l'ADN mitochondrial (ADNmt). Elles induisent l'activation de l'inflammasome NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3), responsable de la production d'interleukines pro-inflammatoires (Il-1 β et l'Il-18) et de la mort cellulaire par pyroptose ^{11,12}. Cela aboutit à la libération du contenu intra-cellulaire dans l'espace extra-cellulaire et parmi eux, la protéine High Mobility Group B1 (HMGB1) et l'ADNmt ¹³. HMGB1 est alors reconnu comme damaged associated molecular pattern (DAMP) induisant des réponses inflammatoires via les Toll Like Receptors (TLRs) et également l'activation Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE). Véritable carrefour de signalisation, son activation est associée au vieillissement, à l'inflammation liée à l'âge (inflammaging) et à la dysfonction mitochondriale. RAGE est un Pattern Recognition Receptor (PRR) qui est capable de lier plusieurs ligands, dont certains DAMPs (protéines S-100 calcium-binding protein (S100) et HMGB1) ^{14,15}. La présence d'HMGB1 a été retrouvée dans la circulation jusqu'à 28 jours après le sepsis chez la souris ¹³. De plus, les protéines S100A8/A9, d'autres ligands du RAGE, sont augmentées durant le sepsis et dans le muscle, induisant de multiples altérations sur la mitochondrie ^{9,13}. Néanmoins, les mécanismes précis à l'origine de la faiblesse musculaire demeurent un sujet de recherche actif. Les rares études réalisées chez l'Homme indiquent que la faiblesse musculaire à long terme serait associée à des dérégulations de la fonction mitochondriale ^{7,8,16}. Cependant, aucune étude n'a cherché à retrouver à long terme, l'ensemble des altérations observées pendant le sepsis (faiblesse musculaire, dysfonction mitochondriale, inflammation). Enfin, si leur persistance est confirmée, l'hypothèse d'un vieillissement accéléré du muscle squelettique induit par le sepsis et dépendant du RAGE, pourrait être envisagé.

2. Fonction et structure du muscle squelettique

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu durant le sepsis et pendant le vieillissement, il est nécessaire d'étudier la physiologie du muscle afin de comprendre comment sa structure et son fonctionnement peuvent être impactés.

2.1 Fonctions

L'organisme comprend 3 types de muscles : les muscles lisses, cardiaques et squelettiques. Le myocyte désigne la cellule musculaire de façon générale et est capable de se contracter grâce à des protéines spécialisées dans la conversion d'énergie chimique en énergie mécanique. Les muscles squelettiques et cardiaques sont des muscles striés en raison de l'organisation régulière de leur unité contractile, le sarcomère, dont la répétition alignée confère cet aspect strié caractéristique. A l'inverse les muscles lisses ne possèdent pas cet arrangement et les fibres d'actines et de myosines sont disposées de façon irrégulière. Les muscles lisses assurent le contrôle du diamètre des organes creux, tels que les vaisseaux sanguins, voies urinaires, respiratoires, permettant la régulation de leur flux ¹⁷. Les fibres musculaires squelettiques sont des cellules de forme cylindrique et longue et multinucléées. La cellule musculaire cardiaque, ou cardiomyocytes sont des cellules mononucléées et ramifiées. Les myocytes lisses sont mononucléés et sont de formes fusiformes (figure 1).



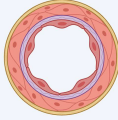



	Caracteristiques	Fonctions	Cellules
Muscle squelettique	Fibres striées, tubulaires et multinucléées		
Muscle lisse	Fibres non striées, fusiformes et mononucléées		
Muscle cardiaque	Fibres striées, ramifiées et mononucléées		

Figure 1. Caractéristiques des différents types de cellules musculaires dans le corps.

Biorender.

Le muscle squelettique représente 40% à 50% de la masse d'un individu. Il assure plusieurs fonctions essentielles, la première est mécanique en convertissant l'énergie chimique en énergie mécanique, rendant possible la locomotion, la production de mouvements et le maintien de la posture. La production d'énergie pour les exercices physiques font de lui le plus grand consommateur d'oxygène du corps. La seconde fonction est métabolique puisqu'il participe au stockage des acides aminés et des glucides pour la régulation du métabolisme et qu'il est impliqué dans la thermogénèse. Enfin, il sert de réservoir en acides aminés pour les autres organes et la synthèse de protéines. Sa dernière fonction est l'homéostasie et la communication avec les autres tissus et cellules. Cette fonction est rendue possible par la sécrétion de médiateurs auto, para et endocrine qui sont appelés myokines. A l'intérieur du tissu musculaire on retrouve différentes populations cellulaires. La principale est représentée par les cellules musculaires elles-mêmes, mais, il y a aussi le tissu adipeux, vasculaire, conjonctif et nerveux^{7,18-20}. Le muscle squelettique joue un rôle central dans la mobilité, le métabolisme énergétique

et l'homéostasie de l'organisme, toute altération de son intégrité compromet ainsi, de multiples fonctions essentielles.

2.2 Structure

Pour assurer l'ensemble de ses fonctions, le muscle squelettique possède une structure hautement organisée, constituée de faisceaux de fibres musculaires entourés de tissu conjonctif. Cette architecture lui confère à la fois sa force contractile et son intégration dans l'ensemble de l'organisme. Le muscle squelettique est entouré d'un tissu conjonctif l'épimysium, à l'intérieur, les fibres musculaires sont organisées sous forme de faisceaux de fibres entourés d'un autre tissu conjonctif, le périmysium. Chaque fibre est entourée d'un tissu conjonctif, l'endomysium (figure 2). Enfin, le sarcolemme représente la membrane plasmique de la cellule musculaire squelettique ⁹.

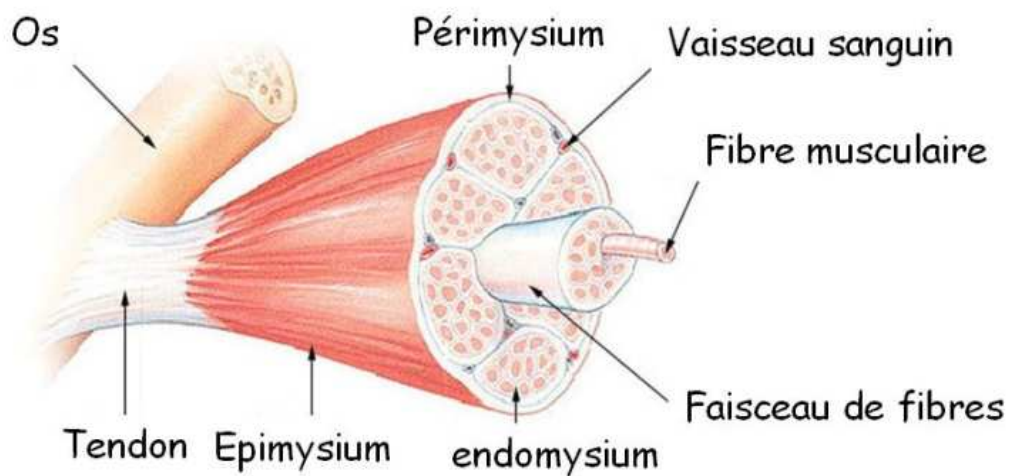


Figure 2. Organisation du muscle squelettique.

Le muscle squelettique possède une structure bien spécifique qui répond aux fonctions remplies par ce dernier. D'après unisciel, https://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/2a_1.html.

2.3 La cellule musculaire

La fibre musculaire possède une forme cylindrique et peut mesurer jusqu'à une dizaine de centimètres, ce qui en fait une des plus longues cellules de l'organisme. Sous le sarcolemme, les myofibrilles occupent la majeure partie du cytoplasme de la cellule, appelé sarcoplasme. La

myofibrille est constituée d'un assemblage de filaments d'actine et de myosine, formant des sarcomères, motifs répétés et alignés le long de la fibre plusieurs fois. Cette configuration donne l'aspect strié au muscle squelettique et constitue un des éléments différenciant des muscles lisses.

Le réseau tubulaire de la fibre musculaire joue un rôle important dans la contraction musculaire. La membrane plasmique possède des invaginations appelées tubules T, qui pénètrent la fibre permettant la propagation efficace du potentiel d'action, qui est acheminé par les motoneurones. Ils sont étroitement liés aux citernes terminales qui représentent des zones spécifiques du réticulum sarcoplasmique (RS) et qui sont situés autour des tubules T, formant le complexe appelé triade. Ces citernes terminales sont des réservoirs de calcium (Ca^{2+}) qui le libèrent lors de la contraction. Entre les triades, le RS forme des tubules longitudinaux, leur rôle est de distribuer de façon homogène le Ca^{2+} à l'ensemble de la myofibrille, permettant une contraction coordonnée sur l'ensemble de la fibre (figure 3).

La mitochondrie peut être représentée sous forme d'une centrale énergétique dans le muscle squelettique, elle la fourni sous forme d' adénosine triphosphate (ATP) et à besoin de se situer au plus proche des structures contractiles. Il existe deux types de populations mitochondriales qui sont distinguées selon leur localisation. La première est la mitochondrie sous-sarcolemmale (située sous le sarcolemme) et la seconde inter-myofibrillaire (située entre les myofibrilles) (figure 3). Cette organisation structurale est dictée par la fonction contractile des myofibrilles qui nécessite des mitochondries proches des unités contractiles et de la consommation d'ATP. Les mitochondries inter-myofibrillaires jouent ce rôle et sont plus spécialisées dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et la production d'ATP. Les mitochondries sous-sarcolemmales sont impliquées dans le maintien du potentiel d'action et alimentent les pompes ioniques ²¹.

La fibre musculaire est multinucléées et possède plusieurs noyaux qui se situent sous le sarcolemme en périphérie des myofibrilles. Les cellules souches, dites satellites sont nichées proches des noyaux des myofibres, elles se situent entre le sarcolemme et la lame basale.

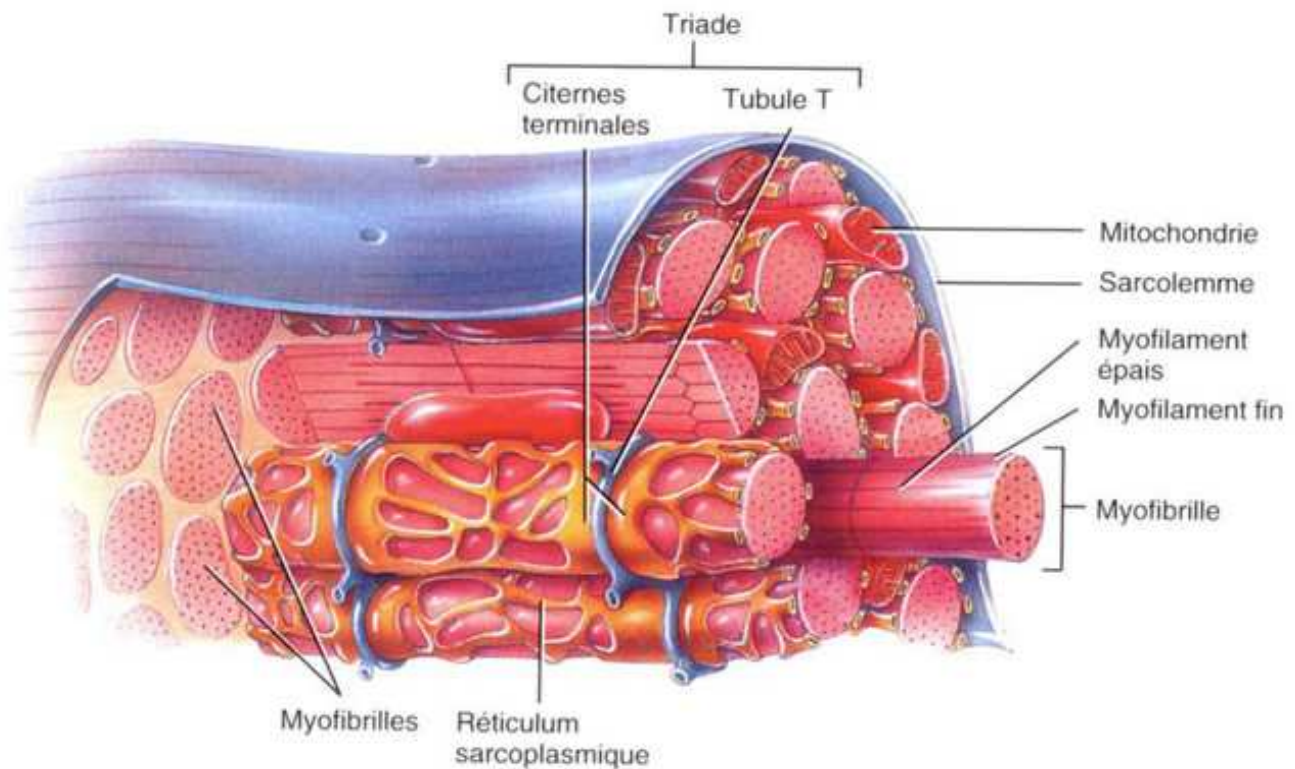


Figure 3. Organisation et structure de la fibre musculaire.

D'après Zeinab El Dirani, (2018).

Le sarcomère est défini comme l'unité contractile responsable du raccourcissement durant le mécanisme de contraction. Il est délimité par deux lignes Z (de l'allemand « zwischen », signifiant « entre »), sur lesquelles s'ancrent, de part et d'autre, les filaments fins constitués d'actine, de tropomyosine et de troponine. En alternance, la bande A contient les filaments épais de myosine. Au centre du sarcomère se positionne la ligne M (de l'allemand « mittel », signifiant « centre »), formée de protéines stabilisant les filaments de myosine. Les filaments élastiques de titine fixent les myosines aux lignes Z et assurent un rôle de stabilité du sarcomère (figure 4). Il existe plusieurs isoformes de la chaîne lourde de myosine au sein des fibres musculaires squelettiques. Ces isoformes déterminent à la fois le type de métabolisme utilisé par la fibre (oxydatif ou glycolytique) et ses propriétés contractiles, telles que la vitesse et l'endurance de contraction ^{18,19,22-24}.

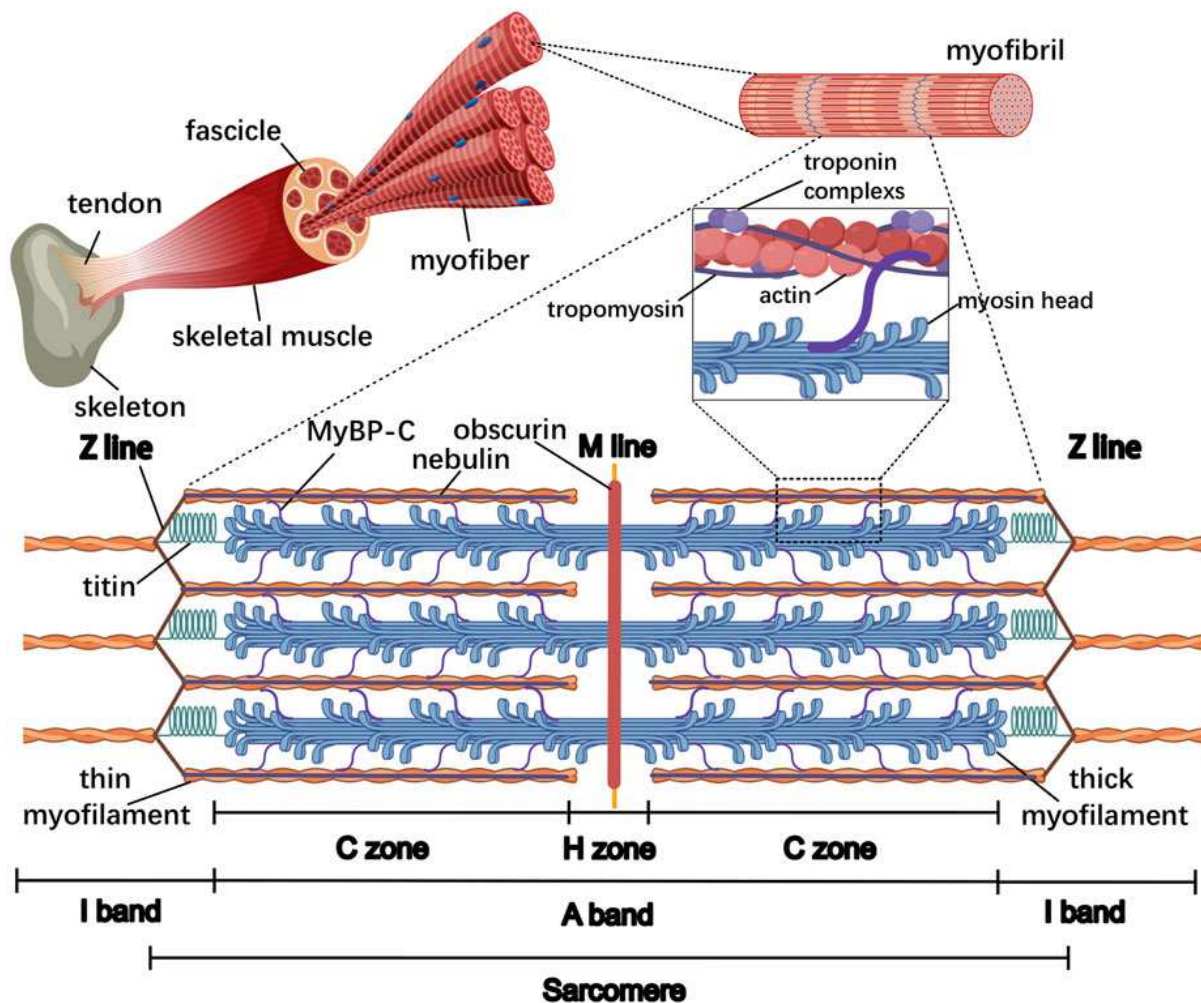


Figure 4. Structure et organisation des sarcomères.

D'après Zhao *et al.*, (2025).

2.4 Les différentes de types de fibres musculaires

Comme mentionné ci-dessus, les différents types de fibres musculaires sont déterminés par l'isoforme de la chaîne lourde de myosine. On distinguera les fibres de types I, IIa, IIx et IIb (figure 4). On classera les fibres dites à contraction lente : les types I, et les fibres à contraction rapide : les types II. Dans les fibres de types II, il existe plusieurs sous-groupes : les types IIa, IIx et IIb. L'Homme étant dépourvu de type IIb, au contraire des rongeurs qui possèdent les fibres IIx et les IIb. Ce classement est rendu possible par le type de métabolisme qu'elles adoptent et par conséquent, par leurs propriétés et fonctions contractiles ²⁵. La première différence se situe dans leur contenu en succinate déshydrogénase (SDH), cette enzyme est ancrée dans la membrane mitochondriale et participe à la respiration OXPHOS. Plus une fibre sera riche en SDH et plus celle-ci possédera un métabolisme oxydatif, moins elle le sera et plus

elle favorisera à l'inverse un métabolisme glycolytique (figure 4). Ainsi, il existe des fibres préférentiellement oxydatives, glycolytiques et des intermédiaires. Les fibres oxydatives possèdent une contraction lente et une résistance importante à la fatigue, autrement dit, elles sont spécialisées dans le maintien d'une contraction dans la durée. Au contraire des fibres glycolytiques, qui possèdent une contraction très rapide mais qui s'épuisent facilement. On remarquera aussi un RS peu développé dans les fibres oxydatives et développé dans les fibres glycolytiques. Cela permet aux fibres glycolytiques un relargage très rapide du Ca^{2+} , permettant une contraction puissante et brève. Il existe plusieurs types de fibres glycolytiques qui se distinguent par leur contenu en SDH. Les fibres IIa possèdent une quantité de SDH plus importante comparée aux fibres IIb, où elle est bien plus faible. La vitesse de contraction est intermédiaire pour les fibres IIa et rapide pour les fibres IIb. Cependant, les fibres IIa et IIb possèdent des niveaux élevés d'enzymes glycolytiques. Ainsi, en résumé, les fibres de types I sont essentiellement oxydatives, les fibres de types IIa constituent un type intermédiaire et sont oxydatives et glycolytiques, et enfin les fibres IIb sont essentiellement glycolytiques. Il a été précédemment été évoqué un troisième type de fibre, les IIx, celles-ci ont été découvertes plus tard. Les fibres IIx, se situent entre les IIa et les IIb, leur niveau de résistance à la fatigue est intermédiaire et le contenu en SDH est élevé, de même que leur contraction qui se situe à mi-chemin entre les IIa et les IIb (figure 4). Les fibres de types IIx chez l'Homme ne correspondent pas aux fibres IIx des rongeurs. Chez l'Homme, le niveau de SDH est bas, là où chez la souris les fibres IIx sont un type intermédiaire entre les fibres IIa et les fibres IIb avec un niveau de SDH élevé ²⁶. Dans les muscles on retrouve la plupart du temps un mélange de différents types de fibres. Cependant, suivant les besoins et les fonctions assurées par le muscle, certains types de fibres vont être privilégiés et dominants. Il existe même des fibres dites hybrides, partageant les caractéristiques de deux types de fibres. Indépendamment de leur type, toutes les fibres musculaires partagent une architecture contractile commune : le sarcomère, l'unité de base de la contraction ²⁷.

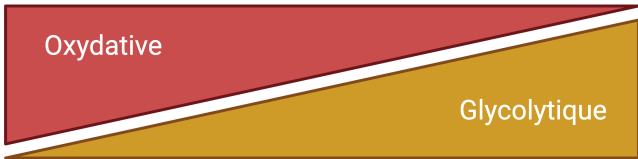




Metabolism				
MyHC isoforms (slow to fast) :	MyHC-I	MyHC-IIa	MyHC-IIx	MyHC-IIb
Twitch	Slow	Moderate	Fast	Fast
Fatigue	Resistant	Moderate resistant	Fast fatigue	Fast fatigue
Mitochondria numbers				
Humans	I	IIa	IIx	
Rodents	I	IIa	IIx	IIb

Figure 5. Classification des différents types de fibres musculaires en fonction de leur métabolisme, de leur capacité contractile et du nombre de mitochondries.

Biorender.

2.5 La contraction musculaire

2.5.1 Le cycle « cross-bridge »

Le cycle de contraction du sarcomère est appelé le cycle « cross-bridge » ou cycle des ponts croisés. Il se réalise par le raccourcissement du sarcomère grâce au glissement des myofilaments épais sur les myofilaments fins en plusieurs étapes. Premièrement, les têtes de myosine vont se lier aux filaments d'actine selon un angle de 45° . Il s'en suit l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase en ADP et P_i , cela entraîne la dissociation des têtes de myosine et de l'actine. Les têtes de myosine basculent et se lient de nouveau à l'actine et forment un angle de 90° . La libération de P_i entraîne ce qui va induire un changement conformationnel et en résulte un mouvement des têtes de myosine qui vont tirer les filaments d'actines. A la fin de la poussée, l'angle est de nouveau à 45° et la molécule d'ADP est à son tour libérée. Les têtes de myosines sont alors prêtes à lier de nouveau une molécule d'ATP et recommencer un cycle (figure 6)¹⁹. L'activation du cycle « cross-bridge » nécessite la libération de calcium par le RS, indispensable à la liaison entre l'actine et la myosine.

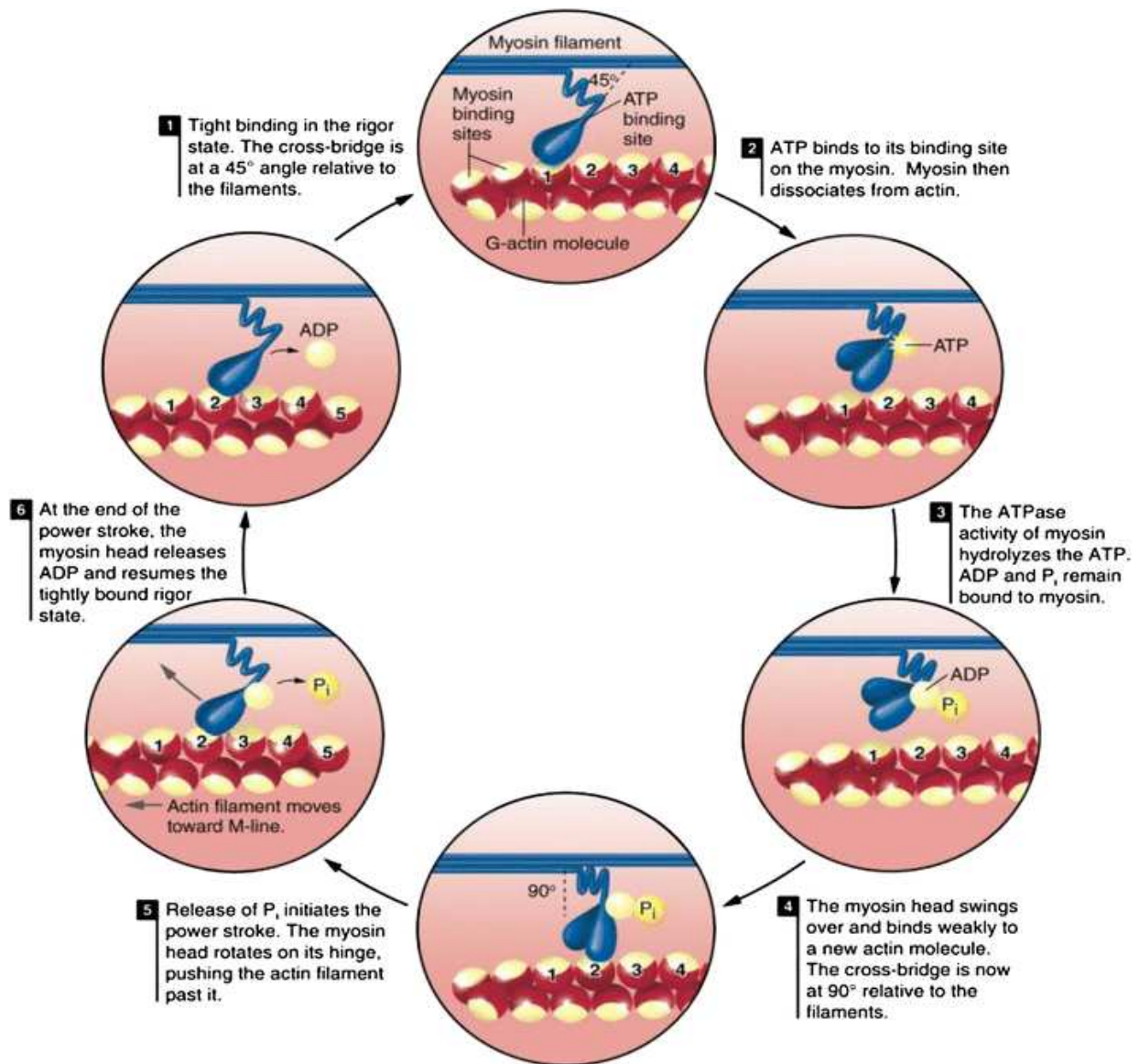


Figure 6. Illustration des différentes étapes du cycle « cross-bridge ».

Le cycle commence par la liaison de l'actine sur la myosine selon un angle de 45°. L'hydrolyse de l'ATP en ADP+P_i entraîne leur dissociation. Les têtes de myosine pivotent pour former un angle à 90° puis se lient de nouveau à l'actine. La libération de P_i entraîne le basculement des têtes de myosine pour former de nouveau un angle de 45°. L'ADP est libérée, ce qui rend possible la nouvelle liaison avec l'ATP et un nouveau cycle de contraction. D'après Frontera et Ochala (2014).

2.5.2 Flux calcique

Le RS est une structure composée d'un réseau de citernes et de tubules qui englobe les myofibrilles et agit comme un grand réservoir pour le calcium. Il possède de multiples liaisons avec les tubules T qui véhiculent le potentiel d'action émit par les motoneurones (figure 3). Lors de la contraction, le potentiel d'action déclenche une libération rapide du Ca²⁺ par les récepteurs de la ryanodine (RyR) situés sur le SR. Le Ca²⁺ se lie à la troponine C, présente sur

les filaments d'actine et provoque un changement de conformation de la tropomyosine et permet l'interaction avec la myosine. A la fin de la phase de contraction, les pompes Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPases (SERCA) pompent de nouveau le Ca^{2+} dans le RS, ce qui permet la dissociation entre l'actine et myosine, et donc la relaxation musculaire. En absence d'ATP après la mort, les pompes SERCA ne fonctionnent plus et le Ca^{2+} reste dans le cytosol. Ainsi, les ponts entre l'actine et la myosine restent en place, entraînant la rigidité cadavérique. Suivant le type de métabolisme, le RS et la sensibilité au Ca^{2+} sont plus développés dans les fibres glycolytiques et rapides que dans les fibres oxydatives. Les fibres rapides possèdent aussi plus de RyR et de pompes SERCA. À l'inverse, le RS est moins développé dans les fibres lentes, mais possède des pompes SERCA avec une affinité plus élevée pour le Ca^{2+} , permettant un recyclage efficace et une contraction soutenue. Ces caractéristiques répondent parfaitement aux besoins des différentes fibres. Les fibres glycolytiques nécessitent une contraction rapide sur une période brève, contrairement aux fibres oxydatives qui doivent maintenir une contraction sur la durée ^{26,28}.

Les mitochondries jouent un rôle important dans la régulation du Ca^{2+} . Les mitochondries sous-sarcolemmales sont proches des lieux de libérations de Ca^{2+} . Les mitochondries captent le Ca^{2+} durant la contraction par le mitochondrial calcium uniporter (MCU) et sont aussi capables de le libérer. L'import de Ca^{2+} dans les mitochondries augmente les rapports de NADH/NAD et d'ATP, qui au final augmente la quantité de substrats disponibles dans la mitochondrie. Ainsi, les mitochondries jouent aussi un rôle important dans l'homéostasie calcique et la fonction contractile ²⁶.

2.6 Cellules souches musculaires

Le muscle squelettique est un tissu relativement stable avec peu de renouvellement des cellules musculaires, cependant, suite à une pathologie, un exercice physique ou une blessure, le stress induit peut entraîner le processus de régénération. Cette capacité est rendue possible grâce aux cellules souches musculaires, appelées aussi cellules satellites. Elles sont mononucléaires et situées juste sous la lame basale et au-dessus du sarcolemme. Le mécanisme implique une activation des cellules qui sera suivie par leur prolifération, puis leur différenciation afin de donner de nouvelles fibres musculaires ^{29,30}. La régénération musculaire commence par la dégénérescence de la fibre musculaire, souvent par apoptose, il s'en suit une réponse inflammatoire médiée par le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) et l'Il-1, qui implique

l'arrivée en premier des neutrophiles, puis des macrophages. Ensuite, il y a une phase d'activation des cellules souches et d'une prolifération cellulaire importante, ces cellules myogéniques pourront se différencier en myoblastes, puis en myotubes en fusionnant entre-eux. L'étape d'activation ne se fait pas uniquement par la présence d'un stress, certains facteurs sont nécessaires comme le Fibroblast Growth Factor (FGF). Les différentes étapes peuvent être caractérisées par des changements morphologiques observables mais aussi par l'expression de certains gènes comme Paired box 7 (Pax7) pour les cellules souches quiescentes et en prolifération, Myogenic differentiation (MyoD) pour les cellules en proliférations et en différenciations, et enfin la Myogenin (MyoG) qui s'exprime durant la différenciation (figure 7). Il existe d'autres gènes permettant de caractériser plus finement ces étapes comme Myogenic Factor 5 (Myf5) et Myogenic Regulatory Factor 4 (Mrf4). Les gènes possèdent une expression qui s'intensifie et qui diminue progressivement au cours des différentes étapes ²⁹.

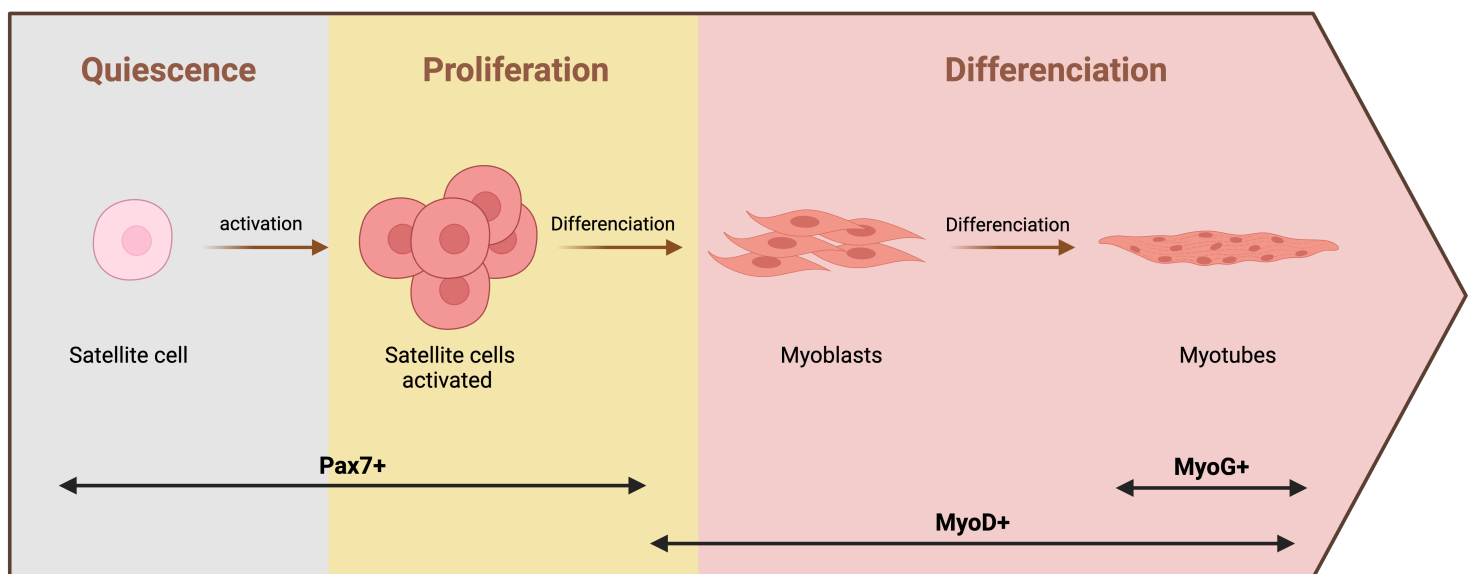


Figure 7. Schéma des différentes étapes de la régénération musculaire.

La régénération du muscle squelettique implique l'activation des cellules souches, suivie de leur prolifération et de leur différenciation de ces cellules. Pax7, MyoD et MyoG représentent les principaux gènes exprimés durant les différentes étapes du processus. Biorender.

Les cellules souches musculaires sont capables d'auto-renouvellement afin de maintenir le pool de cellules à un niveau suffisant. Cela se réalise par divisions symétriques ou asymétriques, soit la cellule souche donne deux cellules souches filles ou alors une cellule souche et une cellule qui va se différencier.

2.7 Cellules non-musculaires

Les muscles contiennent d'autres cellules qui ne sont pas musculaires, parmi elles il y a les fibroblastes qui sont responsables de la production, de l'organisation et du remodelage de la matrice extracellulaire (MEC). Elle est importante pour les propriétés physico-chimiques nécessaires au fonctionnement optimal du muscle (élasticité, rigidité, transmission de la force, communications et interactions cellulaires). On retrouve des cellules vasculaires endothéliales qui forment les capillaires sanguins et qui amènent l'oxygène, les nutriments et évacuent les déchets. Enfin, on retrouve des cellules immunitaires, avec les neutrophiles et les macrophages qui sont importants dans l'immuno-surveillance et la régénération musculaire après une lésion, comme vue précédemment ³¹⁻³³.

2.8 Matrice extracellulaire (MEC)

La MEC est un réseau multiforme de protéines qui entoure les cellules musculaires, son rôle est d'assurer leur soutien mécanique nécessaire à leur intégrité et à leurs fonctions, mais aussi, de rendre possible la communication entre-elles ³⁴. Elle joue aussi un rôle dans la prolifération, l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire. Durant la régénération, de la MEC temporaire est produite, elle permet de donner un environnement propice à la différenciation des myoblastes et à la régulation des cellules souches. La MEC est composée principalement de collagènes, de laminine et de protéoglycanes. La lame basale est quant à elle constituée de collagènes non-fibrillaires, de protéoglycanes et de glycoprotéines non collagènes. Le collagène est la protéine fibreuse la plus répandue dans le muscle squelettique (10% de son poids) et la MEC. Dans le muscle squelettique on retrouve jusqu'à 11 formes de collagènes : I, III, IV, V, VI, XII, XIII, XIV, XV, XVIII et XXII. Il forme un réseau de tissus conjonctifs dans le muscle, correspondant à l'endomysium, le périmysium et l'épimysium. Le collagène I représente le composant principal de l'épimysium et du périmysium. Le collagène III est présent en faible quantité. On retrouve les collagènes I et III dans l'endomysium. Dans la membrane basale qui entoure les fibres musculaires, il y a principalement le collagène IV, mais aussi les collagènes VI, XV et XVIII. Elle est constituée en plus de protéoglycanes et de glycoprotéines qui stimulent la prolifération, la migration, la différenciation et la survie des myoblastes. Parmi elles, il y a les laminines qui permettent l'ancrage des cellules à la lame basale. Au total, dans le muscle squelettique les collagènes I et III sont les plus abondants et représentent près de 75%

du collagène total. En conditions physiologiques, le collagène est produit principalement par les fibroblastes, mais lors de processus inflammatoires et de fibroses, les cellules musculaires peuvent aussi en sécréter ^{35,36}.

3. Métabolisme énergétique du muscle squelettique

L'énergie nécessaire à la fonction contractile dans le muscle provient de l'hydrolyse de l'ATP en ADP+Pi. Suivant le type de fibres musculaires, il y a un type de métabolisme qui y est associé. Les fibres oxydatives, les plus lentes, consomment moins d'ATP mais sont capables de maintenir une contraction plus longtemps. Là, où les fibres glycolytiques sont capables de fournir une contraction forte et brève, avec une consommation d'ATP plus importante. L'ATP sera fourni par 3 mécanismes : la créatine kinase, la glycolyse et l'OXPHOS. La créatine kinase va utiliser 2 molécules d'ADP pour synthétiser une nouvelle molécule d'ATP et permet rapidement un renouvellement des stocks. La synthèse du pyruvate et du lactate par la dégradation du glucose et du glycogène, permettra de fournir de l'ATP via la glycolyse. Enfin, le pyruvate, les acides gras ou les corps cétoniques peuvent être utilisés comme substrats pour l'OXPHOS, réalisé par les mitochondries et qui permet la synthèse de molécules d'ATP en condition aérobie. La créatine kinase est présente dans les deux types de fibres musculaires, mais est plus efficace dans les fibres rapides qui nécessitent une demande d'ATP plus importante à combler. Les muscles lents oxydatifs vont utiliser essentiellement l'OXPHOS, permettant la génération d'ATP en flux constant et le maintien de la contraction. Au contraire, les muscles glycolytiques, gros consommateurs d'ATP, vont utiliser principalement la glycolyse qui génère des stocks d'ATP plus rapidement mais qui est moins efficace. Ils pourront être consommés rapidement pour fournir une contraction rapide. Cependant, ces stocks s'épuisent vite et nécessitent un temps de repos avant de pouvoir réaliser une nouvelle contraction. Ainsi, la mitochondrie se caractérise comme la centrale énergétique du muscle et se place comme principal producteur d'énergie de l'organisme ²⁶.

3.1 Glycolyse

La glycolyse ne nécessite pas d'oxygène et se fait entièrement en condition anaérobie. Le glucose est amené dans la cellule musculaire par le transporteur GLUT4. Ensuite, un enchainement de réactions enzymatiques va se dérouler permettant de passer du glucose, au

glucose-6-phosphate, au fructose-1,6-biphosphate, au glyceraldéhyde-3-phosphate et enfin au pyruvate. A l'issu de la glycolyse 2 molécules d'ATP et du NADH sont produites. En absence d'oxygène le pyruvate sera réduit en lactate afin de générer à nouveaux du NAD^+ , qui permet la réalisation de la dernière étape de la glycolyse et de ne pas s'arrêter. Cependant, s'il y a la présence d'oxygène et de mitochondries, le pyruvate est transporté dans la matrice mitochondriale. Une fois dans la mitochondrie, le pyruvate est converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH) ²⁶.

3.2 β -oxydation

Une autre source possible des acétyl-CoA est par la métabolisation des acides gras via la β -oxydation qui fournit de l'acyl-CoA puis de l'acétyl-CoA. En détails, les acides gras rentrent dans la cellule musculaire par deux types principaux de translocase : la FAT/CD36 et les FATP1 (SCL27A1) et FATP4 (SCL27A4), puis se retrouvent dans le cytoplasme. Ces translocases possèdent également une activité d'acyl-CoA synthétase qui permet la conversion d'acides gras en acyl-CoA. Ensuite, ils traversent la membrane mitochondriale grâce aux enzymes carnitine palmitoyltransferase I et II (CPT-1 et CPT-2), dans le muscle on retrouve plus spécifiquement la CPT1B qui est située dans la membrane externe mitochondriale et CPT2 dans la membrane interne mitochondriale (figure 8). Ensuite, ils sont dégradés durant la β -oxydation en l'acétyl-CoA. La β -oxydation comprend 4 grandes étapes ³⁷ :

- **Déshydrogénation** de l'acyl-CoA en trans-2-énoyl-CoA, réalisé par la cyl-CoA déshydrogénase (codé par ACAD selon la longueur du substrat)
- **Hydratation** de la double liaison donnant du L -3-hydroxy-acyl-CoA, réalisé par l'énoyl-CoA hydratase (ECHS1)
- **Déshydrogénation** en 3-cétoacyl-CoA, réalisé par la medium-/Short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH)
- **Clivage thiolytique** qui donne un acétyl-CoA, réalisé par la 3-cétoacyl-CoA thiolase (ACAA2)

Enfin l'acétyl-CoA peut entrer dans le cycle de Krebs.

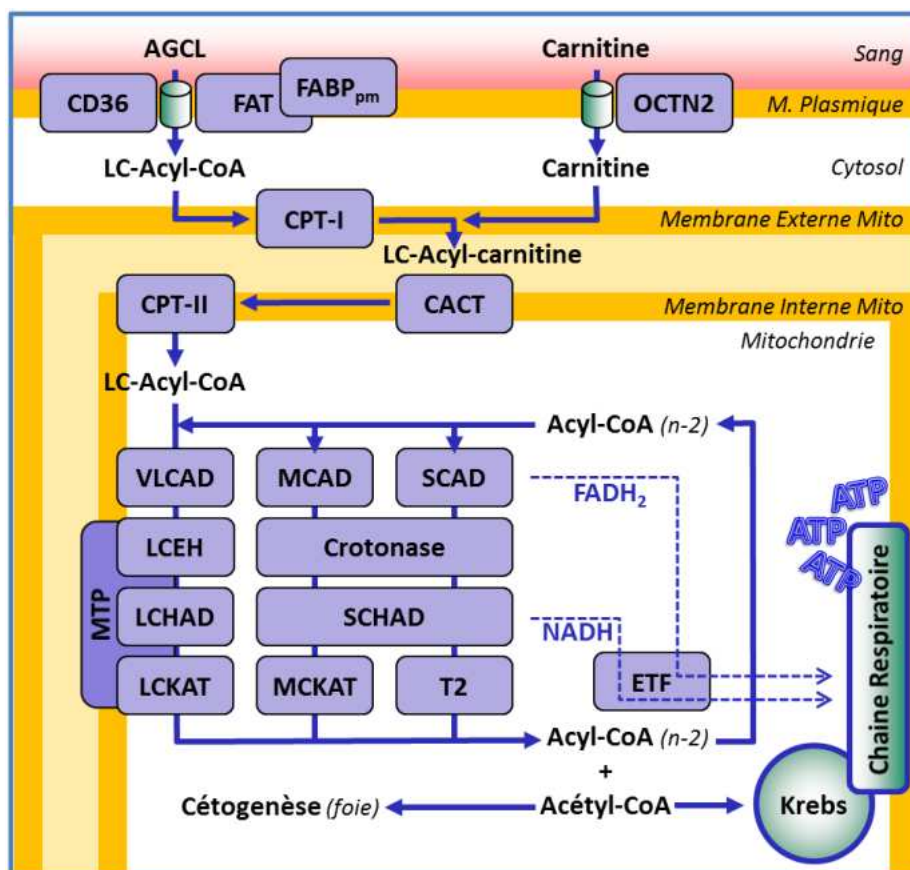


Figure 8. Illustration des différents transporteurs et enzymes nécessaires au métabolisme d'oxydation des acides gras.

Le transport et la métabolisation des acides gras dépend principalement de la longueur de leur chaîne carbonée. Ainsi, selon une chaîne courte, moyenne, longue ou très longue, et selon la longueur de leur chaîne carbonée les enzymes responsables de leur métabolisme sont différentes. D'après Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS), juin 2021.

3.3 Les mitochondries : centrales énergétiques du muscle

3.3.1 Structure et organisation

La mitochondrie était à l'origine une bactérie, elle fût intégrée dans les cellules eucaryotes par le processus d'endosymbiose. Elle se compose d'une double membrane lipidique avec un espace intermembranaire, la membrane interne forme les crêtes mitochondriales et le cytoplasme porte le nom de matrice mitochondriale. Les complexes de la chaîne respiratoire nécessaires à l'OXPHOS sont enchevêtrés dans la membrane mitochondriale interne (Figure 11). Dans la matrice mitochondriale on retrouve plusieurs éléments propres à la mitochondrie, comme l'ADNmt et des ribosomes. Cet ADN est double brins circulaires et code pour 13 sous-unités des complexes respiratoires mitochondriaux, des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert, et le reste est codé par l'ADN nucléaire (ADNn), puis importé dans la mitochondrie.

Sur les 1200 protéines mitochondriales chez l'Homme, cela représente 1% codé par la mitochondrie et le reste par l'ADNn. Chaque mitochondrie possède des molécules d'ADNmt en plusieurs exemplaires, entre 2 à 10 exemplaires en moyenne ³⁸⁻⁴⁰. L'ADNmt est particulièrement sensible aux dommages oxydatifs puisqu'il est situé proche de l'électron transport chain (ETC) et de la production des ROS, de plus, il n'est pas protégé par des histones comme l'ADNn. Enfin, il contient peu de régions non codantes, ainsi, les dommages entraînés sur l'ADNmt peuvent entraîner des conséquences sur la fonction et la structure des protéines mitochondriales. Contrairement à l'ADNn qui privilégie la réparation, l'ADNmt oscille entre réparation et dégradation pour pallier aux dommages ³⁹. Les conséquences de la déplétion d'ADNmt sont encore floues, mais elles sont associées au vieillissement et à la réduction de la fonction mitochondriale ⁴¹. Il existe deux types de populations mitochondriales dans le muscle, les sous-sarcolemmales (SS) et les inter-myofibrillaires (IMF). Les mitochondries SS sont plus grandes et moins rondes que les IMF, qui sont plus petites pour se nicher entre les myofibrilles ⁴². Les mitochondries SS représentent 10% des mitochondries du muscle squelettique, les 90% restants sont des mitochondries IMF (figure 9) ⁴³.

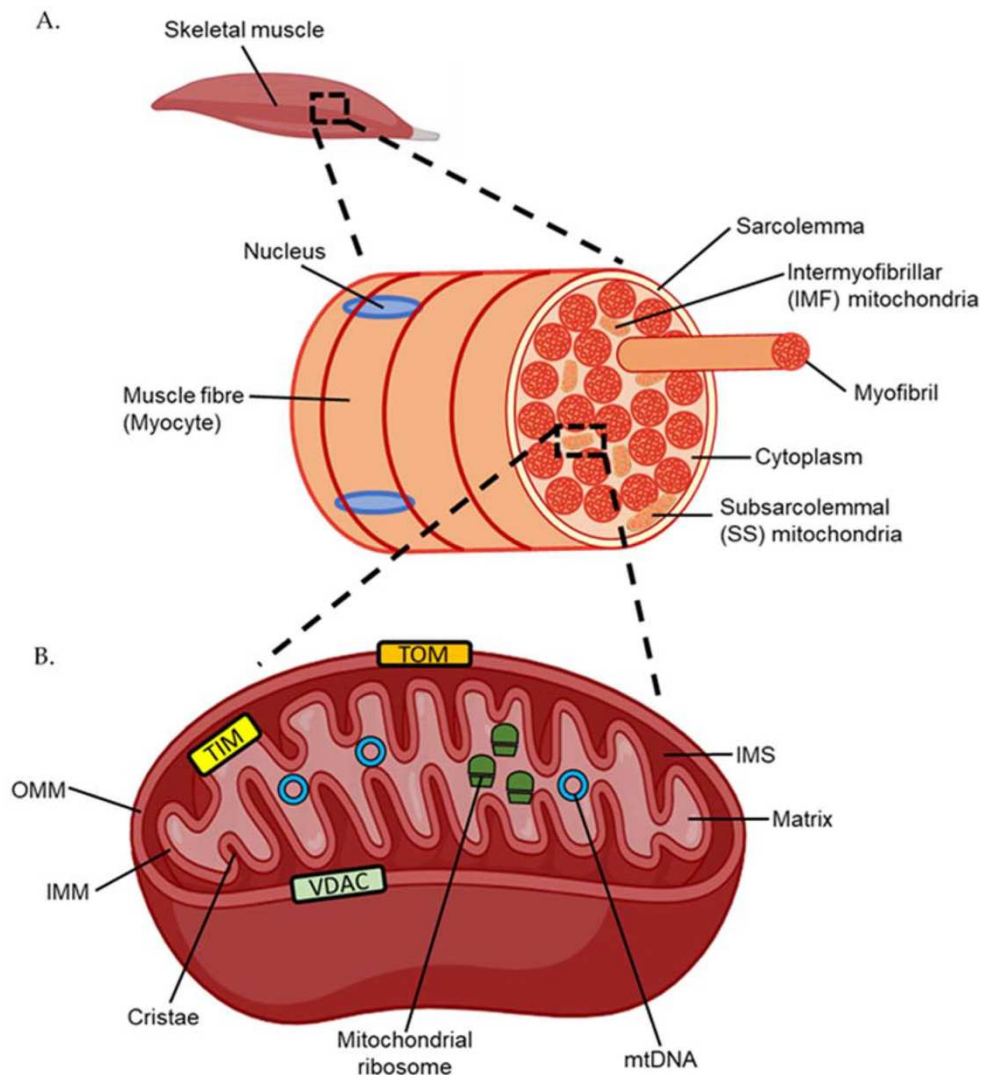


Figure 9. Illustration de la structure et des différents types de populations mitochondriales dans le muscle squelettique.

D'après Taylor et Bishop, (2022).

3.3.2 Cycle de KREBS

Proposé par Hans Adolf Krebs en 1937, le cycle de Krebs, ou tricarboxylic acid cycle (TCA), est une suite de réactions enzymatiques mitochondriales qui oxydent l'acétyl-CoA en CO_2 . Chaque cycle de Krebs génère des coenzymes réduits, 3 molécules de NADH et 1 molécule de FADH_2 , ces derniers donneront leurs électrons au complexe I et au complexe II. Il produit également des précurseurs nécessaires aux réactions de biosynthèse^{44,45}. Les différentes étapes qui composent le cycle de KREBS sont les suivants (figure 10) :

- Condensation : conversion en citrate par la citrate synthase.
- Isomérisation : le citrate est converti en cis-aconitate puis en isocitrate par l'aconitase.

- Génération de CO₂ : conversion en α -cétooglutarate par l'isocitrate déshydrogénase. Production de **NADH**.
- Décarboxylation oxydative : l' α -cétooglutarate est converti en succinyl-CoA par l' α -cétooglutarate déshydrogénase. Production de **NADH**.
- Phosphorylation : production de succinate par la thiokinase succinique.
- Déshydrogénation : la succinate déshydrogénase converti en acide fumarique. Production de **FADH₂**.
- Hydratation : formation de malate par la fumarate hydratase.
- Déshydrogénation : le malate est déshydrogéné pour former de l'oxaloacétate. Ce dernier pourra réagir de nouveau avec de l'acétyl-CoA afin de démarrer un nouveau cycle. Formation de **NADH**.

Au total, le cycle de Krebs génère des coenzymes réduits (3 NADH et 1 FADH₂ par cycle), utilisés ensuite dans la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP par l'OXPHOS.

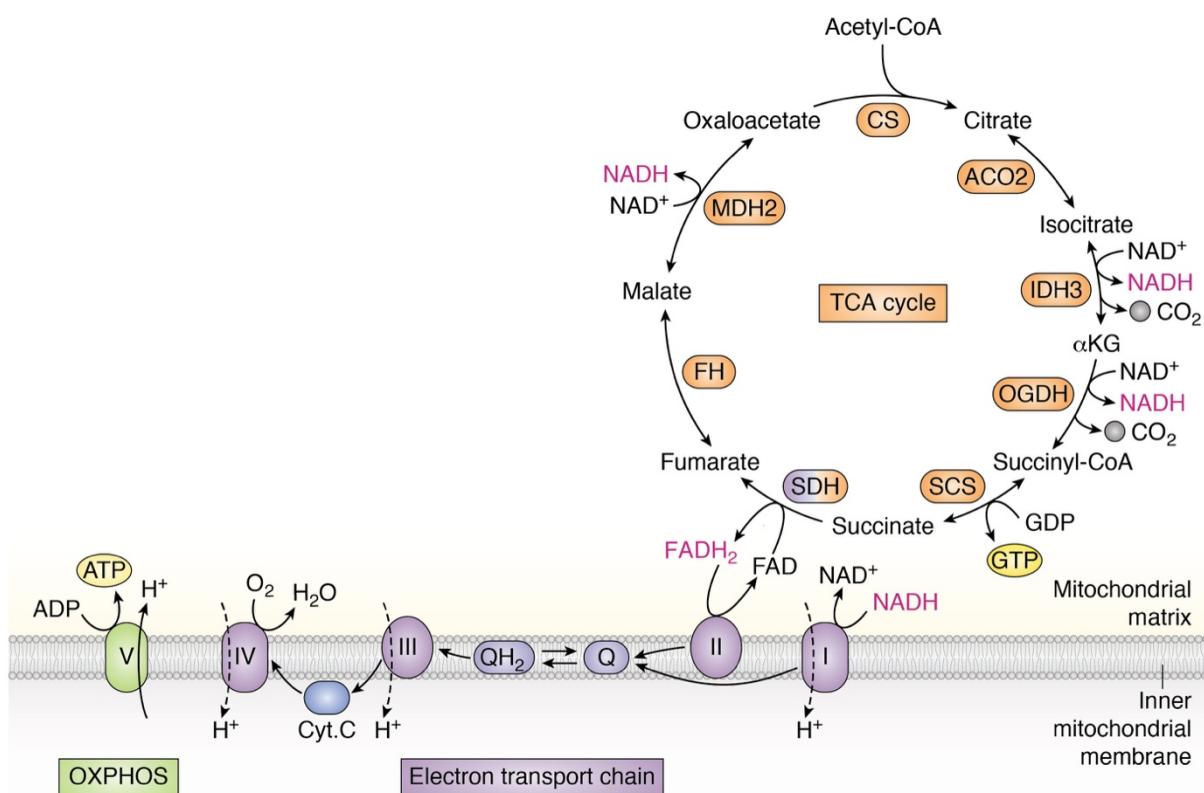


Figure 10. Schéma du cycle de Krebs (TCA cycle) et de la chaîne de transfert d'électron.

D'après Arnold et Finley (2023).

3.3.3 La phosphorylation oxydative (OXPHOS)

Le NADH va donner ses électrons au complexe I (la NADH : ubiquinone oxydoréductase) de la chaîne mitochondriale. Ensuite, l'ubiquinone (ou coenzyme Q), située dans la membrane interne de la mitochondrie, accepte deux électrons et passe de sa forme oxydée (CoQ) à sa forme réduite, l'ubiquinol (CoQH₂). Cette étape génère la production de protons dans l'espace intermembranaire. De son côté le FADH₂ produit durant le cycle de Krebs, donne également ses électrons au complexe II (Succinate : ubiquinone oxydoréductase). Les électrons sont transférés à la CoQ, mais cette fois-ci, cela n'entraîne pas le transfert de protons comme pour le complexe I. L'étape suivante consiste en le transfert des électrons de la CoQH₂ au complexe III (coenzyme Q : cytochrome c réductase) via le cycle Q, au cours duquel un électron réduit le cytochrome C. Lors de ce transfert il y a une libération de protons. Une fois réduit, le cytochrome c apporte les électrons au complexe IV (cytochrome c oxydase). Il est constitué de plusieurs sous-unités qui vont recevoir chacune les électrons apportés un par un. Lors de ce transfert, des protons sont pompés vers l'espace intermembranaire et une autre partie des protons dans la matrice serviront à la réduction l'oxygène en eau (H₂O). Cette réduction de l'oxygène constitue la dernière étape de la respiration mitochondriale. Ainsi, l'ensemble des protons libérés dans l'espace intermembranaire crée un gradient. Le passage des protons à travers l'ATP synthase, de l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale, permet de transférer l'énergie stockée dans le gradient électrochimique pour phosphoryler l'ADP en ATP (figure 11) ^{46,47}.

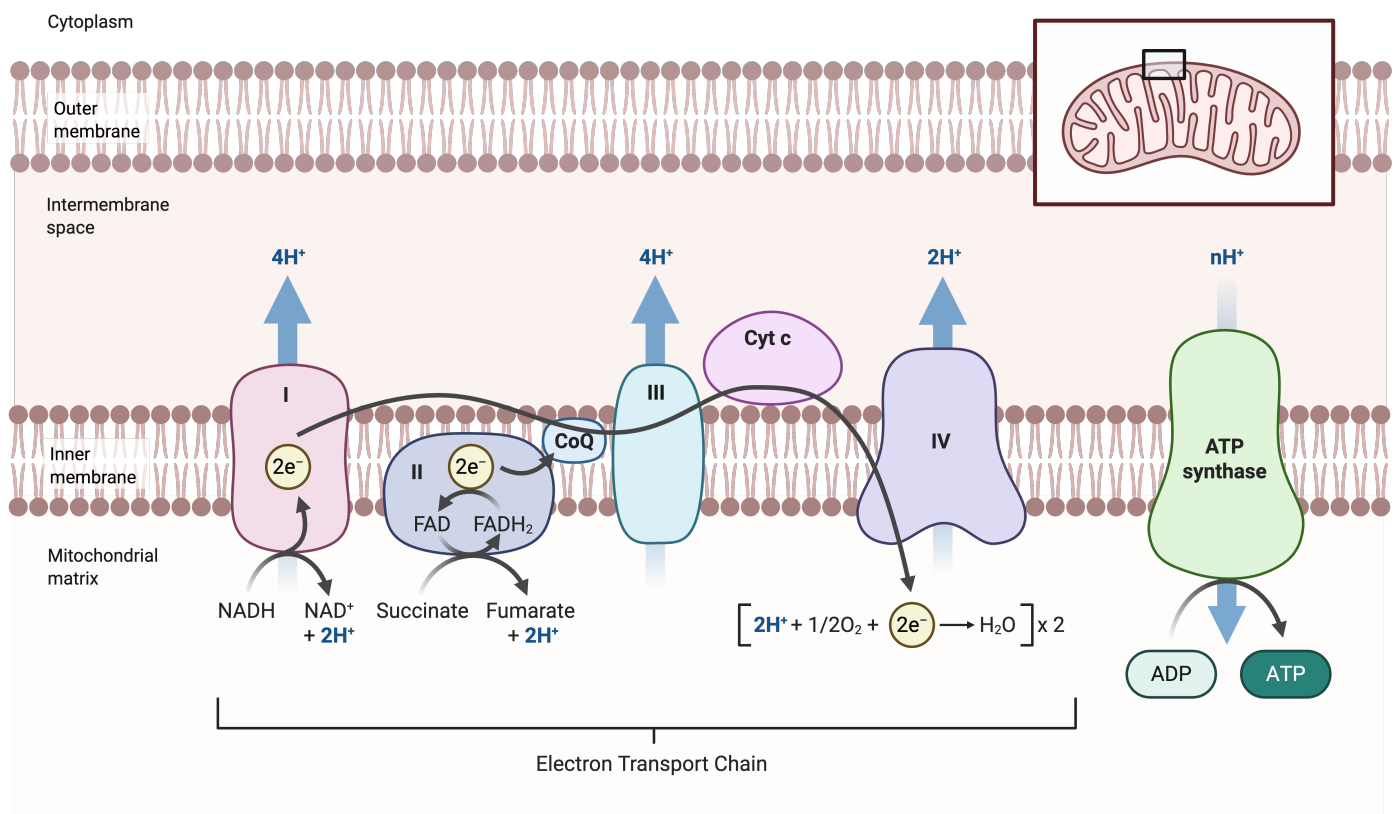


Figure 11. Schéma de la chaîne de transfert d'électron.

Les électrons peuvent entrer dans l'ETC par le complexe I ou le complexe II, ils transitent ensuite par la coenzyme Q (CoQ) pour atteindre le complexe III, puis le cytochrome c et enfin le complexe IV. Le transfert des électrons va entraîner le pompage de protons par le complexe I, III et IV de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce gradient électrochimique sera utilisé par l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'activité du complexe IV est responsable de la consommation d'oxygène. Biorender.

3.3.4 Stress oxydatif et nitrosatif

La mitochondrie constitue la principale source de générations de ROS, une partie des électrons qui transitent au travers de l'ETC fuient. Effectivement, jusqu'à 2% des électrons s'échappent de l'ETC pour former du superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Le complexe I est le plus gros producteur de ROS, suivi du CIII puis le CII. La production de ROS est constante lors de l'activité de l'ETC mais elle peut varier suivant les conditions. Les facteurs qui peuvent impacter la production de ROS sont la production d'ATP, le potentiel électro-chimique (Δp), le potentiel membranaire ($\Delta \psi_m$) et la disponibilité de l'oxygène ^{46,47}. L'oxyde nitrique (NO) fait partie des reactive nitrogen species (RNS), il est produit dans le muscle par les oxyde nitrique synthase (NOS). En présence de $\text{O}_2^{\bullet-}$, il réagit avec pour former du peroxynitrite (ONOO^-). Cette forme est aussi un RNS mais bien plus réactive et elle va réagir avec des résidus tyrosines pour former de la 3-

nitrotyrosine par nitration. Ainsi, de façon indirecte, la présence de 3-nitrotyrosine peut servir de marqueur pour le stress oxydatif. De plus, il s'agit d'une modification post-traductionnelle des protéines qui est irréversible. La seule solution consiste à dégrader les protéines pour l'éliminer. Cela constitue un avantage considérable pour l'étude du stress oxydatif^{8,48-50}. La formation de 3-nitrotyrosine altère directement la structure et la fonction des protéines. Par exemple, la 3-nitrotyrosine va désactiver la fonction de la superoxyde dismutases dépendante de la manganèse (mnSOD), également appelée superoxyde dismutases 2 (SOD2), qui est impliquée dans la conversion de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 . Cela aboutit à une génération accrue de peroxynitrite par l'augmentation de $O_2^{\bullet-}$ ⁴⁸. La génération excessive de ROS et RNS entraîne des dommages aux protéines, lipide et à l'ADN. Plus précisément, cela peut induire directement des dommages au niveau mitochondrial et des complexes de la chaîne respiratoire de par sa proximité de ce dernier et influencer le potentiel de membranaire. Enfin, les ROS affectent également la fonction contractile en modifiant la sensibilité des myofibrilles au Ca^{2+} . Dans les cas de myopathies la signalisation altérée du Ca^{2+} s'accompagne d'une génération de ROS⁵¹.

3.3.5 Fuite de protons

L'OXPHOS n'est pas complètement couplé, une partie des protons pompés dans l'espace intermembranaire retourne dans la matrice en passant au travers de la membrane interne sans passer par l'ATP synthase et donc sans participer à la production d'ATP. Cette fuite de protons est compensée par l'ETC qui continue de pomper des protons afin de compenser cette perméabilité de la membrane interne mitochondriale et pour maintenir le gradient électrochimique nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase^{46,47}.

3.3.6 Défenses antioxydantes

A l'origine, le consensus était de penser que les ROS n'entraînaient que des effets délétères, mais depuis, plusieurs études ont démontré qu'ils agissaient aussi comme des messagers pour transmettre des signaux nécessaires aux mécanismes cellulaires. Lorsque $O_2^{\bullet-}$ est généré par l'ETC, celui-ci est rapidement converti en H_2O_2 par la manganèse superoxyde dismutase (mnSOD). Deux isoformes sont majoritairement présents dans les fibres musculaires, Superoxyde Dismutase 1 (SOD1) et SOD2. SOD1 nécessite le cuivre et le zinc comme cofacteurs catalytiques nécessaires aux réactions d'oxydo-réductions, alors que SOD2 nécessite le manganèse. SOD1 est situé dans le cytosol alors que SOD2 réside dans la matrice

mitochondriale. La forme H_2O_2 n'est pas chargée et donc plus stable, de plus elle est capable de traverser les membranes et donc de quitter la mitochondrie. Les ROS jouent un rôle physiologique en conditions normales dans les voies de signalisations, comme dans la régénération musculaire, l'apoptose, l'autophagie, la croissance et la différenciation cellulaire. Il existe d'autres familles d'enzymes antioxydantes, notamment la catalase, elle converti H_2O_2 en $H_2O + O_2$ ^{46,51-53}.

3.3.7 Biogénèse mitochondriale

L'homéostasie mitochondriale repose sur la balance entre la synthèse de nouvelles mitochondries et leur dégradation. Le maître régulateur de la biogénèse mitochondriale est le Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α). L'activité de PGC-1 α est rendu possible par sa phosphorylation qui est assurée par la Sirtuine 1 (Sirt1). Son activation entraîne l'activation de NRF1 et NRF2, qui stimulent la transcription des gènes mitochondriaux codés par le noyau. En parallèle, TFAM est synthétisé puis transloqué dans la mitochondrie, où il active la transcription des gènes codés par l'ADNmt. Les protéines codées par des gènes issus du noyau sont assemblées dans le cytosol puis adressées à différents endroits de la mitochondrie (membranes, matrice, etc.) ⁵⁴.

3.3.8 Mécanismes de contrôle qualité de la mitochondrie

Lorsque les défenses antioxydantes ne suffisent plus et que les dommages sont trop importants pour la mitochondrie, des mécanismes de contrôle qualité se mettent en place afin de maintenir l'intégrité du réseau mitochondrial, passant par l'élimination sélective des mitochondries dysfonctionnelles.

a. UPRmt

Les dommages à l'encontre des protéines mitochondriales peuvent perturber leur repliement, pour y remédier, la mitochondrie met en place la voie de réponse au repliement protéique spécifique de la mitochondrie, l' unfolded protein response mitochondrial (UPRmt). Ici, cette voie fait intervenir uniquement les différentes heat shock protein (Hsp) qui résident dans la matrice mitochondriale ⁵⁵. Hsp60 est une des protéines chaperonnes clés de ce processus, dont la fonction principale est de déplier les protéines mal conformées afin qu'elles se replient

spontanément de façon correcte ⁵⁶. Plus spécifiquement, Hsp60, en collaboration avec Hsp10, agit initialement comme une protéine chaperonne pour assurer le bon repliement des protéines mitochondriales mal repliées à la suite d'un stress (dommage à l'ADN, stress oxydatif). Mais lors de dommages trop importants, il a été démontré que le couple Hsp60/Hsp10 peut s'associer à la pro-caspase-3 pour former un complexe dans la fraction mitochondriale, stabilisant ainsi cette dernière et la rendant disponible pour l'activation par l'apoptosome via la caspase 9. En condition *in-vitro*, l'ajout de Hsp60 et de Hsp10 accélère l'activation de la caspase-3 en facilitant la disponibilité de la pro-caspase-3 ⁵⁷. Le rôle d'Hsp60 ne se limite pas aux fonctions de protéines chaperonnes, des taux élevés d'Hsp60 ont été retrouvés dans le plasma d'enfant en état de choc septique et corrélés à la mortalité ⁵⁸. Hsp60 peut être libérée dans le compartiment extra-cellulaire via des exosomes lorsque les cellules sont lésées. Les cardiomyocytes sont capables de réaliser cette libération. Une fois dans la circulation, Hsp60 exogène est capable d'induire les voies de l'inflammation à la manière d'un DAMP, en se liant au récepteur TLR4 et en induisant l'activation de la voie Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) et la production de TNF- α et d'Il-1β (Figure 12) ⁵⁹. Des preuves semblent indiquer qu'Hsp60 pourrait interagir avec RAGE mais les voies d'activation et les effets sont encore inconnus ⁶⁰⁻⁶².

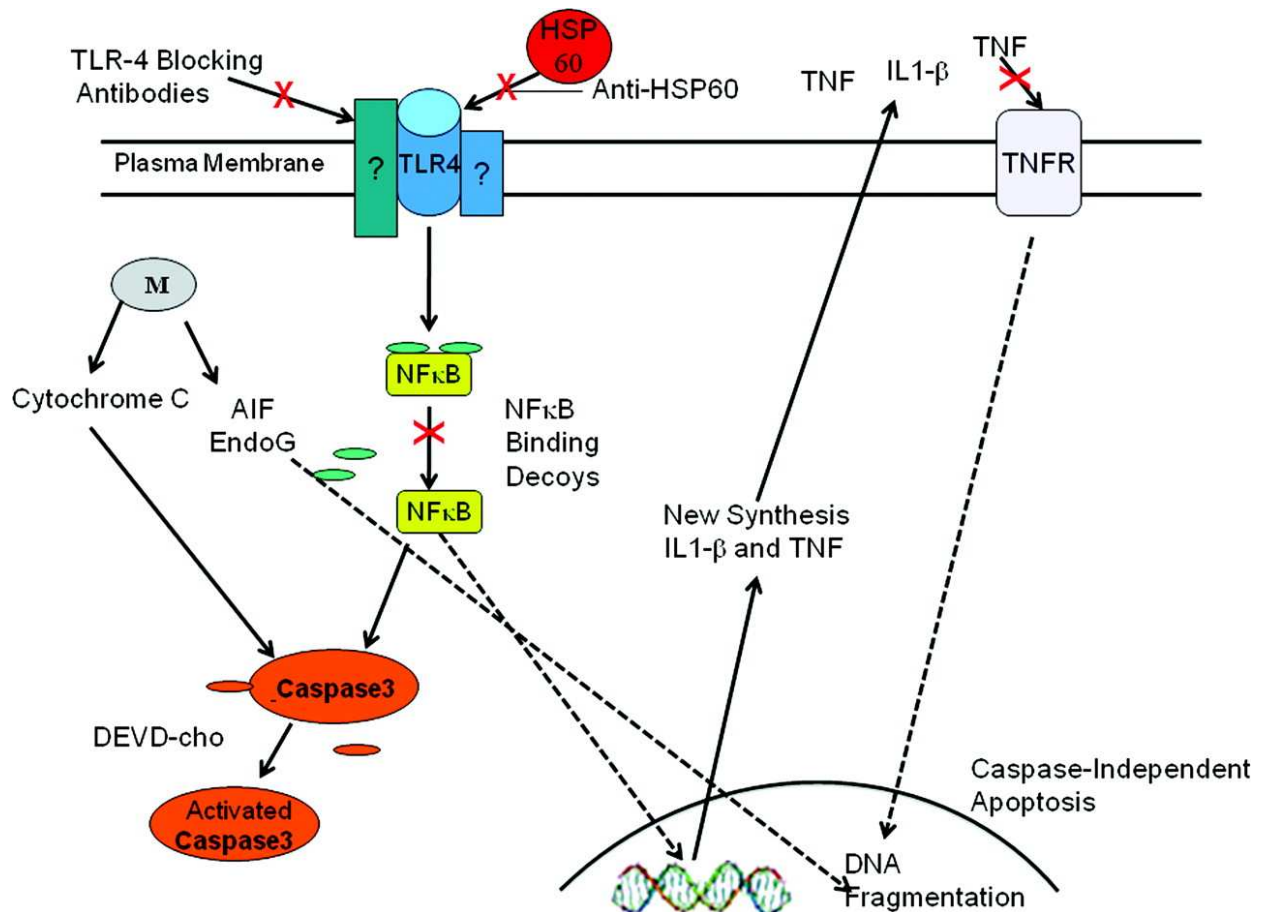


Figure 12. Rôle d'Hsp60 dans l'induction de l'apoptose et de l'inflammation.

Hsp60 est capable de jouer le rôle de DAMP en activant le TLR et en induisant l'activation de NF- κ B. Son activation abouti à la libération de médiateurs pro-inflammatoires (TNF- α et d'IL-1 β). Il interagit aussi avec la Caspase-3 afin de faciliter son clivage et activation nécessaires pour initier l'apoptose. D'après Kim *et al.*, 2009.

b. Dynamique mitochondriale

Le réseau mitochondrial n'est pas statique, il est en perpétuelle adaptation aux conditions qui l'entourent. La fusion et la fission sont les processus nécessaires à la dynamique mitochondriale permettant de favoriser un réseau uni et regroupé ou alors un réseau fragmenté en isolant certaines zones mitochondriales endommagées.

i. La fusion

La fusion mitochondriale est permise par 3 protéines : mitofusine 1 (Mfn1), mitofusine 2 (Mfn2), and optic atrophy protein 1 (Opa1), qui vont jouer chacune un rôle en particulier. La mitochondrie possède une double membrane, ainsi, durant la fusion Mfn1 et Mfn2, situées dans la membrane externe, vont coopérer et interagir ensemble. Il peut y avoir des fusions de

membranes par des interactions homotypiques (Mfn1-Mfn1 ou Mfn2-Mfn2) ou par des interactions hétérotypiques (Mfn1-Mfn2). Cependant, bien qu'elles partagent des homologies, elles ne remplissent pas exactement les mêmes fonctions. Les deux ont une activité GTPase mais Mfn1 est plus efficace pour la fusion entre deux mitochondries. Mfn2 a une affinité plus grande pour le GTP et est exprimée sur les membranes du RE et RS, ainsi, elle peut permettre la communication entre la mitochondrie et le RE ou le RS, qui est importante pour réguler les concentrations de calcium et la fonction mitochondriale. Mfn2 peut être modifiée post-traductionnellement pour être phosphorylée par PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) et devenir une cible pour Parkin et la mitophagie ⁴⁰. Opa1 est une GTPase située dans la membrane interne mitochondriale et joue un rôle important dans la stabilisation des crêtes mitochondriales et des complexes respiratoires et de leurs fonctions. Dans la mitochondrie, OPA1 sera clivée en deux formes, Opa1 long (l-Opa1) et Opa1 court (s-Opa1). l-Opa1 s'insère dans la membrane interne et s-Opa1 est localisée dans l'espace intermembranaire. Les deux formes sont nécessaires pour réaliser la fusion ⁶³. L'initiation de la fusion est permise par les interactions entre Mfn1 et Mfn2, l'hydrolyse du GTP entraîne un changement conformationnel et la fusion des deux membranes externes. Seulement ensuite intervient la fusion de la membrane interne par Opa1, initié par l-Opa1 puis achevée par s-Opa1 (figure 13). La fusion permet de maintenir l'homéostasie mitochondriale en choisissant sélectivement les mitochondries avec un potentiel de membranaire optimal, elle donne la possibilité d'échanger les ADNmt entre elles, mais aussi les protéines et les substrats pour l'OXPPOS. Ces échanges et partages entre les mitochondries sont bénéfiques pour éviter l'accumulation de dommages aux protéines et aux ADNmt en les mélangeant. De manière générale, on attribue une meilleure fonction mitochondriale lorsque le réseau mitochondrial est fusionné que fragmenté ⁶³.

Fusion

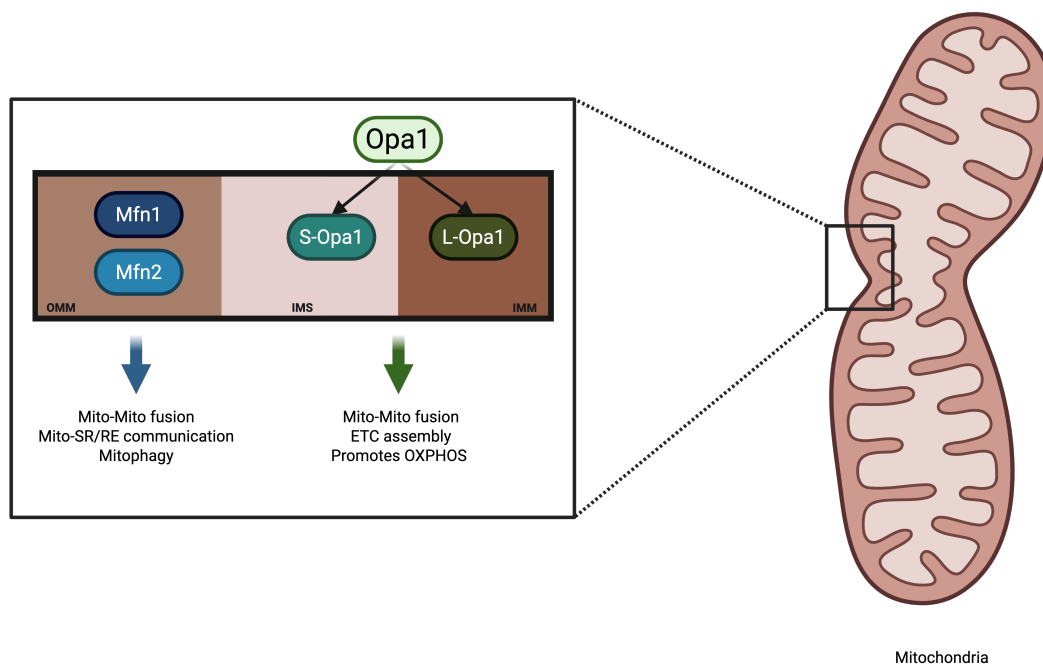


Figure 13. Schéma de la fusion mitochondriale.

La fusion mitochondriale nécessite l'intervention des protéines Mfn1, Mfn2 pour fusion la membrane externe mitochondriale (OMM) et de S-Opa1 et L-Opa1, provenant du clivage d'Opa1, pour la fusion de la membrane interne mitochondriale (IMM). Biorender.

ii. La fission

Au contraire, la fission est principalement associée à un stress mitochondrial, afin d'isoler les mitochondries endommagées et qui sont donc à éliminer ⁶⁴. La fission mitochondriale est contrôlée principalement par la GTPase dynamine-related protein 1 (Drp1), codée par Dnm11. Drp1 nécessite la liaison par des protéines adaptatrices, les principales sont le facteur de fission mitochondrial (Mff) et Fis1, mais il en existe d'autres comme mitochondrial dynamics protein 49 (Mid49) et Mid51, leur liaison permet à Drp1 de se lier à la membrane externe mitochondriale. Les protéines Drp1 vont alors former un anneau ou une spirale autour du site de fission et se resserrer par un mécanisme dépendant du GTP et cliver la mitochondrie en deux mitochondries filles (figure 14). La protéine Drp1 peut être régulée par différentes modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, l'ubiquitination ou encore la S-nitrosylation. La phosphorylation en Ser616 de Drp1 permet son recrutement depuis le cytosol vers la membrane externe de la mitochondrie et de favoriser la fission. La S-nitrosylation de Drp1, suite à la présence de NO, induit également la fragmentation du réseau mitochondrial.

La régulation de la fission mitochondriale passe notamment par la dégradation de Drp1 rendue possible par l'ubiquitination de Drp1 via Parkin.

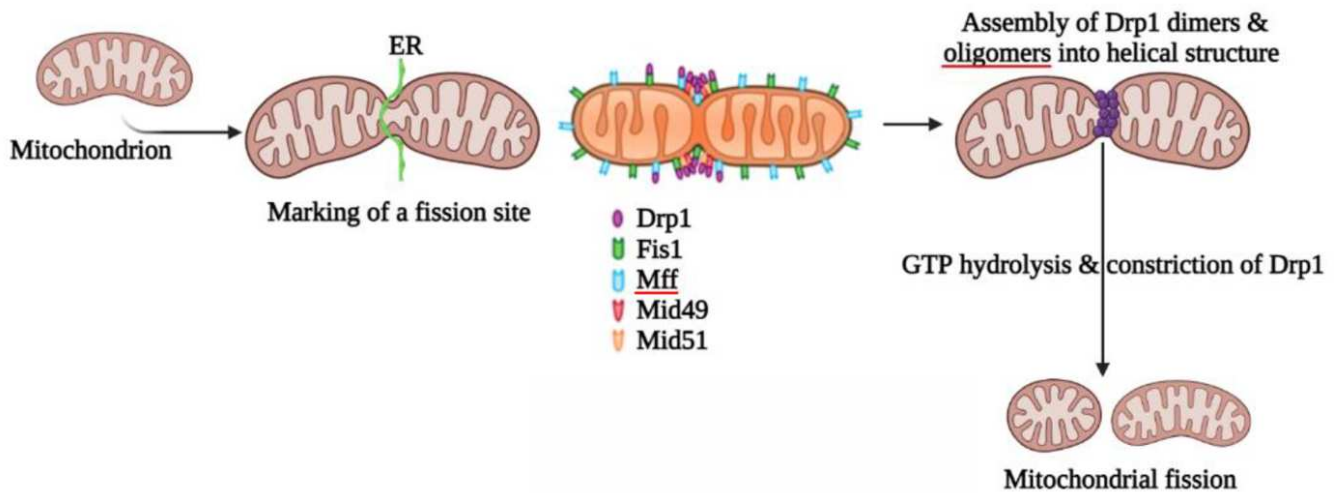


Figure 14. Schéma de la fission mitochondriale.

La fission mitochondriale nécessite un site de fission qui est délimité par le RE, puis de protéines adaptatrices sur la membrane externe mitochondriale : Fis1, Mff, Mid49 et Mid51 pour lier la protéine de fission, Drp1. Celle-ci va s'agréger autour du site de fission pour ceinturer la mitochondrie et la cliver en se resserrant. D'après Zerihun et al. (2023).

La dérégulation de la balance entre la fission et la fusion est à l'origine d'une dysfonction mitochondriale, de la production de ROS, de l'inflammation et à une baisse de la production d'ATP et de l'atrophie musculaire. De plus des mitochondries excessivement fragmentées et isolées sont moins efficaces car elles doivent chacune consommer plus d'ATP pour maintenir leur potentiel membranaire de façon isolée ^{40,64,65}.

c. Autophagie et mitophagie

L'autophagie est un processus cellulaire qui consiste en la dégradation de composants cellulaires via l'activité lysosomale. Ce processus comprend une portion du cytoplasme, contenant les organites ou les protéines à dégrader, qui fusionne avec un phagophore par des processus d'élongation et de maturation pour former un autophagosome. Ensuite, se réalise la fusion avec un lysosome pour donner l'autophagolysosome et procéder à la dégradation de son contenu (figure 15) ⁶⁴. La biogénèse lysosomale est dépendante de l'activation du transcription factor EB (Tfeb), il organise et coordonne l'ensemble des gènes nécessaires au processus ⁶⁶.

Plusieurs protéines vont être impliquées dans ce processus pour marquer les composants à dégrader et pour la réalisation de l'autophagie elle-même (initiation, élongation et maturation). Les dommages sur la mitochondrie vont entraîner l'accumulation de PINK1 sur la membrane mitochondriale externe, ce qui l'identifie pour l'éliminer. Cette accumulation entraîne l'ubiquitination par PARKIN qui sera ensuite reconnue par grâce à microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) sur la membrane du phagophore grâce à p62 qui fait le lien. L'initiation du phagophore nécessite le complexe protéique Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1 (Ulk1), et Beclin1 qui permettront la stabilisation et le début de la formation de la membrane. La formation et l'élongation reposent sur la modification de la protéine LC3. Dans un premier temps, Atg4b clive la forme précurseur de LC3 pour générer LC3-I, une forme soluble prête à être lipidée. Ensuite, autophagy-related 7 (Atg7), active LC3-I ainsi que la protéine Atg12. Atg5 et Atg16 s'associent avec Atg12 afin de former le complexe Atg12. Il permettra la lipidation de LC3-I en LC3-II par la conjugaison à la phosphatidyléthanolamine (PE), qui permet à LC3-II de s'attacher à la membrane. LC3-II possède deux rôles en s'insérant dans la membrane du phagophore. La première est de stabiliser la membrane et de permettre l'élongation, et la deuxième de lier, via p62, les composants ubiquitylés de la mitochondrie à dégrader ^{67,68}. Ainsi, le ratio de LC3-II sur LC3-I peut permettre de suivre le flux autophagique en visualisant l'accumulation d'autophagosome par exemple. Enfin, la dernière étape, dite de maturation, consiste en la fusion de l'autophagosome et le lysosome. Lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP2) et LAMP1 se situent sur la membrane des lysosomes et permettent la fusion avec l'autophagosome pour la dégradation (figure 15) ⁶⁹.

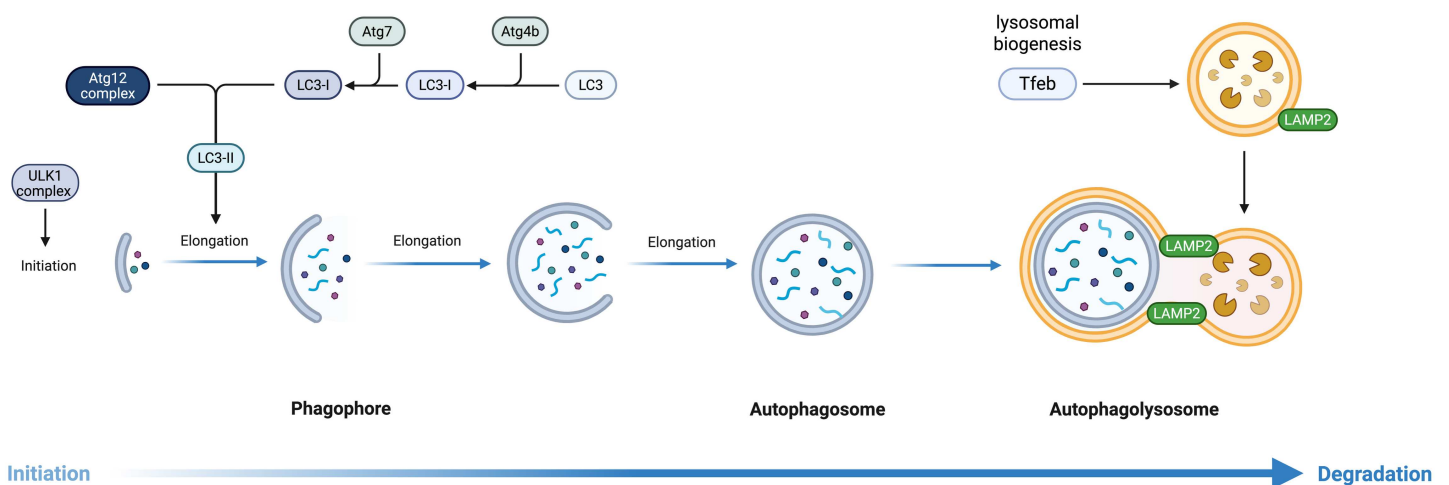


Figure 15. Schéma illustrant les différentes étapes du processus d'autophagie.

L'initiation de l'autophagie nécessite le recrutement du complexe Ulk1 et Beclin. La maturation du phagophore est possible par l'ajout de LC3-II dans la membrane afin de stabiliser cette dernière et permettre son élongation. LC3-II est obtenu à partir de LC3-I grâce à des processus dépendant du complexe ATG12, d'ATG4b, ATG3 et ATG7. Une fois l'élongation terminée, l'autophagosome fusionne avec un lysosome par l'interaction avec les protéines LAMP2. Tfeb contrôle la biogénèse lysosomale. Biorender.

4. Vieillessement et muscle squelettique

Nous allons maintenant nous intéresser au phénomène du vieillissement musculaire et des changements cellulaires et moléculaires que cela implique, afin de comprendre au mieux quelles seraient les types d'altérations que pourrait entraîner le sepsis à long terme si l'hypothèse d'un vieillissement accéléré serait plausible.

4.1 Les piliers biologiques du vieillissement

La population vieillissante a considérablement augmenté ces dernières années, grâce à l'augmentation de l'espérance de vie et de la qualité des soins qui s'est considérablement améliorée. Selon les projections, en 2050, on comptera 1,6 milliards de personnes qui auront plus de 65 ans ^{70,71}. Par définition, le vieillissement se traduit par une diminution progressive des réserves physiologiques et des capacités fonctionnelles de l'organisme. Ce déclin affecte de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires qui, au-delà d'un certain seuil, se traduisent par une capacité de réponses insuffisantes aux différents stress exercés par l'environnement ^{72,73}. Le vieillissement affecte donc tous les organes et cellules de l'organisme. Ainsi, l'âge est défini comme le principal facteur de maladies chroniques ⁷³. Le vieillissement de la population constitue une autre problématique, celle de la fragilité de la population. Les personnes âgées sont plus susceptibles de développer un sepsis avec une incidence bien plus élevée. Cela à cause de comorbidités, d'une diminution de l'efficacité du système immunitaire (causée par l'immunosénescence et l'inflammaging) et de la sarcopénie en outre. La fragilité est définie comme un état clinique aggravé de vulnérabilité associé au vieillissement. Plusieurs types de vieillissement existent, le vieillissement physiologique, celui dans lequel la diminution et la perte des réserves physiologiques restent au-delà d'un seuil contrôlé et restent encore suffisantes pour répondre aux différents stress. A l'opposé, il y a le vieillissement pathologique dans lequel les ressources physiologiques de l'organisme ne permettent pas de compenser les altérations laissées par les différents stress. Il existe l'état de fragilité qui correspond à une perte des réserves physiologiques et expose l'individu aux décompensations et au vieillissement

pathologique si aucune mesure de soutien n'est proposée (figure 16). Cet état touche 40 % des patients âgés en USI et impacte la mortalité et la morbidité ⁷⁴.

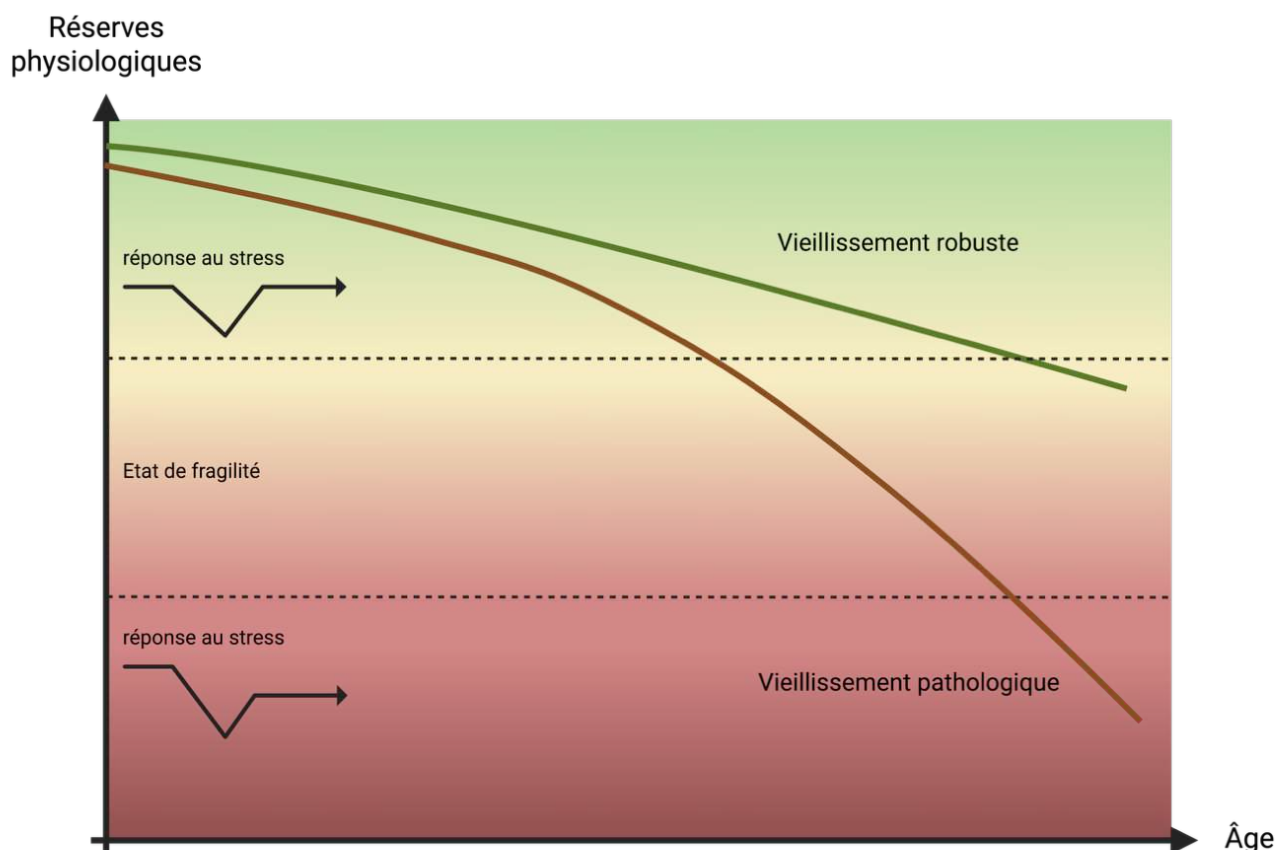


Figure 16. Illustration des différents types de vieillissement, physiologique/robuste, pathologique et l'état de fragilité.

Biorender.

En 2013, puis en 2023, López-Otín a établi les piliers principaux qui constituent le vieillissement physiologique ^{75,76}. Ils se regroupent sous 12 domaines différents : l'instabilité génomique, l'attrition des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de protéostasie, la perte de macroautophagie, la dénutrition, la dysfonction mitochondriale, la sénescence, l'épuisement des cellules souches, l'altération de la communication intercellulaire, l'inflammation chronique et la dysbiose (figure 17) ⁷⁶. Ainsi, ces grands marqueurs sont très utiles pour identifier le vieillissement étant donné qu'il s'agit d'un processus complexe et non limité à seulement quelques modifications. Cependant, il s'agit de marqueurs généraux et ils ne sont pas tous présents dans le vieillissement de chaque tissu ou cellule. Dans ce projet nous

nous concentrons sur la dysfonction mitochondriale, l'inflammation chronique et la sénescence qui sont déterminants dans le vieillissement musculaire et dans les altérations liées au sepsis.

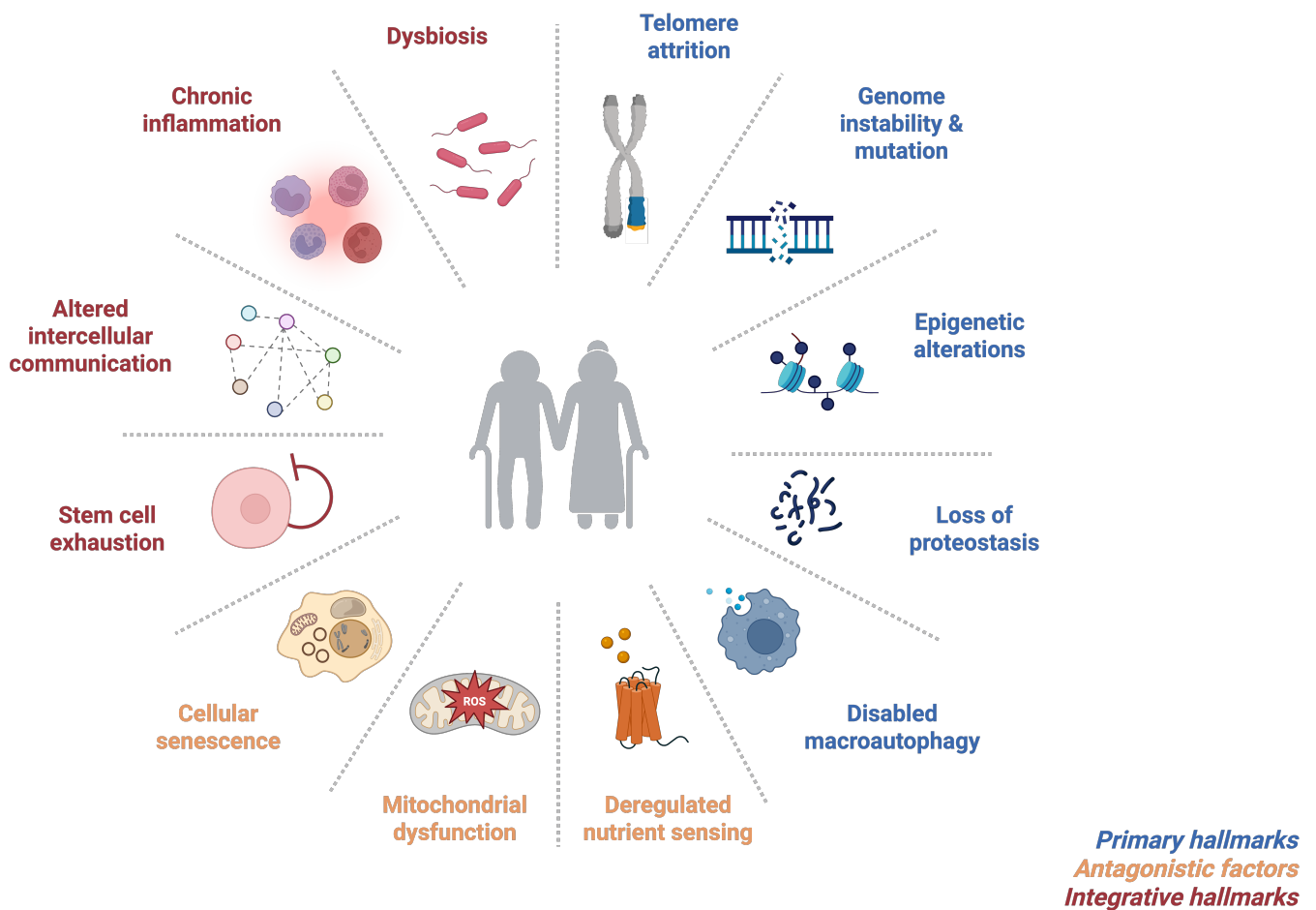


Figure 17. Schéma représentant les 12 grands piliers du vieillissement.

D'après C.López-Otín et *al.* (2023).

4.2 La sarcopénie

La sarcopénie est le nom donné au vieillissement musculaire, il se traduit par une diminution de la fonction et de la masse musculaire. La perte des protéines musculaires est la conséquence du dérèglement du métabolisme entre anabolisme et catabolisme. En d'autres termes, l'élimination des protéines est plus importante que leur synthèse. Plusieurs voies sont impliquées dans la dégradation des protéines musculaires, mais la plus importante est la voie de l'ubiquitin-proteasome system (UPS). C'est une voie sélective et rapide de l'élimination des protéines (notamment en cas d'atrophie pathologique). Leur dégradation est précédée par une ubiquitination, elle sert de signal pour leur reconnaissance et leur clivage par le protéasome. La

sarcopénie est caractérisée par une atrophie préférentielle des fibres de types II et d'une réduction de la force entre 30 et 40%. Il est aussi observé une transition des fibres de types II vers les fibres de types I, soit une transition vers un métabolisme oxydatif. Cette diminution des fibres de types II est expliquée en partie par la diminution des cellules souches et du facteur FGF qui accompagnent ces fibres, mais aussi à une perte des motoneurones ^{77,78}. Toutes ces modifications vont entraîner des conséquences sur les capacités fonctionnelles du muscle. On peut noter une diminution de la force maximale, de la vitesse de contraction, du temps de relaxation après la contraction et de la résistance à la fatigue ⁶⁸. Il n'existe pas de marqueurs spécifiques de la sarcopénie, mais la présence de divers changements cellulaires et moléculaires liés au vieillissement peut permettre de la caractériser. La présence de l'inflammaging, de la dysfonction mitochondriale (consommation d'oxygène, stress oxydatif, voies de régulation de la mitochondrie) et de la sénescence (fibrose, gènes d'arrêts du cycle cellulaire), constituent déjà une bonne base pour s'en approcher ^{79,80}.

4.3 La sénescence cellulaire

4.3.1 Arrêt du cycle cellulaire

La sénescence se traduit par un arrêt irréversible du cycle cellulaire et s'accompagne de la production d'un secretory associated senescence phenotype (SASP) dans lequel on retrouve des cytokines pro-inflammatoires, des protéines impliquées dans la dégradation de la MEC et des chimiokines. Cependant, malgré la limite de réplication atteinte, la cellule reste active métaboliquement. Leur morphologie subit des modifications, la cellule devient plus grosse et aplatie, le noyau est plus volumineux et il y a une accumulation de vacuoles autophagiques qui donne un aspect granuleux au cytoplasme. La sénescence peut être déclenchée par l'exposition de la cellule à différentes sources de stress, comme le stress oxydatif, les dommages à l'ADN ou le raccourcissement des télomères. Son but est de préserver l'organisme contre la prolifération des cellules endommagées ⁸¹. Le SASP produit par les cellules sénescents, comporte plusieurs médiateurs pro-inflammatoires comme Il-1 β , Il-6, Il-15 et l'interféron gamma (IFN- γ) ^{31,80,81}. L'un des marqueurs les plus spécifiques pour déterminer la présence de sénescence dans la cellule est l'augmentation des gènes associés à l'arrêt du cycle cellulaire. Il existe deux voies principalement impliquées dans la stabilisation du cycle cellulaire, la première est la voie médiée par p16 et la seconde est la voie via p21 et p53. L'objectif de ces deux voies est l'arrêt du cycle cellulaire par la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB), à

l'inverse son état hyperphosphorylé permet la poursuite du cycle cellulaire. Dans la voie p16, ce dernier va inhiber le complexe Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4)-Cycline D et entraîne la déphosphorylation de pRB. Dans la voie p21/p53, p53 phosphorylée entraîne l'augmentation de l'expression de p21, ce dernier va inhiber le complexe CDK2-cycline E et entraîner la déphosphorylation de pRB. La voie p16 est principalement induite par les dommages à l'ADN, alors que la voie p53 peut être induite par des dommages à l'ADN, les oncogènes et la production de ROS (figure 18) ⁸¹. Une étude a démontré que des souris âgées présentaient une augmentation de p21 dans des fibres musculaires et de p16 dans des cellules fibro-adipogéniques (FAPs) qui augmentent dans les muscles vieillissants. La protéine γ H2AX était aussi augmentée pendant le vieillissement musculaire. Lorsqu'il y a une cassure double brin de l'ADN, l'histone H2AX est phosphorylée et donne la forme γ H2AX. Enfin, la présence dans le SASP de muscles vieillissants, de Il-6, TNF- α , du plasminogène activateur inhibiteur-1 (Pai-1), de Matrix metalloprotéinase 3 (Mmp3), de Mmp9 et de transforming growth factor beta (Tgf- β) suggère une inflammation et une fibrose ^{31,82,83}.

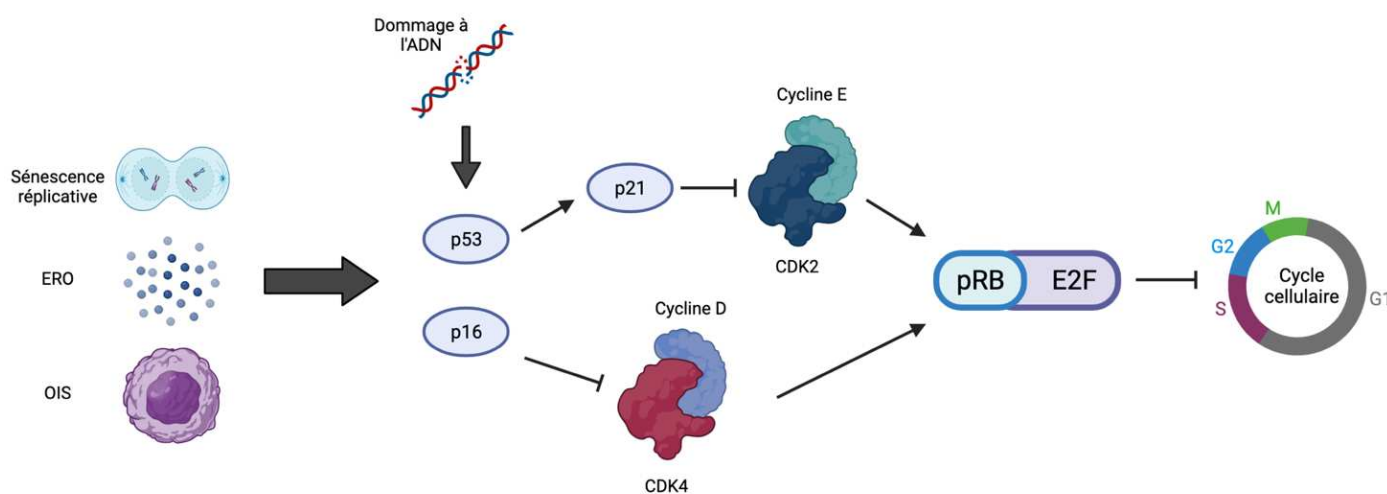


Figure 18. Schéma illustrant les deux voies conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire via p16 et p21/p53.

La voie p16 est activée par la sénescence répllicative, le stress oxydatif et l'activation d'oncogènes (OIS), la voie p53 est activée en plus par des dommages à l'ADN. La voie p16 inhibe le complexe CDK4/Cycline D et la voie P53 active p21 qui inhibe le complexe CDK2/Cycline E. Ces deux voies entraînent la déphosphorylation de pRB, ce qui empêche sa dissociation avec le facteur E2F, et donc la poursuite du cycle cellulaire. Biorender.

4.3.2 La fibrose musculaire

La fibrose est un état associé au vieillissement et à la sarcopénie, elle se caractérise par une agrégation excessive des composants de la MEC, provoquée par une activation chronique de la

cicatrisation. Elle s'accompagne d'un afflux inflammatoire, de chimiokines et des Mmps. Cet environnement perturbe l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la MEC et stimule la production de facteurs comme TGF- β 1, TGF- β 2 et la myostatine. Au début de la fibrose, l'infiltration des neutrophiles et des macrophages est suivie de la sécrétion d'Il-6, du TNF- α et de TGF- β . Cela entraîne une réduction de la capacité myogénique et favorise un environnement pro-fibrotique. Les fibres musculaires subissent un environnement délétère qui conduit finalement à leur mort cellulaire. Il est alors question d'un cercle vicieux entre nécrose et régénération, qui résulte en une accumulation de fibrose et de la perte de fonction musculaire. L'intervention des Mmps est essentielle dans le remodelage de MEC. Leur rôle est de dégrader la MEC afin d'éviter la fibrose. Il existe 28 types de Mmps différentes et 23 répertoriées chez l'Homme réparties dans différents groupes : collagénases, gélatinases, matrilysines et les stromélysines. Les collagénases (Mmp1, Mmp13) dégradent les collagènes fibrillaires, les gélatinases (Mmp2, Mmp9) ciblent les gélatines et le collagène de type IV, présent dans la lame basale. Les matrilysines (Mmp7, Mmp26) sont les plus petites Mmps et possèdent un large éventail de substrats. Enfin, les stromélysines (Mmp3, 10 et 11) clivent divers composés de la MEC, par exemple Mmp3 peut cliver les collagènes III, IV et V, les laminines, la fibronectine, l'ostéopontine et les protéoglycanes. Elle peut aussi activer d'autres Mmps comme la Mmp9. Les Mmps sont produites en réponse à un large éventail de signaux, comme l'inflammation, le stress oxydatif et la présence de DAMPs mitochondriaux (Figure 19). Parmi, les plus importantes on va retrouver la Mmp9, sa fonction est fortement associée à un environnement pro-inflammatoire et aux troubles musculo-squelettique. Mmp2 aussi est très largement étudiée pour son implication dans l'atrophie musculaire. De façon plus générale, les Mmp2, 3 et 9 favorisent la fibrose en favorisant la libération de TGF- β ^{32,34,36,81,84-89}. Ainsi, la fibrose musculaire peut s'installer en réaction à une réponse inflammatoire et à la dysfonction mitochondriale.

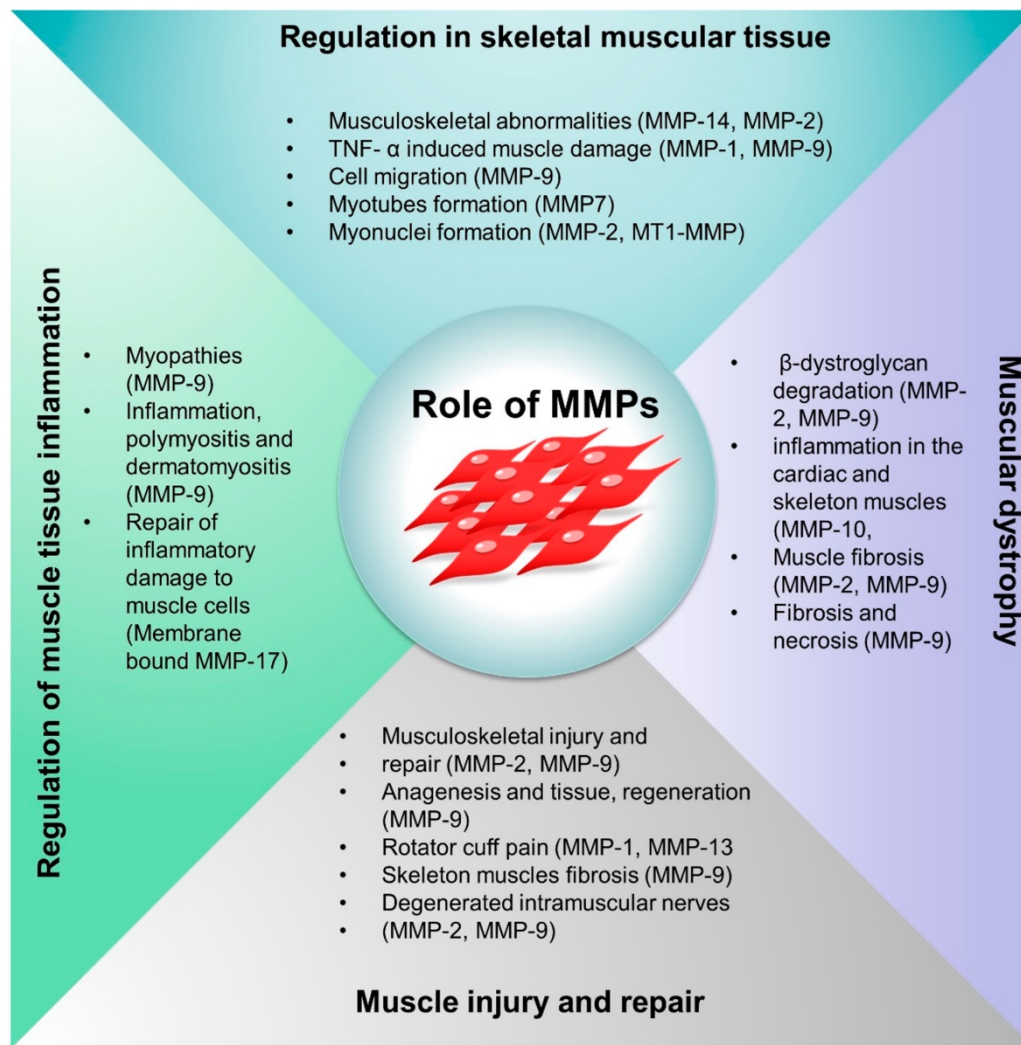


Figure 19. Rôles des différentes Mmps impliquées dans le muscle squelettique.

D'après Kumar et al. 2022.

4.4 La dysfonction mitochondriale

Comme cela a été évoqué antérieurement, la mitochondrie est un organelle essentiel au bon fonctionnement musculaire, elle est la principale voie de production d'ATP par l'O₂PHOS pour la contraction, régule la production de ROS, de Ca²⁺, et participe à l'apoptose. Les altérations mitochondriales liées au vieillissement sont nombreuses, on peut relever des altérations morphologiques, fonctionnelles, des capacités oxydatives, des fuites d'ADNmt, de la dynamique mitochondriale, qui induisent des dommages à la mitochondrie par la même occasion. L'autophagie intervient à ce moment et est particulièrement important car elle est responsable de l'élimination de ces mitochondries endommagées. Sa baisse d'efficacité avec le vieillissement a pour conséquence l'accumulation des mitochondries dysfonctionnelles qui

conduisent à une production supplémentaire de ROS, de fuite d'ADNmt, d'inflammation, etc. La fonction bioénergétique s'en retrouve impactée et se traduit par une réduction des niveaux d'ATP disponibles. Les dommages cellulaires et les anomalies moléculaires se multiplient et entraînent l'activation de la voie de l'inflammasome ^{68,77,90}. Enfin, l'altération des voies du contrôle qualité de la mitochondrie conduit à la sénescence en favorisant la production de ROS. Ces derniers agissent comme de puissants régulateurs de l'expression génique, notamment en modulant l'activité du locus INK4a et l'activation de p16 ⁸⁰.

4.4.1 Altérations bioénergétiques

Les défauts bioénergétiques se traduisent par la réduction de l'ATP cellulaire disponible, la consommation basale et maximale d'oxygène par la mitochondrie, ainsi que l'augmentation des ROS et NOS. Ils peuvent résulter, soit, d'une diminution du nombre de mitochondries par cellule. Il est question d'une réduction de la quantité dans ce cas et non de la qualité de la fonction mitochondriale. Soit d'altérations intrinsèques à la mitochondrie, défauts dans la chaîne respiratoire, mutations de l'ADN mitochondrial, stress oxydant, altération des protéines de l'OXPPOS. Pendant le vieillissement, la biogénèse mitochondriale est diminuée, on peut l'observer par la baisse de PGC-1 α , le gène régulateur principal de ce mécanisme. La baisse de la biogénèse conduit à une diminution du nombre de mitochondries par cellule et à la diminution de la production d'ATP ⁶⁸. De plus, pendant le vieillissement on retrouve aussi des altérations intrinsèques de la mitochondrie. Les ROS produits au niveau de l'ETC, principalement par les complexes I et III, endommagent l'ADNmt, de par sa proximité et le fait qu'il soit peu protégé. Ils peuvent aussi oxyder les protéines, lipides, coenzymes de l'ETC et perturber le transfert des électrons et aggraver la dysfonction mitochondriale. Le stress oxydatif et nitrosatif perturbent également la régulation de la concentration en Ca²⁺ dans le muscle vieillissant. Ils empêchent la fermeture correcte du canal RyR, ce qui entraîne des fuites de Ca²⁺, notamment au niveau des fibres de type I. Ils perturbent aussi les pompes SERCA via le NO qui est capable d'entraîner son inactivation. Ainsi, ces données démontrent que le stress oxydatif et nitrosatif induisent d'importants effets sur la fonction contractile par la régulation du calcium. Le stress oxydatif n'augmente pas seulement dans les cellules musculaires, mais aussi dans les cellules satellites. Avec l'âge, les mécanismes responsables du contrôle qualité de la mitochondrie deviennent moins efficaces, autophagie, dynamique mitochondriale, UPRmt, et renforcent le stress oxydatif et nitrosatif. Durant le vieillissement musculaire, l'activité des enzymes

antioxydantes, catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase, augmentent, ce qui suggère qu'il y a une nécessité de traiter un stress oxydatif et nitrosatif sous-jacent ^{68,78,91}.

4.4.2 Dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est un processus indispensable pour adapter la disponibilité des ressources mitochondriales en fonction des besoins cellulaires et énergétiques. La fission est importante pour permettre la mitophagie, une forme d'autophagie spécialisée dans la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles. Des altérations des protéines impliquées dans la fusion (Mfn1 et Mfn2) dans le muscle squelettique conduisent à une atrophie et à une perte de force musculaire, une accumulation de mutations, une déplétion de l'ADNmt et l'altération de l'ETC. Cependant, à l'inverse lorsque ces altérations impactent la fission (OPA1 et Drp1), les conséquences sont toutes aussi importantes avec une agrégation de mitochondries endommagées, cela provoque un stress du RE, altère les voies mitophagiques et autophagiques, qui vont aboutir à la dégradation du muscle et de sa force ⁶⁸. En résumé, la dynamique mitochondriale repose sur un équilibre délicat entre la fusion et la fission. La moindre dérégulation peut entraîner des conséquences importantes sur la fonction mitochondriale.

4.4.3 Autophagie/mitophagie

La mitophagie est un processus sélectif qui recycle les mitochondries endommagées ou dépolarisées. Durant le vieillissement, l'expression des protéines régulant l'autophagie (LC3, ATG7, p62, Beclin1, Bnip3) sont modifiées et sont liées à une diminution de la mitophagie. Par exemple, on peut retrouver une accumulation de p62 dans le muscle squelettique âgé. p62 est une protéine adaptatrice nécessaire pour l'adressage des mitochondries endommagées vers l'autophagosome, pour finalement aboutir à leur dégradation, et à celle de p62 par la même occasion. Ainsi, l'accumulation de p62 est un marqueur potentiel d'un blocage de l'autophagie. Les altérations peuvent aussi toucher les lysosomes directement, ce qui mène à une baisse de l'efficacité de la dégradation par la mitophagie. Les lysosomes des muscles de rats âgés sont associés à une accumulation de lipides, entraînant une baisse de l'activité de Lamp2 et de la fusion lysosomale. Ainsi, l'altération de la mitophagie est associée à la faiblesse musculaire. Par ailleurs, c'est un processus qui se veut en interaction avec la biogénèse, afin de maintenir un équilibre entre production et élimination des mitochondries. L'objectif étant d'entretenir un niveau constant de mitochondries dans les cellules et avec un fonctionnement optimal ⁶⁸.

Ainsi, durant le vieillissement, la fonction mitochondriale est impactée de manière globale avec une perte de son efficacité et de ses performances. Cette altération résulte à la fois d'une diminution de la biomasse mitochondriale et de l'accumulation de mitochondries endommagées, qui échappent aux mécanismes de contrôle qualité. In fine, ces mitochondries dysfonctionnelles libèrent des signaux délétères pour le tissu musculaire, tels que les ROS, RNS, ADNmt, l'ATP et une dérégulation du Ca^{2+} .

4.5 L'inflammaging

4.5.1 Le récepteur RAGE

Le vieillissement musculaire s'accompagne d'une inflammation chronique et de bas grade, que l'on nomme « inflammaging ». Cette inflammation perdure suite à la présence de multiples médiateurs inflammatoires qui se multiplient avec le vieillissement. Parmi eux, les DAMPs sont des signaux libérés par les mitochondries endommagées et cellules stressées, qui sont reconnus par les récepteurs de l'immunité et induisent une réponse inflammatoire. Ils s'agit de molécules comme les protéines S100, HMGB1, l'ADNmt, l'ATP extra-cellulaire, etc. Il est intéressant de constater parmi ces protéines, plusieurs sont des ligands du RAGE (protéines S100, HMGB1 et ADNmt) ou provenant de la dysfonction mitochondriale⁸⁰. RAGE est un récepteur multiligands appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Il se compose d'une partie intramembranaire, intermembranaire et extramembranaire. Il existe également une forme de RAGE, dite soluble, notée sRAGE et qui est circulante. Il peut être exprimé dans pratiquement tous les tissus de l'organisme et notamment dans le muscle squelettique. A l'état basal son expression est relativement faible, seul le tissu pulmonaire l'exprime fortement. Dans le muscle squelettique il sera exprimé principalement lors de la régénération musculaire, la différenciation et à la suite de stress. A l'origine, RAGE fut nommé de cette façon pour sa capacité à lier les Advanced Glycation End-products (AGEs). Les AGEs sont la résultante d'une réaction non enzymatique entre des nucléophiles et des composés carbonylés (sucre). Les AGEs augmentent au cours du vieillissement. Cependant au fil du temps il a été découvert que RAGE pouvait lier plusieurs dizaines de ligands. Effectivement, RAGE est classé comme un PRR, qui inclue également les TLRs. Il possède donc une activité inflammatoire semblable aux TLRs, présents sur beaucoup de cellules du système immunitaire¹⁵. Il est capable notamment de stimuler différentes voies associées à l'inflammaging via la voie NLRP3/NF- κ B qui aboutit à la

production des cytokines pro-inflammatoires : Il-6, Tnf- α , Il-1 β , mais aussi de ses propres ligands comme HMGB1 (Figure 20) ¹⁵.

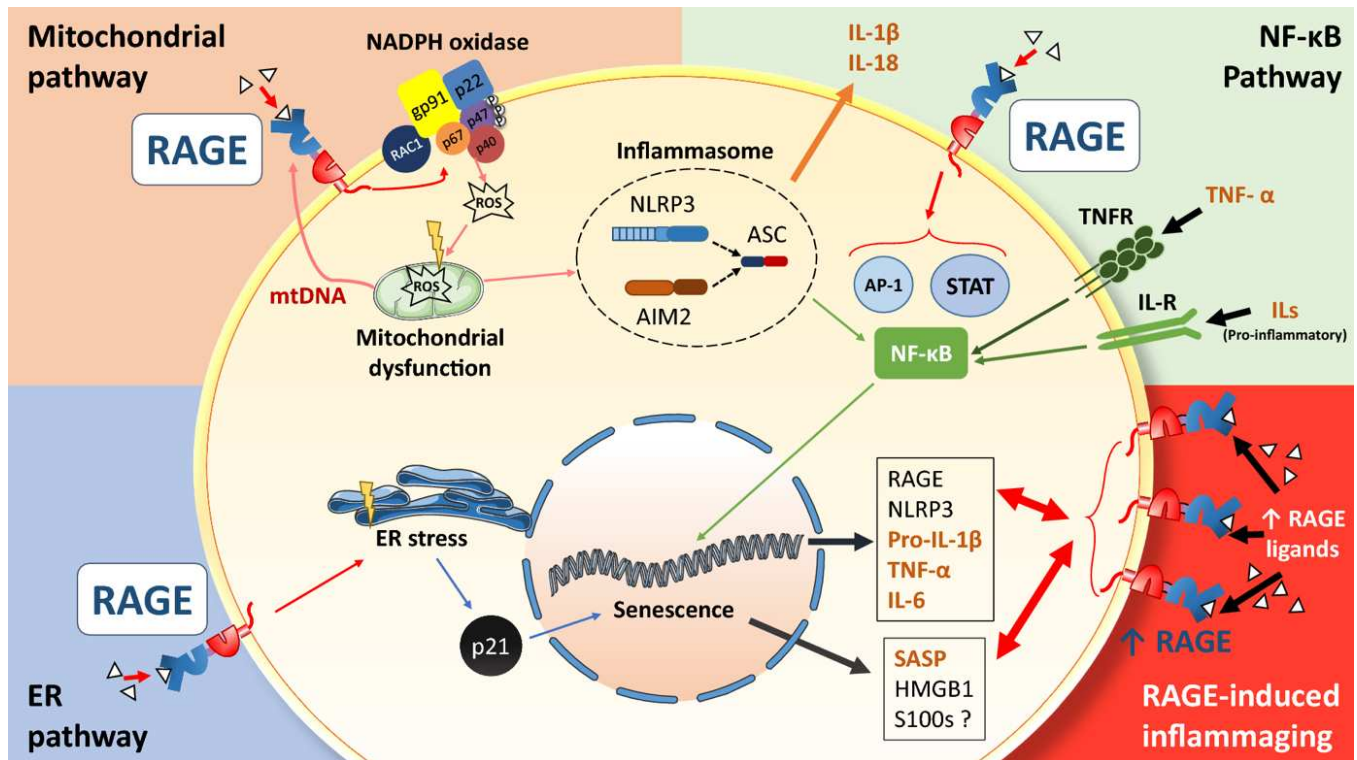


Figure 20. RAGE est impliqué dans la dysfonction mitochondriale et l'inflammation.

RAGE participe à l'inflammation par trois grandes voies de signalisation, la première repose sur la dysfonction mitochondriale et la génération de ROS qui induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3. La seconde médie ses effets par l'activation de la voie NF- κ B qui aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires. La dernière voie implique le stress du RE qui entraîne l'apparition d'un SASP. D'après Teissier et Boulanger. 2019.

Ainsi, RAGE est un récepteur intéressant, puisqu'il constitue un point de convergence entre la dysfonction mitochondriale et l'inflammation.

4.5.2 L'inflammasome Nlrp3

Les TLRs, récepteurs présents sur les cellules immunitaires et non-immunitaires peuvent stimuler l'inflammasome NLRP3 et possèdent la capacité de reconnaître les DAMPs induisant une réponse pro-inflammatoire. NLRP3 est un complexe multiprotéique qui recrute la procaspase-1 par la protéine adaptatrice Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD (ASC). Une fois activée, la caspase-1 clive non seulement les formes précurseurs des cytokines pro-inflammatoires (pro-Il-1 β et pro-Il-18), mais également la progasdermine D. Une

fois clivée, la gasdermine D forme des pores dans la membrane plasmique, permettant la libération d'Il-1 β et d'Il-18 ⁹². Deux signaux sont nécessaires à l'activation de NLRP3, un premier signal d'assemblage, puis un second signal d'activation. L'amorçage de NLRP3 est dépendante principalement de l'activation de NF- κ B, qui est induite par l'activation du TLR4 ou de RAGE ^{92,93}. Par exemple, les lipopolysaccharides (LPS) se situent sur la membrane externe des bactéries à gram négatives et participent au signal 1 de NLRP3. Ensuite, le signal d'activation est donné par divers stimuli comme les Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) et les DAMPs. Des dérégulations dans les flux de potassium (K⁺) et de Ca²⁺ sont des activateurs efficaces de NLRP3, tout comme des signaux provenant de la mitochondrie (ADNmt, ROS, cardiolipines oxydées) ⁹². La libération massive de Ca²⁺ induit une augmentation massive de la concentration de Ca²⁺ dans les mitochondries, ce qui provoque une dysfonction mitochondriale associée à une production de ROS plus importante et à l'activation de NLRP3. Les ROS sont décrits comme des activateurs de NLRP3 mais les mécanismes par lesquels ils opèrent restent encore inconnus. Un mécanisme largement accepté est l'oxydation de l'ADNmt suite à la présence de ROS. Lorsque la mitochondrie subit des dommages, la libération de ROS s'accompagne d'une fuite d'ADNmt. Les ROS vont oxyder l'ADNmt qui sera ensuite reconnu par NLRP3 comme signal activateur (figure 21) ^{92,94}. L'activation de NLRP3 est aussi associée à l'atrophie des fibres de types II chez les personnes âgées. De manière plus générale, NLRP3 est associé au vieillissement du muscle squelettique et son activité augmente avec l'âge ⁸⁰.

En somme, la voie de l'inflammasome NLRP3 est une voie inflammatoire sensible aux dérégulations de la fonction mitochondriale et son activation entraîne des effets délétères sur le muscle.

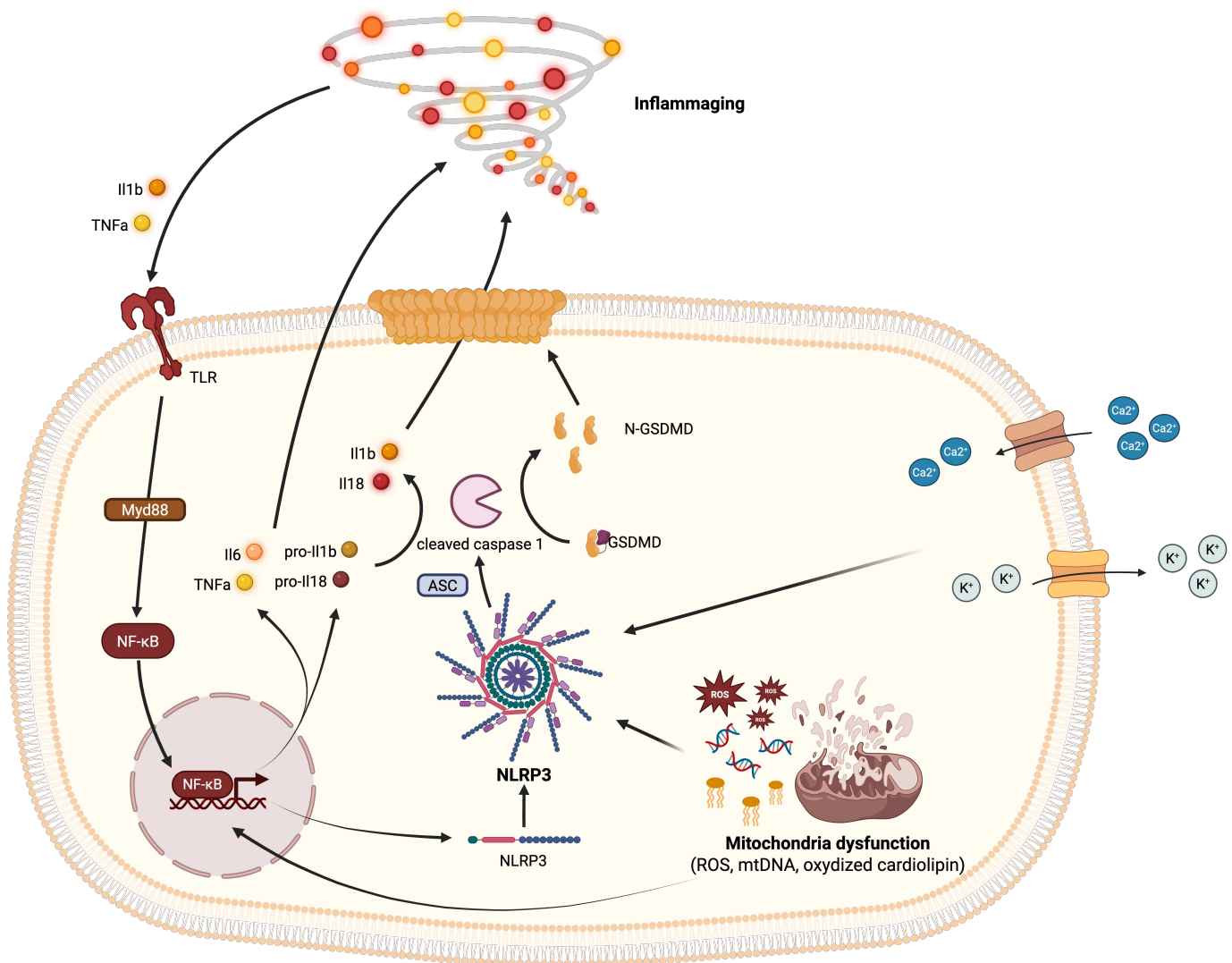


Figure 21. Voie de signalisation de Nlrp3 et de ses principaux activateurs.

L'activation du TLR par le TNF- α et Il-1 β vont entraîner la translocation de NF- κ B par la voie Myd88, qui induit l'expression des gènes Il-6, Tnf- α , pro- Il-1 β et pro-Il-18. Il sera aussi responsable du premier signal pour NLRP3 en permettant son activation. Le signal 2 proviendra de DAMPs, ROS, mtDNA, cardiolipin, efflux de potassium (K^+) et influx de calcium (Ca^{2+}), permettant l'assemblage de NLRP3. Une fois assemblé et actif, il va cliver la procaspase 1 pour la rendre active via la protéine adaptatrice ASC. Ensuite, la caspase 1 va cliver la pro- Il-1 β et la pro-Il-18 en Il-1 β et Il-18. La caspase 1 clive aussi la pro-gasdermine D en gasdermine D N-terminale qui formera un pore dans la membrane afin de permettre la libération des cytokines Il-1 β et Il-18. Biorender.

4.5.3 L'Il-6

Durant le vieillissement et la sarcopénie, les PAMPs sont reconnus comme des signaux de dangers et vont aussi générer une inflammation dépendante des voies TNF- α , Il-6, Il-10, Il-1 β ⁸⁰. L'Il-6 est une cytokine fortement associée à la sarcopénie, des niveaux résiduels, mais détectables restent élevés durant le vieillissement et induisent une atrophie musculaire. L'Il-6

stimule différentes voies de signalisations, mais la voie principalement activée durant l'inflammation est la voie janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 (JAK2/STAT3). L'Il-6 se lie à son récepteur spécifique, l'Il-6R, et entraîne une homodimérisation permettant l'association avec les glycoprotéin 130 (GP130). Une fois le complexe formé, il active la protéine JAK permettant la phosphorylation de la queue cytoplasmique de GP130. S'en suit l'association et la phosphorylation avec la protéine STAT3. STAT3 peut être phosphorylée de différentes façons, la forme phosphorylée la plus importante à lieu sur la tyrosine 705 (STAT3-Y705). Elle est connue pour propager des effets pro-inflammatoires et être impliquée durant le sepsis. La forme STAT3-Y705 se dimérise et peut ensuite se transloquer dans le noyau afin d'activer l'expression de gènes comme Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3), Il-6 et TNF- α . SOCS3 est un inhibiteur de rétro-activation de la voie Il-6 en inhibant JAK2. STAT3 est aussi capable de coopérer avec NF- κ B dans le muscle dans le cadre de la cachexie et de participer à l'atrophie musculaire (figure 22) ^{95,96}.

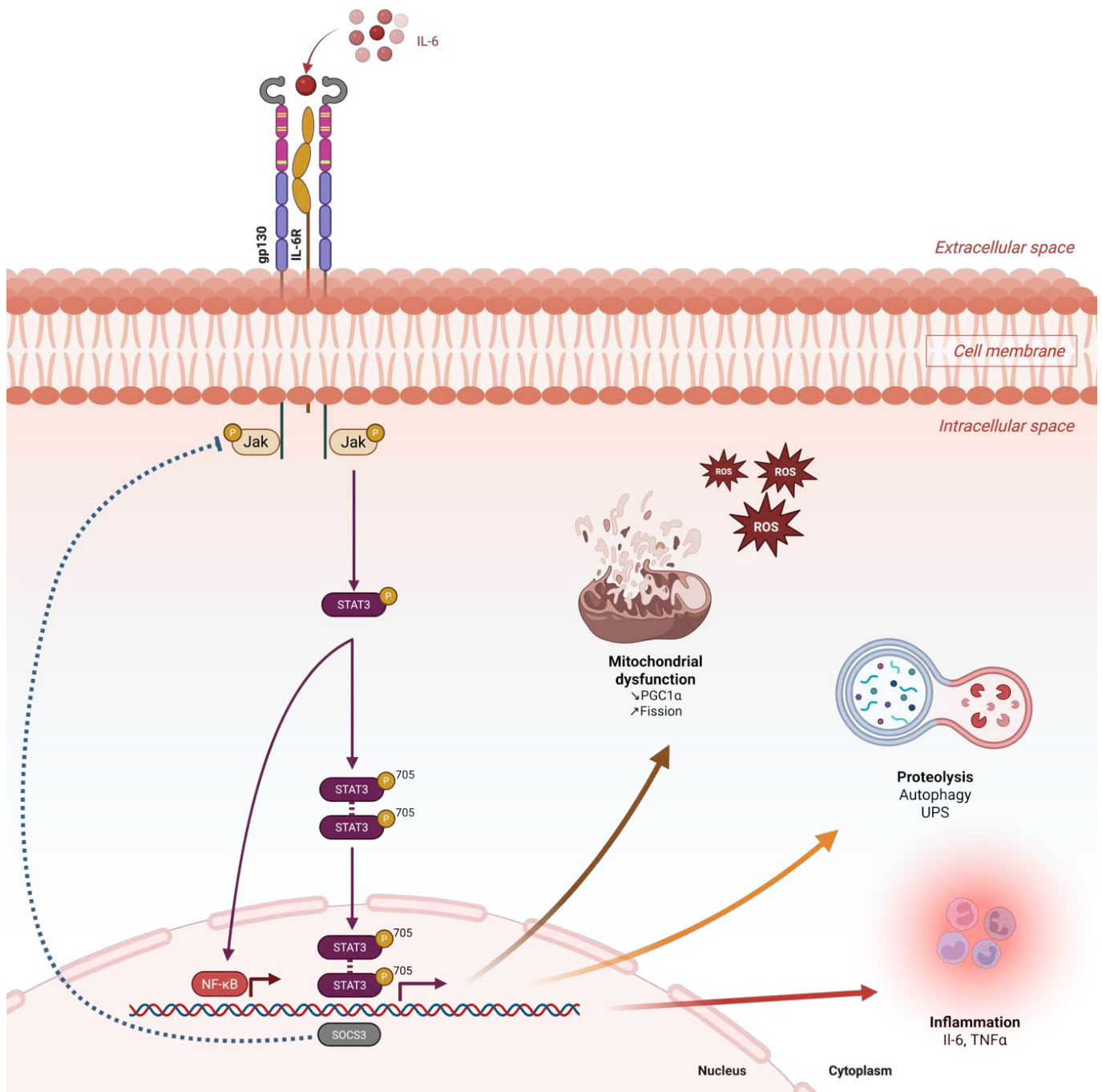


Figure 22. Voie de signalisation de l'IL-6/JAK2/STAT3.

La liaison de l'IL-6 sur son récepteur l'IL-6R entraîne l'interaction avec les protéines GP130, puis avec la protéine JAK2. Ces interactions entraînent la phosphorylation de STAT3 en tyrosine 705. Elle forme ensuite un homodimère avec une autre protéine STAT3-Y705 afin de se transloquer dans le noyau et d'activer un ensemble de gènes impliqués dans l'inflammation (TNF- α et IL-6), la protéolyse via les voies de l'autophagie, de l'UPS, de la dysfonction mitochondriale et une augmentation de fission mitochondriale. Une autre voie, dite non canonique, implique l'interaction de STAT3 avec NF- κ B afin de faciliter sa translocation dans le noyau et l'activation de ses gènes cibles. Enfin, la translocation de STAT3 dans le noyau active SOCS3, une protéine inhibitrice de JAK2, afin d'éviter une boucle de rétro-activation. Biorender.

La stimulation de STAT3 conduit également à la protéolyse et à l'atrophie musculaire par l'autophagie ou l'activation du système UPS via les facteurs de transcriptions Forkhead box O (FoxO) ou caspase 3. Du côté mitochondrial, le traitement Il-6 sur des myotubes inhibe la fusion et favorise la fission, entraînant une baisse de PGC1- α ⁹⁷⁻⁹⁹. A l'inverse, l'inhibition de la voie JAK/STAT améliore la fonction et la masse musculaire, tout en réduisant la libération du SASP. L'Il-6 est une voie polyvalente dans le fonctionnement musculaire, suivant sa cinétique et son niveau d'expression, elle va exercer différents effets. L'Il-6 est impliquée dans le métabolisme, la fonction mitochondriale, la régénération musculaire et l'inflammation. Une augmentation transitoire de l'Il-6 suite à un exercice physique stimule la consommation du glucose et l'oxydation des acides gras, afin d'améliorer les performances musculaires. Elle joue un rôle également dans l'adaptation de la réponse à au jeun en modulant les voies du métabolisme et la génération de ROS¹⁰⁰. Cependant, lorsque sa libération devient chronique, les effets délétères commencent à apparaître, entraînant l'atrophie et la faiblesse musculaire. Le traitement des cellules musculaires par l'Il-6 entraîne une dysfonction mitochondriale, via la réduction de la biogénèse et la fragmentation du réseau mitochondrial. Ces altérations aboutissent à une diminution de l'efficacité de l'O₂PHOS, conduisant à la baisse de la consommation d'O₂ et à la production de ROS¹⁰⁰.

En résumé, L'Il-6 possède deux types d'effet, le premier est le support physiologique du muscle squelettique et de ses diverses fonctions (la croissance, la régénération, la prolifération cellulaire et l'adaptation au stress). Le second implique une réponse inflammatoire et une dysfonction mitochondriale favorisant le catabolisme et la perte de fonction musculaire⁹⁹.

4.5.4 Le Tnf- α

Au même titre que l'Il-6, Le TNF- α est une autre cytokine impliquée dans l'inflammation et l'atrophie musculaire¹⁰¹. Il a été démontré que des niveaux élevés de TNF- α entraînent la perte de la force et de la masse musculaire chez les personnes âgées et augmentent le risque de développer une sarcopénie⁸⁰. Cependant, les mécanismes par lesquels le TNF- α agit ne sont pas encore bien établis¹⁰². Une des voies qui pourrait expliquer ses effets dans la sarcopénie provient de sa capacité à activer la voie NF- κ B. En effet, le TNF- α est capable d'induire la translocation de NF- κ B par l'interaction avec les TLRs, afin d'activer des gènes pro-

inflammatoires et impliqués dans la protéolyse ¹⁰³. De plus, on sait que l'activation de l'inflammasome NLRP3 est responsable de la production de TNF- α . Ainsi, une boucle de rétro-activation se met en place entre l'activation de la voie NF- κ B et la production de TNF- α par l'inflammasome NLRP3 ¹⁰¹. Ces données indiquent que le TNF- α , au même titre que l'Il-6, participe activement au vieillissement du muscle par les voies de l'inflammation et de la protéolyse.

5. Altérations à court terme après le sepsis

Maintenant que nous avons vu la physiologie du muscle squelettique et les caractéristiques du vieillissement musculaire, nous allons voir quelles sont les altérations liées pendant la phase aigüe du sepsis. Ces éléments apporteront déjà des premiers éléments de réflexions pour comprendre les altérations à plus long terme.

5.1 Altérations du phénotype musculaire

5.1.1 Atrophie musculaire

Jusqu'à 70% des patients du sepsis vont développer une atrophie musculaire ¹⁰⁴. Lorsqu'ils sont admis en USI, ils vont rapidement perdre de la masse musculaire, cela touche les membres supérieurs comme les membres inférieurs, il est question d'une diminution de plus de 15% en 10 jours ¹⁰⁵. Celle-ci apparaît précocement durant la réanimation et se traduit par une protéolyse des protéines musculaires via l'autophagie, l'UPS et l'inflammation ¹⁰⁶. Une étude démontre que la Cross-Sectional Area (CSA), qui représente l'aire des fibres musculaires en coupes transversales, est réduite de 26% à 7 jours après le sepsis et est associée avec la diminution de la force musculaire ¹⁰⁴. Cependant, si l'on regarde plus en détails le type de fibres touchées, on se rend compte que l'atrophie impacte plus spécifiquement les fibres avec un métabolisme essentiellement glycolytique, comme les fibres de type IIb et IIx, à l'inverse des fibres oxydatives de type I et IIa qui sont préservées. Enfin, il semble que l'atrophie musculaire s'améliore dans les semaines suivant le sepsis et qu'elle concerne principalement la phase aigüe ^{8,107}.

5.1.2 Altérations fonctionnelles

La faiblesse musculaire post-sepsis est surtout caractérisée par une diminution des capacités fonctionnelles (force et endurance). Le Medical Research Council (MRC) est un score clinique qui permet d'évaluer la fonction musculaire chez les patients. 6 groupes bilatéraux de muscles sont testés, 3 appartenant aux muscles supérieurs (abduction de l'épaule, flexion du coude et extension du poignet) et 3 appartenant aux muscles inférieurs (flexion de la hanche, extension du genou et dorsiflexion de la cheville). Chaque muscle est évalué sur un score allant de 0 à 5, si le score total de tous les groupes musculaires est inférieur à 48, alors cela indique une faiblesse musculaire ¹⁰⁵. Grâce à ce score, une faiblesse musculaire a été diagnostiquée chez les survivants du sepsis pendant les 10 premiers jours. De plus il est rapporté que cette faiblesse musculaire est associée à une atrophie et à une hausse de la mortalité ¹⁰⁵. Il a été observé les mêmes conclusions dans un modèle murin de sepsis induit par injection de selles. Le sepsis entraînait la diminution de la force contractile associée à une atrophie musculaire via la diminution de la CSA des fibres glycolytiques ^{8,107}. Une autre étude chez la souris démontre qu'il y a non seulement une diminution de la force musculaire mais quelle concerne aussi la capacité de résistance à la fatigue qui est réduite ¹⁰⁸. Cependant, ces études soulignent aussi l'altération de la qualité musculaire qui entraînerait la réduction de la force musculaire. Parmi les différentes explications avancées, la mitochondrie semble être au cœur de l'altération de la fonction contractile durant le sepsis. L'accumulation de mitochondries endommagées rend la disponibilité en énergie réduite, par conséquent la fonction musculaire en est affectée. La réponse inflammatoire induit la génération de ROS et de RNS qui vont entraîner des dommages sur les protéines contractiles et altérer leur fonctionnement ¹⁰⁶. L'état de stress chronique durant le sepsis entraînerait des problèmes de régulation du Ca^{2+} avec une fuite des canaux RyR et une baisse d'efficacité des pompes SERCA ¹⁰⁶. Ainsi, la faiblesse musculaire post-sepsis est caractérisée par une diminution de la force mais aussi par une diminution de l'endurance musculaire. Elle serait associée à l'atrophie mais pas forcément liée à cette dernière.

En résumé, la faiblesse musculaire survenant pendant la phase aiguë du sepsis se caractérise par une diminution de la fonction musculaire et par une atrophie. Ces deux phénomènes semblent apparaître en conséquence d'altérations provoquées par une dysfonction mitochondriale.

5.2 Dysfonction mitochondriale aigüe

Comme évoqué précédemment, la dysfonction mitochondriale exerce divers effets sur la fonction contractile du muscle et représente un point clé de la faiblesse musculaire pendant le sepsis.

5.2.1 Bioénergétique et Biogénèse

Il a été démontré que dans le muscle squelettique et le diaphragme des survivants du sepsis, il y avait une diminution de la respiration, de l'activité enzymatique mitochondriale et de la production d'ATP ^{8,9,107,109}. Plusieurs études mentionnent également la présence d'un stress oxydatif et nitrosatif importants, qui sont tous les deux des marqueurs importants d'une baisse d'efficacité mitochondriale et d'altération de sa fonction ^{8,107}. Cette dysfonction impacte également d'autres fonctions dans le muscle comme la régulation du Ca^{2+} qui est importante pour la fonction contractile ¹¹⁰. Comme il en est question pendant le vieillissement, on pourrait penser à une réduction du nombre de mitochondries dans les cellules musculaires, aboutissant à la réduction de la capacité OXPHOS et de la production d'ATP. Il a été démontré qu'il y avait une activation précoce de la biogénèse chez les survivants, ce qui suggère un potentiel mécanisme compensatoire suite à une baisse de la quantité de mitochondries. Cependant, bien que certaines études soulignent une diminution très précoce de la quantité d'ADNmt ou de certains complexes de l'ETC pendant le sepsis, il semblerait que les niveaux protéiques des sous-unités de l'ETC soient maintenus à des niveaux normaux. Les études récentes démontrent qu'il s'agirait même du problème inverse, avec une accumulation des mitochondries dysfonctionnelles à cause de défauts dans les mécanismes impliqués dans leur élimination. Ainsi, la présence non négligeable de mitochondries endommagées pourraient expliquer cette efficacité bioénergétique diminuée ^{10,107,111–113}.

5.2.2 L'autophagie

En effet, différentes études chez la souris montrent par microscopie électronique la présence de mitochondries aberrantes dans le muscle squelettique à la suite du sepsis. Celles-ci sont caractérisées par la disparition des crêtes mitochondriales et d'une matrice anormalement « vide » et dominante (figure 23). De plus, les mitochondries au cours du sepsis sont associées à une augmentation du stress oxydatif et nitrosatif. Ces mitochondries endommagées ne sont

pas éliminées à cause d'un blocage de l'autophagie. Le processus est bien activé mais, il est bloqué dans les étapes finales. Plus précisément, il s'agirait de la fusion entre les lysosomes et l'autophagosome qui serait défectueuse et empêcherait l'élimination des vacuoles autophagiques. L'utilisation de l'urolithine A, un composé naturel qui active l'autophagie, a permis de restaurer le flux autophagique ainsi que les capacités OXPHOS. Une autre étude démontre que la surexpression de Parkin, impliqué dans la mitophagie, améliore l'atrophie musculaire. De la même façon, lorsque l'autophagie est inhibée par la délétion d'ATG7, cela entraîne de graves désordres métaboliques et un dysfonctionnement musculaire qui sont associés à un taux de survie réduit pendant le sepsis ^{8,10,107,114,115}.

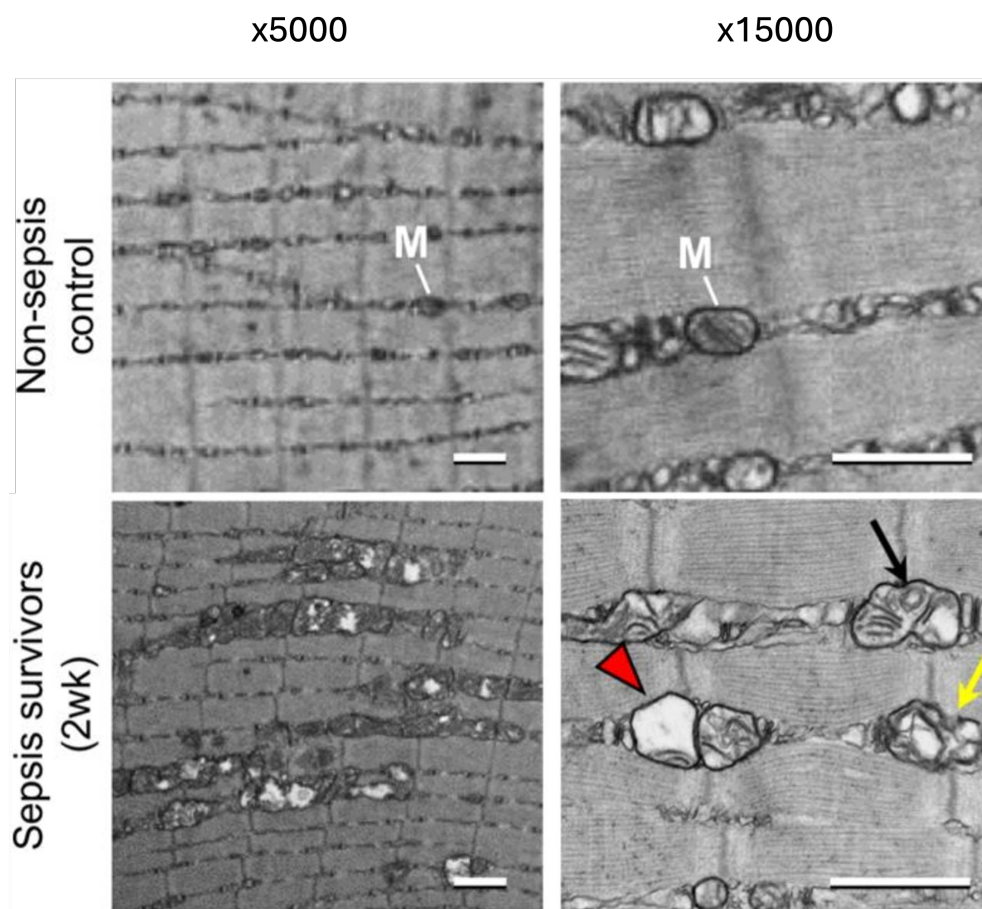


Figure 23. Images au microscope électronique présentant des mitochondries aberrantes/endommagées à la suite du sepsis.

Images de microscopie électronique prise de l'EDL chez la souris survivante 2 semaines après le sepsis. En haut, images d'une souris contrôle, et en bas d'une souris survivante du sepsis. A gauche, grossissement x5000 et à droite x15000. D'après Owen *et al.*, 2019.

Ainsi, ces données renforcent l'hypothèse que la dysfonction mitochondriale serait bien à l'origine de faiblesse musculaire. Elle proviendrait de l'accumulation des mitochondries endommagées et qui perturberaient la fonction contractile.

5.2.3 La dynamique mitochondriale

Comme vu précédemment, la dynamique mitochondriale est un processus important dans l'homéostasie mitochondriale. Elle joue un rôle clé dans l'isolement des mitochondries dysfonctionnelles grâce à la fission pour dégradation via la mitophagie. Une étude récente démontre que le sepsis induit l'activation du RAGE via la libération des protéines S100a8/a9. En conséquence, la fonction mitochondriale s'en retrouve perturbée et présente une activation anormale de la fission mitochondriale qui se traduit par un réseau fragmenté et déstructuré. Dans ces conditions délétères, la fonction mitochondriale est fortement altérée et une production d'ATP diminuée, une baisse de la respiration et une faiblesse musculaire. Au niveau du diaphragme, un muscle essentiellement oxydatif, les mêmes observations sont réalisées avec une augmentation de la fission mitochondriale après le sepsis. L'utilisation d'un inhibiteur de la fission mitochondriale a permis d'améliorer la production d'ATP et la morphologie mitochondriale, ainsi que l'atrophie musculaire. De plus, dans une autre étude, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de Drp1 a permis d'atténuer l'inflammation médiée par le TNF- α et l'Il-6, ainsi que la phosphorylation de NF- κ B et le stress oxydatif^{9,109,116}.

Ainsi, les données de la littérature laissent à conclure que pendant le sepsis, la dysfonction mitochondriale caractérisée par une diminution de la production d'ATP, de la consommation d'oxygène et une augmentation de la production des ROS et des RNS. Il ne semble pas y avoir de baisse spécifique de la quantité des mitochondries ce qui oriente plutôt sur des problèmes de capacité ou d'efficacité de l'OXPHOS. Cette hypothèse s'appuie aussi sur la présence d'une fission mitochondriale exagérée et d'une autophagie bloquée. Effectivement, la fission est essentielle pour aboutir à la dégradation des mitochondries endommagées. Un blocage de l'autophagie pourrait expliquer pertinemment pourquoi un réseau mitochondrial fragmenté persiste, même plusieurs jours après le sepsis chez la souris. Enfin, l'accumulation de telles mitochondries est cohérente avec la dysfonction mitochondriale persistante plusieurs jours après le sepsis.

5.3 Inflammation musculaire post-sepsis

Le sepsis est caractérisé par un épisode d'inflammation aigue intense et potentiellement mortel. De plus, nous avons pu voir précédemment que la mitochondrie dysfonctionnelle est à l'origine de divers signaux qui sont capables d'activer une réponse inflammatoire. Nous allons voir dans la partie suivante les différentes voies de signalisation impliquées dans la réponse au sepsis.

5.3.1 Voie de l'inflammasome NLRP3

Une des voies inflammatoires les plus décrites durant le sepsis est la voie NLRP3. Elle joue un rôle important dans la protéostasie musculaire puisqu'elle est initiatrice de la pyroptose, une mort cellulaire induite par l'inflammation. Pendant le sepsis, NLRP3 est fortement activé et permet la maturation de l'Il-1 β . Il a été montré que l'inhibition de NLRP3 chez la souris permettait de réduire cette inflammation associée au sepsis. La voie NLRP3/Il-1 β est responsable également de l'atrophie musculaire, notamment en influençant l'expression de l'Il-6¹¹⁷. Des données provenant de myotubes traités par du LPS permettent de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents. Ils démontrent que le traitement par le LPS induit une activation de NLRP3 associée à une production de ROS mitochondriaux (mtROS) et d'Il-1 β s'accompagnant d'une atrophie des myotubes¹¹⁸. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les protéines S100A8/A9, ligands du RAGE, sont également capables de stimuler l'activité de NLRP3. De plus ils sont retrouvés augmentés à la suite du sepsis et induisent des mécanismes pro-inflammatoires. Cela constitue un lien direct entre la voie NLRP3 et la voie RAGE qui sont toutes deux associées au sepsis¹¹⁹.

5.3.2 Voie RAGE

Durant le sepsis, des fortes concentrations de RAGE ont été retrouvées¹²⁰. Son activation participerait à l'inflammation médiée par la voie NF- κ B via une boucle de rétro-activation¹²¹. Une caractéristique intéressante de RAGE est sa capacité à lier différents ligands. On retrouve notamment les protéines HMGB1 et les S100A8/A9. Ces ligands possèdent une forte affinité pour RAGE et sont retrouvés en augmentation pendant et à la suite du sepsis au niveau du muscle squelettique pour les protéines S100A8/A9 et dans la circulation ou le compartiment extra-cellulaire pour HMGB1⁹. La présence d'HMGB1 dans la circulation extra-cellulaire pendant le sepsis amplifie la réponse inflammatoire systémique puisqu'il agit comme DAMPs

reconnu par différents TLRs et RAGE. Plus spécifiquement au niveau du muscle, HMGB1 est responsable de l'atrophie musculaire via les voies de l'autophagie et de l'UPS ¹²². Quant aux protéines S100A8/A9, elles favorisent l'atrophie musculaire et la dysfonction mitochondriale suite au sepsis, notamment via RAGE. Une étude a montré que l'inhibition du RAGE pendant le sepsis permettait d'améliorer la fonction mitochondriale et l'atrophie musculaire. Les effets des protéines S100A8/A9 seraient médiés par l'augmentation de l'expression de la protéine Drp1, régulatrice de la fission mitochondriale. En conséquence, une diminution de la production d'ATP et de la fonction musculaire ⁹.

Ainsi, pendant le sepsis, RAGE lui-même et plusieurs de ses ligands sont augmentés, notamment au niveau du muscle squelettique. Sa capacité à lier l'inflammation et la dysfonction mitochondriale font de lui un récepteur particulièrement pertinent et intéressant à étudier.

5.3.3 Voie Il-6

Chez l'Homme, les concentrations circulantes d'Il-6 sont retrouvées en augmentation pendant le sepsis, mais aussi après le passage en USI et sont corrélées à un taux de mortalité plus important ¹²³. Pendant le sepsis, la voie Il-6/JAK2/STAT3 est une des voies qui participent activement à l'atrophie musculaire et à l'ICUAW avec l'Il-1 β comme observé précédemment ⁹⁵. Il a été retrouvé l'expression augmentée de SOCS3, un effecteur final de l'activation de la voie Il-6/STAT3, dans des biopsies musculaires de patients survivants du sepsis ⁹⁶. Elle est non seulement retrouvée présente dans le plasma des patients mais aussi au niveau du muscle et est impliquée dans la génération des mtROS et de l'atrophie musculaire. Lorsque l'on l'inhibe, elle permet d'améliorer la force musculaire et d'atténuer la production des ROS. Les effets bénéfiques de l'inhibition de l'Il-6 sur la mitochondrie seraient médiés notamment par la régulation positive de Pgc1- α ¹²⁴.

En somme, l'Il-6 est une cytokine active pendant le sepsis et exerce ses effets principalement par la voie JAK2/STAT3, impactant la fonction mitochondriale avec une augmentation des ROS. Enfin, au niveau musculaire, elle participe surtout à la fonte musculaire par les voies de l'UPS et de l'autophagie, aboutissant à la protéolyse. Il est intéressant de noter qu'il s'agit de mécanismes semblables à ce qu'il se passe durant la sarcopénie.

5.3.4 Voie TNF- α

Le TNF- α , est une autre cytokine inflammatoire qui augmente dans le muscle squelettique pendant le sepsis ^{125,126}. Cependant, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le score Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), et le taux de TNF- α circulant. Le score SOFA est un score de gravité clinique en se basant sur le dysfonctionnement d'organes (respiratoire, cardio-vasculaire, rein, etc). Néanmoins, il a été démontré que les niveaux de TNF- α sont corrélés à la mortalité du sepsis sur 28 jours. Il est intéressant de noter que l'Il-1 β , qui est fortement associé au sepsis comme détaillé précédemment, n'est pas non plus corrélé avec le score SOFA, alors que l'implication de cette voie est associée au sepsis ¹²⁷. Cela suggère que malgré le peu de connaissances que nous avons à son sujet, il reste un médiateur de l'inflammation et du vieillissement musculaire à ne pas à négliger. Il existe peu d'études qui ont analysé l'implication du TNF- α dans le sepsis et le muscle, néanmoins, une étude démontre son augmentation 48 heures après le sepsis dans un modèle de Cecal Ligation and Puncture (CLP) chez la souris¹²⁴.

En résumé, durant la phase aiguë du sepsis, la faiblesse musculaire se manifeste par une diminution des performances contractiles et la présence d'une protéolyse. La dysfonction mitochondriale se place comme un acteur clé des altérations du muscle squelettique, induisant des anomalies bioénergétiques, un stress oxydatif et nitrosatif, responsables de la perte de performance. De plus, la mitochondrie est responsable d'une stimulation active de l'inflammation via les voies du RAGE, de NLRP3 et de l'Il-6. Enfin, il est intéressant de constater que les voies de la dysfonction mitochondriale et les voies inflammatoires impliquées sont sensiblement les mêmes que pendant le vieillissement musculaire.

6. Altérations à moyen et long terme après le sepsis

Bien que la faiblesse musculaire durant le sepsis ne soit pas entièrement comprise, l'implication de certains mécanismes comme la dysfonction mitochondriale et l'inflammation sont démontrés. Les études qui s'intéressent aux conséquences à long terme après le sepsis sont rares et il est essentiel de les explorer afin de mieux comprendre cette pathologie chronique qui touche une grande partie des survivants du sepsis. Néanmoins, quelques études se sont penchées sur le sujet et fournissent d'importantes données qui démontrent une atteinte majeure du muscle squelettique à long terme.

6.1 Conséquences connues à long terme après le sepsis

6.1.1 Données sur le muscle

Le sepsis chez l'Homme est à l'origine d'une faiblesse musculaire persistante sur plusieurs groupes musculaires, allant jusqu'à 5 ans après le passage en USI ^{7,16,128,129}. Elle est associée à la modulation anormale de certains groupes de gènes chez les survivants du sepsis. Ils sont associés à la fonction mitochondriale, le métabolisme lipidique et la fibrose musculaire. La fonction mitochondriale est aussi impactée par des altérations de l'ETC, de la synthèse d'ATP et de la respiration mitochondriale. L'activité du complexe I et de la citrate synthase étaient diminuées réciproquement de 21% et 14%. Au microscope électronique, les observations morphologiques montrent des mitochondries aberrantes avec des structures manquantes, altérées ou possédant des vacuoles. Concernant l'atrophie musculaire, les conclusions sont floues. Une étude a constaté une atrophie essentiellement des fibres de type II, d'autres études ne mentionnent pas d'atrophie musculaire ⁷. Enfin différentes analyses soulignent l'importance de la masse et de la faiblesse musculaire dans le pronostic à long terme après le sepsis ^{130–132}.

En 2019, Owen s'est intéressé aux conséquences musculaires chez la souris jusqu'à 1 mois après le sepsis dans un modèle par injection de selles hétérologues. De la même façon que chez l'Homme, une persistance de la faiblesse musculaire a été observée au niveau de l'EDL, mais sans atrophie. D'autres études ont également retrouvé cette faiblesse musculaire jusqu'à 61 et 70 jours après le sepsis. Les altérations mitochondriales associées étaient nombreuses, il a pu être constaté que 2 semaines après le sepsis, les souris présentaient des mitochondries aberrantes et une diminution des capacités respiratoires. Il en était de même pour les activités enzymatiques des différents complexes mitochondriaux qui étaient diminués et accompagnés d'un stress oxydatif. L'utilisation d'un protecteur du stress oxydatif de la mitochondrie a permis d'améliorer la faiblesse musculaire et l'activité mitochondriale. A noter qu'il subsistait des défauts de régénérations musculaires 21 jours après le sepsis. Cette anomalie proviendrait d'un dysfonctionnement des cellules souches musculaires et notamment de l'altération de leur fonction mitochondriale. Comme vu précédemment, elle peut être à l'origine d'une réponse inflammatoire par la libération de DAMPs. Cependant, quasiment aucune étude ne s'est intéressée à cette problématique à très long terme après le sepsis. Les concentrations plasmatiques des médiateurs inflammatoires Il-6 et TNF- α étaient retournées à la normale 14

jours après le sepsis. Cependant, au niveau musculaire nous n'avons aucune information ^{8,112,133,134}.

En conclusion, les survivants du sepsis à long terme présentent une persistance de la faiblesse musculaire et une dysfonction mitochondriale similaire à celles observées durant la phase aigüe. Cependant, les mécanismes de régulation de la mitochondrie et les voies inflammatoires impliqués dans le muscle squelettique restent encore insuffisamment étudiés.

6.1.2 Au niveau de l'organisme

D'autres études ont étudié les conséquences à long terme mais, sur d'autres organes, cependant, elles pourraient constituer de précieuses banques d'informations afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le muscle. Plusieurs études ont regardé les conséquences au niveau rénal, le rein est un organe fortement impacté durant le sepsis, et une majorité vont développer une insuffisance rénale aigüe (IRA) à la suite du passage en USI. L'IRA peut se transformer en insuffisance rénale chronique par la suite, ce qui démontre une fois de plus la persistance des altérations post-sepsis à long terme. Tout comme le muscle, c'est un organe qui est fortement enrichi en mitochondries, dont le bon fonctionnement est essentiel à son activité. Pendant le sepsis, il a été retrouvé une dysfonction mitochondriale, l'augmentation du stress oxydatif et une réponse inflammatoire de façon similaire aux données sur le muscle ^{135,136}. 14 jours après le sepsis, le rein montre des signes de fibrose ainsi qu'une persistance de marqueurs de l'inflammation ¹³⁷. Une étude à long terme sur le tissu aortique a démontré que le sepsis a accéléré la sénescence endothéliale et vasculaire avec l'augmentation de ROS, de MMP-9, p16, p21, p53 et des altérations des paramètres de contraction et de relaxation de l'aorte ¹³⁸. Au niveau du foie, il a été découvert que le sepsis altérerait son fonctionnement sur le long terme, notamment en entraînant une fibrose hépatique et une inflammation ^{139,140}. Enfin, dans la circulation, il a été retrouvé la présence de différents médiateurs pro-inflammatoires comme Hsp60, Il-6 et TNF- α , de plus, HMGB1 a été retrouvé en augmentation jusqu'au 28ème jours après le sepsis ^{13,58}.

L'ensemble de ces données corroborent les observations réalisées dans le muscle, impliquant une dysfonction mitochondriale et un état inflammatoire. Par ailleurs, les altérations induites par le sepsis semblent persister bien au-delà de la phase aigüe, certains organes présentent

même des signes de sénescence accompagnée d'une fibrose. S'agissant de caractéristiques clés du vieillissement, auxquels s'ajoutent la dysfonction mitochondriale, le stress oxydatif et l'inflammation, cela renforce l'hypothèse d'un vieillissement accéléré à la suite du sepsis.

Partie II – Hypothèses et objectifs

La majorité des patients survivant du sepsis développent une ICUAW qui impacte fortement leur survie et leur qualité de vie. Elle est accompagnée par une dysfonction mitochondriale et une réponse inflammatoire complexe. Le récepteur RAGE, un récepteur impliqué dans l'inflammation et le vieillissement, possède plusieurs de ses ligands qui sont fortement augmentés pendant le sepsis. Il est connu également pour participer à la perturbation de la fonction mitochondriale et au stress oxydatif, ainsi, il pourrait représenter un médiateur clé dans l'apparition et la persistance des altérations musculaires liées au sepsis. Certaines études démontrent l'existence d'une faiblesse musculaire et d'altérations mitochondriales bien au-delà de la phase aiguë du sepsis. Cependant, l'ensemble des altérations à très long terme, incluant la faiblesse musculaire, la dysfonction mitochondriale et l'inflammation, n'ont pas été identifiées et suffisamment caractérisées. Étant donné qu'il s'agit de voies impliquées dans le vieillissement, si, elles s'avèrent retrouvées à distance du sepsis, cela pourrait s'apparenter à un vieillissement accéléré. Ainsi, dans ces circonstances, l'activation de la voie RAGE apparaît comme un mécanisme pertinent, s'inscrivant comme un point de pivot entre la dysfonction mitochondriale, l'inflammation et le vieillissement musculaire induit par le sepsis.

- **Dans ce projet de thèse, l'objectif premier est de mettre en évidence la présence d'altérations du muscle squelettique à long terme après le sepsis dans un modèle murin.**
- **Le second objectif s'intéresse à l'implication du RAGE et à son effet sur le développement des différentes altérations après le sepsis.**

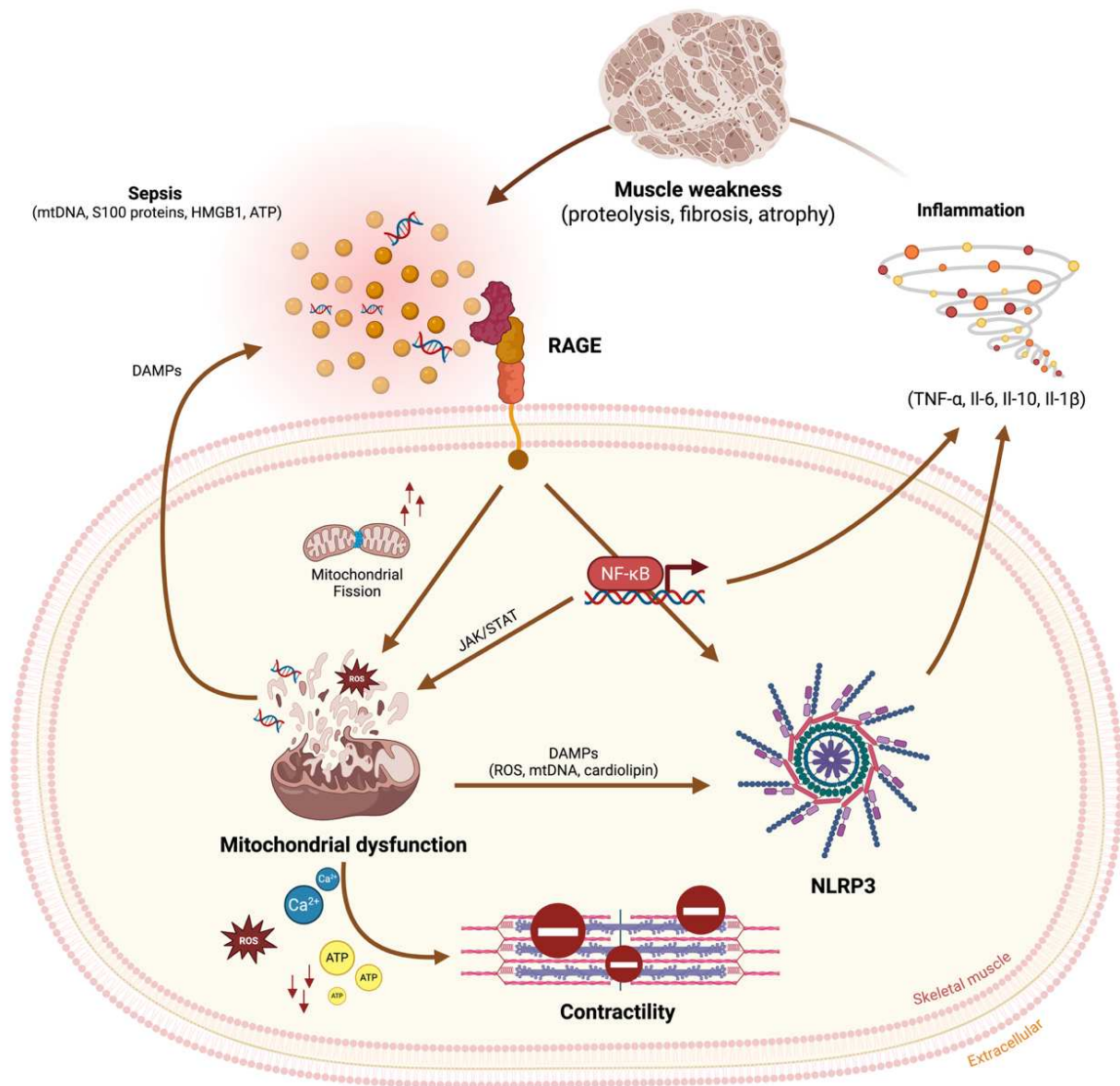


Figure 24. Synthèse schématique de l'hypothèse de travail.

Le sepsis initial est responsable de la libération de plusieurs ligands (DAMPs) du RAGE. Ces derniers sont capables d'induire une dysfonction mitochondriale par l'altération de la morphologie mitochondriale et par l'activation de la voie NF-κB. Une inflammation est alors induite par l'activation et l'assemblage de NLRP3. Il s'installe alors un environnement délétère pour le muscle qui peut conduire à une baisse de la fonction contractile par la dysfonction mitochondriale et qui peut aller jusqu'à la mort de la cellule musculaire. Cela conduit à la libération du contenu cellulaire avec notamment la présence de DAMPs, qui stimulent à nouveau l'activation de RAGE et perpétue un cercle vicieux entre RAGE, la dysfonction mitochondriale, l'inflammation et la faiblesse musculaire à long terme. Biorender.

Partie III - Matériels et méthodes

1. Modèle de sepsis murin

Les souris mâles C57BL/6J de type sauvage (WT) (Charles Rivers Laboratories, Saint Germain Nuelles, France) et les souris mâles WT et *Ager*^{-/-} issues de la même portée, obtenues de souris *Ager*^{+/-} (du Pr. A.M. Schmidt, Université de New York), sont croisées dans notre animalerie et hébergées dans un environnement exempt d'agents pathogènes spécifiques (SPF), avec des cycles de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité à une température constante de 21 °C. Les souris avaient libre accès à la nourriture et à l'eau. Le sepsis a été induit par injection intrapéritonéale (IP) de 400 µL de selles hétérologues. La phase de réanimation a été retardée de 12 heures et a été effectuée toutes les 12 heures pendant 5 jours. Les souris ont reçu une analgésie IP (buprénorphine, 100 µg/kg), des antibiotiques (imipénem-cilastatine, 50 mg/kg) et une hydratation sous-cutanée (NaCl 0,9 %, 25 mL/kg) (Figure 25).

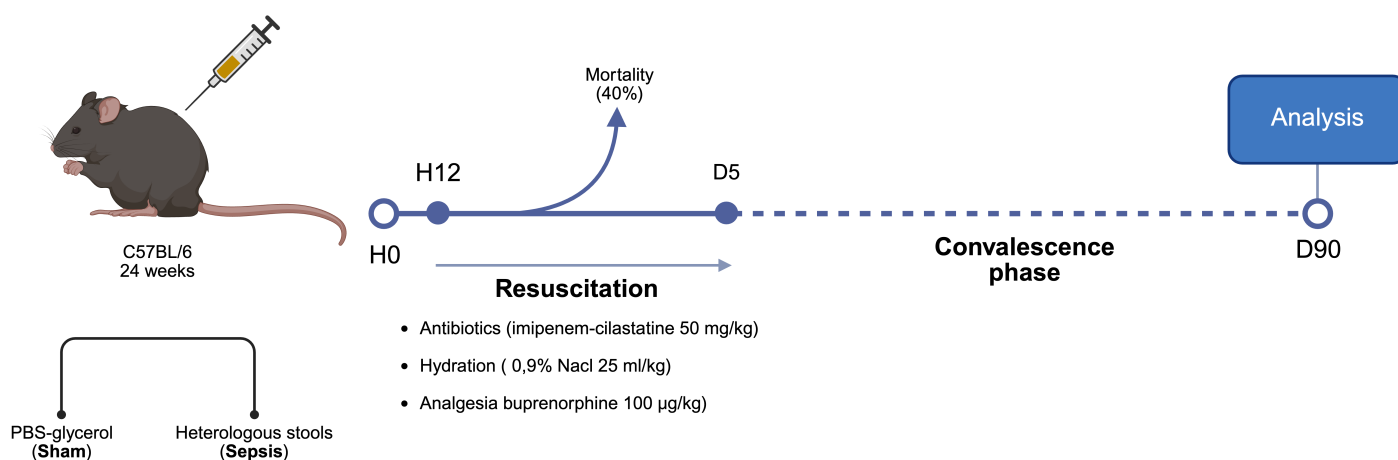


Figure 25. Modèle de sepsis murin par injection de selles hétérologues.

Les souris dans le groupe Sepsis subissaient une injection de selles hétérologues (100 mg/ml, 400 µl) et dans le groupe Sham une injection placebo constitué de PBS-glycerol à 10%, dans les deux groupes une injection d'analgésie était effectuée. La phase de réanimation était retardée de 12 heures et consistait en une injection d'analgésie, d'antibiotique et d'hydratation. Les injections étaient répétées toutes les 12 heures et sur une période de 5 jours. Les souris survivantes étaient ensuite laissées en phase de convalescence jusqu'à l'analyse à 3 mois. Biorender.

La température (Lasergrip 774, Etekcity, Anaheim, États-Unis), le poids et le murine sepsis score (MSS), un score de gravité clinique, ont été surveillés toutes les 12 heures jusqu'au 10ème

jour. Les souris septiques ont été exclues si, 12 heures après l'induction, leur MSS était inférieur à 10/24 ou si leur température était supérieure à 30 °C (Figure 26). Les souris ont été immédiatement euthanasiées par dislocation cervicale si les points limites (MSS > 24/28, absence totale de réaction après stimulation par l'expérimentateur et perte de poids supérieure à 20 % par rapport au poids corporel initial) étaient atteints. Les souris ont été hébergées dans l'animalerie et euthanasiées par dislocation cervicale pour les différentes analyses réalisées. La période de convalescence qui correspond à la période entre la fin de la phase de réanimation et les analyses était de 3 mois. On peut estimer que cette période correspond à environ 5 à 10 ans en comparaison chez l'Homme. Ce choix permet à la fois de disposer d'un délai suffisant pour évaluer les altérations à long terme après le sepsis mais tout en restant réalisable dans un projet de thèse d'un point de vue contraintes expérimentales ^{141,142}. Pour chaque souris, le poids humide de chaque muscle était mesuré à l'aide d'une balance de haute précision (SM 425i, VWR, Radnor, PA, États-Unis). Toutes les procédures animales ont été approuvées par le comité d'éthique local (Éthique de l'expérimentation animale CEEA75, APAFIS #43559-2023050417009712).

<p style="text-align: center;">Murine Sepsis Score</p> <p>7 items évaluant le niveau de sévérité clinique de la souris septique. Chaque item est coté de 0 à 4. 0 est l'état normal, 4 est le grade le plus sévère. Score normal à 0, score maximal à 28.</p>		<p>Apparence</p> <p>0- Le manteau du pelage est lisse.</p> <p>1- Quelques poils ont une piloérection.</p> <p>2- La majorité des poils a une piloérection.</p> <p>3- La piloérection peut être absente, la souris apparaît "gonflée".</p> <p>4- La piloérection peut être absente, la souris apparaît "émaciée".</p>	
Niveau de conscience	0- La souris est active.	Yeux	0- Yeux ouverts.
	1- La souris est active mais évite de se tenir sur ses pattes arrières.		1- Yeux pas complètement ouverts, avec de possibles sécrétions.
	2- L'activité de la souris est ralentie mais la souris déambule toujours.		2- Yeux fermées à moins de la moitié, avec de possibles sécrétions.
	3- L'activité est altérée. La souris ne bouge que lorsqu'elle est stimulée. Les mouvements sont tremblants.		3- Yeux fermées à plus de la moitié, avec de possibles sécrétions.
	4- L'activité est sévèrement altérée. La souris reste stationnaire lorsqu'elle est stimulée. Des tremblements sont possibles.		4- Yeux fermées ou laiteux.
Activité	0- La quantité d'activité est normale. La souris mange, boit, escalade, court, se bat.	Fréquence respiratoire	0- Normal, respiration rapide.
	1- L'activité est légèrement diminuée. La souris déambule dans sa cage.		1- Respiration légèrement diminuée (la fréquence n'est pas quantifiable à l'œil).
	2- L'activité est supprimée. La souris est stationnaire avec des mouvements occasionnels.		2- Respiration modérément diminuée.
	3- Absence d'activité. La souris est stationnaire.		3- Respiration sévèrement diminuée (la fréquence est facilement quantifiable à l'œil, 0,5 seconde entre chaque inspiration).
	4- Absence d'activité. La souris tremble notamment ses pattes arrières.		4- Respiration extrêmement diminuée (plus de 1 seconde entre chaque inspiration).
Réponse au stimuli	0- La souris répond immédiatement au stimuli auditif ou tactile.	Qualité de la respiration	0- Normal.
	1- Faible réponse ou pas de réponse au stimuli auditif. Forte réponse au stimuli tactile (s'échappe).		1- Brèves périodes de respiration laborieuse.
	2- Pas de réponse au stimuli auditif. Réponse modérée au stimuli tactile (fait quelques pas).		2- Respiration laborieuse, pas de gasping.
	3- Pas de réponse au stimuli auditif. Réponse légère au stimuli tactile (pas de locomotion).		3- Respiration laborieuse avec des gasps intermittents.
	4- Pas de réponse au stimuli auditif ou tactile (ne bouge pas si la souris est bousculée).		4- Gasping.

Figure 26. Murine Sepsis Score (MSS).

Tableau représentant les différents critères pris en compte dans l'évaluation du murine sepsis score (MSS) toutes les 12 heures durant la phase de réanimation pendant le protocole de sepsis. Les souris sont évaluées pour leur niveau de conscience, leur activité motrice, la réponse à un stimuli (contact de la souris avec le doigt par exemple), l'apparence du pelage, l'ouverture des yeux, la fréquence de respiration et la qualité de la respiration (régulière, marquée par des pauses, etc.).

2. Préparation des solutions de selles hétérologues

Les solutions de selles injectées dans les souris pour induire le sepsis étaient préparées au laboratoire. Un groupe de souris C57BL/6J Wild-Type (WT) donneuses permettait la récolte des selles au niveau caecum grâce à une spatule après sacrifice de la souris par dislocation cervicale. Ensuite, les selles étaient mélangées à une solution de PBS-glycérol 10% en proportion 100 mg de selles pour 1 ml de solution sous agitation magnétique. Ensuite, le mélange était filtré en plusieurs passages dans des filtres de 100 et 70 µm. Enfin, la solution

était répartie dans des aliquots, puis stockés au congélateur à -80°C permettant un stock et une stabilité des inductions reproductibles sur 1 an.

3. Suivi de la composition corporelle

La composition corporelle était analysée par time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) à une fréquence de 7,5 MHz chez les animaux vigiles toutes les 24 heures pendant 10 jours à compter de l'induction du sepsis (Minispec fl50, 7,5 Mhz, Bruker, Billerica, MA, États-Unis). Au-delà, et jusqu'à 3 mois, l'analyse était réalisée tous les 15 jours. Il s'agit d'une Nuclear Magnetic Resonance (RMN) par relaxométrie, c'est-à-dire qui mesure le temps de relaxation des protons dans les tissus pour les classer selon leur signature de relaxation. Les données recueillies comprenaient la masse maigre (muscles, organes et l'eau intracellulaires – liée au tissu), la masse grasse et la masse des fluides.

4. Tapis de course

La première étape consistait en un exercice d'adaptation pour habituer la souris à courir sur le tapis roulant. La souris était placée sur le tapis roulant statique (treadmill simplex II, Ohio, Columbus Instruments, États-Unis) pendant 2 minutes pour s'acclimater et explorer son environnement, ainsi que la grille électrique. Par la suite, le tapis roulant était réglé progressivement à 10 m/min pendant 10 minutes. A la fin du test, la souris était laissée sur le tapis roulant statique pendant 2 minutes avant d'être replacée dans sa cage. Le test d'effort a été effectué 1 heure après l'acclimatation. La souris était placée sur le tapis roulant statique pendant 2 minutes, puis le tapis roulant était programmé pour fonctionner à 10 m/min progressivement, tandis qu'un chronomètre était déclenché. Toutes les 4 minutes, la vitesse était augmentée de 4 m/min jusqu'à ce que la souris soit épuisée. L'épuisement était considéré comme atteint lorsque la souris restait sur la grille électrique pendant 5 secondes consécutives sans retourner sur le tapis. Les paramètres d'intensité et de fréquence de la grille électrique étaient adaptés en fonction de la réponse de chaque souris aux stimuli électriques. Les procédures expérimentales étaient réalisées en conditions aveugles.

5. Contractilité *ex-vivo*

La contractilité musculaire a été mesurée à l'aide du système DMT Muscle Strip Myograph, couplé au stimulateur CS4+ (820MO, DMT, Hinnerup, Danemark). Les muscles *soleus* ont été disséqués sous irrigation régulière avec une solution de Krebs (120 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1,25 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 11 mM D-glucose et 2 mM Na-pyruvate). Des ligatures proximales et distales ont été réalisées pendant la dissection à l'aide de sutures non résorbables 4.0. Après isolation, les muscles ont été placés dans une chambre de contractilité contenant la même solution de Krebs, oxygénée en continu avec un mélange de carbogène (95 % O₂ / 5 % CO₂), et ajustée à un pH de 7,4. Une phase de stabilisation a été réalisée à une tension passive maintenue de 10 mN. La tension de stimulation optimale a été déterminée sur la base de la réponse contractile maximale aux stimulations de contraction (1 Hz). Une tension supra-optimale de 38 V (+20 %) a ensuite été utilisée pour toutes les analyses. La longueur optimale (L_0) a été progressivement ajustée pour obtenir la force maximale en réponse à la contraction, puis à la stimulation tétanique (150 Hz, 500 ms). Ensuite, un protocole de stimulation automatisé utilisant le logiciel MyoPULSE a été appliqué pour analyser les paramètres de contraction musculaire. La fatigabilité musculaire a été évaluée par une stimulation continue à 40 Hz pendant 120 secondes. La procédure expérimentale a été réalisée en aveugle.

6. Analyse de la CSA musculaire

Les muscles ont été placés sur un support en liège et recouverts de gomme tragacanth (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, États-Unis), avant d'être congelés dans du 2-méthylbutane (M32631, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) réfrigéré à l'azote liquide. Des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (CM3050 S, Leica, Wetzlar, Allemagne). Les coupes musculaires ont été incubées pendant 15 minutes à température ambiante (TA), lavées avec du PBS pendant 5 minutes, puis perméabilisées avec du PBS-Triton-X100 à 0,05 % trois fois pendant 5 minutes à RT. Le blocage a été effectué avec du PBS-BSA à 3 % pendant 1 heure à RT. Chaque coupe a été incubée avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à RT dans du PBS-BSA à 3 %. Une lamelle (Diamant Star, Menzel-Gläser, Braunschweig, Allemagne) a été montée sur chaque lame à l'aide de fluoromont (F4680, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis). Les coupes ont été imagées à l'aide d'un scanner de

lames automatisé (Axioscan Z1, Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Les images ont été analysées automatiquement à l'aide du plugin MuscleJ2 du logiciel Image J afin d'obtenir des données phénotypiques et des données sur la section transversale.

7. Culture cellulaire de myoblastes - C2C12

Les myoblastes murins ont été obtenus auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1772, Manassas, Virginie, États-Unis). Les cellules ont été cultivées dans un milieu Dulbecco modifié à haute teneur en glucose (4,5 g/L) (DMEM – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis), complété par 10 % de sérum fœtal bovin (FBS – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) et 1 % de pénicilline/streptomycine (P/S – Thermo Fisher Scientific). Les passages étaient réalisés lorsque la confluence atteignait au maximum 70-80% et à l'aide de 0.05% trypsin-EDTA (Fischer, 11580626). La différenciation était initiée lorsque la confluence atteignait 90 % et en remplaçant le milieu de croissance par du DMEM à haute teneur en glucose, complété par 2 % de sérum de cheval (HS, Dominique Dutsher, Bernolsheim, France) et 1 % de P/S. Après 7 jours de différenciation, les cellules ont été traitées pendant 14 jours par du LPS à 100 ng/ml (LPS, L2880, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, États-Unis) ou le solvant (PBS) uniquement ajouté au milieu de différenciation. Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère humide avec 5 % de CO₂ à 37 °C. Les changements de milieu ont été effectués toutes les 48 ou 72 heures.

8. Respirométrie haute résolution sur fibres perméabilisées de muscle

Les protocoles pyruvate/malate/glutamate (PMG) et fatty acid oxydation (FAO) permettaient d'évaluer la respiration mitochondriale induite par les différents complexes de manière séquentielle, par le complexe I, le complexe II et enfin le complexe IV sur des fibres perméabilisées de *soleus* et d'*extensor digitorum longus* (EDL). Les fibres étaient placées dans du BIOPS (2,77 mM, CaK₂EGTA, 7,23 mM, K₂EGTA, 0,5 mM, 6,56 mM MgCl₂-6H₂O, 15 mM Na₂phosphocréatine, 0,5 mM dithiothréitol, 5,77 mM Na₂ATP, 20 mM imidazole, 20 mM taurine, 50 mM MES-hydrate, pH 7,1) à 4 °C pour une dissociation mécanique. Les fibres obtenues étaient perméabilisées chimiquement dans 1,5 ml de BIOPS contenant de la saponine

(50 µg/µL) à 4 °C pendant 30 minutes, sous agitation douce. Lavage deux fois dans un tampon de respiration Mir05 (60 mM d'acide lactobionique, 3 mM de MgCl₂-6H₂O, 20 mM de taurine, 20 mM d'HEPES, 110 mM de saccharose, 10 mM de KH₂PO₄, 0,5 mM d'EGTA, 1 g/L d'albumine sérique bovine (BSA) sans acide gras, pH 7,1), les fibres musculaires (2-4 mg) ont été placées dans des chambres O2K hyperoxygénées (400 nmol O₂/L, Oroboros Instruments, Innsbruck, Autriche) et la consommation d'oxygène a été mesurée à 25 °C. Deux protocoles ont été mis en œuvre. Le premier protocole était le suivant : (i) ajout de pyruvate (5 mM), de malate (2 mM) et de glutamate (10 mM) pour évaluer la consommation d'oxygène (J_{O₂}) lorsque la chaîne de transfert d'électrons (ETC) n'est pas couplée à l'ATP synthase (notée LEAK) ; (ii) l'ajout d'ADP (5 mM) pour évaluer le J_{O₂} lorsque l'ETC alimentée en électrons par le complexe I (CI-CIV) est liée à l'ADP synthase (condition de phosphorylation oxydative - OXPHOS) ; (iii) injection de l'inhibiteur du complexe I, la roténone (0,5 µM), et de succinate (10 mM) pour évaluer la J_{O₂} avec des électrons circulant du complexe II au complexe IV (CII-CIV) dans des conditions OXPHOS ; (iv) l'ajout de l'inhibiteur du complexe III antimycine A (2,5 µM) et l'ajout d'ascorbate (2 mM) et de tétraméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride (0,5 mM) pour mesurer le J_{O₂} maximal du complexe IV (CIV). Le deuxième protocole consistait en : (i) l'injection d'octanoyl-L-carnitine (0,5 mM) et de malate (2 mM) pour évaluer la fuite ; (ii) l'ajout d'ADP (5 mM) pour mesurer le J_{O₂} dans des conditions OXPHOS (figure 27). Au cours de chaque protocole, du cytochrome c (10 µM) a été ajouté pour tester l'intégrité de la membrane mitochondriale externe : les expériences ont été exclues si l'augmentation du J_{O₂} était supérieure à 15 % après). Le système a été calibré en début d'expérience, après une phase de stabilisation de 15 minutes à la pression atmosphérique avec les stoppers ouverts, puis de nouveau en fin de mesure par addition d'hydrosulfite de sodium.

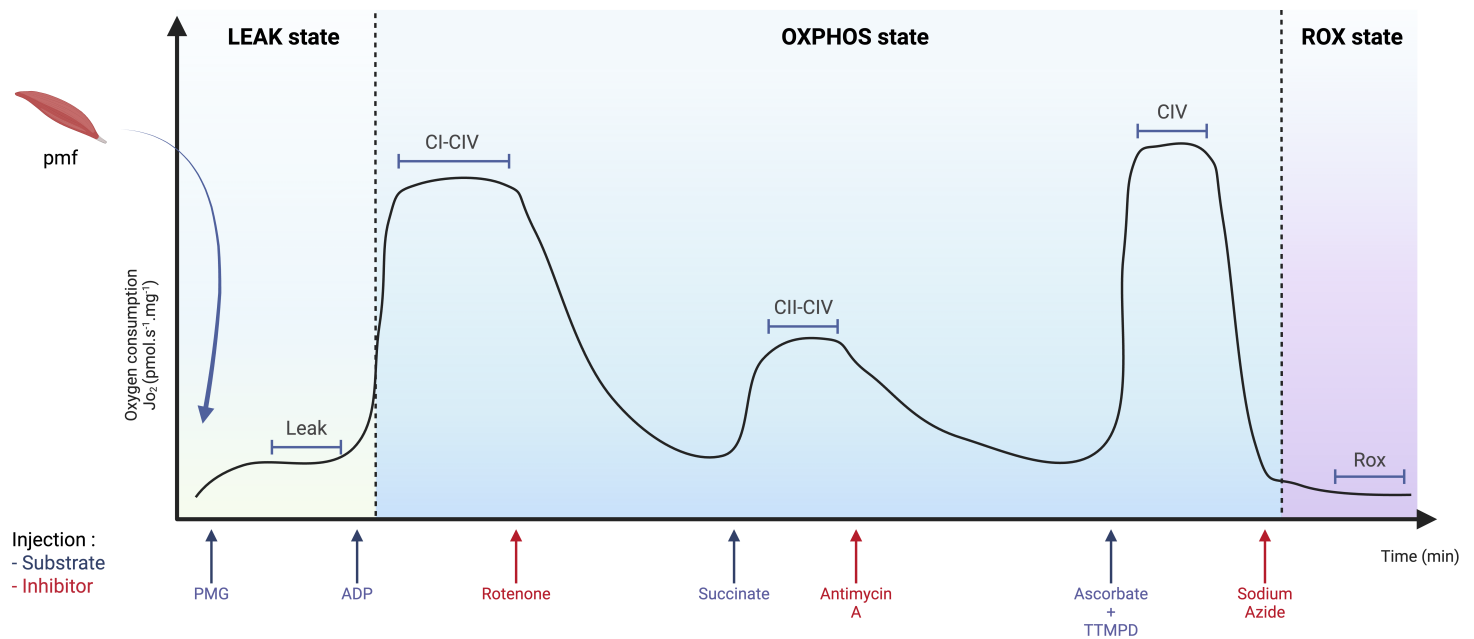


Figure 27. Protocole de respirométrie haute résolution sur fibres perméabilisées musculaires.

Courbe représentative du protocole pyruvate-glutamate-malate (PMG) évaluant la consommation d'oxygène (J_{O_2}) des fibres musculaires perméabilisées du *soleus* (pmf) de souris par respirométrie haute résolution à l'aide d'injections successives et séquentielles : le pyruvate (5 mM), malate (2 mM) et glutamate (10 mM) permettent d'évaluer l'état leak (associé à la fuite de protons) ; l'ADP (5 mM) permettant d'évaluer l'état de phosphorylation oxydative (OXPHOS) dépendante de l'activité du complexe I au IV ; la roténone (Rot, 0,5 μ M) et succinate (10 mM) donnent l'état OXPHOS médié du complexe II au IV ; l'antimycine A (2,5 μ M), l'ascorbate (2 mM) et le TMPD (0,5 mM) donnent l'état OXPHOS médié par le complexe IV uniquement et enfin, l'azide de sodium (100 mM) permet d'évaluer l'état ROX qui donne la valeur de la respiration indépendante de la fonction mitochondriale. Biorender.

9. Respirométrie haute résolution sur cellules musculaires

Des cellules C2C12 différenciées en myotubes et mises en suspension dans un milieu de différenciation ont été placées dans les chambres du système O2K (0,5 million/mL) à 37°C. Après stabilisation (respiration basale), l'inhibiteur de l'ATP synthase, l'oligomycine (10 μ M) a été ajouté afin d'évaluer le J_{O_2} en l'absence de production d'ATP (LEAK). Des injections séquentielles du découpleur 3-chlorophénylhydrazone carbonyl cyanide (CCCP, 1 μ M par injection) ont été effectuées afin d'obtenir le J_{O_2} maximal (respiration maximale). Enfin, la capacité respiratoire de réserve a été calculée en soustrayant la respiration basale à la respiration maximale. La dernière étape consistait à ajouter de l'azide de sodium pour inhiber le complexe IV et l'activité de l'ETC, la respiration résiduelle mesurée correspondait à la respiration non mitochondriale (Figure 28). Le système a été calibré en début d'expérience, après une phase de

stabilisation de 15 minutes avec le stopper ouvert, puis de nouveau en fin de mesure par addition d'hydrosulfite de sodium.

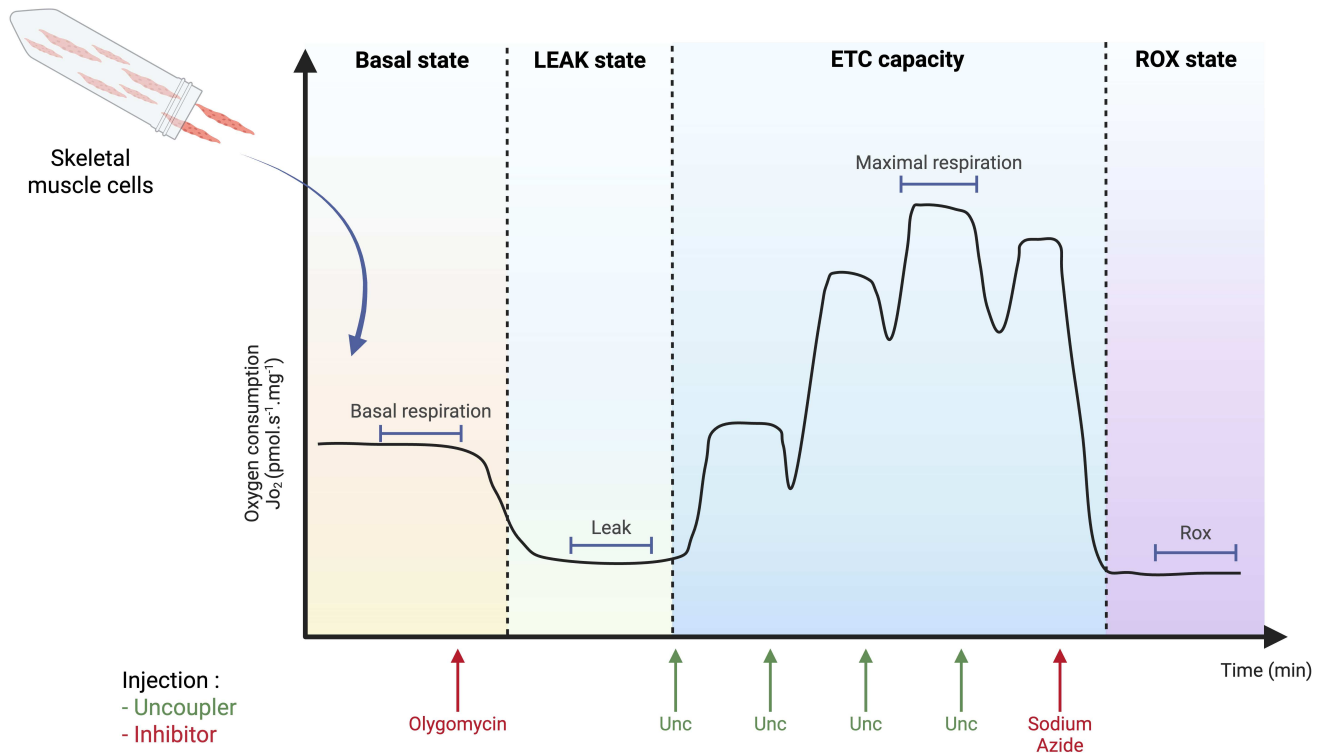


Figure 28. Protocole de respirométrie haute résolution sur cellules musculaires.

Courbe représentative du protocole de consommation d'oxygène (J_{O_2}) réalisé sur des myotubes par respirométrie haute résolution après injections successives et séquentielles : l'oligomycine ($10 \mu\text{M}$) permet d'évaluer la respiration leak (fuite de protons) ; le découpleur (Unc, $1 \mu\text{M}$) injecté plusieurs fois (sous forme de pulse) permet d'évaluer la respiration maximale atteinte par l'ETC et l'azide de sodium (100 mM) permet d'évaluer l'état ROX qui correspond à la respiration non mitochondriale. La basal respiration correspond à la respiration de routine/basale entretenue par les cellules dans leur milieu sans ajout de substrats ou d'inhibiteurs. Biorender.

10. Western-blot

Le *quadriceps* a été pulvérisé en poudre à l'aide d'un broyeur cellulaire (Cellcrusher, Schull, Co. Cork, Irlande). Un tampon de lyse RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, $0,1 \%$ SDS, 150 mM NaCl, 1% désoxycholate de sodium, 1% Triton), contenant 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle (#36978, Thermo Fisher, MA, États-Unis) et 1 mM de cocktail inhibiteur de protéase/phosphatase (#5872, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, États-Unis) a été ajouté à environ 20 mg de poudre musculaire ($60 \mu\text{L}/\text{mg}$). Les échantillons ont

ensuite été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis) et centrifugés à 15 000 g pendant 10 minutes à 4 °C. La concentration en protéines du surnageant a été déterminée à l'aide du réactif de Bradford (B6916, Sigma, Burlington, VT, États-Unis). 40 µg de protéines ont été mélangés à une solution de LDS et à une solution d'agent réducteur (B0008, B0009, Thermofisher, Waltham, MA, États-Unis) et dénaturés pendant 10 minutes à 70 °C. Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse dans un tampon Tris-glycine (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3) sur des gels de polyacrylamide SDS 8-15 %. Les protéines étaient transférées sur des membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis) à l'aide du système de transfert Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis). Les membranes ont été incubées dans une solution de lait ou de BSA à 5 % dans une solution saline tamponnée au Tris contenant 0,1 % de Tween 20 (TBST), puis incubées pendant une nuit à 4 °C avec l'anticorps primaire, suivie d'une incubation d'une heure avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort ou à un fluorophore. Les complexes protéiques ont été révélés par chimiluminescence (kit Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis) ou par fluorescence (Odyssey Fx, Li-Cor, Lincoln, NE, États-Unis). L'expression des protéines a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, MD, États-Unis, <https://imagej.nih.gov/ij/>) et normalisée avec la protéine glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GADPH).

11. Expression génique par qPCR

Environ 20 mg de poudre de *quadriceps* obtenue à l'aide du Cell Crusher ont été homogénéisés dans 1 ml de TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, États-Unis), et les acides ribonucléiques (ARN) totaux ont été extraits conformément au protocole du fabricant. Un traitement à la DNase (DNASE, Thermofisher, Waltham, MA, États-Unis) a été effectué à 37 °C pendant 30 minutes, puis inactivé par un traitement à l'EDTA à 65 °C pendant 10 minutes dans un thermocycleur (BioRad MJ Mini Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis). 1 µg d'ARN a été collecté pour la rétrotranscription à l'aide du kit de transcriptase inverse à haute capacité pour ADNc (Thermo Fisher, Waltham, MA, États-Unis) dans un thermocycleur (25 °C pendant 10 minutes, 37 °C pendant 2 heures et 85 °C pendant 5 minutes). Les qPCR ont été réalisées et suivies en temps réel à l'aide du kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA, États-Unis) et du système QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied

Biosystems, Waltham, MA, États-Unis), respectivement. La quantification relative a été obtenue à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

12. Expression génique par quantigene

Les *quadriceps* (environ 4-5 mg) ont été placés dans 40 μ L de solution d'homogénéisation (50 mg/mL de protéinase K (QP1013) et solution d'homogénéisation (QS0106) dans un rapport de 1:100). Les échantillons ont été préparés par incubation à 65 °C pendant 30 minutes, puis agités par vortex toutes les 5 minutes jusqu'à obtention d'un mélange homogène. Ensuite, les solutions obtenues étaient utilisées conformément aux instructions du fabricant (Thermo Fisher Scientific). Les plaques ont été lues à l'aide d'un Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis), le bruit de fond a été soustrait et les valeurs ont été normalisées par rapport à la moyenne géométrique des gènes de référence (Rpl23, Rpl32 et Pgk1).

13. Quantification de l'ADNmt

L'ADN total a été isolé à partir de 20 mg de *quadriceps* à l'aide du kit QIAamp Fast DNA tissue (QIAGEN, Hilden, Allemagne), conformément au protocole du fabricant. 40 pg d'ADN total ont été utilisés pour réaliser la qPCR. Les qPCR ont été réalisées et suivies en temps réel à l'aide du kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher, Waltham, MA, États-Unis) et du système QuantStudio 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, MA, États-Unis), respectivement. La quantification relative du gène mitochondrial NADH déshydrogénase 1 (ND1) sur le gène nucléaire peptidyl-prolyl cis-trans isomérase (PPIA) a été réalisée à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

14. Tableau et caractéristiques des anticorps utilisés

Cible	Référence	Fabriquant	Dilution
Primary antibody			
OXPHOS	stn-19467	abcam	1/3000
3-NT	ab-61392	abcam	1/3000
Hsp60	sc-59567	Santa Cruz Biotechnology	1/3000
Csp-1	AG-20B-0042-C100	AdipoGen Life Sciences	1/3000
Sod2	F0508	H&W Biotech	1/1000
MHC IIa	SC-71	DSHB	1/100
MHC IIb	BF-F3	DSHB	1/50
MHC I	BA-D5	DSHB	1/50
Laminine	4h8-2	DSHB	1/100
Secondary Antibody			
Mouse IgG 700	926-68170	Li-Cor	1/10000
Mouse IgG 800	925-32212	Li-Cor	1/10000
Rabbit IgG 700	926-68071	Li-Cor	1/10000
Rabbit IgG 800	827-08365	Li-Cor	1/10000
Mouse IgG1 (Alexfluor 488)	A-21121	Thermofisher	1/250
Mouse IgM (Alexfluor 555)	A-21426	Thermofisher	1/250
Mouse IgG2b (Alexfluor 647)	A-21242	Thermofisher	1/250
Rat IgG (Alexfluor 555)	A-48261	Thermofisher	1/250
Mouse IgG	7076	Cell signaling	1/5000
Rabbit IgG	7074	Cell signaling	1/5000

15. Tableau et caractéristiques des amorces qPCR

	Sequence : forward	Sequence : reverse	Accession number
<i>Nd1</i>	TCCGAGCATCTTATCCACGC	GTATGGTGGTACTCCCGCTG	NC_005089.1
<i>Ppia</i>	ACACGCCATAATGGCACTGG	CAGTCTTGGCAGTGCAGAT	NM_008907.2
<i>Pgcl1a</i>	CGGAAATCATATCCAACCAG	TGAGGACCGCTAGCAAGTTTG	NM_008904.3
<i>Nrf1</i>	TGCATCTCACCCCTCCAAACC	GAAGCTGAGCCTGGGTCATT	NM_001164226.1
<i>Nrf2</i>	ATGGAGCAAGTTTGGCAGGA	GCTGGGAACAGCGGTAGTAT	NM_010902.5
<i>Tfam</i>	ACCGTATTGCGTGAGACGAA	CAGACAAGACTGATAGACGAGGG	NM_009360.4
<i>Lipin</i>	GCTCGTGAATCCTCTTGGTTC	GAGCTCCTTCACCGTCACAA	NM_172950.3
<i>Cpt1a</i>	ACGTTGGACGAATCGGAACA	TGGACTTGTCAAACCACCTGT	NM_013495.2
<i>Cpt1b</i>	AAGTTCAGAGACGAACGCCC	AAGTTCGGCGATGTCCAACA	NM_009948.2
<i>Cact</i>	CCGAAACCCATCAGTCCGTT	GTCTGCAGTCGGACCTTGAC	NM_020520.5
<i>Cpt2</i>	TGAGAACGGCATTGGGAAGG	ATCAAACCAGGGGCCTGAGA	NM_009949.2
<i>Acad5</i>	AAGTATGCCGAGAACCGCAA	TCTGCCAGCTTGAAGTGGAT	NM_007383.3
<i>Acad9</i>	AGCTGGACAAGAACGCTCC	GGGCACAGATATAGGCTCGC	NM_172678.4
<i>Hadha</i>	AAGCCTTTGGGGAGCGATTT	TCCCAGACTTGCGACCTAAG	NM_178878.3
<i>Echs1</i>	GAACACATCGTCTCTCCGCC	TGAAAGTTAGCACCCGAGGC	NM_053119.3
<i>Il-6</i>	CCACGGCCTTCCCTACTTCA	CCACGATTTCACAGAGAACATG	NM_031168.2
<i>Nlrp3</i>	CCCTTGGAGACACAGGACTC	GAGGCTGCAGTTGTCTATTCC	NM_145827.3
<i>Ager</i>	CAGTGTCCCTAATAAGGTGGGG	CGCAGTGTAAGAGTCCC GT	NM_001271422.1
<i>Mmp2</i>	GAGAAGGACAAGTGGTCCGC	GCTGTATTCCCGACCGTTGA	NM_008610.3
<i>Mmp3</i>	CCCTGGGACTCTACCACTCA	GCTGTGGGAGTTCCATAGAGG	NM_010809.2
<i>P21</i>	GCAGAATAAAAGGTGCCACAGG	GACAACGGCACACTTTGCTC	NM_001111099.2
<i>P53</i>	GCTTCTCGACCCTGCTAGAT	CCTCCATGGCAGTCATCAAGA	XM_030245922.1

<i>H2ax</i>	CTCCCCACACCTCCACAAAG	CCCGAAGTGGCTCAGCTC	NM_010436.2
<i>S100A8</i>	GGAGTTCCTTGCGATGGTGA	GGCCAGAAGCTCTGCTACTC	NM_013650.2
<i>S100A9</i>	AGCTGCATGAGAACAACCCA	CAGCCTTTGCCATGACTGTG	NM_009114.3

16. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 10 (GraphPad, San Diego, Californie, États-Unis). Les valeurs quantitatives sont exprimées sous forme de moyennes avec erreur standard de la moyenne (SEM). Les courbes de survie de Kaplan-Meier ont été comparées à l'aide du test du log-rank. Après avoir effectué le test de normalité de Shapiro-Wilk, les comparaisons entre deux groupes ont été réalisées à l'aide du test t de Student ou du test de Mann-Whitney. Les comparaisons entre trois groupes ou plus ont été effectuées à l'aide d'un test one-way ANOVA avec un test post-hoc de Sidak ou de Fisher si les valeurs suivaient une distribution normale (test de Shapiro-Wilk), sinon un test de Kruskal-Wallis a été effectué avec un test post-hoc de Dunn. Les comparaisons entre trois groupes ou plus à l'aide d'un two-way ANOVA ont utilisé le test post-hoc de Tukey ou de Benjamini-Krieger-Yekutieli two- stages.

Partie IV - Résultats

1. Caractérisation du modèle de sepsis murin à long terme

La première étape de ce projet a été d'élaborer un modèle de sepsis murin qui permettrait d'étudier les altérations à long terme après le sepsis. Il a donc été choisi de s'orienter sur le modèle de sepsis murin induit par injection de selles hétérologues déjà maîtrisé au laboratoire au moment de mon arrivé. Ce modèle a servi à étudier les altérations post-sepsis à H24 et J10 et reproduit de manière fiable la faiblesse musculaire, la dysfonction mitochondriale et l'inflammation post-sepsis ^{107,143}.

La mortalité des souris sepsis durant la phase de réanimation était d'environ 40%, qui est similaire aux données de mortalité retrouvées chez l'Homme durant le passage en USI (Figure 29A). Nous avons monitoré différents paramètres (poids, température, MSS) chez les souris durant les 10 premiers jours. Les souris survivantes au sepsis présentent une diminution du poids à partir de 60 heures et une augmentation du MSS à partir de 12 heures et cela jusqu'au 10eme jour (Figure 29B, C). Elles sont également en hypothermie à partir de la 12eme heure et vont retrouver une température similaire et stable aux souris Sham à partir de la 168eme heure (Figure 29D).

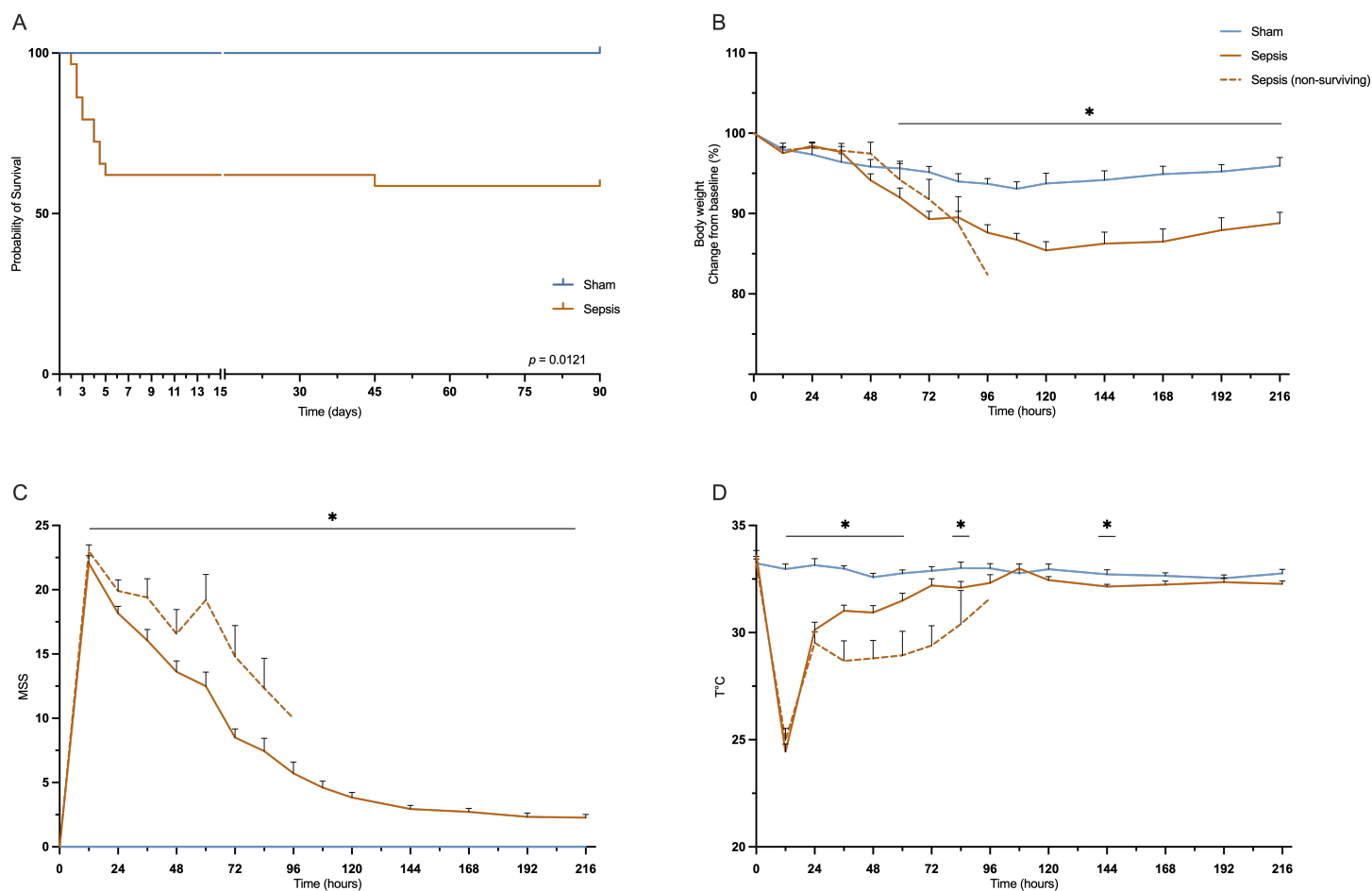


Figure 29. Suivis de la mortalité et clinique des souris survivantes au sepsis pendant 3 mois et les 10 premiers jours chez la souris.

Courbe de Kaplan-Meier de survie (A) pour les souris Sham (n=12) et Sepsis (n=29). Variations du poids (B), du MSS (C) et de la température (D) mesurées chez les souris Sham (n=12), Sepsis (n=17) et sepsis non-survivantes (n=12). Comparaisons statistiques entre Sham vs Sepsis (*). Les données sont analysées avec un log-rank test (A) et two-way ANOVA with Tukey post-hoc (B, C, D). * $p < 0.05$.

Ainsi, ces résultats nous indiquent que le modèle de sepsis murin présenté ici permet bien d'induire des altérations cliniques quantifiables traduisant une réponse systémique associée à un état septique.

Nous avons également poursuivi de façon bimensuelle, le relevé des paramètres de la composition corporelle jusqu'au sacrifice des souris. Durant la phase précoce (10 premiers jours) il existe des variations dans le poids, la masse maigre, grasse et des fluides qui tendent tous à rentrer dans l'ordre à partir de 15 jours (Figure 30A, B, C et D). Cependant, il persiste une perte de poids des souris sepsis par rapport à leur poids initial qui reste diminué jusqu'à un mois après le sepsis. De plus, une augmentation de la masse des fluides chez les souris survivantes du sepsis comparées aux souris sham pendant le premier mois est constatée (Figure

30A,D). Les résultats indiquent ici que malgré des variations durant la phase précoce de la composition corporelle, il semble que dans le long terme, il n'y ait pas de modifications persistantes. Cependant, ces propos sont à nuancer puisque nous avons tout de même des variations du poids et de la masse des fluides qui continuent au-delà de la phase précoce et peuvent sous-entendre des altérations métaboliques persistantes à moyen terme.

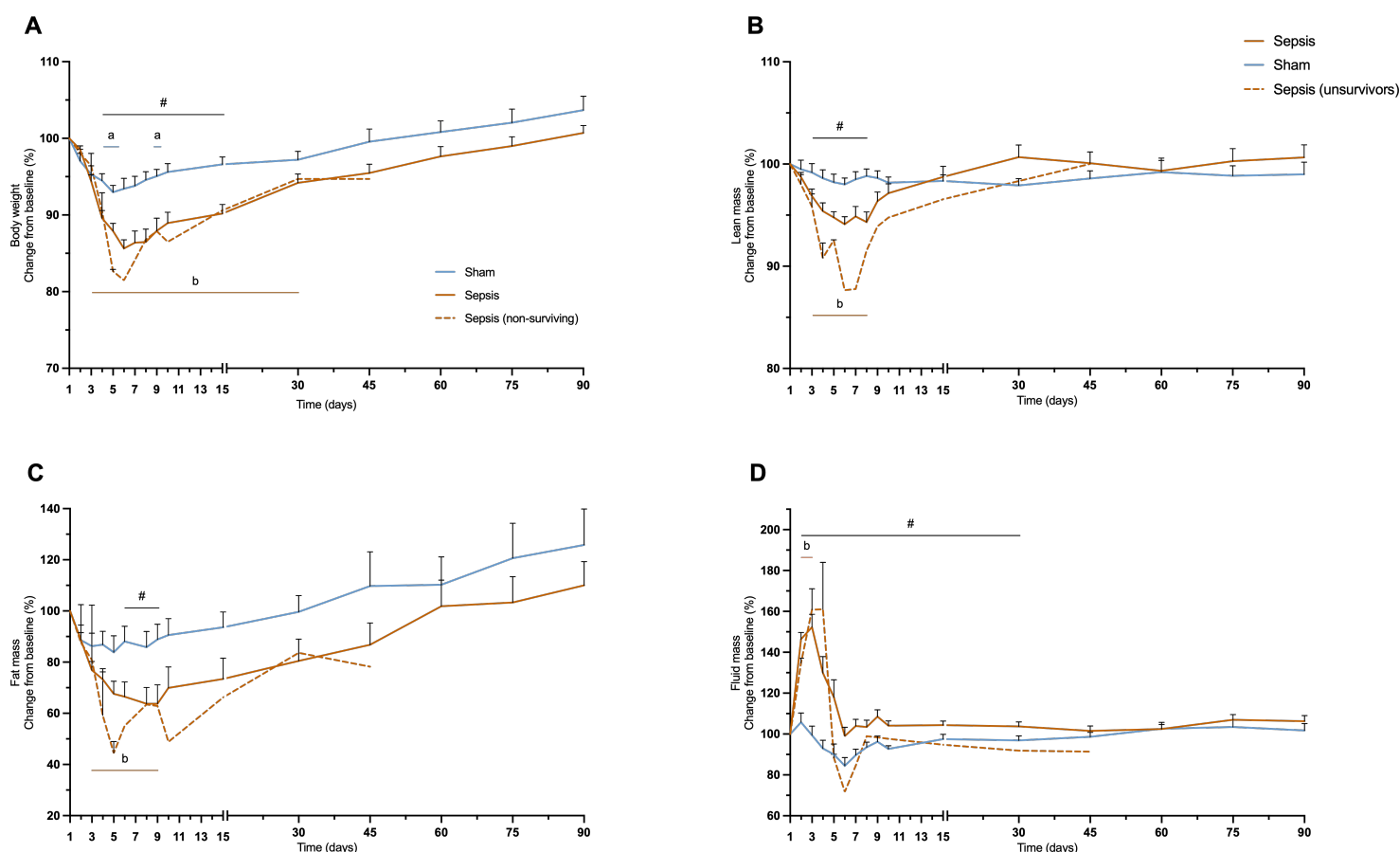


Figure 30. Le sepsis n'induit pas de changements de la composition corporelle à long terme après le sepsis.

Variations comparées à la baseline en poids (A), en masse maigre (B), en masse grasse (C) et en masse des fluides (D) ont été mesurées chez les souris Sham (n=12), Sepsis (n=17) and sepsis non-survivantes (n=12). Les comparaisons statistiques sont réalisées entre Sham vs Sepsis (#), Sham vs baseline (a), Sepsis vs baseline (b). Les données sont analysées par un two-way ANOVA avec un Tukey post-hoc (A, B, C, D). # < 0.05.

En conclusion, notre modèle de sepsis murin présente des altérations typiques d'une réponse de l'organisme à une infection. Elles se manifestent rapidement après l'induction en sepsis et s'accompagnent d'une mortalité similaire aux données observées en clinique. Ces résultats indiquent que le sepsis ne semble pas altérer à cette échelle les différents compartiments de

l'organisme, dont la masse maigre à 3 mois. Néanmoins, cette première approche n'est pas suffisante pour conclure sur la potentielle réduction de la masse musculaire après le sepsis.

2. Les souris survivantes du sepsis à long terme ne présentent pas d'atrophie des fibres oxydatives

Le prochain objectif était d'analyser plus précisément la présence d'une potentielle atrophie musculaire. Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord commencé par récolter les muscles inférieurs de la souris (*soleus*, *tibialis anterior*/TA, EDL, *quadriceps*, *gastrocnemius*) et les avons mesurés. Nous avons aussi analysé le poids humide de souris âgées (18 mois) versus des souris jeunes (2 mois), cela dans le but d'avoir des données liées au vieillissement et de références. Nous pouvons observer que le vieillissement entraîne de manière générale une perte de masse musculaire sur les muscles. A noter que seul le *Soleus* ne semble pas impacter par cette perte de poids (Figure 31A). Concernant les souris survivantes du sepsis, on peut observer qu'il n'y a pas de perte de masse musculaire (Figure 31B). Ainsi, il ne semble pas y avoir d'atrophie musculaire, du moins, pas à cette échelle d'analyse comparée au vieillissement.

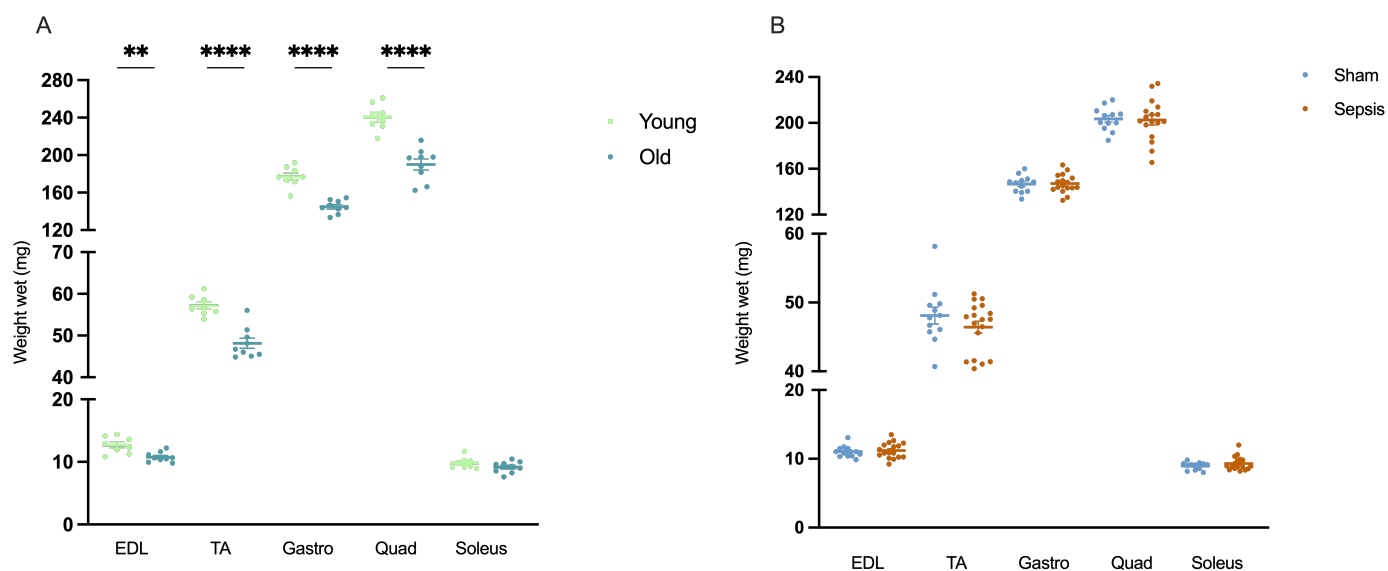


Figure 31. Le poids humide des souris survivantes au sepsis n'est pas impacté à long terme.

Analyse du poids humide des muscles EDL, TA, *gastrocnemius*, *quadriceps* et *soleus* entre souris jeunes de 2 mois (Young, n=8) et âgées de 18 mois (Old, n=9) (A), puis entre souris Sham (n=12) et Sepsis (n=18) (B). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les données sont analysées par un t-test (A, B). ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Cependant, cette approche n'est pas très précise, il n'est pas pris en compte uniquement la masse musculaire, la masse du tissu conjonctif et des fluides peuvent jouer sur le poids final. Afin de compléter cette étude, nous avons réalisé une analyse sur des coupes histologiques de TA via un marquage de la laminine et des différents types de fibres permettant d'avoir une analyse plus fine de la CSA en fonction des différents types de fibres et de leur répartition (Figure 32A). L'aire moyenne des fibres diffère entre les deux groupes de souris, mais, si l'on regarde plus en détail, on peut observer une diminution de la CSA des fibres préférentiellement glycolytiques de types IIx et IIb (Figure 32B). Enfin, après le sepsis on n'observe pas de réarrangement dans les proportions en fonction des différents types de fibres (Figure 32C).

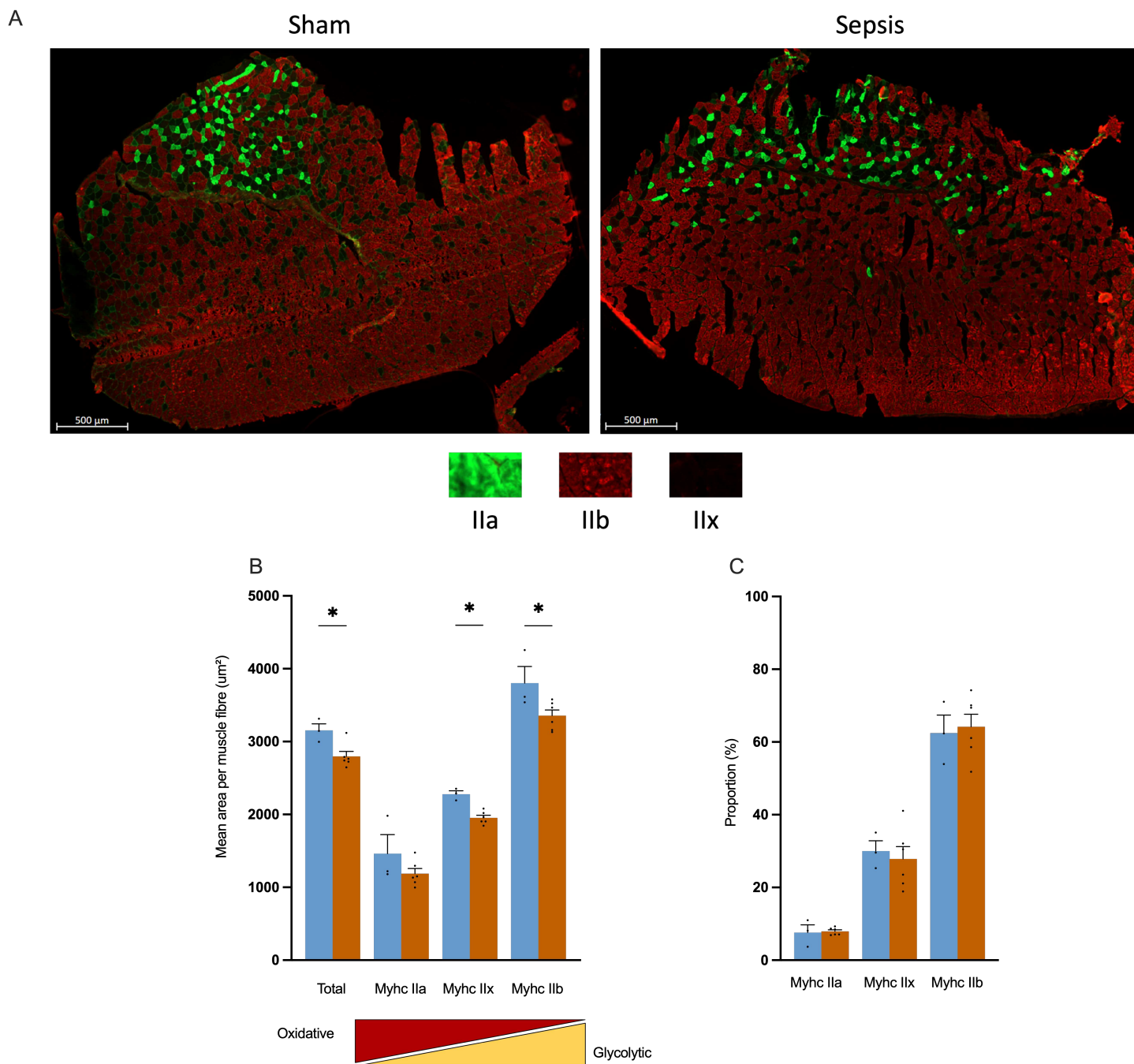


Figure 32. Les fibres musculaires oxydatives ne sont pas impactées par l'atrophie.

Images représentatives de microscopie à fluorescence de TA des souris Sham (à gauche) et Sepsis (à droite) (A), pour les fibres de type IIa en vert, IIb en rouge et IIx qui correspond à l'ensemble des fibres non marquées. La surface de chaque fibre (C) et la répartition des fibres (B) par muscle ont été mesurées et quantifiées par le plugin MuscleJ2 (Fiji) pour les souris Sham (n=3) et Sepsis (n=6). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les données sont analysées par un test Mann-Whitney (B, C). * $p < 0,05$.

En complément de l'analyse morphologique par CSA et de la masse humide, nous avons regardé différents marqueurs impliqués dans le métabolisme et la régénération musculaires tels que FGF21, GDF-8 (myostatine) et Pax7. L'analyse de l'expression de ces gènes régulateurs

permet d'apprécier l'état du métabolisme du muscle squelettique, en distinguant une orientation vers l'anabolisme et l'hypertrophie, le maintien d'un métabolisme basal ou, au contraire, l'activation de voies cataboliques susceptibles de souligner l'atrophie musculaire. Aucune modification significative de l'expression de ces gènes n'a été constatée, indiquant une absence de variation transcriptionnelle détectable de ces voies, 3 mois après le sepsis (Figure 33).

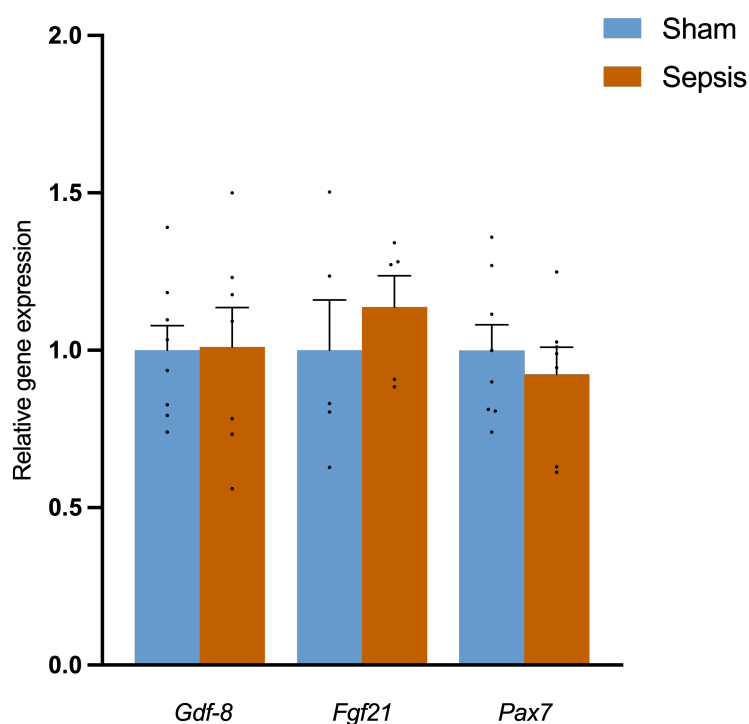


Figure 33. Le métabolisme et la régulation musculaire ne sont pas affectés à long terme après le sepsis.

Analyse par qPCR de l'expression relative des ARNm de *Gdf-8*, *Fgf21* et *Pax7* dans le *quadriceps* dans les groupes Sham (n=8, 5) et Sepsis (n=7). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*). Les données sont analysées avec un test de Mann-Whitney.

Ces résultats obtenus sur la masse musculaire démontrent qu'il existe une possible atrophie des fibres essentiellement glycolytiques mais que les fibres oxydatives ne sont pas impactées à long terme après le sepsis.

3. Le muscle squelettique des souris survivantes du sepsis présente une régulation à la hausse de voies associées à la fibrose

La présence d'une fibrose musculaire à long terme après le sepsis chez l'Homme est une des rares altérations observées de façons répétées. De plus, il s'agit d'une composante majeure du vieillissement et pourrait indiquer que le muscle présente des caractéristiques d'un vieillissement pathologique induit par le sepsis. Pour réaliser ce travail, nous avons analysé l'expression de différents gènes impliqués dans le processus de fibrose. La hausse de l'expression de *Mmp9* et de *Tgf- β 1* dans le *quadriceps* laisse penser qu'il y a potentiellement une présence de fibrose chez les souris survivantes du sepsis (Figure 34).

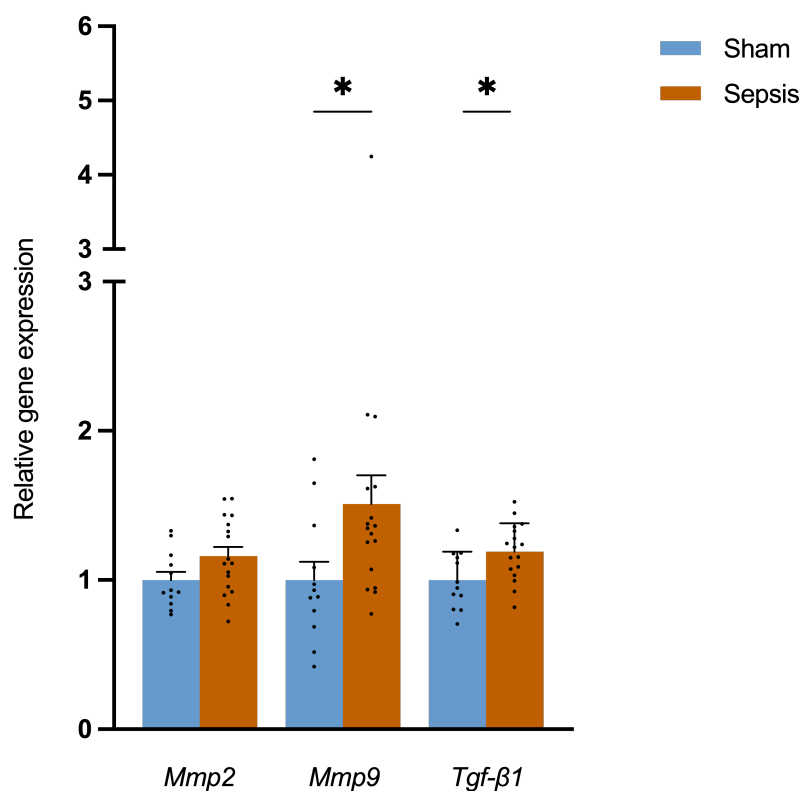


Figure 34. Augmentation de l'expression des gènes associés à la fibrose chez les souris survivantes au sepsis.

Analyse par quantigène de l'expression relative des gènes *Mmp2*, *Mmp9* et *Tgf- β 1* dans le *quadriceps* des groupes Sham (n=12) et Sepsis (n=17). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les données ont été analysées avec un t-test ou un test Mann-Whitney. * p<0,05.

4. La résistance à la fatigue du muscle oxydatif est diminuée chez les souris survivantes du sepsis

L'étude du phénotype musculaire a été finalisée par l'étude des capacités contractiles. Nous avons analysé les performances de contractilités du *soleus* chez les souris survivantes du sepsis. Les capacités de l'EDL n'ont pas été réalisées à cause de problèmes techniques rencontrés sur la mise en pratique du protocole sur l'appareil de contractilité. Nous avons évalué les capacités de résistance à la fatigue par un test de tapis de course et de stimulations répétées *ex-vivo* sur une période de 2 minutes. La force de contraction maximale était évaluée en fonction de la fréquence appliquée. Le test sur tapis de course n'a pas démontré de différences (Figure 26A). La force maximale contractile, quelle que soit la fréquence appliquée du *soleus* n'était pas affectée ici (Figure 26B, C). Ce résultat n'est pas étonnant puisque le *soleus* est un muscle oxydatif spécialisé dans l'endurance et la résistance à la fatigue. Cependant, on remarque qu'à la fin du test de résistance à la fatigue, celle-ci était diminuée de 14% chez les Sepsis (Figure 26E). Les résultats montrent une diminution de la résistance à la fatigue chez les souris sepsis à partir de 40 seconde jusqu'à la fin du test avec une diminution en moyenne de 5,5% (Figure 35D).

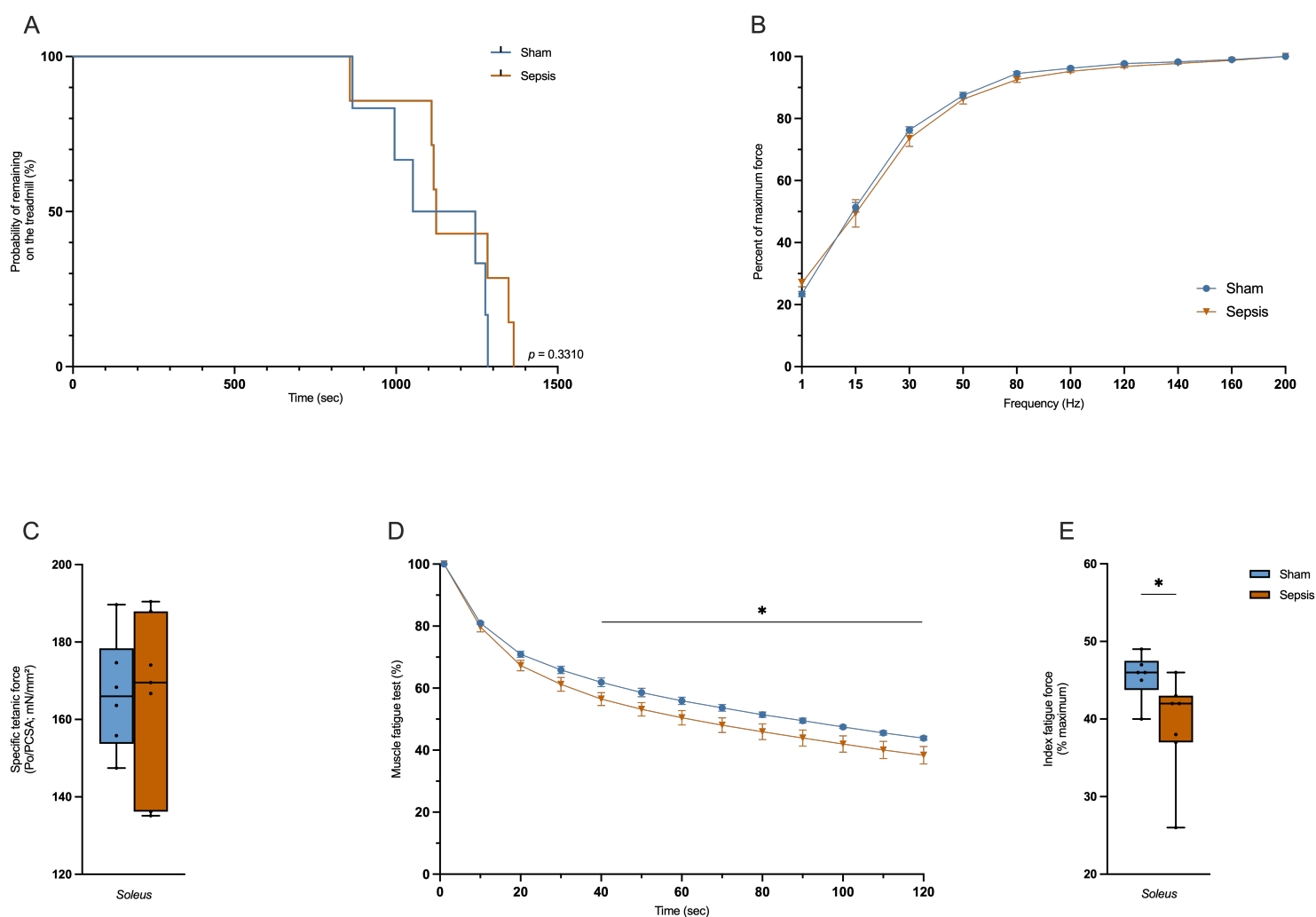


Figure 35. Les souris survivantes du sepsis présentent une réduction de la résistance à la fatigue.

Courbe de Kaplan-Meier de la probabilité des souris Sham (n=6) ou Sepsis (n=7) de rester sur le tapis de course (A). Pourcentage de la force contractile maximale en fonction de la fréquence du *soleus* (B). Boîtes à moustaches représentant la médiane, les quartiles inférieur et supérieur, ainsi que les valeurs minimales et maximales. Les données représentent la production de force tétanique spécifique du *soleus* (C) dans les groupes Sham (n = 6) et Sepsis (n = 7). Évolution de la fatigue du *soleus* (exprimée en pourcentage par rapport à la force initiale) au cours du temps pendant 2 minutes (D). Boîtes à moustaches représentant la médiane, les quartiles inférieur et supérieur, ainsi que les valeurs minimales et maximales (E). Les données représentent le pourcentage de fatigue du *soleus* atteint après 2 minutes de contraction par rapport à la valeur initiale dans les groupes Sham (n = 6) et Sepsis (n = 7). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*). Les données ont été analysées à l'aide du test du log-rank (A), du test Mann-Whitney (A, C, E) ou two-way ANOVA avec post-hoc Benjamini-Krieger-Yekutieli two- stages (B, D). * p < 0,05.

Nos résultats obtenus démontrent que le sepsis induit à long terme une faiblesse musculaire qui se traduit par une diminution de la résistance à la fatigue du muscle oxydatif. Sans atrophie musculaire constatée des fibres oxydatives, cela oriente nos hypothèses sur la présence de désordres intrinsèques au muscle squelettique. Le muscle oxydatif est riche en mitochondrie et repose principalement sur l'OXPHOS pour fournir l'ATP nécessaires durant la contraction.

5. Les souris survivantes du sepsis développent une dysfonction mitochondriale à long terme

Notre hypothèse repose sur la dysfonction mitochondriale comme explication à la faiblesse musculaire persistante chez les souris survivantes du sepsis. Pour répondre à cette question nous avons étudié la respiration mitochondriale sur deux types de muscle, le *soleus*, un muscle oxydatif et l'EDL, un muscle glycolytique. Ainsi, nous avons une vision de la fonction mitochondriale sur les deux types de métabolisme. On peut observer que les souris survivantes du sepsis possèdent une diminution de 14% de la respiration mitochondriale dépendante du CI et du CIV et de 16% de la respiration dépendante du CIV via le protocole PMG (Figure 36A). Le leak démontre une légère baisse qui pourrait faire penser à un défaut d'efficacité mais le RCR (rapport du CI sur le leak), ne présente pas de variations, ce qui indique que la diminution de la respiration observée ne dépend pas d'un défaut d'efficacité mais bien d'une baisse de la capacité OXPHOS (Figure 36A). On observe également une diminution de 14% de la respiration médiée par les acides gras qui est accompagnée d'une baisse légère du leak et d'un RCR similaire (Figure 36B). Les données chez les souris âgées démontrent des résultats proches de ce que nous avons observé précédemment. Elles présentent une diminution de l'ensemble des états respiratoires (associés aux complexes I, II et IV - Figure 36C) et d'une diminution du leak mais sans modification du RCR en protocole PMG. Le protocole FAO présente une consommation identique, et cela malgré un leak diminué, mais sans impacter le RCR (Figure 36D).

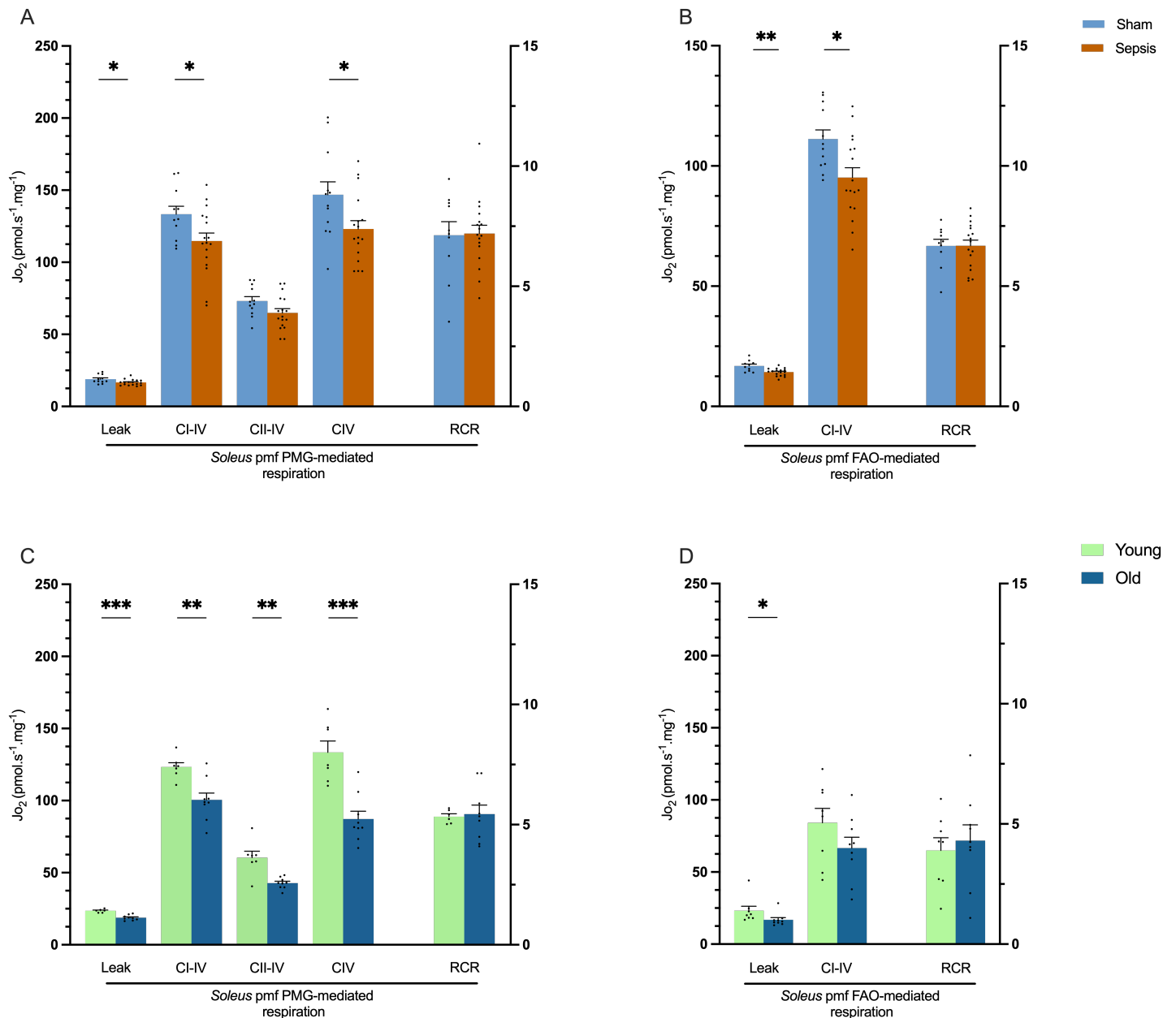


Figure 36. Les souris survivantes du sepsis développent une dysfonction mitochondriale dans le muscle oxydatif similaire au vieillissement.

Données de consommation (Jo_2) de fibres musculaires perméabilisées (pmf) provenant du *soleus* de souris Sham (n=12), Sepsis (n=17), Jeunes (n=7,8) et Vieilles (n=9) à l'aide du protocoles PMG pour les états de respiration OXPHOS médiés par le CI à CIV, le CII à CIV, le CIV et le RCR (A, C). Un second protocole était évalué, le protocole FAO pour les états de respiration OXPHOS médiés par le CI et le CII à CIV et le RCR (B, D). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*), et entre Jeunes et Vieilles (*). Les données sont analysées avec un t-test (A, B, D) ou avec un test de Mann-Whitney (C, D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

L'analyse de l'EDL chez les souris survivantes du sepsis démontre aucune modification de la respiration mitochondriale et quel que soit l'état analysé et le substrat consommé, hormis une

baisse du leak mais toujours sans modification de l'efficacité par le RCR (Figure 37A, B). On peut observer que ces résultats sont cohérents avec ceux observés chez les souris âgées où il n'y a aucune perte de la respiration mitochondriale avec le vieillissement (Figure 37C, D). Cela n'est pas étonnant puisqu'il s'agit d'un muscle principalement glycolytique et qu'il ne repose pas sur l'O₂PHOS pour produire son ATP. Enfin, ces données nous confortent dans l'hypothèse qu'il s'agirait de la fonction mitochondriale qui pourrait être une des principales causes de la faiblesse musculaire.

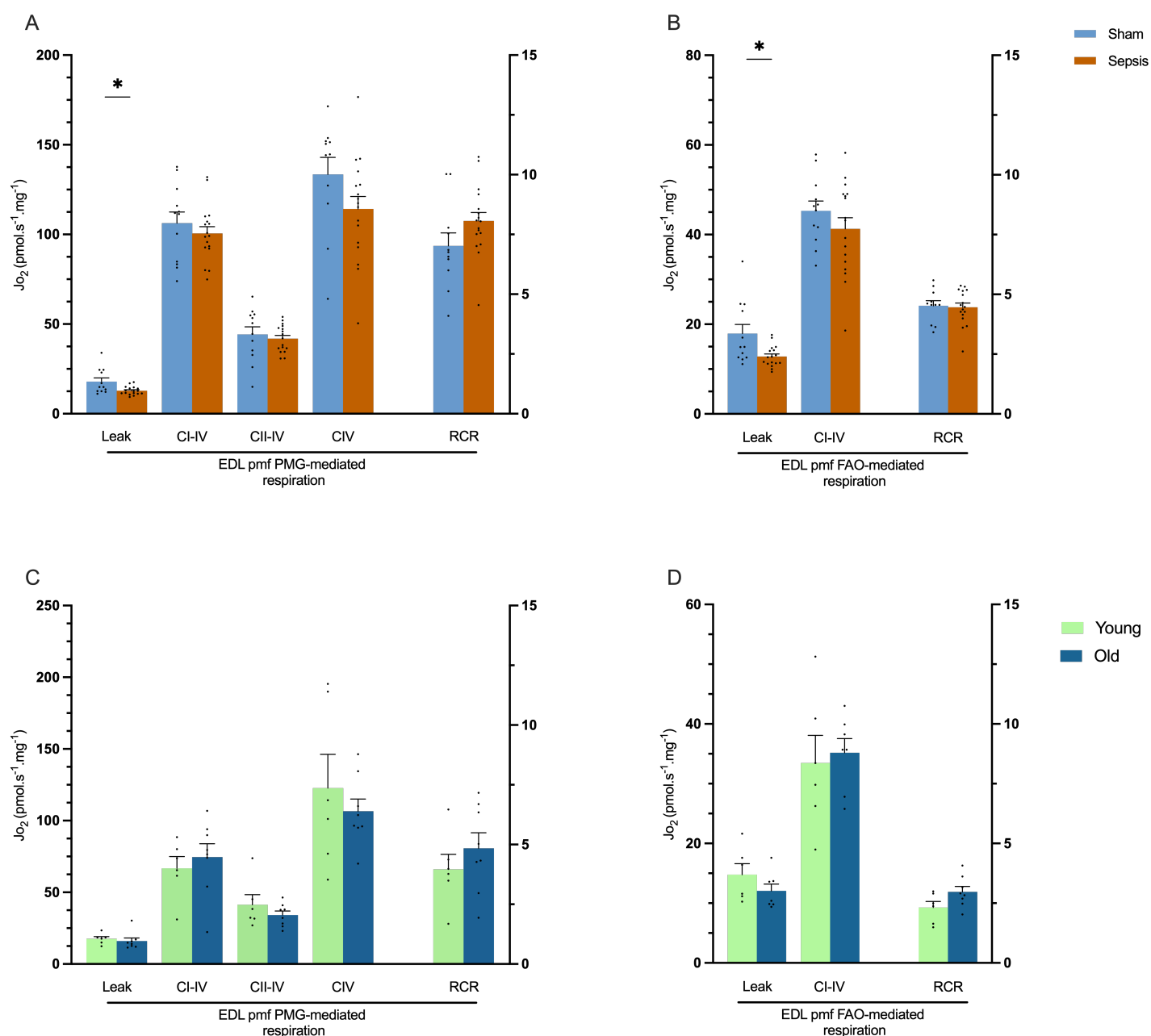


Figure 37. Le muscle glycolytique n'est pas impacté par le sepsis et le vieillissement.

Données de consommation (Jo_2) de fibres musculaires perméabilisées (pmf) provenant d'EDL de souris Sham (n=12), Sepsis (n=17), Jeunes (n=6) et Vieilles (n=9) à l'aide du protocoles PMG pour les états de respiration OXPHOS médiés par le CI à CIV, le CII à CIV, le CIV et le RCR (A, C). Un second protocole était évalué, le protocole FAO pour les états de respiration OXPHOS médiés par le CI et le CII à CIV et le RCR (B, D). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*), et entre Jeunes et Vieilles (*). Les données sont analysées avec un t-test (A,B) ou avec un test de Mann-Whitney (A, B, C ,D). * $p < 0.05$.

En somme, nous avons constaté que le sepsis induisait une dysfonction mitochondriale 3 mois après le sepsis chez la souris. Elle se caractérise par une diminution de la capacité OXPHOS médiée par les complexes I et IV. Elle concerne la respiration médiée par les glucides et les acides gras. Enfin, elle est similaire à la perte observée pendant le vieillissement.

La dysfonction mitochondriale ne se traduit pas uniquement par une diminution de la capacité OXPHOS. Elle s'associe également à une augmentation de la production de stress oxydatif et nitrosatif. Ainsi, nous avons étudié l'expression de protéines impliquées dans les dommages aux protéines liés par les ROS et RNS, ainsi que dans les défenses antioxydantes. Les gènes des enzymes antioxydantes ne sont pas régulés différemment entre les deux groupes (Figure 38A). Il en est de même d'un point de vu protéique, avec l'expression de SOD2 (Figure 38B). Cependant, la présence d'un niveau deux fois plus élevé dans le groupe Sepsis de protéines 3-Nitrotyrosine (3-NT) indique la présence de protéines endommagées par un stress nitrosatif et oxydatif (Figure 38C).

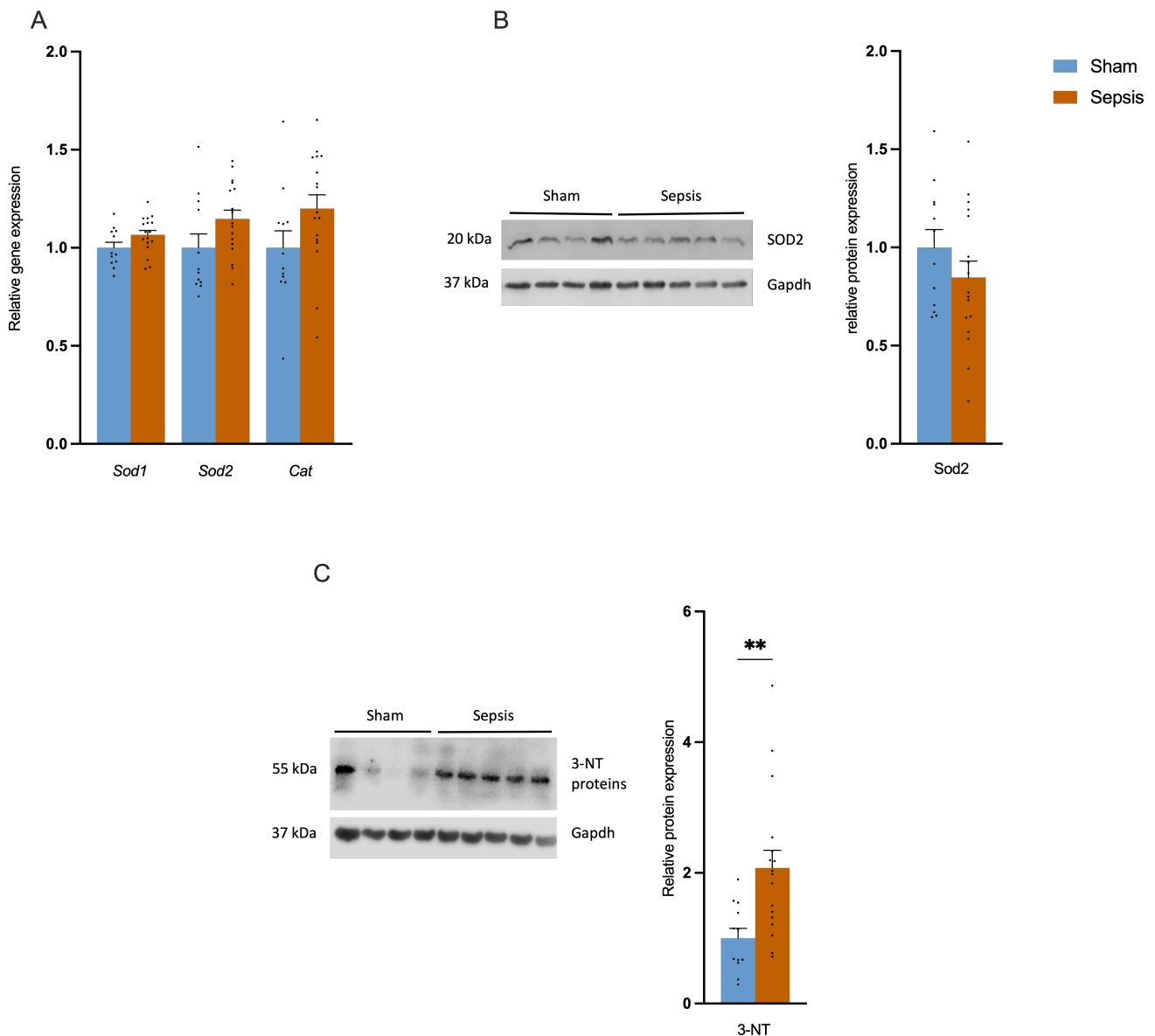


Figure 38. La dysfonction mitochondriale persistante à long terme après le sepsis chez la souris entraîne un stress nitrosatif.

Analyse par quantigène de l'expression des gènes *Sod1*, *Sod2* et *Catalase* (*Cat*) dans le *quadriceps* (A). Analyse par westernblot de l'expression des protéines Sod2 (B) et 3-Nitrotyrosine (3-NT) (C) dans le *quadriceps*. Les groupes analysés sont Sham (n=12) et Sepsis (n=16, 17). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*). Les données sont analysées avec un t-test (A, B,) ou avec un test de Mann-Whitney (C). ** $p < 0.01$.

La dysfonction mitochondriale à long terme après le sepsis chez la souris est caractérisée par une baisse de la respiration mitochondriale et la présence d'un stress nitrosatif.

6. La dysfonction mitochondriale observée en FAO ne provient pas d'une dérégulation du métabolisme des acides gras

Précédemment, nous avons observé une baisse de la fonction mitochondriale médiée par les acides gras. Afin d'écartier toutes causes possibles provenant du métabolisme des acides gras, transporteurs et enzymes, nous avons étudié plusieurs d'entre eux. Nos résultats démontrent qu'aucune différence dans leurs régulations n'est présente entre le groupe Sham et Sepsis (Figure 39).

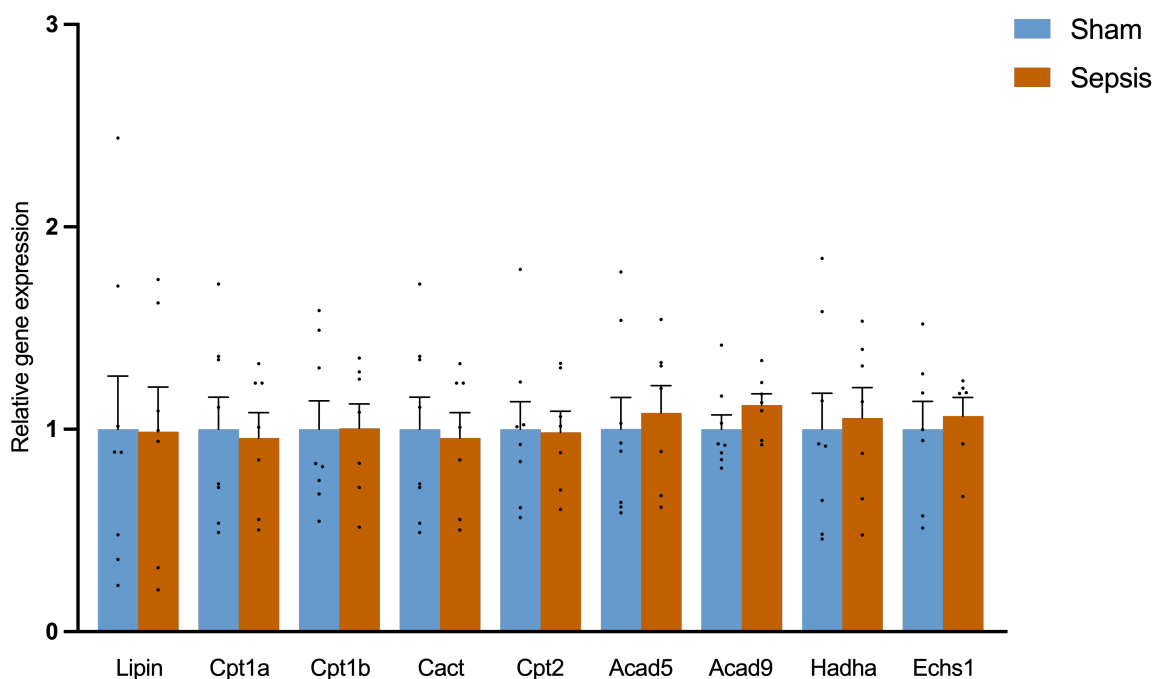


Figure 39. Les enzymes et les transporteurs du métabolisme des acides gras ne sont pas impliqués dans la réduction de la respiration mitochondriale.

Analyse par qPCR de l'expression des ARNm de *Lipin*, *Cpt1a*, *Cpt1b*, *Cact*, *Cpt2*, *Acad5*, *Acad9*, *Hadha* et *Echs1* dans le *quadriceps* dans les groupes Sham (n=8) et Sepsis (n=7). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*). Les données sont analysées avec un test de Mann-Whitney.

Ces observations nous confortent dans notre hypothèse, la cause du dysfonctionnement mitochondrial proviendrait plutôt de la capacité OXPHOS et non d'un problème lié à l'efficacité et/ou dépendant du métabolisme des substrats.

7. Le sepsis n'entraîne pas de diminution des complexes respiratoires à long terme après le sepsis

L'objectif suivant était d'analyser une possible diminution de la quantité de mitochondries dans le muscle squelettique afin d'expliquer la baisse de respiration mitochondriale observée. Plusieurs approches sont possibles, nous avons décidé de commencer par évaluer la quantité d'ADNmt. Cette technique, bien que rapide à mettre en place, ne donne qu'une estimation indirecte de la quantité de mitochondries. Nous en avons profité également pour analyser le taux de délétions chez les souris sepsis, étant un paramètre altéré durant le vieillissement et pouvant avoir un impact sur la fonction mitochondriale. La quantité d'ADNmt baisse d'environ 18% chez les souris survivantes du sepsis, mais une légère hausse du taux de délétions est observée chez les souris sepsis (Figure 40A, B). Quand l'on regarde ce qui se passe durant le vieillissement, les souris âgées de 24 mois présentent une forte diminution de 40% de la quantité d'ADNmt et également une légère hausse du nombre du taux de délétions (Figure 40C, D). Étant donné que le nombre de copies de *Nd4* augmente dans les deux cas ici et qui est plutôt subtile, il est fort probable que cela peut provenir du design et de l'efficacité des amorces qui entraînerait une meilleure amplification de *Nd4* vis-à-vis de *Nd1*. Ensuite, nous avons voulu savoir si cette baisse de la quantité d'ADNmt était accompagnée d'une baisse de la biogénèse, pouvant expliquer une possible baisse du nombre de mitochondries. L'analyse des gènes associés à la régulation de la biogénèse par *Pgc1-a*, *Nrf1*, *Nrf2* et *Tfam*, permettent de constater que leurs expressions sont maintenues dans les deux groupes (Figure 40E). Enfin, pour compléter ces analyses et avoir une appréciation plus directe du niveau des protéines impliquées dans l'OXPPOS, nous avons directement quantifié les différentes protéines des complexes respiratoires. Nous, pouvons voir que les expressions restent constantes dans les deux groupes (Figure 40F).

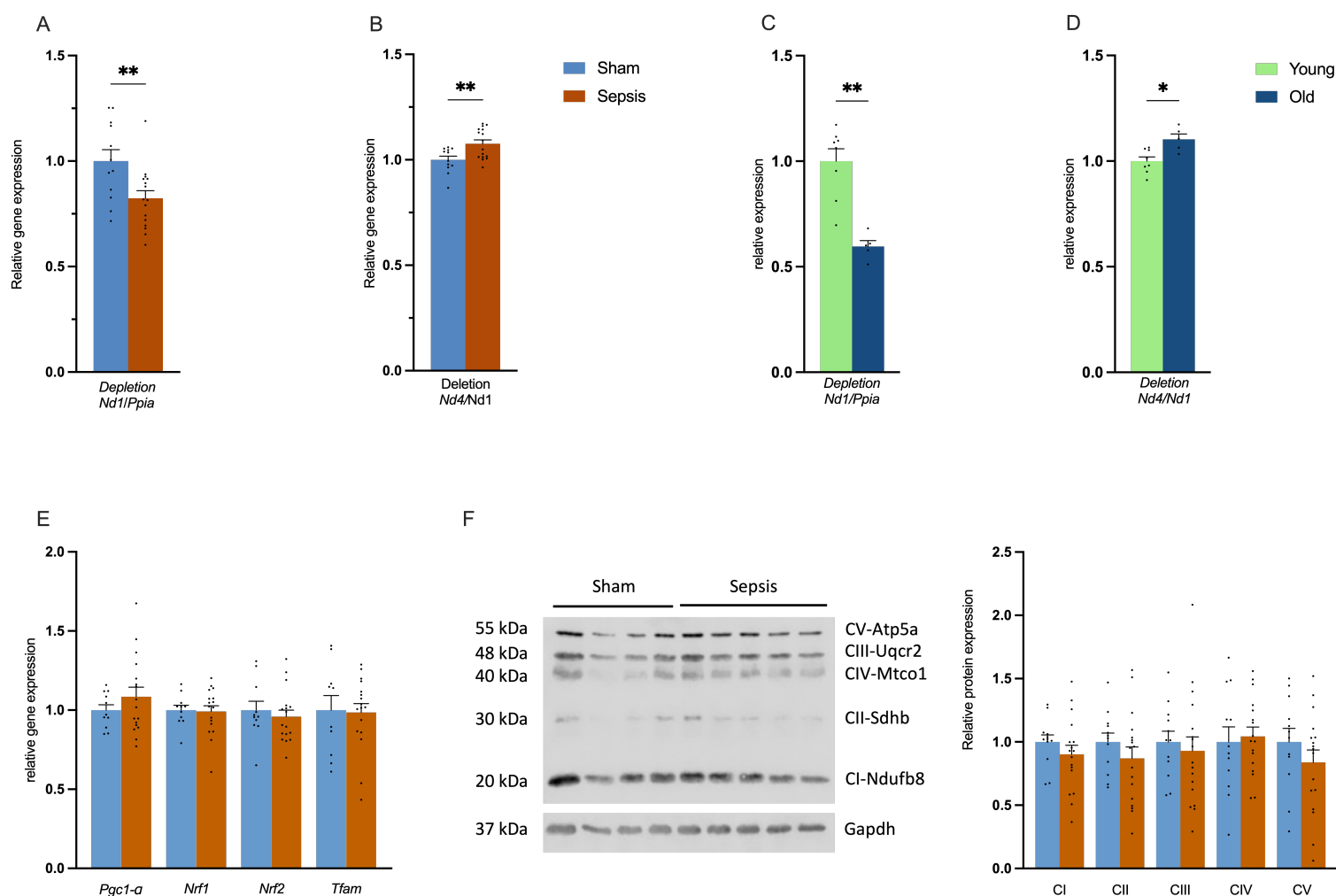


Figure 40. La biogénèse mitochondriale n'est pas impactée par le sepsis à long terme.

Analyse de la quantité d'ADNmt (déplétion) par la normalisation de l'expression de l'ARNm de *Nd1* sur *Ppia* dans le *quadriceps* de souris (**A**, **C**). Analyse du taux de délétion de l'ADNmt par la normalisation de l'expression de l'ARNm de *Nd4* sur *Nd1* dans le *quadriceps* (**B**, **D**). Analyse par qPCR de l'expression des ARNm de *Pgc1-a*, *Nrf1*, *Nrf2* et de *Tfam* dans le *quadriceps* (**E**). Analyse de l'expression protéique de Ndufb8 (CI), Sdhb (CII), Uqcrl2 (CIII), Mtco1 (CIV), Atp5a (CV) et de Gapdh dans le *quadriceps* (**F**). Les analyses sont faites dans les groupes Sham (n=12), Sepsis (n=17) Young (n=8) et Old (n=5). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*), et entre Young et Old (*). Les données sont analysées avec un t-test (A, B, E, F) ou avec un test de Mann-Whitney (C, D, E, F). * p < 0.05, ** p < 0.01.

Malgré une diminution de la quantité d'ADNmt, celle-ci ne semble pas suffisante pour impacter la quantité de mitochondries et le niveau des complexes protéiques nécessaires pour l'OXPPOS. De plus, la diminution de la d'ADNmt n'est pas aussi importante que pendant le vieillissement, il est nécessaire d'atteindre un certain seuil de déplétion pour observer un impact fonctionnel.

8. Les souris survivantes du sepsis présentent une augmentation des marqueurs associés à la voie mtUPR et à l'apoptose

La diminution de la respiration mitochondriale n'est pas expliquée par une atrophie musculaire des fibres oxydatives ni par une diminution du nombre de mitochondries. Les études récentes sur le sepsis indiquent que la dysfonction mitochondriale post-sepsis est associée à une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles via un blocage de l'autophagie, un mécanisme du contrôle qualité de la mitochondrie. Dans ce but, nous avons étudié l'expression de différents marqueurs impliqués dans les voies de contrôle qualité : l'autophagie, la mitophagie, la dynamique mitochondriale et l'UPRmt. Les gènes associés à l'autophagie et à la mitophagie ne présentent pas de variations. Les seules exceptions sont, *Lamp2* et *Park2*, mais leur augmentation reste négligeable compte tenu qu'aucun des autres gènes dans les voies dans lesquelles ils sont impliqués ne varient (Figure 41A, B). Cependant, bien qu'il s'agisse d'une augmentation modérée, il y a une augmentation préférentiellement des gènes associés à la fission mitochondriale, au contraire de la fusion qui ne varie pas. Ainsi, on peut constater l'augmentation de 17% de *Fis1* et de 42% de *Dnm1l* (Figure 41C). Enfin, nous avons observé l'augmentation de presque de 60% d'Hsp60 dans le groupe sepsis et qui était accompagné par une augmentation de la protéine Caspase-3 clivée de 2,7 fois comparé au groupe Sham (Figure 41D, E).

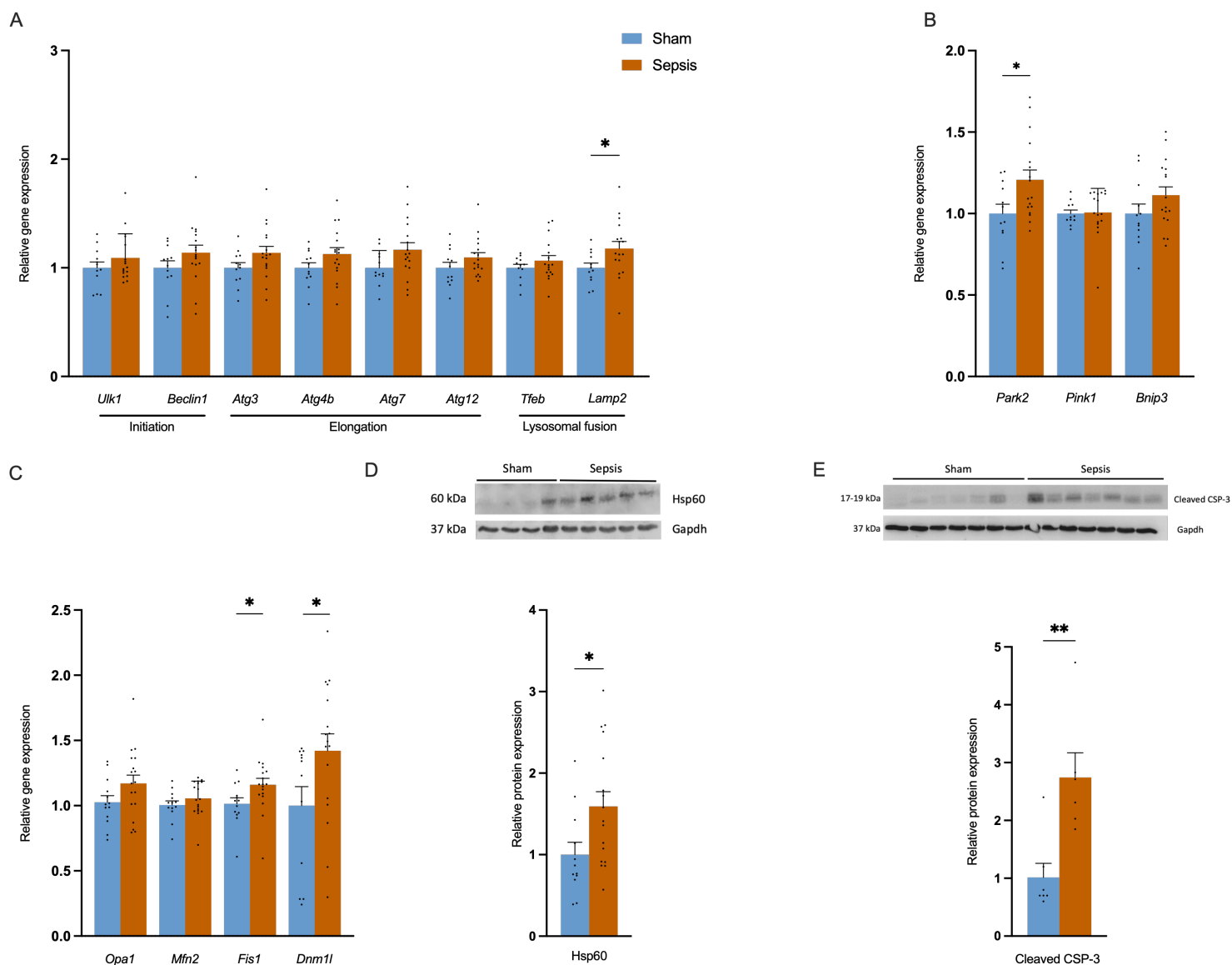


Figure 41. Le sepsis induit une hausse de la voie UPRmt et de la Caspase 3 clivée.

Analyse de l'expression des ARNm de *Opa1*, *Mfn2*, *Fis1*, *Dnm1l*, *Park2*, *Pink1*, *Bnip3*, *Tfeb*, *Ulk1*, *Lamp2*, *Beclin1*, *Atg3*, *Atg4b*, *Atg7* et *Atg12* par quantigène dans le *quadriceps* (A, B, C) dans les groupes Sham (n=12) et Sepsis (n=17). Analyse de l'expression de Hsp60 (D), de Caspase-3 clivée (Cleaved CSP-3) (E) et de Gapdh par westernblot dans les *quadriceps* des groupes Sham (n=12) et Sepsis (n=17). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*). Les données sont analysées avec un t-test (A, B, C, D) ou avec un test de Mann-Whitney (A, B). * p < 0.05, ** p < 0.001.

L'ensemble de ces données sur les mécanismes du contrôle qualité de la mitochondrie indiquent une dérégulation du mécanisme d'Hsp60 et une activation de la Caspase-3, étant impliquée dans l'apoptose. Cependant, nous savons que la Caspase-3 peut nécessiter l'expression d'Hsp60 pour se stabiliser et permettre son activation par la suite. Par ailleurs, la régulation transcriptionnelle de la dynamique mitochondriale était en faveur de la fission. Ainsi, il

semblerait avoir la persistance de l'activation de la voie UPRmt et de la fission mitochondriale à long terme après le sepsis chez la souris.

9. Présence d'une inflammation persistante médiée par les voies de NLRP3 et du RAGE à long terme après le sepsis

Les données récupérées sur la fonction mitochondriale laissent paraître un stress induit notamment par la présence de protéines 3-NT, qui peuvent être associées à un environnement pro-inflammatoire. La dysfonction mitochondriale est également à l'origine de DAMPs, de puissants activateurs de l'inflammation. De plus, le sepsis est caractérisé par une réponse inflammatoire soutenue et complexe mettant en jeu plusieurs voies de signalisation. Dans le but de caractériser une inflammation persistante après le sepsis nous avons donc commencé par analyser l'expression de différentes voies impliquées pendant le sepsis. Une première analyse de l'expression des gènes, nous indique qu'il semble il y avoir deux voies principalement actives. La première est la voie NLRP3 avec une hausse de plus de 7,5 fois pour *Il-1 β* et de 4,3 fois pour *Nlrp3* dans le groupe Sepsis. Ensuite, on a constaté également une augmentation de *Ager* de 3,8 fois comparée aux Sham. *Hmgbl* était augmenté plus modestement avec une hausse de 10% dans le groupe Sepsis. Enfin les voies inflammatoires associées à la sarcopénie et au sepsis dépendante de l'Il-6 et du TNF- α étaient stables (Figure 42A). Par qPCR nous avons analysé l'expression de deux autres gènes, *S100a8* et *S100a9*, connus pour être impliqués dans la réponse inflammatoire, au sepsis, mais aussi, ligands du RAGE. Il est constaté une augmentation de 45% et de 76% réciproquement pour *S100a8* et *S100a9* dans le groupe sepsis (Figure 42B). Par la suite, nous avons voulu confirmer en partie ces résultats par l'analyse de l'expression protéique, pour cela nous avons étudié l'expression de la Caspase-1 clivée, une protéine effectrice en aval de la voie NLRP3. Pour la voie Il-6 nous avons choisi la protéine STAT3 et sa phosphorylation en tyrosine 705. Cependant, la protéine RAGE étant faiblement exprimée dans le tissu musculaire, le western-blot ne s'est pas montré suffisamment sensible pour la quantifier. Les résultats confirment notre première conclusion sur les voies actives dans le groupe Sepsis. La première étant une absence de la voie Il-6/STAT3 (Figure 42C) et la seconde, bien une activation de la voie NLPR3 avec la présence de la forme clivée de la Caspase-1 qui augmente de plus de 2,5 fois dans le groupe Sepsis (Figure 42D).

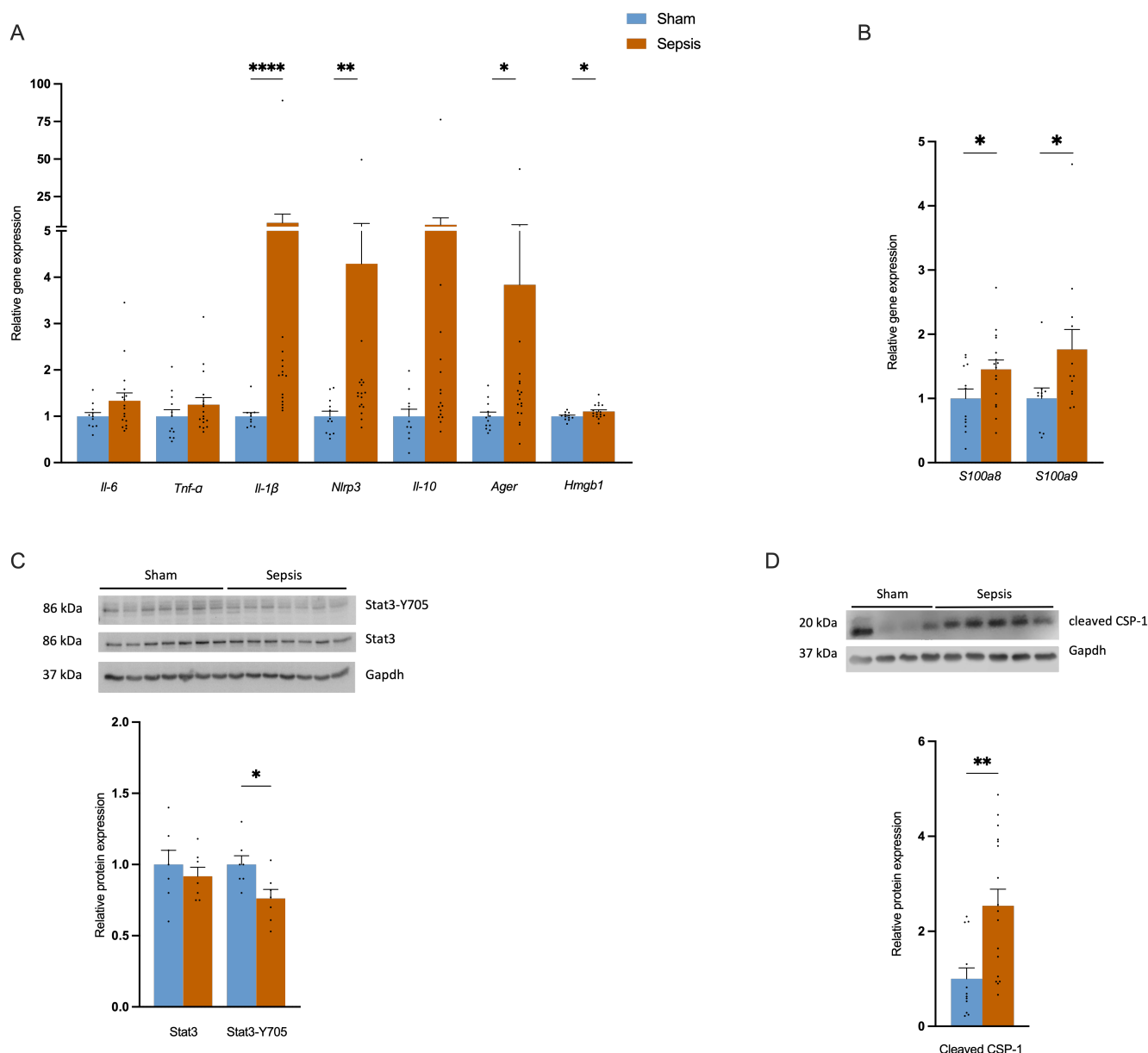


Figure 42. Le sepsis induit une inflammation chronique à long terme médiée par les voies Nlrp3 et RAGE.

Analyse de l'expression des ARNm de l'*Il-6*, *Tnf-α*, *Il-1β*, *Nlrp3*, *Il-10*, *Ager* et *Hmgbl* par quantigène dans le *quadriceps* (A) dans les groupes Sham (n=12) et Sepsis (n=17). Analyse de l'expression des ARNm de *S100a8*, et *S100a9* par qPCR dans le *quadriceps* (B) dans les groupes Sham (n=10, 12) et Sepsis (n=12, 16). Analyse de l'expression de Stat3, Stat3-Y705 (C), Caspase 1 clivée (CSP-1) (D) et de Gapdh par westernblot dans le *quadriceps* dans les groupes Sham (n=7, 12) et Sepsis (n=7, 17). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*). Les données sont analysées avec un t-test (A, B, D) ou avec un test de Mann-Whitney (A, B, C). * p < 0.05, ** p < 0.01.

Pris ensemble, ces résultats indiquent qu'à 3 mois après le sepsis, les souris présentent une persistance de l'activation de la voie NLRP3 et RAGE dans le muscle squelettique. Ces résultats

sont cohérents puisqu'il s'agit de voies inflammatoires sensibles à la dysfonction mitochondriale et impliquées dans le sepsis à la phase aiguë.

10. Les altérations musculaires à long terme après le sepsis ne sont pas associées à la sénescence

Nous avons donc démontré qu'il existait à long terme après le sepsis la présence d'une faiblesse musculaire associée à une dysfonction mitochondriale et à une inflammation persistante. Ces altérations font partie intégrante du processus de vieillissement musculaire. Leurs persistance pourraient traduire la présence de la sénescence et d'un vieillissement accéléré par le sepsis. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié différents grands marqueurs de la sénescence qui renforceraient la notion de vieillissement ici. Les résultats démontrent l'absence de variations significatives entre les groupes Sham et Sepsis (Figure 43).

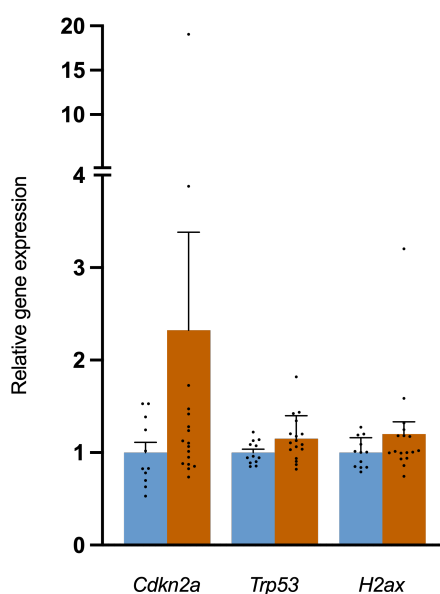


Figure 43. Absence de l'expression de marqueurs de la sénescence dans le muscle à long terme après le sepsis.

Analyse de l'expression des ARNm de *p16* (*Cdkn2a*), *p53* et *H2ax* par quantigène dans le *quadriceps* des groupes Sham (n=12) et Sepsis (n=17). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham et Sepsis (*). Les données sont analysées avec un test de Mann-Whitney.

Ainsi, bien que le muscle squelettique soit victime de plusieurs grandes altérations associées au vieillissement et persistantes dans le temps, elles ne semblent pas aboutir à un vieillissement classique, dit « physiologique ».

11. Reproduction des altérations musculaires dans un modèle *in-vitro* par traitement chronique au LPS

La dysfonction mitochondriale observée dans notre modèle de sepsis murin ne permet pas différencier si elles sont dues uniquement aux cellules musculaires ou si elles sont dues à l'influence des effets systémique de l'organisme. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en place par la cellule musculaire elle-même, nous avons développé un modèle *in-vitro* de C2C12 différenciées en myotubes afin de les traiter au LPS à faible dose et de façon chronique. Les résultats sur la respiration mitochondriale sont clairs et se retrouve sur chaque état, respiration basale et maximale en baissent d'environ 25% et 33% respectivement dans le groupe traité au LPS (Figure 44A). La respiration libre, qui correspond au ratio de la respiration maximale sur la respiratoire basale, est diminuée de 37%. Cela indique une efficacité réduite de la fonction OXPHOS dans ces conditions (Figure 44A). Ensuite, nous avons voulu évaluer si la dysfonction mitochondriale s'accompagne d'une réponse inflammatoire, d'une fibrose et d'une potentielle sénescence de façon similaire au modèle de sepsis murin. L'étude des gènes associés à l'inflammation révèle une augmentation de 2,3 fois de l'*Il-6*, de 1,75 fois de *Nlrp3* et de 3 fois de *Ager*. Pour la fibrose, *Mmp3* montre une impressionnante hausse de plus de 37 fois. Enfin, il n'y a pas de différences observables dans les gènes associés au vieillissement (Figure 44B).

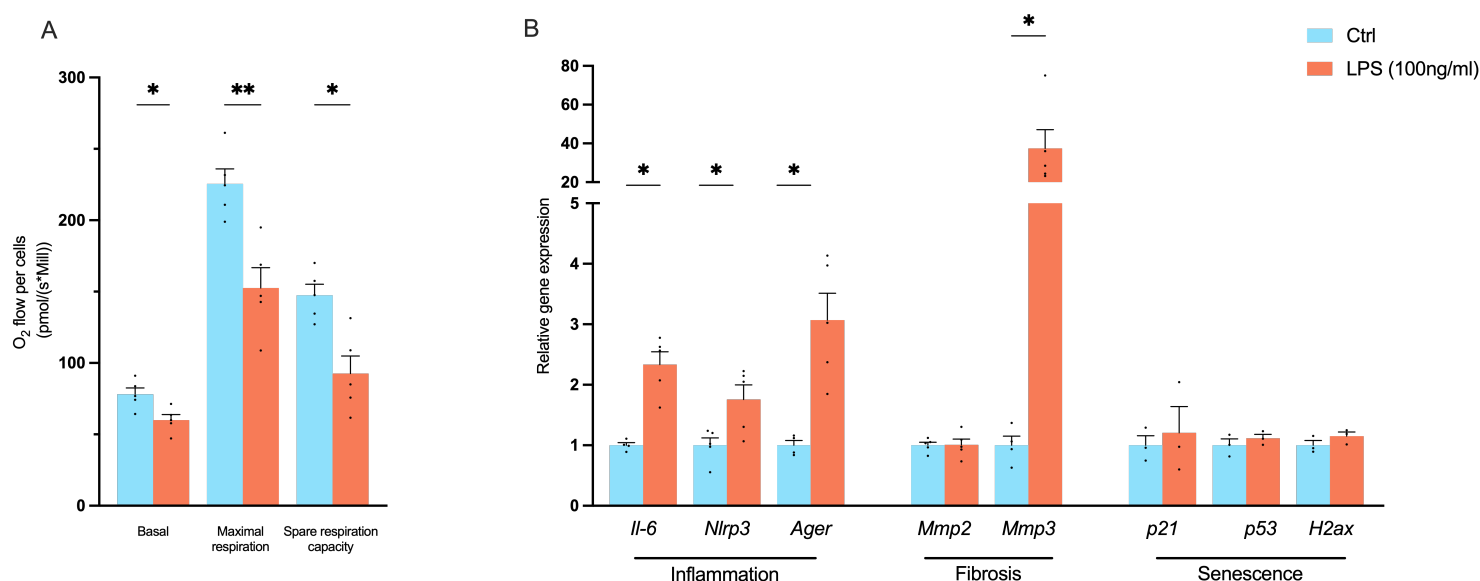


Figure 44. Un traitement au LPS chronique et à faible dose entraîne une dysfonction mitochondriale et une activation transcriptionnelle des voies de l'inflammation et de la fibrose.

Consommation d'oxygène des cellules musculaires traitées avec un placebo (ctrl) ou avec du LPS à 100 ng/ml (LPS) pour les états suivants : respiration basale (sans substrat ni inhibiteur ajoutés), la respiration maximale découplée et la respiration libre (respiration maximale – la respiration basale) (n=5 par groupe). Analyse de l'expression des ARNm de l'*Il-6*, *Nlrp3*, *Ager*, *Mmp2*, *Mmp3*, *p21*, *p53* et *H2ax* par qPCR des cellules musculaires (n=5 par groupe). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont effectuées entre ctrl et LPS 100 ng/ml (*). Les données sont analysées avec un test de Mann-Whitney (A, B). * p < 0.05, ** p < 0.01.

Les résultats présentés au niveau de la cellule sont en accord avec notre modèle murin. Nous retrouvons une dysfonction mitochondriale associée à une inflammation par les mêmes voies et à une activation de Mmps sans sénescence apparente. Il semblerait donc que les altérations observées au niveau du muscle proviennent bien du muscle lui-même et pas d'un effet systémique de l'organisme.

En conclusion, nous avons identifié chez les souris survivantes du sepsis à long terme, une faiblesse musculaire du muscle oxydatif sans atrophie et accompagnée d'une potentielle fibrose. Elle associée à une dysfonction mitochondriale caractérisée par la présence de RNS et l'activation de la voie mtUPR. Enfin, une inflammation persistante était observée et médiée par les voies NLRP3 et RAGE. RAGE étant un vecteur de l'inflammation et la dysfonction mitochondriale associée au sepsis, nous avons choisi d'étudier son rôle du RAGE dans le développement des altérations post-sepsis à long terme.

12. La mortalité et les paramètres de la composition corporelle des souris *Ager*^{-/-} post-sepsis ne varient pas

L'étude de la survie des souris *Ager*^{-/-} montre que les souris inhibées pour le RAGE possèdent une mortalité similaire aux souris wt et que l'inhibition ne semble pas améliorer ou détériorer la mortalité pendant et après le sepsis (Figure 45).

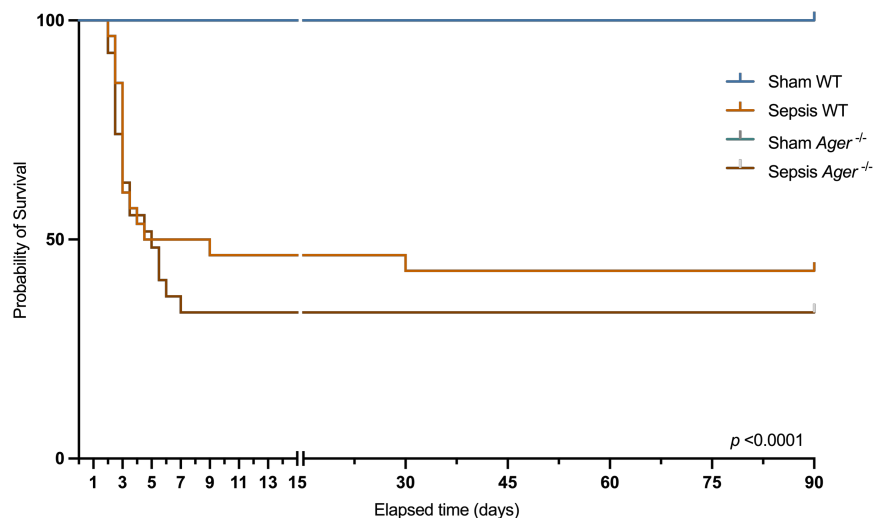


Figure 45. Les souris *Ager*^{-/-} possèdent une mortalité similaire aux souris wt.

Courbes de Kaplan-Meier pour les groupes Sham wt (n=12), Sepsis wt (n=28), Sham *Ager*^{-/-} (n=12) and Sepsis *Ager*^{-/-} (n=27). Les comparaisons statistiques sont faites entre Sham wt vs Sepsis wt, Sham *Ager*^{-/-} vs Sepsis *Ager*^{-/-}, Sham wt vs Sham *Ager*^{-/-} et Sepsis wt vs Sepsis *Ager*^{-/-}. Les données ont été analysées avec un test log-rank.

Ensuite, nous avons analysé de la même façon que précédemment les différents paramètres de la composition corporelle dans les différents groupes sur toute la période de convalescence. Nous observons des variations de tous les paramètres durant la phase précoce mais qui reviennent rapidement stables au bout du 15^{ème} jour (Figure 46A, B, C, D). Cependant, une augmentation de tous les paramètres comparés à la baseline dans le groupe Sham *Ager*^{-/-} et de la masse maigre comparée à la baseline dans le groupe Sham wt apparaissent dans les dernières semaines et jusqu'au 3^{ème} mois (Figure 46A, B, C, D). Les souris Sham wt et Sham *Ager*^{-/-} ne présentent pas de différences entre elles, ce qui peut indiquer que ces augmentations dans le long terme peuvent être dues à une évolution normale liée à l'âge.

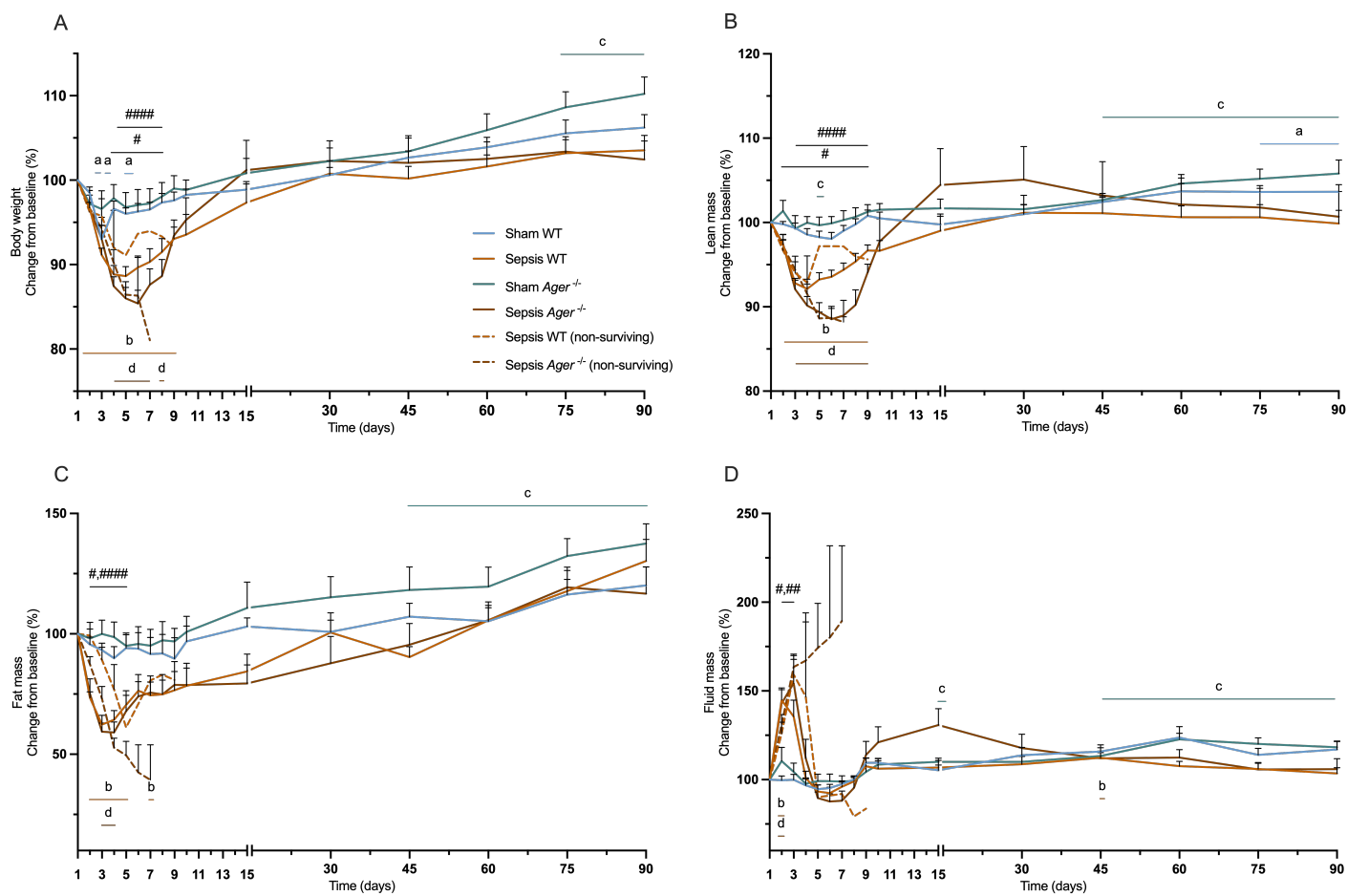


Figure 46. La composition corporelle des souris *Ager*^{-/-} reste inchangée sur le long terme.

Variations comparé à la baseline du poids, de la masse grasse, de la masse maigre et de la masse hydrique ont été mesurées sur 90 jours pour les groupes Sham WT (n=12), Sepsis WT (n=12), Sham *Ager*^{-/-} (n=12), Sepsis *Ager*^{-/-} (n=7), Sepsis WT non survivants (n=15) et Sepsis *Ager*^{-/-} non survivants (n=18). Les comparaisons statistiques sont effectuées entre Sham WT et Sepsis WT (#), Sham *Ager*^{-/-} et Sepsis *Ager*^{-/-} (####), Sham WT et la baseline (a), Sepsis WT et la baseline (b), Sham *Ager*^{-/-} et la baseline (c) et Sepsis *Ager*^{-/-} et la baseline (d). Les données ont été analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs avec un test post-hoc de Tukey (A, B, C, D) * p < 0,05.

Ainsi, la caractérisation des souris *Ager*^{-/-} montrent que l'inhibition du RAGE n'augmente pas la mortalité et que l'évolution des différentes composantes corporelles reste similaire à celle des souris Sepsis wt. Ces résultats sont cohérents avec ceux trouvés précédemment (Figures 29 et 30).

13. Le sepsis n'entraîne pas d'atrophie musculaire chez les souris

Ager^{-/-}

Nous avons commencé par regarder si les souris *Ager*^{-/-} montraient la présence d'une atrophie musculaire dépendant des fibres IIx et IIb, comme observée durant nos premiers résultats (Figure 32). Nos résultats démontrent que le poids humide reste inchangé entre les différents groupes, ce qui est concordant avec ce que nous avons déjà observé (Figure 47A). Cependant, nous avons pu constater également que la CSA ne changeait pas non plus dans le groupe Sepsis wt, contrairement à ce que nous avons trouvé (Figure 47C). Cela permet de relativiser la possible atrophie observée précédemment, d'autant plus que les résultats avaient été obtenus à partir de groupes d'échantillons relativement faibles (n=3). Les souris Sepsis *Ager*^{-/-} ne présentaient pas non plus d'atrophie liée à la CSA (Figure 47C). Il n'y a pas non plus de changements concernant la répartition des fibres et de possible shift du métabolisme (Figure 47D).

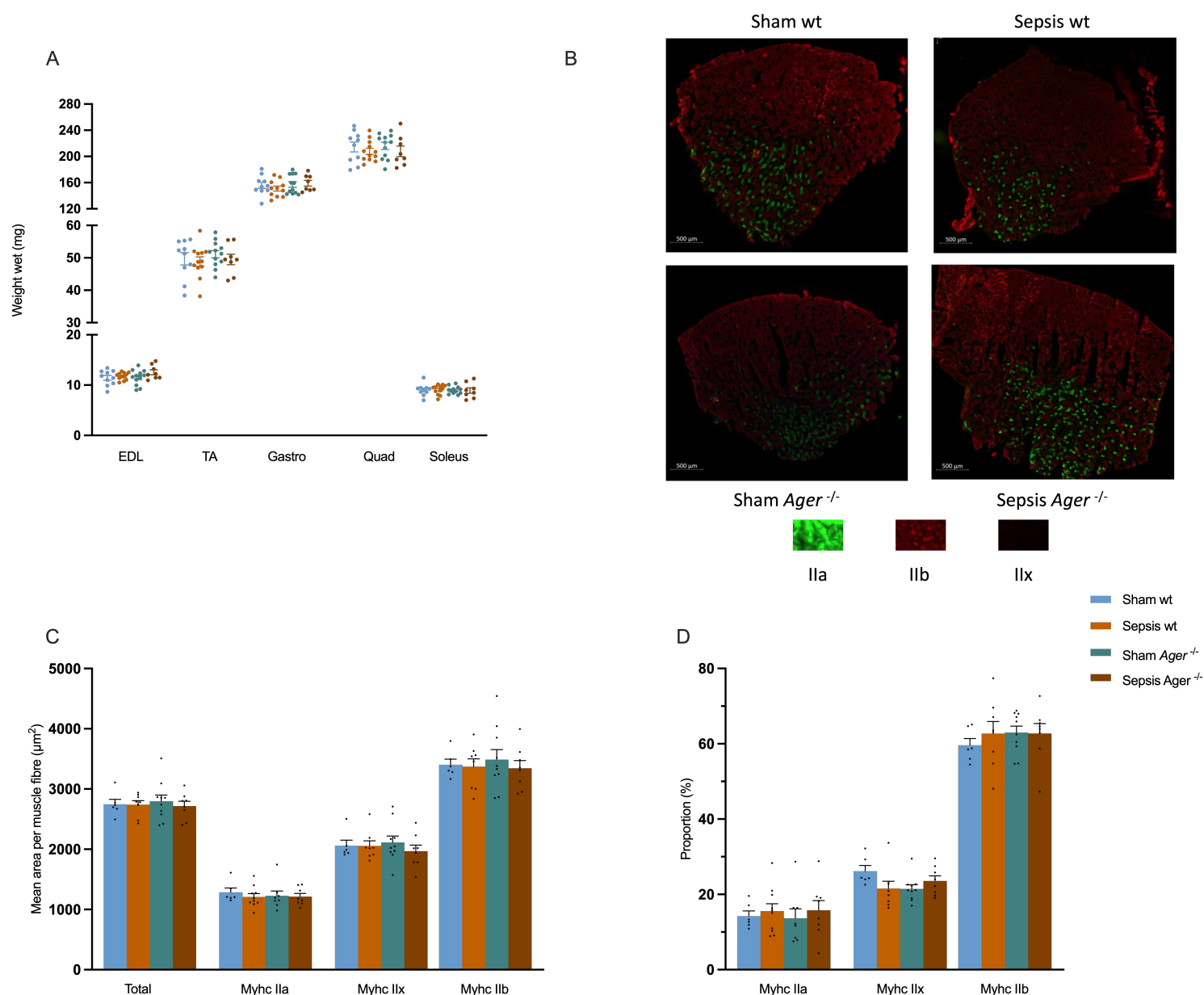


Figure 47. Les souris survivantes du sepsis *Ager*^{-/-} ne présentent pas d'atrophie musculaire.

Analyse du poids humide des muscles EDL, TA, *gastrocnemius*, *quadriceps* et *soleus* dans les groupes Sham wt (n=10), Sepsis wt (n=12), Sham *Ager*^{-/-} (n=12) et Sepsis *Ager*^{-/-} (n=8)(A). Images représentatives de microscopie à fluorescence de TA des souris Sham wt (en haut à gauche), Sepsis wt (en haut à droite), Sham *Ager*^{-/-} (en bas à gauche) et Sepsis *Ager*^{-/-} (en bas à gauche) (B). Les fibres de type IIa sont marquées en vert, IIb en rouge et IIx qui correspondent à l'ensemble des fibres non marquées. La surface de chaque fibre (C) et la répartition des fibres (D) par muscle ont été mesurées et quantifiées par le plugin MuscleJ2 (Fiji) dans les groupes Sham wt (n=6), Sepsis wt (n=8), Sham *Ager*^{-/-} (n=10) et Sepsis *Ager*^{-/-} (n=8). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont réalisées entre Sham WT vs Sepsis WT vs Sham *Ager*^{-/-} vs Sepsis *Ager*^{-/-} (*). Les données sont analysées par un one-way ANOVA avec un test post-hoc Sidak (A) ou un test post-hoc Kruskal-Wallis avec un test Dunn's post-hoc (C, D).

En somme, ces données indiquent que le sepsis n'induit pas d'atrophie musculaire à long terme sur le muscle squelettique et que l'inhibition du RAGE n'influence pas non plus ce paramètre.

Ces observations renforcent nos hypothèses précédentes concernant l'implication de la qualité musculaire dans la réponse au sepsis.

14. Les souris *Ager*^{-/-} post-sepsis ne développent pas de dysfonction mitochondriale

La dysfonction mitochondriale est l'altération majeure que nous avons identifiée avec l'inflammation suite au sepsis. Nous avons donc analysé la respiration mitochondriale de la même façon que précédemment avec les souris *Ager*^{-/-}. Nous pouvons observer que le *soleus* présente une diminution de la respiration de 14% pour le stade CI à CIV et de 17% pour le stade CIV chez les souris sepsis avec le protocole PMG (Figure 48A). En FAO, une diminution du stade CI au CIV est aussi observée avec plus de 21% dans le groupe Sepsis wt (Figure 48B). Les RCR respectifs de chaque protocole restent identiques, tout comme le leak (Figure 48A, B). Ainsi, il s'agit-là aussi d'une diminution de la fonction OXPHOS sans modification de son efficacité. Ces résultats sont cohérents et identiques aux observations faites dans la figure 36. Concernant l'EDL, aucune modification n'est remarquée, que ça soit en protocole PMG et FAO (figure 48C, D). Là aussi ces résultats sont identiques à nos précédentes observations en figure 37. Concernant les souris *Ager*^{-/-}, celles-ci ne présentent pas de différences significatives comparées aux souris Sham *Ager*^{-/-} et ceux dans aucun des protocoles réalisés (PMG et FAO) pour le *soleus*. Elles ne présentent pas non plus de différences avec les souris Sepsis wt, ce qui indique que les niveaux des souris Sepsis *Ager*^{-/-} se situent quelque part entre les niveaux des souris Sham *Ager*^{-/-} et Sepsis wt (Figure 48A, B). Concernant l'EDL, aucune variation n'est observée, cela était attendu et cohérent avec le métabolisme de l'EDL plus glycolytique et non impacté par le sepsis (Figure 48C, D).

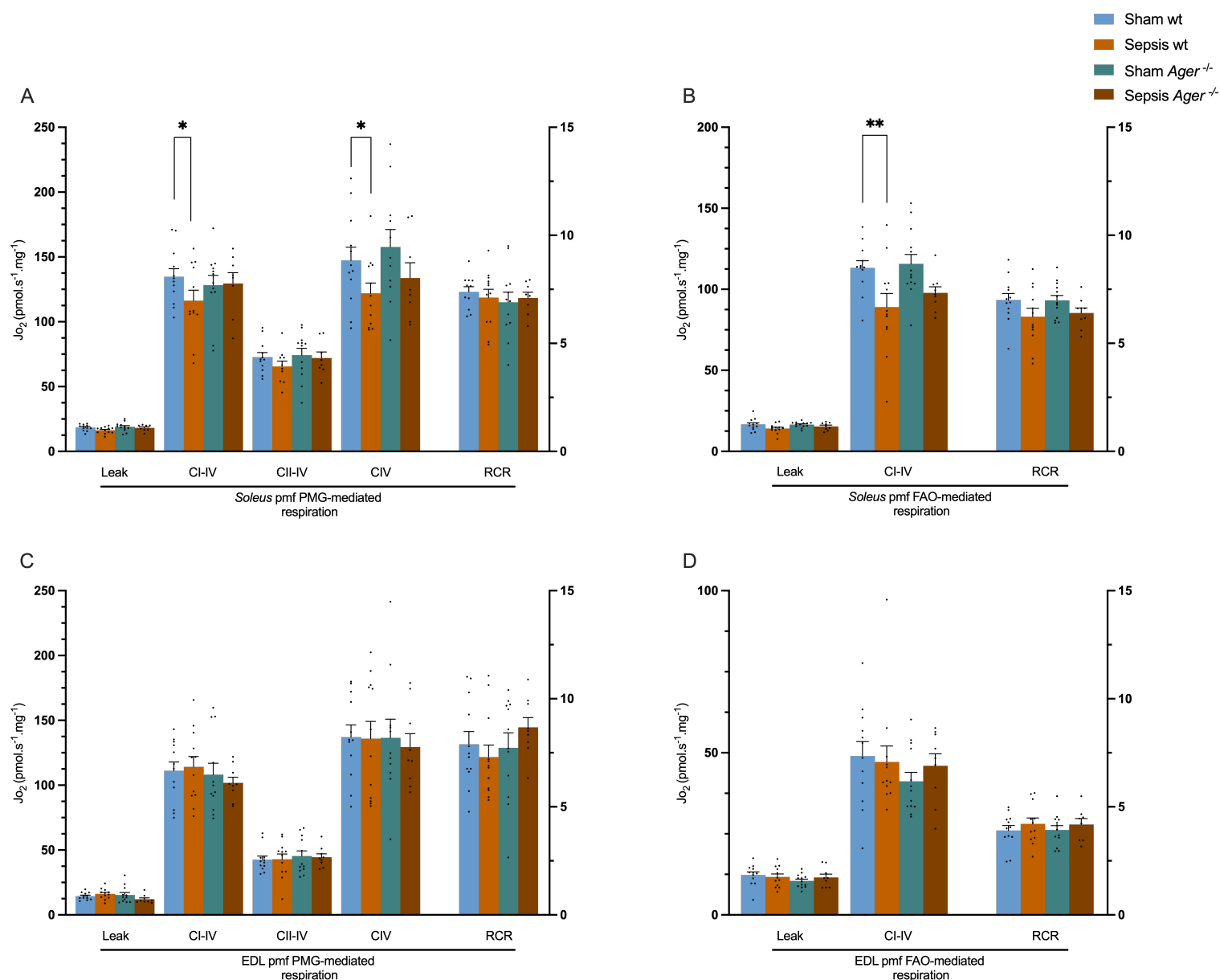


Figure 48. Les souris *Ager*^{-/-} ne développent pas de dysfonction mitochondriale à long terme après le sepsis.

Analyse de la consommation d'oxygène (Jo_2) en oroboros de fibres perméabilisées (pmf) de *soleus* en protocole PMG (A) et FAO (B) et de pmf d'EDL en protocole PMG (C) et FAO (D) dans les groupes Sham WT (n=12), Sepsis WT (n=12), Sham *Ager*^{-/-} (n=12) et Sepsis *Ager*^{-/-} (n=9). Le protocole PMG évalue les stades OXPHOS médiés du CI au CIV, CII au CIV et CIV, le protocole FAO évalue les stades OXPHOS médié par du CI et du CII au CIV. Le RCR évalue l'efficacité de la respiration mitochondriale par le rapport du CI sur le leak. Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont réalisées entre Sham WT vs Sepsis WT vs Sham *Ager*^{-/-} vs Sepsis *Ager*^{-/-} (*). Les données sont analysées par un one-way ANOVA avec un test post-hoc Fisher's LSD (A, B, C, D). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Ainsi, ces résultats corroborent les résultats retrouvés précédemment concernant la dysfonction mitochondriale 3 mois après le sepsis chez la souris. Les souris *Ager*^{-/-} ne développent pas de diminution de la respiration mitochondriale comparées à leur contrôle. Cependant, ces résultats

doivent être interprétés avec prudence, puisque nous n'avons pas démontré non plus de différences entre les souris Sepsis wt et Sepsis *Ager*^{-/-}.

15. Les souris *Ager*^{-/-} ne développent pas d'inflammation médiée par la Caspase-1, ni de stress mitochondrial et nitrosatif

Nous avons voulu ensuite analyser si l'absence de la dysfonction mitochondriale chez les souris *Ager*^{-/-} était accompagnée d'une inhibition des voies de stress nitrosatif, mtUPR et inflammatoires. Dans un premier temps, nos résultats démontrent qu'une nouvelle fois, nous reproduisons bien une augmentation de l'expression protéiques d'Hsp60, de 3-NT et de l'inflammation médiée par la voie NLRP3 avec la caspase-1 clivée (Figure 49A, B, C). Ensuite, les résultats concernant les souris *Ager*^{-/-} ne démontrent aucune augmentation significative de ces marqueurs, comparées aux souris Sham *Ager*^{-/-} (Figure 49A, B, C). Il en est de même pour les souris Sepsis *Ager*^{-/-} et Sepsis wt. Enfin, les résultats montrent que les souris Sham wt et Sham *Ager*^{-/-} présentent des niveaux similaires d'expressions dans ces différents marqueurs (Figure 49A, B, C).

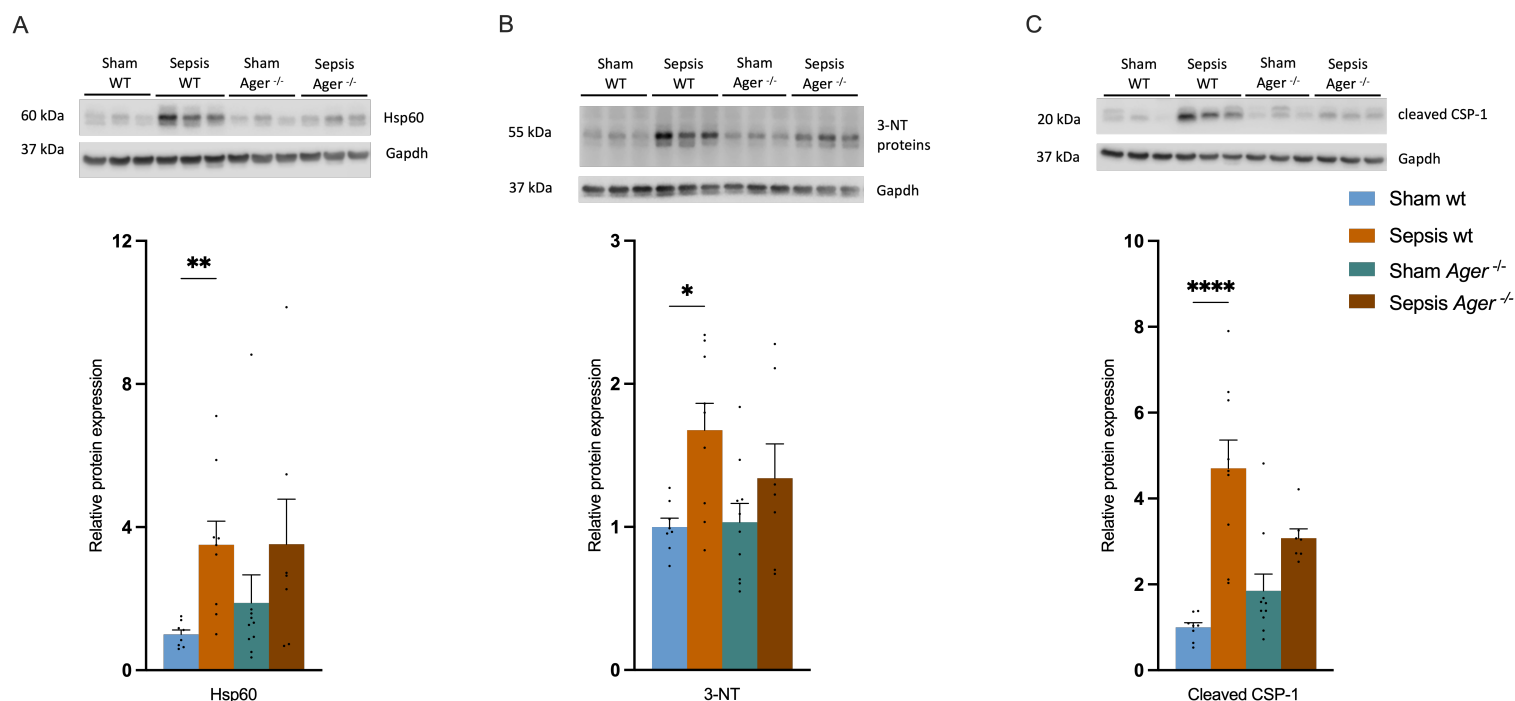


Figure 49. Les souris *Ager*^{-/-} ne développent pas d'inflammation médiée par la voie Caspase-1, de stress nitrosatif et mitochondrial à long terme après le sepsis.

Expression protéique par westernblot de Hsp60 (A), 3-nitrotyrosine (3-NT) (B), Caspase-1 clivée (C) et de la Gapdh dans le *quadriceps* chez les animaux Sham WT (n=8), Sepsis WT (n=9), Sham *Ager*^{-/-} (n=9) et Sepsis *Ager*^{-/-} (n=7). Les données sont exprimées en moyenne avec SEM. Les comparaisons statistiques sont réalisées entre Sham WT vs Sepsis WT vs Sham *Ager*^{-/-} vs Sepsis *Ager*^{-/-} (*). Les données sont analysées par un one-way ANOVA avec un test post-hoc Sidak (B) ou avec un test Kruskal-Wallis avec un test post-hoc Dunn's (A,C). * p < 0.05, ** p < 0.01, **** p < 0.0001.

Ces résultats sont en accords avec ceux retrouvés pour la respiration mitochondriale. Nous démontrons à nouveau ici, que les souris survivantes 3 mois après le sepsis développent une augmentation de la voie mtUPR, un stress nitrosatif et une inflammation médiée par la voie NLRP3 dans le muscle squelettique. L'inhibition du RAGE a permis d'empêcher le développement de ces altérations mais pas de façon absolue, puisque les souris sepsis wt et sepsis *Ager*^{-/-} ne sont pas différentes significativement.

Partie V - Discussion

Mon projet de thèse se divisait en deux grands objectifs, le premier était la caractérisation des altérations du muscle squelettique à long terme après le sepsis dans un modèle murin par injection de selles hétérologues. Le second se concentrait sur le rôle joué par le RAGE dans les conséquences à long terme.

Au travers de ce travail nous avons démontré que les souris survivantes du sepsis développaient une faiblesse musculaire, une dysfonction mitochondriale, ainsi qu'une inflammation 3 mois après le sepsis. Ces données sont similaires aux altérations retrouvées pendant la phase aigüe du sepsis ^{8,108,117,144}. Elles sont également conformes aux quelques études qui ont étudié les altérations à moyen et à long terme chez la souris ^{7,8,16,107,107,134,145}. Ces résultats indiquent que notre modèle représente un outil fiable et pertinent pour l'étude translationnelle des atteintes musculaires à long terme après le sepsis.

Nous avons commencé par caractériser le phénotype musculaire des souris survivantes du sepsis. On a observé une réduction de la CSA des fibres IIX et IIB. Cependant, elle n'a pas été retrouvée dans le groupe sepsis wt comparé au groupe sham wt dans les expériences avec les souris RAGE *Ager*^{-/-}. Cette divergence pourrait refléter une première conclusion délicate à interpréter en regard du faible effectif dans le groupe Sham (n=3), ce qui entraîne une limite de puissance statistique. Concernant les fibres oxydatives et les fibres IIA, nous n'avons constaté à aucun moment la présence d'une atrophie. La littérature existante stipule bien la présence d'une atrophie musculaire à la suite du sepsis, mais, elle semble pas être suffisante pour expliquer les altérations du sepsis et leurs persistances. En effet, l'atrophie musculaire observée pendant le sepsis tend à se résoudre, n'impacte pas les fibres oxydatives (I et IIA), au contraire des altérations qui elles, persistent ^{8,107,146}. Ajouté à cela, nous avons aussi démontré qu'il n'y avait pas de variation des gènes associés au métabolisme musculaire et à l'épuisement des cellules souches. Ces observations renforcent l'hypothèse qu'il n'y a pas d'atrophie musculaire dans notre modèle ^{147,148}. Enfin, l'augmentation de l'expression des gènes Tgf-β et de Mmp9 laissent supposer qu'il pourrait y avoir la présence d'une fibrose. Ces résultats seraient en adéquation avec les études récentes et notamment chez l'Homme, qui montrent en histologie des traces de fibrose dans les muscles de patients survivants du sepsis à 6 mois et 5 ans ^{7,16}.

Les expériences sur la fonction musculaire démontrent que le *soleus*, un muscle oxydatif, présente une diminution de la résistance à la fatigue dans le groupe sepsis. D'autres études ont également démontré que les muscles squelettiques, dont le muscle oxydatif, étaient impactés

durant le sepsis et présentaient une diminution des capacités contractiles ^{107,109}. Ainsi, nous avons démontré que le sepsis était capable d'induire une faiblesse musculaire à long terme chez les souris survivantes du sepsis. L'absence d'atrophie musculaire et notamment au niveau du muscle oxydatif suggère une atteinte de la qualité musculaire et d'altérations intrinsèques.

Le muscle oxydatif puise son énergie à partir de l'ATP, qui repose majoritairement sur la fonction l'OXPHOS et la mitochondrie ¹⁴⁹. La dysfonction mitochondriale pourrait constituer une cause probable de la faiblesse musculaire précédemment observée. De plus, plusieurs études ont analysé celle-ci pendant le sepsis et soulignent la présence d'une dysfonction mitochondriale ^{8,109,143}. Nos résultats en respirométrie haute résolution, démontrent une diminution de la respiration mitochondriale dans le muscle oxydatif, mais sans modification de son efficacité. Elle est généralisée et concerne la respiration médiée par plusieurs complexes (I et IV), mais concerne aussi la respiration médiée par les glucides et les acides gras. Le muscle glycolytique ne présentait aucun changement, ce qui est cohérent avec son métabolisme qui privilégie essentiellement la glycolyse et non la mitochondrie. Ces résultats s'accordent parfaitement avec différentes études qui démontrent spécifiquement des atteintes de la fonction mitochondriale dans le muscle oxydatif suite au sepsis ^{8,107,109,150}. De plus, des analyses transcriptomiques sur des biopsies de patients à long terme après le sepsis, présentent des anomalies dans la régulation de diverses voies associées à la fonction mitochondriale : respiration cellulaire, OXPHOS et synthèse d'ATP. Ils ont également démontré que l'activité du complexe I était réduite chez les patients ⁷. Ainsi, la diminution de la fonction musculaire et du muscle oxydatif pourrait être expliquée par une dysfonction mitochondriale persistante. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à ce phénomène, il peut notamment résulter d'une diminution du nombre de mitochondries. Pour répondre à cette question, nous avons analysé la quantité d'ADNmt et des protéines des différents complexes respiratoires pour quantifier les mitochondries et les unités fonctionnelles dans les cellules musculaires. Nos résultats rapportent une légère baisse de l'ADNmt, alors que les gènes associés à la biogénèse sont restés stables. De plus, l'expression des différents complexes respiratoires dans le muscle squelettique ne montre aucune variation. Ces données suggèrent que la réduction de l'ADNmt après le sepsis n'est pas suffisante pour affecter la quantité des complexes respiratoires dans le muscle squelettique. De plus, nos expériences chez les souris âgées présentent une diminution de la respiration mitochondriale et de la quantité d'ADNmt d'environ 50%, bien supérieure à celle observée dans nos souris Sepsis. Ces résultats confirment l'hypothèse que la diminution observée de l'ADNmt chez les souris sepsis n'est pas suffisante pour modifier les niveaux des

complexes respiratoires et surement le nombre de mitochondrie. Il semble que la dysfonction mitochondriale ne soit pas due à une réduction des mitochondries dans le muscle. Les délétions de l'ADNmt constituent également une cause possible. Néanmoins, aucune diminution n'a été observée dans le groupe sepsis, ce qui témoigne d'une absence de délétions. Ces résultats sont cohérents avec une étude qui a démontré la présence d'une dysfonction mitochondriale 5 ans après le sepsis chez l'Homme sans changement de la quantité d'ADNmt ⁷. A ce stade, notre réflexion nous oriente plutôt vers un problème intrinsèque à la mitochondrie.

Nos résultats montrent que la dysfonction mitochondriale est associée à une augmentation de la présence de protéines 3-NT, marqueur de nitration et de la présence d'un stress oxydatif et nitrosatif dans le muscle. Malgré l'observation de ce stress, les niveaux des défenses antioxydantes n'étaient pas modulées à la hausse, dont notamment SOD2. Ces observations sont cohérentes avec des analyses réalisées chez la souris et le rats où des protéines 3-NT ont été retrouvées dans le muscle oxydatif et également pendant le vieillissement. La présence de 3-NT a été retrouvée dans des fractions mitochondriales, ce qui peut induire une perte d'activité de ces protéines ^{8,107,151,152}. Le stress nitrosatif est capable d'induire la formation de groupements nitrotyrosines (nitration) au niveau de la protéine NDUFB8 (complexe I) et d'inhiber sa fonction, ainsi que de réduire la consommation d'oxygène ¹⁰⁷. De manière générale, les protéines mitochondriales sont particulièrement sensibles à la nitration et aux dommages induits. Une des fonctions de SOD2 est de limiter l'apparition de protéines 3-NT en traitant le stress nitrosatif et oxydatif ¹⁵²⁻¹⁵⁴. Ainsi, la présence de protéines 3-NT pourrait expliquer la diminution de la respiration mitochondriale précédemment observée dans le muscle oxydatif. Une étude a démontré que la surexpression de SOD2 permettait protéger des altérations mitochondriales et musculaires induite 21 jours après le sepsis ¹³⁴. Dans notre modèle, l'expression de SOD2 n'augmente pas malgré la hausse de protéine 3-NT, ce qui peut constituer une explication à la présence du stress nitrosatif et de la dysfonction mitochondriale. Cependant, nous ne quantifions pas l'activité enzymatique de SOD2, nous ne faisons que supposer un niveau de défenses antioxydantes insuffisant. D'autres expériences seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, il a été démontré que Hsp60 est impliqué dans le fonctionnement de SOD2 en veillant à son bon repliement. De plus, Hsp60 peut subir une perte de fonction par la nitration ^{56,155}. Ainsi, ces informations suggèrent que SOD2, bien que non diminué dans nos échantillons, pourrait être moins efficace. Cela entraînerait une accumulation des dommages par le stress nitrosatif et la diminution de la respiration mitochondriale. L'activation d'Hsp60 traduit la présence d'un stress mitochondrial et peut également entraîner

l'apoptose par la caspase 3 en présence de dommages trop importants ⁵⁷. Ces dommages peuvent être aussi pris en charge par différents mécanismes impliqués dans le contrôle qualité de la mitochondrie (autophagie, dynamique mitochondriale). Des altérations de ces voies durant le sepsis sont responsables d'une accumulation de mitochondries endommagées et dysfonctionnelles ^{8,9,107,114}. Pour tester cette hypothèse nous avons analysé différents gènes associés à ces mécanismes. Nous avons observé une régulation à la hausse de la fission mitochondriale. Bien que celle-ci soit modérée, elle pourrait indiquer la présence de mitochondries endommagées et nécessaires à isoler pour leur dégradation. Le sepsis est connu pour induire des dommages importants et entraîner l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles en association avec une fission mitochondriale augmentée ^{8,9,107,116}. Par ailleurs, l'autophagie et la mitophagie ne présentaient pas de signes d'activation. Une augmentation nette des deux marqueurs Hsp60 et de la Caspase-3 clivée dans le groupe Sepsis a été constatée, suggérant l'activation de l'apoptose et de la voie UPRmt. Il s'agit d'une observation intéressante puisque Hsp60 est un potentiel médiateur de l'activation de la Caspase-3 et sous-entend une possible corrélation entre les deux marqueurs. Il a été démontré que Hsp60 est augmenté dans le plasma d'enfants en choc septique et participe à l'apoptose par l'activation de la caspase 3 dans les myocytes cardiaques ^{58,156}. Hsp60 possède également des propriétés pro-inflammatoires en se liant au TLR4 et en induisant l'activation de l'Il-1 β ¹⁵⁶. Un schéma similaire a été découvert dans les microglies, Hsp60 permettrait d'une part de déclencher la mort cellulaire, mais aussi dans le même temps une l'inflammation médiée par la voie NLRP3/Caspase-1 et Il-1 β ^{157,158}.

Ainsi, ces résultats indiquent que le sepsis induit une dysfonction mitochondriale associée à un stress nitrosatif persistant. Les défenses antioxydantes ne semblent pas suffisamment efficaces pour contrer les dommages induits par le stress nitrosatif contre les protéines, et notamment au niveau de la mitochondrie et du complexe I. Cela entraînerait une réduction de la fonction OXPHOS et des défauts bioénergétiques. La libération massive d'Hsp60 conduit à l'activation de l'apoptose dépendante la Caspase-3 et induit une réponse inflammatoire dépendante du TLR4 (Figure 50). L'activation de la fission mitochondriale pourrait témoigner de l'accumulation des mitochondries dysfonctionnelles.

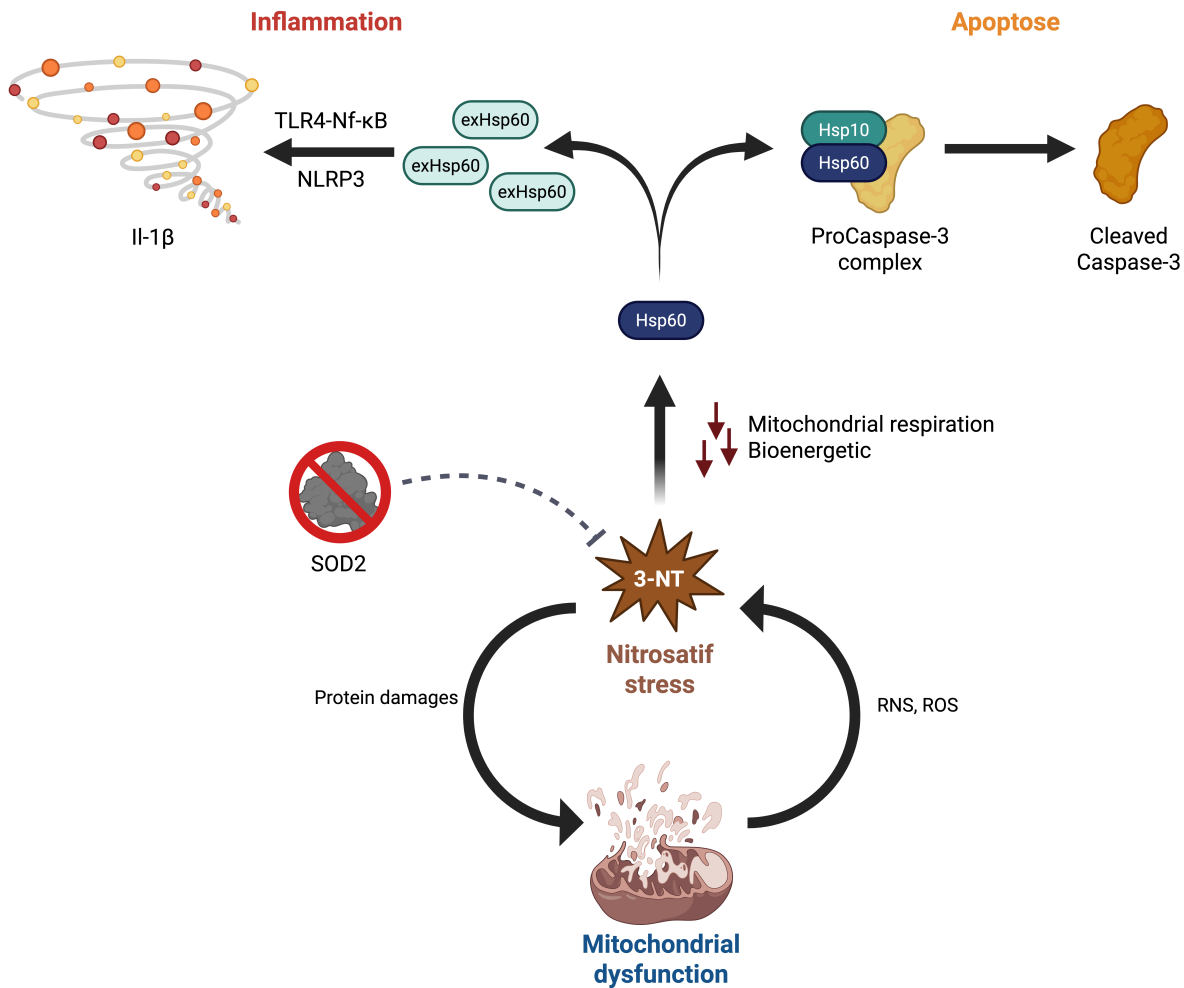


Figure 50. Représentation des mécanismes hypothétiques de la dysfonction mitochondriale dans le muscle squelettique à long terme après le sepsis chez la souris.

La dysfonction mitochondriale durant le sepsis induit un stress oxydatif et nitrosatif qui exacerbe la dysfonction mitochondriale. Des dommages sont générés et résultent en des modifications des protéines mitochondriales par nitration. Normalement inhibés par SOD2, les dommages nitrosatifs vont s'accroître et induire la production d'Hsp60. La première voie entraînera la formation du complexe Hsp10, Hsp60 et procaspase-3 qui vont permettre l'activation de la caspase 3 et de l'apoptose. La seconde voie passe par la libération dans le milieu extracellulaire d'Hsp60 (exHsp60). Celle-ci sera détectée comme DAMP par le TLR4 et va initier une réponse inflammatoire médiée par la voie NLRP3 et IL-1B. Biorender.

Pendant le sepsis, plusieurs voies inflammatoires sont mobilisées, tels que $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, NLRP3 et RAGE. Nous avons donc orienté notre analyse des gènes associés à l'inflammation sur l'ensemble de ces voies ^{9,159,160}. Parmi elles, deux voies en ressortent principalement, la première est la voie NLRP3/IL-1 β , confirmée en plus par l'expression de la Caspase-1 clivée, un effecteur en aval de la voie. La seconde est la voie RAGE, en partie confirmée par l'augmentation de ses ligands à forte affinité (HMGB1, S100a8 et S100a9). Cependant,

l'expression de RAGE n'était pas détectable par western-blot dans les échantillons de muscle et ne nous a pas permis de confirmer sa présence d'un point de vue protéique. Par ailleurs, nous avons eu l'opportunité de confirmer l'augmentation de l'expression génique du RAGE dans notre modèle *in-vitro*. Elle était aussi associée à une diminution de la fonction mitochondriale et à une inflammation dans des myotubes traités par du LPS à faible dose et de façon chronique afin de reproduire un environnement s'approchant de notre modèle murin. En comparaison avec la littérature à propos des voies inflammatoires retrouvées pendant le sepsis, les mêmes sont retrouvées dans notre étude. La voie NLRP3 est une voie fortement active pendant le sepsis et associée à une production accrue d'Il-1 β et de Caspase-1^{92,117,122,161,162}. Il en est de même pour la voie RAGE qui trouve son expression augmentée pendant le sepsis et certains de ses ligands, et ceux mêmes à long terme après le sepsis. A noter que les protéines S100a8, S100a9 et HMGB1 sont aussi capables de lier le TLR4^{9,13,163–165}. Ces données confirment la présence d'une inflammation à long terme après le sepsis via les voies NLRP3 et RAGE. Enfin, ils sont également cohérents avec des études qui stipulent que la voie NLRP3 est sensible à l'augmentation d'Hsp60, ce qui renforce notre hypothèse précédente concernant la dysfonction mitochondriale^{157,158}.

Nos données démontrent que les survivants du sepsis présentent principalement une faiblesse musculaire, une dysfonction mitochondriale et une inflammation. Ces altérations font partie intégrante du processus de vieillissement musculaire et nous pouvons logiquement nous demander, si nous ne sommes pas dans un contexte de vieillissement accéléré induit par le sepsis^{68,80,86}. C'est à partir de cette hypothèse que nous avons évalué certains paramètres pendant le vieillissement entre des souris jeunes et âgées et testé les grands marqueurs dans notre modèle. Nous avons pu constater que la dysfonction mitochondriale observée après le sepsis était similaire à celle observée durant le vieillissement. Bien qu'il n'y ait pas de présence de délétions de l'ADNmt, on a pu observer une déplétion de l'ADNmt dans les deux contextes. Cependant, la déplétion induite par le vieillissement est plus importante. L'autre divergence concerne le poids humide, une baisse est constatée sur plusieurs groupes musculaires durant le vieillissement, ce qui n'est pas le cas après le sepsis. Cela peut suggérer que nous ne sommes pas exactement dans le même contexte concernant le types d'altérations moléculaires et cellulaires observées. Les voies inflammatoires et de signalisations mises en jeu ne sont probablement pas exactement les mêmes. Enfin, les principaux marqueurs du vieillissement n'ont pas montré de signe d'activation chez les survivants du sepsis. Cela confirme que nous ne sommes pas dans un contexte de vieillissement physiologique à proprement parlé, même s'il

existe des altérations similaires. De plus, dans l'étude de l'inflammation, nous n'avons pas remarqué d'augmentations de l'Il-6 et du TNF- α qui sont pourtant associées à la sarcopénie et à la perte de masse musculaire ^{100,101}. Ainsi, dans notre modèle nous ne décelons ni atrophie musculaire, ni activation de la voie Il-6 et TNF- α , soulignant une divergence avec la sarcopénie. Enfin, les données provenant de notre modèle *in-vitro*, renforcent ces résultats avec l'absence de sénescence après une stimulation chronique au LPS et l'activation des voies inflammatoire via NLRP3 et RAGE. Ces résultats finissant d'écarter l'homologie avec un vieillissement musculaire à proprement parlé, où dans le muscle âgé la présence de sénescence est décelée ³¹. Cependant, cela pourrait désigner un mécanisme insidieux, ne reproduisant pas tous les marqueurs du vieillissement (notamment la sénescence), le rendant plus compliqué à déceler, mais, pas moins dangereux et impactant pour autant, notamment chez les patients. La dysfonction mitochondriale, l'inflammation et la faiblesse musculaire sont-elles bien observées et sont toutes aussi impactantes pour l'organisme. Il s'agirait alors plus d'altérations qualitatives du muscle que quantitatives. Cependant, conclure que le sepsis n'induit pas de vieillissement musculaire à long terme revient à raisonner de manière dichotomique et ne reflète pas toute la complexité du phénomène.

L'exposition prolongée des myotubes au LPS constitue un modèle *in-vitro* simplifié du sepsis mais pertinent pour cibler la réponse muscle spécifique à un signal inflammatoire via le TLR4 et le RAGE ¹⁶⁶. Il nous permet d'observer la réponse mitochondriale et inflammatoire suite à un signal inflammatoire chronique. L'objectif ici, est d'observer si les altérations mitochondriales et inflammatoires sont spécifiques au muscle et ne sont pas une conséquence d'effets systémiques exercés par l'organisme. Les résultats de la respiration mitochondriale étaient clairs avec une diminution de celle-ci sur l'ensemble des états analysés. Du côté de l'inflammation, nous avons observé la régulation à la hausse des voies NLRP3, RAGE mais aussi de l'Il-6. Concernant une potentielle fibrose dans le muscle, nous avons étudié l'expression de diverses métalloprotéases dans notre modèle *in-vitro* et nous avons constaté la régulation à la hausse de Mmp3. La réponse cellulaire démontrait l'absence de marqueurs de la sénescence. Ainsi, ces résultats sont conformes à nos données retrouvées chez la souris survivantes du sepsis. De plus, ils sont cohérents avec les traitements LPS réalisés sur des C2C12 dans une autre étude qui démontre l'activation de l'inflammasome NLRP3, l'augmentation de la fission mitochondriale et la perturbation du métabolisme mitochondrial ¹¹⁸. Ainsi, ces résultats valident nos observations chez la souris et soutiennent la mise en place d'une réponse musculaire spécifique à long terme après le sepsis par une dysfonction

mitochondriale associée à une inflammation médiée par NLRP3 et RAGE. Par ailleurs, un phénotype pro-fibrotique apparaît, bien qu'il ne soit pas associé aux caractéristiques du vieillissement musculaire classique. Sur la base de ces observations et de l'activation de la voie RAGE, ainsi que de ses liens avec la fonction mitochondriale, l'inflammation et le sepsis, nous avons étudié l'effet de son inhibition sur les altérations musculaires après le sepsis. Pour réaliser ces expériences nous avons appliqué notre protocole d'induction du sepsis sur des souris *Ager*^{-/-}. La mortalité des souris *Ager*^{-/-} n'était pas différente en comparaison des souris Sepsis *Ager*^{-/-}. Ainsi, l'inhibition de RAGE n'améliore pas la survie mais n'exacerbe pas non plus le sepsis à ce niveau. Dans un premier, temps nous avons pu constater que nous avons reproduit l'ensemble des altérations observées à long terme après le sepsis une seconde fois. Ce qui renforce considérablement nos conclusions précédentes. Les souris Sepsis *Ager*^{-/-}, bien que non-différentes significativement des souris Sepsis wt, ne développaient pas de dysfonction mitochondriale, ni d'inflammation vis-à-vis des souris Sham *Ager*^{-/-}. Cela est cohérent avec les données qui indiquent que l'inhibition du RAGE pendant le sepsis permet d'améliorer la fonction mitochondriale et la fonction musculaire^{9,167}. RAGE est également impliqué dans les altérations liées au vieillissement en participant à l'inflammaging par la voie NLRP3, NF-κB et à la dysfonction mitochondriale. Son inhibition a permis de prévenir le vieillissement rénal^{15,167,168}. Ainsi, ces résultats suggèrent que les altérations à long terme après le sepsis seraient médiées en partie par la voie RAGE. Une autre partie pourrait être médiée par le TLR4, possiblement activé par Hsp60, comme suggéré précédemment. Enfin, il convient également de considérer qu'il pourrait s'agir de la conséquence de ces deux voies de signalisation imbriquées. En effet, aucune étude n'a démontré si Hsp60 pouvait lier RAGE, d'autant plus que RAGE a la capacité de reconnaître différents DAMPs, et que Hsp60, une fois dans la circulation extracellulaire en devient un, à l'image des protéines S100a8, S100a9, l'ADNmt ou encore HMGB1. Cependant, d'autres expériences seront nécessaires pour clarifier l'importance de chaque voie dans les altérations à long terme après le sepsis et pour aller plus loin dans ces hypothèses. Par ailleurs, les expériences étaient menées sur certains groupes possédant un nombre relativement faible d'échantillons et la variabilité élevée observée dans certains résultats (écart-type important) peuvent masquer des différences biologiques réelles. Une augmentation de la taille d'échantillon pourrait permettre de clarifier ces tendances. Ce dernier point est commun à une grande partie de nos expériences et pourrait suggérer aussi que chaque individus récupère différemment. Cette variabilité est rencontrée dans plusieurs études et proviendrait notamment des cellules elles-mêmes, qui présentent des altérations transcriptionnelles à court terme, tandis que d'autres montrent des modifications plus tardives,

contribuant à une récupération inégale selon les tissus et types cellulaires ^{112,145}. Il serait potentiellement intéressant d'analyser les altérations à long terme en fonction d'un score de récupération et qui ciblerait les patients les plus impactés à long terme.

Partie VI - Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que les souris survivantes du sepsis développent à long terme une faiblesse musculaire caractérisée par une réduction de la résistance à la fatigue dans le muscle oxydatif. Elle s'accompagne de plusieurs altérations musculaires telles que la dysfonction mitochondriale et l'inflammation. De plus, des résultats intéressants suggèrent également, la présence d'une fibrose et d'une fission mitochondriale, cependant, d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer ces hypothèses. La dysfonction mitochondriale est associée à la présence d'un stress nitrosatif et à une augmentation de la voie UPRmt médiée par Hsp60. Cette augmentation serait responsable de l'activation de l'apoptose via la Caspase-3, et aussi d'une possible activation de la voie inflammatoire dépendante d'Hsp60 dans le milieu extra-cellulaire qui stimulerait la voie NLRP3/Caspase-1/Il-1 β . Enfin, nous avons également démontré qu'une inflammation médiée par les voies de NLRP3 et de RAGE était présente (Figure 51). Les effets de l'inhibition du RAGE se sont révélés encourageants, permettant d'empêcher en partie le développement de la dysfonction mitochondriale, de l'inflammation, du stress nitrosatif et d'Hsp60. Cependant, les niveaux d'expression n'étaient pas différents des souris Sepsis wt et suggèrent une inflammation plus complexe, reposant potentiellement sur deux voies ou plus. La présence d'Hsp60 dans notre modèle de sepsis murin pourrait proposer une hypothèse valable en soutenant l'idée d'une réponse inflammatoire médiée par le TLR4 en plus de RAGE (Figure 51). Les travaux futurs devront explorer cette hypothèse ainsi que les mécanismes impliqués dans la faiblesse musculaire à long terme après sepsis, en particulier les liens entre dysfonction mitochondriale et inflammation, afin de mieux comprendre le caractère chronique de ces altérations.

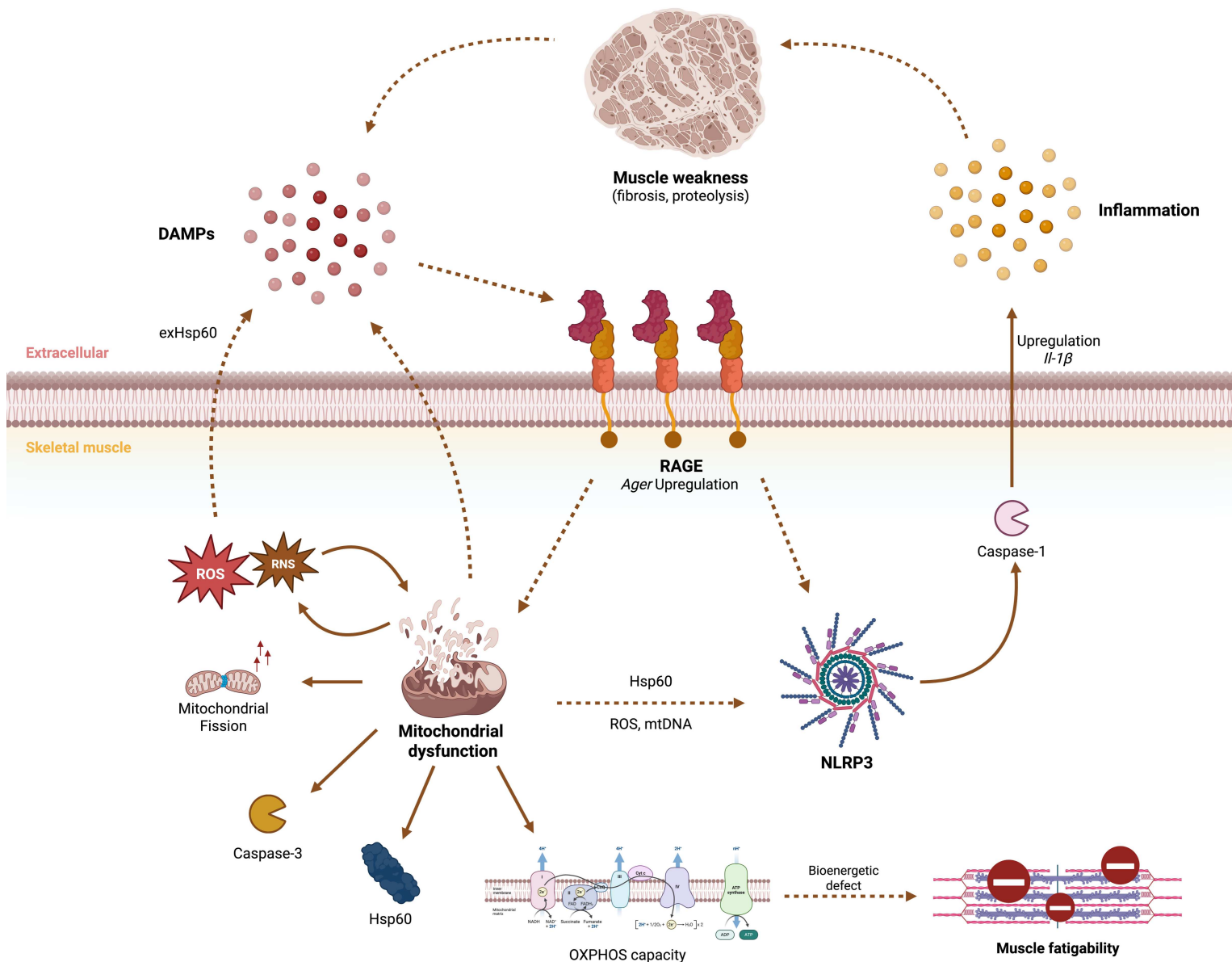


Figure 51. Schéma récapitulatif des altérations musculaires à long terme après le sepsis et leurs interactions.

Le sepsis entraîne une diminution de la résistance à la fatigue du muscle squelettique qui pourrait s'expliquer par la dysfonction mitochondriale et la baisse de capacité l'OXPHOS. Les ROS et RNS libérés vont entraîner des dommages comme la nitration des protéines musculaires. La dysfonction mitochondriale va aboutir à l'augmentation de Hsp60 qui agit comme un DAMPs et pourra être capable d'induire l'inflammation via NLRP3. Hsp60 est également responsable de l'activation de la caspase-3, protéine impliquée dans l'apoptose. L'activation de la voie NLRP3 induira une inflammation médiée par la Caspase-1 et la production d'IL-1B. L'activation de RAGE est associée aux voies mitochondriales et inflammatoires. Une potentielle fibrose est présente et peut participer à la faiblesse musculaire. Les traits pleins représentent des activations des protéines ou événements décrits. Les flèches en tirets représentent des interactions hypothétiques et qui restent encore à démontrer. Biorender.

Bibliographie

1. Gritte, R. B., Souza-Siqueira, T., Curi, R., Machado, M. C. C. & Soriano, F. G. Why Septic Patients Remain Sick After Hospital Discharge? *Frontiers in Immunology* **11**, (2021).
2. Evans, L. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Critical Care Medicine* **49**, e1063 (2021).
3. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
4. Mira, J. C., Brakenridge, S. C., Moldawer, L. L. & Moore, F. A. Persistent Inflammation, Immunosuppression and Catabolism Syndrome (PICS). *Crit Care Clin* **33**, 245–258 (2017).
5. Schefold, J. C., Bierbrauer, J. & Weber-Carstens, S. Intensive care unit-acquired weakness (ICUAW) and muscle wasting in critically ill patients with severe sepsis and septic shock. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **1**, 147–157 (2010).
6. Hermans, G. & Van Den Berghe, G. Clinical review: intensive care unit acquired weakness. *Crit Care* **19**, (2015).
7. Uzun Ayar, C. *et al.* Altered muscle transcriptome as molecular basis of long-term muscle weakness in survivors from critical illness. *Intensive Care Med* <https://doi.org/10.1007/s00134-025-07949-3> (2025) doi:10.1007/s00134-025-07949-3.
8. Owen, A. M. *et al.* Chronic muscle weakness and mitochondrial dysfunction in the absence of sustained atrophy in a preclinical sepsis model. *eLife* **8**, e49920.
9. Huang, D. *et al.* Elevated levels of S100A8 and S100A9 exacerbate muscle mitochondrial fragmentation in sepsis-induced muscle atrophy. *Commun Biol* **8**, 1–15 (2025).
10. Sedraoui, S. *et al.* Lack of compensatory mitophagy in skeletal muscles during sepsis. *The Journal of Physiology* **n/a**,.
11. Paik, S., Kim, J. K., Silwal, P., Sasakawa, C. & Jo, E.-K. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol* **18**, 1141–1160 (2021).
12. Chen, R., Kang, R. & Tang, D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med* **54**, 91–102 (2022).
13. Valdés-Ferrer, S. I. *et al.* HMGB1 Mediates Anemia of Inflammation in Murine Sepsis Survivors. *Mol Med* **21**, 951–958 (2015).
14. Riuzzi, F. *et al.* RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **9**, 1213–1234 (2018).

15. Teissier, T. & Boulanger, É. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is an important pattern recognition receptor (PRR) for inflammation. *Biogerontology* **20**, 279–301 (2019).
16. Walsh, C. J. *et al.* Transcriptomic analysis reveals abnormal muscle repair and remodeling in survivors of critical illness with sustained weakness. *Sci Rep* **6**, 29334 (2016).
17. Sweeney, H. L. & Hammers, D. W. Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, a023200 (2018).
18. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* **96**, 183–195 (2015).
19. Zhao, J., Du, X., Fang, W., Zhu, H. & Yue, B. Architecture and molecular machinery of skeletal myofibers: a systematic review of the structure–function relationships. *Front. Cell Dev. Biol.* **13**, (2025).
20. Snyder, S. & Handschin, C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 α , myokines and exercise. *Bone* **80**, 115–125 (2015).
21. Ferreira, R. *et al.* Subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria proteome differences disclose functional specializations in skeletal muscle. *PROTEOMICS* **10**, 3142–3154 (2010).
22. Roman, W. & Gomes, E. R. Nuclear positioning in skeletal muscle. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **82**, 51–56 (2018).
23. Mukund, K. & Subramaniam, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **12**, e1462 (2020).
24. Parry, H. A. *et al.* Impact of capillary and sarcolemmal proximity on mitochondrial structure and energetic function in skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **602**, 1967–1986 (2024).
25. Talbot, J. & Maves, L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **5**, 518–534 (2016).
26. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber Types in Mammalian Skeletal Muscles. *Physiological Reviews* **91**, 1447–1531 (2011).
27. Sieck, D. C. *et al.* Structure-Activity Relationships in Rodent Diaphragm Muscle Fibers vs. Neuromuscular Junctions. *Respir Physiol Neurobiol* **180**, 88–96 (2012).
28. Barone, V., Randazzo, D., Del Re, V., Sorrentino, V. & Rossi, D. Organization of junctional sarcoplasmic reticulum proteins in skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil* **36**, 501–515 (2015).

29. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M. A. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiological Reviews* **93**, 23–67 (2013).
30. Motohashi, N., Minegishi, K. & Aoki, Y. Inherited myogenic abilities in muscle precursor cells defined by the mitochondrial complex I-encoding protein. *Cell Death Dis* **14**, 1–13 (2023).
31. Zhang, X. *et al.* Characterization of cellular senescence in aging skeletal muscle. *Nature Aging* **2**, 1–15 (2022).
32. Contreras, O., Rossi, F. M. V. & Theret, M. Origins, potency, and heterogeneity of skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors-time for new definitions. *Skeletal Muscle* **11**, 16 (2021).
33. Jiang, H. *et al.* MuSCs and IPCs: roles in skeletal muscle homeostasis, aging and injury. *Cell. Mol. Life Sci.* **81**, 67 (2024).
34. Ahmad, K., Choi, I. & Lee, Y.-H. Implications of Skeletal Muscle Extracellular Matrix Remodeling in Metabolic Disorders: Diabetes Perspective. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 3845 (2020).
35. Mahdy, M. A. A. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res* **375**, 575–588 (2019).
36. Gallardo, F. S. *et al.* Role of TGF- β /SMAD/YAP/TAZ signaling in skeletal muscle fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **328**, C1015–C1028 (2025).
37. Houten, S. M. & Wanders, R. J. A. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inherit Metab Dis* **33**, 469–477 (2010).
38. Protasoni, M. & Zeviani, M. Mitochondrial Structure and Bioenergetics in Normal and Disease Conditions. *International Journal of Molecular Sciences* **22**, 586 (2021).
39. Santos, R. X. *et al.* Mitochondrial DNA Oxidative Damage and Repair in Aging and Alzheimer's Disease. *Antioxid Redox Signal* **18**, 2444–2457 (2013).
40. Romanello, V. & Sandri, M. MITOCHONDRIA QUALITY CONTROL AND MUSCLE MASS MAINTENANCE. *Front. Physiol.* **6**, (2016).
41. Nile, D. L. *et al.* Age-Related Mitochondrial DNA Depletion and the Impact on Pancreatic Beta Cell Function. *PLOS ONE* **9**, e115433 (2014).
42. Hood, D. A. & Iqbal, S. Muscle mitochondrial ultrastructure: new insights into morphological divergences. *Journal of Applied Physiology* **114**, 159–160 (2013).

43. Taylor, D. F. & Bishop, D. J. Transcription Factor Movement and Exercise-Induced Mitochondrial Biogenesis in Human Skeletal Muscle: Current Knowledge and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1517 (2022).
44. Akram, M. Citric Acid Cycle and Role of its Intermediates in Metabolism. *Cell Biochem Biophys* **68**, 475–478 (2014).
45. Arnold, P. K. & Finley, L. W. S. Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *Journal of Biological Chemistry* **299**, (2023).
46. Zhao, R.-Z., Jiang, S., Zhang, L. & Yu, Z.-B. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine* **44**, 3–15 (2019).
47. Nolfi-Donagan, D., Braganza, A. & Shiva, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biology* **37**, 101674 (2020).
48. Pacher, P., Beckman, J. S. & Liaudet, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews* **87**, 315–424 (2007).
49. Rigamonti, E. *et al.* Requirement of Inducible Nitric Oxide Synthase for Skeletal Muscle Regeneration after Acute Damage. *The Journal of Immunology* **190**, 1767–1777 (2013).
50. Cai, Z. & Yan, L.-J. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res* **1**, 15–26 (2013).
51. Lian, D., Chen, M.-M., Wu, H., Deng, S. & Hu, X. The Role of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Myogenesis and Muscle Disease. *Antioxidants* **11**, 755 (2022).
52. Barbieri, E. & Sestili, P. Reactive Oxygen Species in Skeletal Muscle Signaling. *Journal of Signal Transduction* **2012**, 982794 (2012).
53. Di Meo, S., Napolitano, G. & Venditti, P. Mediators of Physical Activity Protection against ROS-Linked Skeletal Muscle Damage. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 3024 (2019).
54. Popov, L.-D. Mitochondrial biogenesis: An update. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **24**, 4892–4899 (2020).
55. Dabravolski, S. A. *et al.* Role of the mtDNA Mutations and Mitophagy in Inflammaging. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 1323 (2022).
56. Marino Gammazza, A., Macaluso, F., Di Felice, V., Cappello, F. & Barone, R. Hsp60 in Skeletal Muscle Fiber Biogenesis and Homeostasis: From Physical Exercise to Skeletal Muscle Pathology. *Cells* **7**, 224 (2018).

57. Samali, A., Cai, J., Zhivotovsky, B., Jones, D. P. & Orrenius, S. Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of Jurkat cells. *The EMBO Journal* **18**, 2040–2048 (1999).
58. Wheeler, D. S. *et al.* Extracellular heat shock protein 60 (Hsp60) levels in children with septic shock. *Inflamm. res.* **56**, 216–219 (2007).
59. Swaroop, S., Sengupta, N., Suryawanshi, A. R., Adlakha, Y. K. & Basu, A. HSP60 plays a regulatory role in IL-1 β -induced microglial inflammation via TLR4-p38 MAPK axis. *J Neuroinflammation* **13**, 27 (2016).
60. de Haan, J. J., Smeets, M. B., Pasterkamp, G. & Arslan, F. Danger Signals in the Initiation of the Inflammatory Response after Myocardial Infarction. *Mediators of Inflammation* **2013**, 206039 (2013).
61. Chen, T.-H., Koh, K.-Y., Lin, K. M.-C. & Chou, C.-K. Mitochondrial Dysfunction as an Underlying Cause of Skeletal Muscle Disorders. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 12926 (2022).
62. Guan, S.-S. *et al.* The pathological role of advanced glycation end products-downregulated heat shock protein 60 in islet β -cell hypertrophy and dysfunction. *Oncotarget* **7**, 23072–23087 (2016).
63. Zanfardino, P., Amati, A., Perrone, M. & Petruzzella, V. The Balance of MFN2 and OPA1 in Mitochondrial Dynamics, Cellular Homeostasis, and Disease. *Biomolecules* **15**, 433 (2025).
64. VanderVeen, B. N., Fix, D. K. & Carson, J. A. Disrupted Skeletal Muscle Mitochondrial Dynamics, Mitophagy, and Biogenesis during Cancer Cachexia: A Role for Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, e3292087 (2017).
65. Zerihun, M., Sukumaran, S. & Qvit, N. The Drp1-Mediated Mitochondrial Fission Protein Interactome as an Emerging Core Player in Mitochondrial Dynamics and Cardiovascular Disease Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 5785 (2023).
66. Settembre, C. *et al.* TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science* **332**, 1429–1433 (2011).
67. Cao, W., Li, J., Yang, K. & Cao, D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bulletin du Cancer* **108**, 304–322 (2021).
68. Xu, X. & Wen, Z. The mediating role of inflammaging between mitochondrial dysfunction and sarcopenia in aging: a review. *Am J Clin Exp Immunol* **12**, 109–126 (2023).
69. Eskelinen, E.-L. *et al.* Role of LAMP-2 in Lysosome Biogenesis and Autophagy. *Mol Biol Cell* **13**, 3355–3368 (2002).

70. Ferrucci, L. *et al.* Measuring biological aging in humans: A quest. *Aging Cell* **19**, e13080 (2020).
71. Zengarini, E. *et al.* Fatigue: Relevance and implications in the aging population. *Experimental Gerontology* **70**, 78–83 (2015).
72. McHugh, D. & Gil, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *Journal of Cell Biology* **217**, 65–77 (2017).
73. Khan, S. S., Singer, B. D. & Vaughan, D. E. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell* **16**, 624–633 (2017).
74. Ibarz, M., Haas, L. E. M., Ceccato, A. & Artigas, A. The critically ill older patient with sepsis: a narrative review. *Annals of Intensive Care* **14**, 6 (2024).
75. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).
76. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* **186**, 243–278 (2023).
77. Wang, T. Searching for the link between inflammaging and sarcopenia. *Ageing Research Reviews* **77**, 101611 (2022).
78. Szentesi, P., Csernoch, L., Dux, L. & Keller-Pintér, A. Changes in Redox Signaling in the Skeletal Muscle with Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, 4617801 (2019).
79. Tournadre, A., Vial, G., Capel, F., Soubrier, M. & Boirie, Y. Sarcopenia. *Joint Bone Spine* **86**, 309–314 (2019).
80. Liang, Z. *et al.* Inflammaging: The ground for sarcopenia? *Experimental Gerontology* **168**, 111931 (2022).
81. González-Gualda, E., Baker, A. G., Fruk, L. & Muñoz-Espín, D. A guide to assessing cellular senescence in vitro and in vivo. *The FEBS Journal* **288**, 56–80 (2021).
82. Tang, C. W. *et al.* The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells. *J Cell Sci* **121**, 1014–1024 (2008).
83. Siddiqui, M. S., François, M., Fenech, M. F. & Leifert, W. R. Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **766**, 1–19 (2015).
84. Gonzalez, D. *et al.* ALS skeletal muscle shows enhanced TGF- β signaling, fibrosis and induction of fibro/adipogenic progenitor markers. *PLOS ONE* **12**, e0177649 (2017).

85. Alameddine, H. S. & Morgan, J. E. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Inflammation and Fibrosis of Skeletal Muscles. *J Neuromuscul Dis* **3**, 455–473.
86. Kumar, L., Bisen, M., Khan, A., Kumar, P. & Patel, S. K. S. Role of Matrix Metalloproteinases in Musculoskeletal Diseases. *Biomedicines* **10**, 2477 (2022).
87. Lieber, R. L. & Ward, S. R. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **305**, C241–C252 (2013).
88. Piskór, B. M., Przyłipiak, A., Dąbrowska, E., Niczyporuk, M. & Ławicki, S. Matrilysins and Stromelysins in Pathogenesis and Diagnostics of Cancers. *Cancer Management and Research* **12**, 10949–10964 (2020).
89. Laronha, H. & Caldeira, J. Structure and Function of Human Matrix Metalloproteinases. *Cells* **9**, 1076 (2020).
90. Antuña, E. *et al.* Inflammaging: Implications in Sarcopenia. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 15039 (2022).
91. Pansarasa, O., Bertorelli, L., Vecchiet, J., Felzani, G. & Marzatico, F. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radical Biology and Medicine* **27**, 617–622 (1999).
92. Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H. & Shi, F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis* **10**, 128 (2019).
93. Olejarz, W. *et al.* RAGE and TLRs as Key Targets for Antiatherosclerotic Therapy. *BioMed Research International* **2018**, 7675286 (2018).
94. Sutterwala, F. S., Haasken, S. & Cassel, S. L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1319**, 82–95 (2014).
95. Zanders, L. *et al.* Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **13**, 713–727 (2022).
96. Ma, J. F. *et al.* STAT3 promotes IFN γ /TNF α -induced muscle wasting in an NF- κ B-dependent and IL-6-independent manner. *EMBO Molecular Medicine* **9**, 622–637 (2017).
97. White, J. P. *et al.* IL-6 regulation on skeletal muscle mitochondrial remodeling during cancer cachexia in the ApcMin/+mouse. *Skeletal Muscle* **2**, 14 (2012).
98. Pettersen, K. *et al.* Cancer cachexia associates with a systemic autophagy-inducing activity mimicked by cancer cell-derived IL-6 trans-signaling. *Sci Rep* **7**, 2046 (2017).

99. Moresi, V., Adamo, S. & Berghella, L. The JAK/STAT Pathway in Skeletal Muscle Pathophysiology. *Frontiers in Physiology* **10**, (2019).
100. Abid, H., Ryan, Z. C., Delmotte, P., Sieck, G. C. & Lanza, I. R. Extramyocellular interleukin-6 influences skeletal muscle mitochondrial physiology through canonical JAK/STAT signaling pathways. *The FASEB Journal* **34**, 14458–14472 (2020).
101. Feng, Z. *et al.* Pathophysiological Mechanisms Underlying Sarcopenia and Sarcopenic Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis of Biomarker Evidence. *International Journal of Molecular Sciences* **26**, 5113 (2025).
102. Bian, A.-L. *et al.* A study on relationship between elderly sarcopenia and inflammatory factors IL-6 and TNF- α . *European Journal of Medical Research* **22**, 25 (2017).
103. Liu, D. *et al.* Frontiers in sarcopenia: Advancements in diagnostics, molecular mechanisms, and therapeutic strategies. *Molecular Aspects of Medicine* **97**, 101270 (2024).
104. Yoshihara, I., Kondo, Y., Okamoto, K. & Tanaka, H. Sepsis-Associated Muscle Wasting: A Comprehensive Review from Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 5040 (2023).
105. Nakanishi, N. *et al.* Upper limb muscle atrophy associated with in-hospital mortality and physical function impairments in mechanically ventilated critically ill adults: a two-center prospective observational study. *J intensive care* **8**, 87 (2020).
106. Batt, J., dos Santos, C. C., Cameron, J. I. & Herridge, M. S. Intensive Care Unit-acquired Weakness. *Am J Respir Crit Care Med* **187**, 238–246 (2013).
107. Pierre, A. *et al.* Sepsis Induces Long-Term Muscle and Mitochondrial Dysfunction Due to Autophagy Disruption Amenable by Urolithin A. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* <https://doi.org/10.1002/jcsm.70041> (2025) doi:10.1002/jcsm.70041.
108. Crowell, K. T. & Lang, C. H. Contractility and Myofibrillar Content in Skeletal Muscle are Decreased During Post-Sepsis Recovery, But Not During the Acute Phase of Sepsis. *Shock* **55**, 649 (2021).
109. Oliveira, T. S. *et al.* Sepsis Disrupts Mitochondrial Function and Diaphragm Morphology. *Front. Physiol.* **12**, (2021).
110. Maestraggi, Q. *et al.* Skeletal Muscle and Lymphocyte Mitochondrial Dysfunctions in Septic Shock Trigger ICU-Acquired Weakness and Sepsis-Induced Immunoparalysis. *BioMed Research International* **2017**, 7897325 (2017).
111. Carré, J. E. *et al.* Survival in Critical Illness Is Associated with Early Activation of Mitochondrial Biogenesis. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 745–751 (2010).

112. Rocheteau, P. *et al.* Sepsis induces long-term metabolic and mitochondrial muscle stem cell dysfunction amenable by mesenchymal stem cell therapy. *Nat Commun* **6**, 10145 (2015).
113. Jiroutková, K. *et al.* Mitochondrial function in skeletal muscle of patients with protracted critical illness and ICU-acquired weakness. *Critical Care* **19**, 448 (2015).
114. Leduc-Gaudet, J.-P. *et al.* Autophagy ablation in skeletal muscles worsens sepsis-induced muscle wasting, impairs whole-body metabolism, and decreases survival. *iScience* **26**, (2023).
115. Crowell, K. T., Soybel, D. I. & Lang, C. H. Restorative Mechanisms Regulating Protein Balance in Skeletal Muscle During Recovery From Sepsis. *Shock* **47**, 463 (2017).
116. Zhu, Y. *et al.* Protective Effects of Inhibition of Mitochondrial Fission on Organ Function After Sepsis. *Front Pharmacol* **12**, 712489 (2021).
117. Huang, N. *et al.* Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Medicine Experimental* **5**, 3 (2017).
118. Eggelbusch, M. *et al.* The NLRP3 inflammasome contributes to inflammation-induced morphological and metabolic alterations in skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **n/a**, (2022).
119. Wang, S. *et al.* S100A8/A9 in Inflammation. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
120. Yan, Z. *et al.* Targeting adaptor protein SLP76 of RAGE as a therapeutic approach for lethal sepsis. *Nat Commun* **12**, 308 (2021).
121. Zhao, X., Liao, Y. & Huang, Q. The impact of RAGE inhibition in animal models of bacterial sepsis: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res* **46**, 11–21 (2018).
122. Qi, S.-Y. *et al.* HMGB1 in Septic Muscle Atrophy: Roles and Therapeutic Potential for Muscle Atrophy and Regeneration. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **16**, e13711 (2025).
123. Yende, S. *et al.* Inflammatory Markers at Hospital Discharge Predict Subsequent Mortality after Pneumonia and Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 1242–1247 (2008).
124. Yang, B. *et al.* IL-6 Deficiency Attenuates Skeletal Muscle Atrophy by Inhibiting Mitochondrial ROS Production through the Upregulation of PGC-1 α in Septic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2022**, 9148246 (2022).
125. Stana, F. *et al.* Differential Regulation of the Autophagy and Proteasome Pathways in Skeletal Muscles in Sepsis. *Critical Care Medicine* **45**, e971 (2017).

126. Crowell, K. T., Kelleher, S. L., Soybel, D. I. & Lang, C. H. Marginal dietary zinc deprivation augments sepsis-induced alterations in skeletal muscle TNF- α but not protein synthesis. *Physiological Reports* **4**, e13017 (2016).
127. Gharamti, A. A. *et al.* Proinflammatory cytokines levels in sepsis and healthy volunteers, and tumor necrosis factor-alpha associated sepsis mortality: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* **158**, 156006 (2022).
128. dos Santos, C. *et al.* Mechanisms of Chronic Muscle Wasting and Dysfunction after an Intensive Care Unit Stay. A Pilot Study. *Am J Respir Crit Care Med* **194**, 821–830 (2016).
129. Prescott, H. C. & Costa, D. K. Improving Long-term Outcomes after Sepsis. *Crit Care Clin* **34**, 175–188 (2018).
130. Kim, T. *et al.* ICU rehabilitation is associated with reduced long-term mortality from sepsis in patients with low skeletal muscle mass: a case control study. *Annals of Translational Medicine* **7**, 430–430 (2019).
131. Darden, N. *et al.* Long-term clinical outcomes in critically ill patients with sepsis and pre-existing low muscle mass: a retrospective cohort study. *BMC Anesthesiol* **23**, 313 (2023).
132. Saccheri, C. *et al.* ICU-acquired weakness, diaphragm dysfunction and long-term outcomes of critically ill patients. *Annals of Intensive Care* **10**, 1 (2020).
133. Nakanishi, N. *et al.* Sepsis causes neutrophil infiltration in muscle leading to muscle atrophy and weakness in mice. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
134. Kingren, M. S. *et al.* Post-sepsis chronic muscle weakness can be prevented by pharmacological protection of mitochondria. *Molecular Medicine* **30**, 221 (2024).
135. van der Slikke, E. C. *et al.* Sepsis is associated with mitochondrial DNA damage and a reduced mitochondrial mass in the kidney of patients with sepsis-AKI. *Crit Care* **25**, 36 (2021).
136. Matejovic, M. *et al.* Molecular differences in susceptibility of the kidney to sepsis-induced kidney injury. *BMC Nephrology* **18**, 183 (2017).
137. Wen, X. *et al.* Time-dependent effects of histone deacetylase inhibition in sepsis-associated acute kidney injury. *ICMx* **8**, 9 (2020).
138. Merdji, H. *et al.* Septic shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: A new pathway involved in the post sepsis long-term cardiovascular complications. *Vascular Pharmacology* **141**, 106922 (2021).
139. Nessler, N. *et al.* Liver Dysfunction Is Associated with Long-Term Mortality in Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* **193**, 335–337 (2016).

140. Gonnert, F. A. *et al.* Hepatic Fibrosis in a Long-term Murine Model of Sepsis. *Shock* **37**, 399 (2012).
141. Jackson, S. J. *et al.* Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim* **51**, 160–169 (2017).
142. Dutta, S. & Sengupta, P. Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences* **152**, 244–248 (2016).
143. Pierre, A. *et al.* Sepsis-like Energy Deficit Is Not Sufficient to Induce Early Muscle Fiber Atrophy and Mitochondrial Dysfunction in a Murine Sepsis Model. *Biology* **12**, 529 (2023).
144. Eikermann, M. *et al.* Muscle force and fatigue in patients with sepsis and multiorgan failure. *Intensive Care Med* **32**, 251–259 (2006).
145. Cho, D. S., Schmitt, R. E., Dasgupta, A., Ducharme, A. M. & Doles, J. D. Single-cell deconstruction of post-sepsis skeletal muscle and adipose tissue microenvironments. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **11**, 1351–1363 (2020).
146. Coelho, C. W. *et al.* Exercise training prevents skeletal muscle damage in an experimental sepsis model. *Clinics* **68**, 107–114 (2013).
147. Elkina, Y., von Haehling, S., Anker, S. D. & Springer, J. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**, 143–151 (2011).
148. Larson, K. R. *et al.* FGF21 Induces Skeletal Muscle Atrophy and Increases Amino Acids in Female Mice: A Potential Role for Glucocorticoids. *Endocrinology* **165**, bqae004 (2024).
149. Khattri, R. B. *et al.* Isolated murine skeletal muscles utilize pyruvate over glucose for oxidation. *Metabolomics* **18**, 105 (2022).
150. Callahan, L. A. & Supinski, G. S. Sepsis-induced myopathy. *Critical Care Medicine* **37**, S354 (2009).
151. Barreiro, E., Comtois, A. S., Gea, J., Laubach, V. E. & Hussain, S. N. A. Protein Tyrosine Nitration in the Ventilatory Muscles. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 438–446 (2002).
152. Murakami, H. *et al.* Cumulative 3-nitrotyrosine in specific muscle proteins is associated with muscle loss during aging. *Experimental Gerontology* **47**, 129–135 (2012).
153. Joffre, J. & Hellman, J. Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction in Sepsis and Acute Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling* **35**, 1291–1307 (2021).
154. Davis, C. W. *et al.* Nitration of the mitochondrial complex I subunit NDUFB8 elicits RIP1- and RIP3-mediated necrosis. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 306–317 (2010).

155. Barone, R. *et al.* Alcoholic Liver Disease: A Mouse Model Reveals Protection by *Lactobacillus fermentum*. *Clinical and Translational Gastroenterology* **7**, e138 (2016).
156. Kim, S.-C. *et al.* Extracellular Heat Shock Protein 60, Cardiac Myocytes, and Apoptosis. *Circulation Research* **105**, 1186–1195 (2009).
157. Swaroop, S., Mahadevan, A., Shankar, S. K., Adlakha, Y. K. & Basu, A. HSP60 critically regulates endogenous IL-1 β production in activated microglia by stimulating NLRP3 inflammasome pathway. *J Neuroinflammation* **15**, 177 (2018).
158. Xr, G. *et al.* Phthalate drives splenic inflammatory response via activating HSP60/TLR4/NLRP3 signaling axis-dependent pyroptosis. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)* **346**, (2024).
159. Martínez-García, J. J. *et al.* P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *Nat Commun* **10**, 2711 (2019).
160. Young, W. A. *et al.* Improved Survival following induction of sepsis by cecal slurry in PD-1 knockout murine neonates. *Surgery* **161**, 1387–1393 (2017).
161. Liu, Y. *et al.* The role of NLRP3 inflammasome in inflammation-related skeletal muscle atrophy. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
162. Busch, K. *et al.* Inhibition of the NLRP3/IL-1 β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **12**, 1653–1668 (2021).
163. Riuzzi, F. *et al.* RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **9**, 1213–1234 (2018).
164. Cerón, J. J. *et al.* S-100 Proteins: Basics and Applications as Biomarkers in Animals with Special Focus on Calgranulins (S100A8, A9, and A12). *Biology* **12**, 881 (2023).
165. Huang, H. & Tu, L. Expression of S100 family proteins in neonatal rats with sepsis and its significance. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 1631–1639 (2015).
166. Nair, M. *et al.* Lipopolysaccharides induce a RAGE-mediated sensitization of sensory neurons and fluid hypersecretion in the upper airways. *Sci Rep* **11**, 8336 (2021).
167. Daussin, F. N., Boulanger, E. & Lancel, S. From mitochondria to sarcopenia: Role of inflammaging and RAGE-ligand axis implication. *Experimental Gerontology* **146**, 111247 (2021).
168. Teissier, T. *et al.* Knockout of receptor for advanced glycation end-products attenuates age-related renal lesions. *Aging Cell* **18**, e12850 (2019).

ANNEXES

RAGE Contributes to Persistent Sepsis-Induced Muscle and Mitochondrial Alterations

Authors: Raphaël Romien¹, Alexandre Pierre^{1,2}, Sarah Ducastel¹, Arthur Dubech^{1,2}, Jérémy Lemaire¹, Gaëlle Grolaux¹, Marie Frimat^{1,3}, Benoit Brassart^{1,2}, Claire Bourel^{1,2}, Michael Howsam¹, Cécile Yelnik¹, Eric Boulanger^{1,4}, Raphaël Favory^{1,2}, Sebastien Preau^{1,2}, Steve Lancel^{1*}

¹Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France

²Division of Intensive Care, Hôpital Roger Salengro, CHU de Lille, 59000 Lille, France

³Division of Nephrology, Hôpital Claude Huriez, CHU de Lille, 59000 Lille, France

⁴Division of Geriatrics, Hôpital Albert Calmette, CHU de Lille, 59000 Lille, France

*Corresponding author. Email: steve.lancel@univ-lille.fr

Abstract: A majority of patients surviving sepsis develop muscle weakness. However, the underlying cellular and molecular pathways remain largely unexplored. To determine whether sepsis leads to long-term persistent muscular consequences and to identify the underlying mechanisms, we used a murine model of reanimated sepsis induced by intraperitoneal injection of a heterologous stool slurry. Muscles were analyzed 3 months later. The oxidative muscle exhibited reduced fatigue resistance and decreased mitochondrial respiration, without a corresponding reduction in mitochondrial OXPHOS proteins. Glycolytic and mixed muscle fibres were atrophied. Markers of oxidative and mitochondrial stress, as well as genes involved in mitochondrial fission, remained present 3 months after sepsis. Low-grade, but significant, muscular inflammation was also measured. Specifically, both the NLRP3 inflammasome and the receptor of Advanced Glycation End-products (RAGE) axis were upregulated. Interestingly, long-term sepsis-induced muscular consequences were not observed in RAGE knockout mice. Overall, we describe for the first time in mice that sepsis causes long-lasting muscle dysfunction after recovery, including mitochondrial alterations and low-grade inflammation, and that RAGE may represent a promising target to mitigate long-term muscle alterations induced by sepsis.

Introduction

Sepsis-induced organ dysfunction results from a dysregulated systemic immune response to host infection ^{1,2}. In 2017, sepsis affected almost 49 million people and caused around 11 million deaths ^{1,2}. Patients admitted to an intensive care unit (ICU) with septic shock have a mortality rate of around 40% ¹. ICU-acquired weakness (ICUAW) is a widespread complication affecting a majority of survivors ³⁻⁵. The reduction in muscle force persists for several months after sepsis, seriously impacting the quality of life of survivors, affecting daily activities, leading to a deterioration in physical condition, and increasing the risk of long-term mortality ^{3,6}.

Skeletal muscle represents around 40% of human body mass and plays a key role in maintaining posture, locomotion, and the conversion of chemical energy into mechanical work. It is a major player in energy metabolism, participating in the storage of amino acids and carbohydrates, thermoregulation, and energy production during exercise through mitochondrial ATP production. Any skeletal muscle damage has immediate repercussions on independence, quality of life, and general health ^{7,8}.

It has been shown that human sepsis survivors have reduced muscle force and collagen deposition in skeletal muscle for up to 5 years after their admission to the ICU ⁹. In addition, in mice, it has been shown that the muscle weakness observed in the first hours after sepsis onset can persist for up to one month ¹⁰⁻¹². Sepsis survivors show a decrease after sepsis in muscle cross-sectional area (CSA) and force that lasts up to 70 days in mice and 5 years in humans ¹³⁻¹⁵. Mitochondrial dysfunction may represent the main cause of post-sepsis muscle weakness ¹⁴. It was shown that 5 years after ICU admission for critical illness, survivors had muscle weakness associated with lower respiratory-chain complex activity, and abnormal expression of mitochondria-related RNA ¹⁵.

Mitochondrial alterations include reduced respiration, increased production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), as well as impaired mitochondrial quality control mechanisms ^{16,17}. Among these last, impairment of autophagy flux (involved in the removal and recycling of damaged cellular components) has recently been described ¹⁸. Mitochondrial dynamics involve both fusion and fission to support energy production or isolate damaged mitochondria for elimination. Sepsis disrupts mitochondrial dynamics in muscles, leading to mitochondrial dysfunction and increased levels of proteins involved in mitochondrial fission ^{19,20}. Thus, during sepsis, the mitochondrial quality control pathways (autophagy and mitochondrial dynamics) are impaired, leading to the accumulation of damaged mitochondria. Dysfunctional mitochondria may release mitochondrial DNA (mtDNA), which is considered to be a damage-associated molecular pattern (DAMP). DAMPs are messengers inducing inflammatory responses relying on the NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome ¹⁷. This pathway is responsible for pro-caspase-1 activation, which allows pro-interleukin-1 β (Il-1 β) cleavage into active Il-1 β ²¹. Activation of caspase 1 (CSP-1) by the NLRP3 inflammasome during sepsis leads to pyroptosis and massive release of high-mobility group box protein (HMGB1), which is one of the lethal mechanisms of sepsis ²²⁻²⁴. HMGB1 has a powerful inflammatory capacity, binding to RAGE to induce pyroptosis ²⁵, and has been shown to remain increased for at least 28 days post-sepsis in a Cecal Ligation and Puncture-induced (CLP) mouse model ²³.

However, these mechanisms associated with mitochondrial dysfunction and inflammation are mainly described during the acute phase of sepsis, and knowledge of the long-term impacts of sepsis on skeletal muscle remains limited. Our study aimed to use a long-term sepsis survivor mouse model to study skeletal muscle-related alterations by evaluating muscle function and phenotype, mitochondrial function, inflammation, and the role of RAGE in modulating long-term sepsis-induced muscle alterations.

Results

Sepsis does not change body composition in the long term

Sepsis was induced in mice by injection of a heterologous stool slurry, followed by a delayed resuscitation phase starting 12 hours later and lasting for 5 days. Resuscitation was performed by administration of antibiotics, hydration, and analgesia. Mice were analysed 3 months after sepsis induction (Figure 1A). During the acute phase of sepsis, corresponding to the first 10 days, mortality was around 38% in the Sepsis group. One mouse was excluded based on the exclusion criteria (Figure 1B). One death occurred in the Sepsis group during the convalescence period (10 to 90 days; Figure 1B). Sepsis mice lost up to 8% ($p=0.0004$) more weight than Sham mice between days 4 and 15. From day 3 after sepsis induction, Sepsis mice lost up to 14.4% of their initial body weight ($p<0.0001$), and the loss persisted until day 30 (Figure 1C). For the lean mass, we found a decrease of up to 4.5% ($p=0.0009$) in the Sepsis group compared with the Sham group between days 3 and 8 (Figure 1D). Compared to baseline, lean mass in the Sepsis group decreased by up to 5.9% ($p<0.0001$ -Figure 1D). Between day 6 and 9, the Sepsis group had 25.1% ($p=0.0131$) less fat mass than the Sham group, a reduction of up to 36.3% ($p=0.0040$) compared with pre-induction baseline in the Sepsis group (Figure 1E). Fluid mass increased by up to 52.8% ($p<0.0001$) in Sepsis compared with Sham mice from day 2 to 30, but was higher than baseline only between days 2 and 3, increasing to 52.3% ($p<0.0001$), likely reflecting the resuscitation phase during which saline solution was administered subcutaneously, and possibly also reduced fluid losses due to transient renal dysfunction and/or increased capillary permeability (Figure 1F). In contrast, no significant changes in any of these parameters remained between Sham and Sepsis survivors 3 months later (Figure 1).

Sepsis leads to long-term oxidative muscle fatigability and atrophy of skeletal muscle fibres

In line with the absence of changes in the body composition, muscle wet weight of the *extensor digitorum longus* (EDL), the *tibialis anterior* (TA), the *gastrocnemius*, the *quadriceps*, and the *soleus* were not different between the Sham and the Sepsis groups at 3 months (Figure 2A). Analysis of the distribution of fibre type in the TA showed no changes in either group (Figure 2B). However, the total CSA was significantly reduced from 3153 to 2798 μm^2 ($p=0.0476$) 3 months after sepsis (Figure 2B). In particular, fibre types IIb and IIx decreased in the Sepsis group from 3804 to 3355 μm^2 ($p=0.0476$) and from 2279 to 1953 μm^2 ($p=0.0238$), respectively, by the end of the experiment (Figure 2B). Along with these changes, the Sepsis group showed a significant 50% ($p=0.0267$) increase in matrix metalloproteinases 9 (*Mmp9*) expression (Figure 2C). No changes were found in the expression of the main genes involved in cell cycle arrest (Figure 1SA). When we assessed muscle function using a treadmill test and an *ex vivo* test. Mice in both the Sham and the Sepsis groups ran for similar duration on the treadmill, with average running times of 1119.5 seconds and 1171.7 seconds, respectively (Figure 2D). Both groups showed similar specific tetanic force, and there were also no differences in percentage force between the two groups according to the frequency applied, from 1 to 200 Hz (Figure 2E). The *soleus* fatigability test showed that the Sepsis group was more fatigable from 40 seconds to the end of the test, with a mean difference of 5.5% ($p=0.0395$) of fatigability, and, by the end of the fatigue test, the Sepsis group exhibited 14% ($p=0.0315$) higher muscle fatigue than the Sham group (Figure 2F).

Sepsis is responsible for long-term, persistent mitochondrial alterations in skeletal muscles

Permeabilised fibres from the *soleus* of surviving Septic mice had a ~14% ($p=0.0312$) lower oxygen consumption (JO_2) for oxidative phosphorylation (OXPHOS) respiration driven by complex I to IV (Figure 3A). Complex IV JO_2 also decreased by around 16% ($p=0.0274$) in the Sepsis group, from 146.8 at baseline to 123.1 pmol/s/mg at 3 months (Figure 3B). Finally, the Oct-M protocol used for assessing fatty acid-mediated respiration also showed a decrease of around 14% ($p=0.0109$), with a mean of 111.2 pmol/s/mg for the Sham group and 95.2 pmol/s/mg for the Sepsis group (Figure 3B).

To examine whether prolonged infection can trigger mitochondrial dysfunction specifically in muscle cells themselves, we conducted a supplementary experiment where we treated C2C12 muscle cells with chronic (14 days) and low-dose (100 ng/mL) lipopolysaccharide (LPS). In the LPS-treated myotubes, basal respiration decreased by 23.2% ($p=0.0166$), from 78 to 59.9 pmol/(s*Mill), and maximal respiration by 32.4% ($p=0.0035$) from 225.5 to 152.5 pmol/(s*Mill), while the spare respiratory capacity was decreased by 37.2% ($p=0.0056$), from 147.4 to 92.6 pmol/(s*Mill) (Figures 3D).

Returning to the mice, the amount of mtDNA was reduced by almost 18% ($p=0.0092$) in the Sepsis group compared with the Sham group (Figure 3E). However, we did not detect any significant changes in the respiratory chain protein expression (Ndufb8, Sdhb, Uqcrc2, Mtco1, and Atp5a) (Figures 3F, S2).

We also explored mitochondrial quality control pathways. While levels of mitochondrial fusion-related genes *Opal* and *Mfn2* were not different between groups, levels of mitochondrial fission-related genes, *Fis1* and *Dnm1l*, were increased in Sepsis by 16% ($p=0.0197$) and 42.1% ($p=0.0416$), respectively (Figure 3G). No differences, except a moderate increase in the *Park2* and *Lamp2* genes in the Sepsis group ($p<0.05$), were found in autophagy/mitophagy gene expression (Figure S1). Regarding oxidative stress, despite a 2-fold ($p=0.0016$) increase in the 3-nitrotyrosine in Sepsis compared with Sham mice (Figures 3I, S3), the mRNA levels encoding

the antioxidant enzymes *Sod1*, *Sod2*, and *Cat* were not different (Figure 3H). Finally, Hsp60 in Sepsis mice (a mitochondrial chaperone) increased by 59.2% ($p=0.0251$) compared with Sham mice (Figures 3J, S4).

The NLRP3 and RAGE pathways remain activated 3 months after sepsis induction

Since inflammation contributes to the pathogenesis of sepsis^{20,26} and may participate in mitochondrial dysfunction, we assessed skeletal muscle gene expression of major pro-inflammatory pathways. While no differences were found for *Il-6* and *TNF- α* between both groups, *Nlrp3* mRNA increased 4-fold ($p=0.0043$) and *Il-1 β* mRNA increased 7.5-fold in Sepsis versus Sham mice ($p<0.0001$). In line with this finding, cleaved caspase CSP-1, an effector protein of the activation and assembly of the NLRP3 inflammasome, was 2.5-fold higher in the Sepsis group compared with the Sham group ($p=0.0025$; Figures 4B, S5). Finally, *Ager* gene expression remained 3.8-fold higher ($p=0.0141$) in the Sepsis group at 3 months (Figure 4A).

Ager^{-/-} mice do not develop mitochondrial dysfunction and long-term inflammation after sepsis

To evaluate a potential link between inflammation and mitochondrial dysfunction observed three months after sepsis, we also examined *Ager*^{-/-} mice. Mortality was similar between the Sepsis WT and *Ager*^{-/-} groups, around 60% (Figure 5A). In the long term, increases in lean body mass were observed in Sham WT (Figure 5C), and in all body composition parameters in Sham *Ager*^{-/-} mice (Figures 5B–E), whereas no differences in body weight, lean mass, fat mass, or fluid mass were found between Sepsis WT and Sepsis *Ager*^{-/-} mice at any time point (Figure 5).

Mitochondrial respiration was lower in the Sepsis WT group compared with the Sham WT group, decreasing from 134.9 J_{O₂} to 113.9 J_{O₂} ($p=0.0424$) for complex I-mediated respiration and 147.9 J_{O₂} to 117.8 ($p=0.04$) J_{O₂} for complex IV-mediated respiration in the PMG protocol. Similarly, fatty acid-mediated respiration showed a decrease from 113.2 J_{O₂} to 89.1 J_{O₂} ($p=0.0066$) in Sepsis WT (Figure 6A). Sepsis *Ager*^{-/-} and Sham *Ager*^{-/-} mice showed no differences, whatever the state of respiration and protocol used (Figure 6A). Expression of cleaved CSP-1 increased by ~5-fold ($p<0.0001$) in the WT Sepsis group compared with the WT Sham group. In the *Ager*^{-/-} Sepsis group, cleavage CSP-1 was not different from the *Ager*^{-/-} Sham group (Figures 6B, S6). As in Figure 3I, 3-NT protein levels were increased by ~70% ($p=0.0241$) in Sepsis WT mice compared with Sham WT mice, but there was no difference between Sepsis *Ager*^{-/-} and Sham *Ager*^{-/-} mice, nor between Sepsis WT and Sepsis *Ager*^{-/-} animals (Figures 6C, S7). Finally, while the expression of Hsp60 was higher by 3.5-fold ($p=0.0077$) in the Sepsis WT group compared with the Sham WT group, no differences between Sepsis *Ager*^{-/-} and Sham *Ager*^{-/-} groups, nor Sepsis WT and Sepsis *Ager*^{-/-}, were observed for this parameter (Figures 6D, S8).

Discussion

We used a murine sepsis survivor model based on previously validated experimental approaches by Owen *et al.* and Pierre *et al.*, and we characterised this model in the long-term, *i.e.* 3 months^{11,12,27}. Mice develop muscle weakness, mitochondrial dysfunction, and inflammation, alterations that are also observed following sepsis in the early phase^{10,11,26,28}. Although few long-term studies are available, these alterations have also been observed in the mid-to-long term following sepsis in humans^{9,15,29} and mice^{11,14,27,30}. These findings confirm our mouse model as a reliable and translationally relevant tool for the study of chronic muscle alterations following sepsis. Interpretations regarding muscle-specific effects should be made with caution, as our conclusions are based on alterations observed across different skeletal muscles with distinct metabolic profiles. Nevertheless, these convergent findings indicate a generalised impact of sepsis on multiple muscle types.

Our investigation in sepsis survivor mice shows similar persistent alterations in muscle phenotype. First, we observed a decrease in the CSA of IIx and IIb fibres of *TA* muscle. This result should be interpreted cautiously given the small number of sham samples. Although overall muscle wet weight remained unchanged, this likely results from edema, inflammation, or fibrosis, as well-documented in sepsis, all of which can mask actual muscle atrophy^{9,12,15}. Nevertheless, studies have shown that sepsis survivors have a reduction in CSA, which is correlated with a reduction in muscle force^{31,32}. In the murine sepsis model, treadmill performance and maximal tetanic force were not significantly altered despite muscular atrophy. This observation aligns with findings reported by Dos Santos *et al.*, Owen *et al.*, and Kingren *et al.*, who demonstrated an absence of correlation between muscle mass or atrophy and strength in sepsis survivors. Such structure-function decoupling underscores the importance of muscle quality rather than muscle mass alone in the recovery process following sepsis^{11,14,33}. Although oxidative type IIa fibres did not exhibit signs of atrophy, they displayed reduced fatigue resistance, suggesting a qualitative alteration of muscle function. Since oxidative muscles rely predominantly on mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) for energy production, we next investigated mitochondrial respiration in the soleus³⁴. Using permeabilised *soleus* fibres, we found that mitochondrial respiration based on the two main metabolic pathways (glycolysis and fatty acid oxidation) was impaired, especially in the respiration mediated by complexes I and IV. Our complementary *in vitro* experiments on C2C12 muscle cells further support our *in vivo* findings,

indicating mitochondrial dysfunction within muscle cells. Several studies have reported impaired mitochondrial respiration in skeletal muscle and the diaphragm following sepsis ^{11,19,27}. In our study, a deeper investigation of mitochondrial defects revealed a reduction in mtDNA content, increased transcription of mitochondrial fission-related genes, and evidence of both mitochondrial and oxidative stress. Although the reduction in mtDNA content was approximately 18%, this did not significantly affect the protein levels of the respiratory complexes. In the murine sepsis model, the reduction in mtDNA content is moderate, and protein levels remain unchanged. Several studies have shown that only severe mtDNA depletion (above 50%) affects mitochondrial mRNA expression, protein abundance, and respiratory function ^{35,36}. Dos Santos *et al.* demonstrated that 6 months after ICU discharge, survivors showed no changes in mitochondrial content or population size ³³. These observations support the hypothesis that the mitochondrial dysfunction observed in the murine sepsis model may result primarily from reduced mitochondrial efficiency rather than a decrease in mitochondrial number. However, this interpretation should be viewed with caution, as human data and preclinical studies may differ regarding the regulation of mitochondrial dynamics. Previous studies have also reported that excessive mitochondrial fission is linked to impaired mitochondrial efficiency in skeletal muscle after sepsis in mice ²⁰. We found an increase in pro-fission-related genes Drp1 and Fis1, which could promote aberrant mitochondrial fission and may contribute to the impaired long-term efficiency of mitochondrial respiration after sepsis. Further experiments are required to fully characterise this mitochondrial quality control pathway. Finally, the increased levels of mitochondrial and oxidative stress markers, such as Hsp60 and 3-NT, suggest that mitochondria are stressed and in a pro-oxidant environment. This indicates that the early nitro/oxidative stress observed after 10 days of sepsis endures long afterwards ^{11,12}. Moreover, the accumulation of 3-NT, known to reflect oxidative damage to mitochondrial complex I, was accompanied by a decrease in complex I-mediated respiration ^{11,27,37,38}. These findings further support the hypothesis of altered mitochondrial quality in sepsis survivors. Finally, these data are consistent with previous work in our laboratory and with Owen *et al.*, who observed an increase in 3-NT labelling two weeks after sepsis in the muscle ¹¹. It is noteworthy that Hsp60, through its chaperone function within the mitochondrial unfolded protein response (UPRmt), contributes to the stability of respiratory complex proteins. Under mitochondrial dysfunction and oxidative stress conditions, it assists in the proper folding of SOD2, a key mitochondrial enzyme involved in antioxidant defense. Thus, Hsp60 plays an important role in managing oxidative stress and limiting the resulting damage ^{39,40}. When released extracellularly, it also acts as a DAMP that stimulates NLRP3-mediated inflammation ⁴¹⁻⁴³. These data therefore suggest that the increase in Hsp60 may reflect both an adaptive response to mitochondrial stress triggered by oxidative damage and respiratory dysfunction, as indicated by 3-NT positive proteins and its contribution to inflammation via NLRP3 inflammasome activation.

We subsequently sought to identify key pro-inflammatory mediators involved in sepsis, including TNF- α , IL-6, and the NLRP3 and RAGE signalling pathways ^{20,24,44}. Our results showed transcriptional activation of the NLRP3 pathway and the resultant IL-1 β , as well as the cleaved effector protein CSP-1. It has been shown that the NLRP3 pathway is involved in sepsis and that its inhibition leads to improvement of muscle atrophy and inflammation ²⁶. It has also been shown that NLRP3 can be activated by DAMPs from mitochondria, through mtDNA leakage or ROS production ^{45,46}. We also observed that the *Ager* transcript, encoding for the RAGE receptor, was 4-fold higher in muscle from sepsis survivors, while elevated levels of key RAGE ligands were found during sepsis and several months afterward ^{20,47-49}. RAGE is involved in various deleterious processes – features of aging – including disruption of mitochondrial function, chronic inflammation (inflammaging), and senescence ⁵⁰⁻⁵². In our experimental model, genes associated with senescence did not show significant change; however, we observed upregulation of *Mmp9*, a gene involved in inflammation and fibrosis ⁵³. Thus, sepsis leads to long-term alterations that are also found in aging muscle and in sarcopenia ^{54,55}. Based on these observations, sepsis may contribute to accelerated aging of skeletal muscle in the long term, though further work is needed to better characterise and understand the mechanisms involved in post-septic muscle aging. Circulating metabolic and inflammatory parameters were not assessed in this study, and a systemic contribution to the observed muscular alterations cannot be completely excluded, as several studies have reported persistent metabolic and inflammatory disturbances following sepsis ^{29,56,57}. However, Owen *et al.* observed normalisation of circulating inflammatory markers despite persistent skeletal-muscle and mitochondrial alterations similar to those described here, suggesting a muscle-specific component to these long-term effects ¹¹.

To determine whether RAGE may represent a central point linking mitochondrial dysfunction and inflammation, we tested whether *Ager*^{-/-} mice were protected from the two main long-term consequences of sepsis, *i.e.* mitochondrial dysfunction and inflammation. Mortality did not differ between *Ager*^{-/-} and WT mice during sepsis. Several studies have reported either protective or deleterious effects of RAGE inhibition on survival following infection, highlighting the heterogeneous impact of RAGE deletion. In the murine sepsis model, the standardised antibiotic therapy likely compensated for the loss of RAGE-dependent inflammatory responses, while *Ager*^{-/-} mice may have developed additional compensatory immune mechanisms preserving survival. Three months after induction of sepsis, and in contrast to WT mice, *Ager*^{-/-} mice had not developed mitochondrial dysfunction or inflammation. This is consistent with reports indicating that RAGE inhibition may improve mitochondrial and muscle function during sepsis in mice ^{20,50}. Those beneficial effects of RAGE invalidation on aging-related

parameters are consistent with previous studies ^{50,51} and show that activation of the NLRP3 pathway primarily depends on NF- κ B signaling, which is itself stimulated by RAGE ^{58,59}. Activation of NLRP3 has been linked to both reduced muscle function and muscle atrophy ^{60–62}. Thus, the absence of Csp-1-mediated inflammation in *Ager*^{-/-} mice may indicate a potential improvement in muscle function after sepsis. However, we did not quantify Il-1 β , the final effector cytokine that directly affects muscle tissue. Future studies will need to confirm Il-1 β expression and clarify the signaling pathways underlying its activation, as well as its reduction in the *Ager*^{-/-} model to validate this hypothesis.

In parallel, no studies had reported such a long-term protective effect on sepsis-induced persistent mitochondrial dysfunction and NLRP3-CSP1-mediated inflammation. Future studies should include direct assessments of muscle contractile performance in *Ager*^{-/-} mice to confirm whether the observed molecular and mitochondrial protection translates into preserved muscle function. Finally, further investigations are required to establish the underlying molecular mechanisms and to determine whether pharmacological RAGE inhibition may prevent muscular damage induced by sepsis.

Conclusion

We first established a long-term survivor mouse model of sepsis that faithfully reproduces the various alterations observed in skeletal muscle several months after the initial infection. Long-term sepsis survivors exhibit muscle weakness associated with mitochondrial dysfunction and inflammation. RAGE invalidation prevents sepsis-induced mitochondrial dysfunction and inflammation in mice surviving sepsis. Development of specific RAGE inhibitors may represent an interesting strategy to prevent long-term muscular consequences triggered by an acute inflammation.

Materials and methods

Murine model of sepsis

Wild-type (WT) C57BL/6J mice (Charles Rivers Laboratories, Saint Germain Nuelles, France) and WT and *Ager*^{-/-} littermates obtained from *Ager*^{+/-} (from Pr. A.M. Schmidt, New York University) mice crossing in our animal facility were housed in specific pathogen-free (SPF) environment, with 12h/12h light and dark cycles and a temperature at 21°C. Mice had free access to food and water. Sepsis was induced by intraperitoneal (IP) injection of 360 μ L of a heterologous stool suspension prepared in PBS-glycerol 10%. Sham mice underwent the same resuscitation procedures, including antibiotics, analgesia and subcutaneous hydration, but received an intraperitoneal injection of PBS-glycerol 10% instead of stool. The resuscitation phase was delayed by 12 hours and was performed every 12 hours for 5 days. Mice received IP analgesia (buprenorphine, 0.1 mg/kg), antibiotics (imipenem-cilastatin, 40 mg/kg), and subcutaneous hydration (NaCl 0.9%, 25 mL/kg). Temperature (Lasergrip 774, Etekcity, Anaheim, USA), weight, and clinical condition (murine sepsis score MSS¹² were monitored every 12 hours until day 10. Sepsis mice were excluded if, 12 hours after induction, their MSS was < 10/28 or their body temperature remained > 30 °C, indicating insufficient development of the septic state. These animals were excluded from the sepsis cohort and thus neither considered as survivors or non-survivors. Sepsis mice were excluded if, 12 hours after induction, their MSS was less than 10/24 or the temperature was greater than 30°C. Mice were immediately euthanised by cervical dislocation if limit points (MSS > 24/28, a total absence of reaction following stimulation by the experimenter, and a weight loss greater than 20% compared to the initial body weight) were reached. These animals were counted as non-survivor. After the resuscitation phase, the mice were housed in the animal facility and euthanised by cervical dislocation 3 months after the induction of sepsis (average weight 35g). For each mouse, the wet weight of each muscle was measured using a high-precision balance (SM 425i, VWR, Radnor, PA, USA). All animal procedures and methods were approved by the Lille ethics committee (Animal Experimentation Ethics Committee CEEA75, Authorization number APAFIS #43559-2023050417009712), in accordance with our national and institutional regulations, and with ARRIVE guidelines ⁶³.

Longitudinal monitoring of body composition

Body composition was analysed by time-domain nuclear magnetic resonance (TD-NMR) in animals every 24 hours for 5 days from the induction of sepsis (Minispec fl50, 7.5 Mhz, Bruker, Billerica, MA, USA). Analysis was repeated every 15 days until sacrifice. Data collected included lean mass, fat mass, and fluid mass.

Cross-sectional area, and muscle fibre types

Muscles were put onto a support made of cork and covered with tragacanth gum (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Tex, USA), before freezing in 2-methylbutane (M32631, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) refrigerated with liquid nitrogen. Sections of 10 μ m thickness were prepared using a cryostat (CM3050 S, Leica, Wetzlar, Germany). Muscle sections were incubated for 15 minutes at room temperature (RT), washed with

PBS for 5 minutes, and permeabilised with 0.05% PBS-Triton-X100 three times for 5 minutes at room temperature (RT). Blocking was performed with 3% PBS-BSA for 1 hour at RT. Each section was incubated with primary antibody for 1 hour at RT in 3% PBS-BSA (Table S1). A coverslip (Diamant Star, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) was mounted on each slide using fluoromount (F4680, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The sections were imaged by an automated slide scanner (Axioscan Z1, Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were automatically analysed using the MuscleJ plugin with Image J software to obtain phenotyping and cross-sectional-area data.

Treadmill

The mouse was placed on a static treadmill for 2 minutes for acclimation. The treadmill was set at 10 m/min for 10 minutes, and the mouse was left on the treadmill for 2 minutes before being replaced in its cage. The effort test was carried out 1 hour after acclimation. The mouse was placed on a static treadmill for 2 minutes, then the treadmill was programmed to run at 10 m/min, at the same time a chronometer was started. Every 4 minutes, the speed was increased by 4 m/min until the mouse was exhausted. Exhaustion was considered to have occurred when the mouse remained on the electric grid for 5 consecutive seconds. The experimental procedure was performed under blinded conditions.

Ex vivo contractility

Muscle contractility was performed by using the DMT Muscle Strip Myograph system, coupled to the CS4+ stimulator (820MO, DMT, Hinnerup, Denmark). *Soleus* were dissected under regular irrigation with Krebs solution (120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.25 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM KH₂PO₄, 11 mM D-glucose and 2 mM Na-pyruvate). Proximal and distal ligatures were made during dissection using 4.0 non-absorbable sutures. After isolation, muscles were placed in a contractility chamber containing the same Krebs solution that was oxygenated continuously with a Carbogen mixture (95% O₂ / 5% CO₂), and adjusted to pH 7.4. A stabilisation phase was performed at a maintained passive voltage of 10 mN. The optimal stimulation voltage was determined on the basis of the maximal contractile response to twitch stimulations (1 Hz). A supra-optimal voltage of 38 V (+20%) was then used for all analyses. The optimal length (L₀) was progressively adjusted to obtain the maximum force in response to twitch and then tetanic stimulation (150 Hz, 500 ms). Next, an automated stimulation protocol using MyoPULSE software was applied to analyse muscle contraction parameters. Muscle fatigability was assessed by continuous stimulation at 40 Hz for 120 seconds. The experimental procedure was performed under blinded conditions.

C2C12 murine myoblast cell line

Murine myoblasts were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, CRL-1772, Manassas, VA, USA). Cells were cultured in high-glucose (4.5 g/L) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1% penicillin/streptomycin (P/S – Thermo Fisher Scientific). When confluence reached 90%, differentiation was induced by replacing the growth media with high-glucose DMEM, supplemented with 2% horse serum (HS – Dominique Dutsher, Bernolsheim, France) and 1% P/S. Cells were maintained in a humid atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Media changes were performed every 48 or 72 hours. After 7 days of differentiation, cells were treated for 14 days with lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml, L2880, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or solvent (PBS).

High-resolution respirometry on permeabilised muscle fibres

The PMG protocol enables assessment of the mitochondrial respiration driven by the different complexes sequentially, by complex I, complex II, and finally complex IV on *soleus* permeabilised fibres. *Soleus* were placed in BIOPS (2.77 mM, CaK₂EGTA, 7.23 mM, K₂EGTA, 0.5 mM, 6.56 mM MgCl₂-6H₂O, 15 mM Na₂phosphocreatine, 0.5 mM dithiothreitol, 5.77 mM Na₂ATP, 20 mM imidazole, 20 mM taurine, 50 mM MES-hydrate, pH 7.1) at 4°C for mechanical dissociation. The resulting fibres were chemically permeabilised in 1.5 ml BIOPS containing saponin (50 µg/µL) at 4°C for 30 min, with gentle agitation. Washed twice in Mir05 respiration buffer (60 mM lactobionic acid, 3 mM MgCl₂-6H₂O, 20 mM taurine, 20 mM HEPES, 110 mM sucrose, 10 mM KH₂PO₄, 0.5 mM EGTA, 1 g/L Bovine Serum Albumin (BSA) fatty acid-free, pH 7.1), muscle fibres (2-4 mg) were placed into the hyper oxygenated O₂K chambers (400 nmol O₂/L, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) and oxygen consumption was measured at 25°C. Two protocols were carried out. This first protocol was: (i) addition of pyruvate (5 mM), malate (2 mM), and glutamate (10 mM), to assess the oxygen consumption (JO₂) when the electron transfer chain (ETC) is not coupled to the ATP synthase (noted LEAK); (ii) addition of ADP (5 mM) to evaluate the JO₂ when the ETC fed with electrons from complex I (CI-CIV) is linked to the ADP synthase (oxidative phosphorylation condition-OXPHOS); (iii) injection of the complex I inhibitor Rotenone (0.5 µM) and succinate (10 mM) to assess the JO₂ with electrons circulating from complex II to IV (CII-CIV) in OXPHOS conditions; (iv) addition of the complex III inhibitor antimycin A (2.5 µM) and addition of ascorbate (2 mM) and

tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (0.5 mM) to measure maximal JO_2 of complex IV (CIV). The second protocol consisted of: (i) injection of octanoyl-L-carnitine (0.5 mM) and malate (2 mM) to assess LEAK; (ii) addition of ADP (5 mM) to measure JO_2 in OXPHOS conditions. During each protocol, cytochrome c (10 μM) Q was added to test the outer mitochondrial membrane integrity: experiments were excluded if the increase in JO_2 was higher than 15% following).

High-resolution respirometry on muscle cells

Differentiated C2C12 cells (0.5 million/mL) suspended in differentiation media were placed into the O2K chambers. After stabilisation (basal respiration), the ATP synthase inhibitor oligomycin (10 μM) was added to assess the JO_2 in the absence of ATP production (LEAK). Sequential injections of the uncoupler 3-chlorophenylhydrazone carbonyl cyanide (CCCP – 1 μM per injection) were performed to obtain the maximal JO_2 (maximal respiration). Finally, spare respiratory capacity was calculated as maximal respiration less basal respiration.

Western-blot

Quadriceps was pulverised in powder using a cell crusher (Cellcrusher, Schull, Co. Cork, Ireland). RIPA lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton), containing 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (#36978, Thermo Fisher, MA, USA) and 1 mM protease/phosphatase inhibitor cocktail (#5872, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) was added to approximately 20 mg of muscle powder (60 $\mu\text{L}/\text{mg}$). Then, samples were homogenised using a Bead Mill (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and centrifuged at 15,000 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant protein concentration was determined using Bradford's reagent (B6916, Sigma, Burlington, VT, USA). 40 μg of protein were mixed into a solution with LDS and a reducing agent solution (B0008, B0009, Thermofisher, Waltham, MA, USA) and were denatured for 10 minutes at 70°C. Proteins were then separated by electrophoresis in a Tris-glycine buffer (Tris 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3) on 8-15% SDS polyacrylamide gels. Proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated in 5% milk or BSA solution in Tris-Buffered Saline containing 0.1% Tween 20 (TBST) and then incubated overnight at 4°C with the primary antibody (Table S1), followed by one-hour incubation with a secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase or a fluorophore (Table S1). Protein complexes were revealed by chemiluminescence (Clarity Western ECL Substrate Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) or fluorescence (Odyssey Fx, Li-Cor, Lincoln, NE, USA). Protein expression was quantified using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) and standardised with the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GADPH) protein.

Gene expression with Quantigene

Quadriceps (~4 mg) were placed in 40 μL of working homogenisation solution (50 mg/mL proteinase K (QP1013) and homogenisation solution (QS0106) at a ratio of 1:100). Samples were incubated at 65°C for 30 minutes, vortexed every 5 minutes until a homogeneous mixture was obtained, and used according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). Plates were read using a Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), the background noise was subtracted, and the values normalised to the geometric mean of the reference genes (Rpl23, Rpl32, and Pgk1).

mtDNA copy number

Total DNA was isolated from 20 mg of quadriceps using the QIAamp Fast DNA tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's protocol. 40 pg of total DNA was used to perform qPCR. qPCRs were performed and followed in real-time using the PowerUp SYBR Green Master Mix kit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) and the QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), respectively. Relative quantification of ND1, a mitochondrial gene, and PPIA, a nuclear gene, was performed using method $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. The ratio of the mitochondrial NADH dehydrogenase 1 (ND1) gene to the nuclear peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIA) gene. Primers used are available in Table S2.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 10 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Quantitative values are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM). Kaplan-Meier survival curves were compared using the log-rank test. After performing the Shapiro-Wilk normality test, comparisons between two groups were made with a Student's t-test or Mann-Whitney test. Comparisons between three or more groups were performed by a one-way ANOVA test with a Sidak or Fisher's post-hoc test if the values followed a normal

distribution (Shapiro-Wilk test), otherwise a Kruskal-Wallis was performed with a Dunn's post-hoc test. Comparisons of three or more groups using a mixed-effects model (REML).

References

1. Gritte, R. B., Souza-Siqueira, T., Curi, R., Machado, M. C. C. & Soriano, F. G. Why Septic Patients Remain Sick After Hospital Discharge? *Frontiers in Immunology* **11**, (2021).
2. Evans, L. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Critical Care Medicine* **49**, e1063 (2021).
3. Prescott, H. C. & Costa, D. K. Improving Long-term Outcomes after Sepsis. *Crit Care Clin* **34**, 175–188 (2018).
4. Li, X. *et al.* Sepsis leads to impaired mitochondrial calcium uptake and skeletal muscle weakness by reducing the *mtu1:mtu* protein ratio. *Shock* **60**, 698 (2023).
5. Cox, M. C. *et al.* The impact of sarcopenia and acute muscle mass loss on long-term outcomes in critically ill patients with intra-abdominal sepsis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **12**, 1203–1213 (2021).
6. Winters, B. D. *et al.* Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med* **38**, 1276–1283 (2010).
7. Khan, S. S., Singer, B. D. & Vaughan, D. E. Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell* **16**, 624–633 (2017).
8. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int* **96**, 183–195 (2015).
9. Walsh, C. J. *et al.* Transcriptomic analysis reveals abnormal muscle repair and remodeling in survivors of critical illness with sustained weakness. *Sci Rep* **6**, 29334 (2016).
10. Crowell, K. T. & Lang, C. H. Contractility and Myofibrillar Content in Skeletal Muscle are Decreased During Post-Sepsis Recovery, But Not During the Acute Phase of Sepsis. *Shock* **55**, 649 (2021).
11. Owen, A. M. *et al.* Chronic muscle weakness and mitochondrial dysfunction in the absence of sustained atrophy in a preclinical sepsis model. *eLife* **8**, e49920.
12. Pierre, A. *et al.* Sepsis-like Energy Deficit Is Not Sufficient to Induce Early Muscle Fiber Atrophy and Mitochondrial Dysfunction in a Murine Sepsis Model. *Biology* **12**, 529 (2023).
13. Nakanishi, N. *et al.* Sepsis causes neutrophil infiltration in muscle leading to muscle atrophy and weakness in mice. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
14. Kingren, M. S. *et al.* Post-sepsis chronic muscle weakness can be prevented by pharmacological protection of mitochondria. *Molecular Medicine* **30**, 221 (2024).
15. Uzun Ayar, C. *et al.* Altered muscle transcriptome as molecular basis of long-term muscle weakness in survivors from critical illness. *Intensive Care Med* <https://doi.org/10.1007/s00134-025-07949-3> (2025) doi:10.1007/s00134-025-07949-3.
16. Hermans, G. & Van Den Berghe, G. Clinical review: intensive care unit acquired weakness. *Crit Care* **19**, (2015).
17. Hu, D. *et al.* Mitochondrial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic perspectives. *Crit Care* **28**, 292 (2024).
18. Sedraoui, S. *et al.* Lack of compensatory mitophagy in skeletal muscles during sepsis. *The Journal of Physiology* **602**, 2823–2838 (2024).
19. Oliveira, T. S. *et al.* Sepsis Disrupts Mitochondrial Function and Diaphragm Morphology. *Front. Physiol.* **12**, (2021).
20. Huang, D. *et al.* Elevated levels of S100A8 and S100A9 exacerbate muscle mitochondrial fragmentation in sepsis-induced muscle atrophy. *Commun Biol* **8**, 1–15 (2025).
21. Shi, X., Tan, S. & Tan, S. NLRP3 inflammasome in sepsis (Review). *Molecular Medicine Reports* **24**, 1–8 (2021).
22. Chen, R., Kang, R. & Tang, D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med* **54**, 91–102 (2022).

23. Valdés-Ferrer, S. I. *et al.* HMGB1 Mediates Anemia of Inflammation in Murine Sepsis Survivors. *Mol Med* **21**, 951–958 (2015).
24. Martínez-García, J. J. *et al.* P2X7 receptor induces mitochondrial failure in monocytes and compromises NLRP3 inflammasome activation during sepsis. *Nat Commun* **10**, 2711 (2019).
25. Yang, H., Wang, H. & Andersson, U. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
26. Huang, N. *et al.* Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. *Intensive Care Medicine Experimental* **5**, 3 (2017).
27. Pierre, A. *et al.* Sepsis Induces Long-Term Muscle and Mitochondrial Dysfunction due to Autophagy Disruption Amenable by Urolithin A. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **16**, e70041 (2025).
28. Eikermann, M. *et al.* Muscle force and fatigue in patients with sepsis and multiorgan failure. *Intensive Care Med* **32**, 251–259 (2006).
29. Pierre, A. *et al.* Muscle weakness after critical illness: unravelling biological mechanisms and clinical hurdles. *Critical Care* **29**, 248 (2025).
30. Cho, D. S., Schmitt, R. E., Dasgupta, A., Ducharme, A. M. & Doles, J. D. Single-cell deconstruction of post-sepsis skeletal muscle and adipose tissue microenvironments. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **11**, 1351–1363 (2020).
31. Hickmann, C. E. *et al.* Impact of Very Early Physical Therapy During Septic Shock on Skeletal Muscle: A Randomized Controlled Trial. *Critical Care Medicine* **46**, 1436 (2018).
32. Yoshihara, I., Kondo, Y., Okamoto, K. & Tanaka, H. Sepsis-Associated Muscle Wasting: A Comprehensive Review from Bench to Bedside. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 5040 (2023).
33. dos Santos, C. *et al.* Mechanisms of Chronic Muscle Wasting and Dysfunction after an Intensive Care Unit Stay. A Pilot Study. *Am J Respir Crit Care Med* **194**, 821–830 (2016).
34. Khattri, R. B. *et al.* Isolated murine skeletal muscles utilize pyruvate over glucose for oxidation. *Metabolomics* **18**, 105 (2022).
35. Lebedeva, M. A. & Shadel, G. S. Cell Cycle- and Ribonucleotide Reductase-Driven Changes in mtDNA Copy Number Influence mtDNA Inheritance Without Compromising Mitochondrial Gene Expression. *Cell Cycle* **6**, 2048–2057 (2007).
36. Peralta, S., Wang, X. & Moraes, C. T. Mitochondrial transcription: Lessons from mouse models. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1819**, 961–969 (2012).
37. Murakami, H. *et al.* Cumulative 3-nitrotyrosine in specific muscle proteins is associated with muscle loss during aging. *Experimental Gerontology* **47**, 129–135 (2012).
38. Barreiro, E., Comtois, A. S., Gea, J., Laubach, V. E. & Hussain, S. N. A. Protein Tyrosine Nitration in the Ventilatory Muscles. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 438–446 (2002).
39. Marino Gammazza, A., Macaluso, F., Di Felice, V., Cappello, F. & Barone, R. Hsp60 in Skeletal Muscle Fiber Biogenesis and Homeostasis: From Physical Exercise to Skeletal Muscle Pathology. *Cells* **7**, 224 (2018).
40. Barone, R. *et al.* Alcoholic Liver Disease: A Mouse Model Reveals Protection by *Lactobacillus fermentum*. *Clinical and Translational Gastroenterology* **7**, e138 (2016).
41. Yang, Y. *et al.* Glutamine sustains energy metabolism and alleviates liver injury in burn sepsis by promoting the assembly of mitochondrial HSP60-HSP10 complex via SIRT4 dependent protein deacetylation. *Redox Report* **29**, 2312320 (2024).
42. Kaneki, M. Metabolic inflammatory complex in sepsis: septic cachexia as a novel potential therapeutic target. *Shock* **48**, 600–609 (2017).
43. Swaroop, S., Mahadevan, A., Shankar, S. K., Adlakha, Y. K. & Basu, A. HSP60 critically regulates endogenous IL-1 β production in activated microglia by stimulating NLRP3 inflammasome pathway. *J Neuroinflammation* **15**, 177 (2018).
44. Young, W. A. *et al.* Improved Survival following induction of sepsis by cecal slurry in PD-1 knockout murine neonates. *Surgery* **161**, 1387–1393 (2017).

45. Danielski, L. G., Giustina, A. D., Bonfante, S., Barichello, T. & Petronilho, F. The NLRP3 Inflammasome and Its Role in Sepsis Development. *Inflammation* **43**, 24–31 (2020).
46. Qiu, Y. *et al.* Mitochondrial DNA in NLRP3 inflammasome activation. *International Immunopharmacology* **108**, 108719 (2022).
47. Riuzzi, F. *et al.* RAGE in the pathophysiology of skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **9**, 1213–1234 (2018).
48. van Zoelen, M. A. D. *et al.* Receptor for advanced glycation end products facilitates host defense during Escherichia coli-induced abdominal sepsis in mice. *J Infect Dis* **200**, 765–773 (2009).
49. Zhang, L. *et al.* S100B/RAGE/Ceramide signaling pathway is involved in sepsis-associated encephalopathy. *Life Sciences* **277**, 119490 (2021).
50. Daussin, F. N., Boulanger, E. & Lancel, S. From mitochondria to sarcopenia: Role of inflammaging and RAGE-ligand axis implication. *Experimental Gerontology* **146**, 111247 (2021).
51. Teissier, T. *et al.* Knockout of receptor for advanced glycation end-products attenuates age-related renal lesions. *Aging Cell* **18**, e12850 (2019).
52. Grossin, N. *et al.* Dietary CML-enriched protein induces functional arterial aging in a RAGE-dependent manner in mice. *Molecular Nutrition & Food Research* **59**, 927–938 (2015).
53. Alameddine, H. S. & Morgan, J. E. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Inflammation and Fibrosis of Skeletal Muscles. *J Neuromuscul Dis* **3**, 455–473.
54. Jimenez-Gutierrez, G. E. *et al.* Molecular Mechanisms of Inflammation in Sarcopenia: Diagnosis and Therapeutic Update. *Cells* **11**, 2359 (2022).
55. Cruz-Jentoft, A. J. & Sayer, A. A. Sarcopenia. *The Lancet* **393**, 2636–2646 (2019).
56. Wasyluk, W. & Zwolak, A. Metabolic Alterations in Sepsis. *Journal of Clinical Medicine* **10**, 2412 (2021).
57. Mehdi, S. F. *et al.* Endocrine and metabolic alterations in response to systemic inflammation and sepsis: a review article. *Molecular Medicine* **31**, 16 (2025).
58. Yang, Y., Wang, H., Kouadir, M., Song, H. & Shi, F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis* **10**, 128 (2019).
59. Olejarz, W. *et al.* RAGE and TLRs as Key Targets for Antiatherosclerotic Therapy. *BioMed Research International* **2018**, 7675286 (2018).
60. Liu, Y. *et al.* The role of NLRP3 inflammasome in inflammation-related skeletal muscle atrophy. *Front. Immunol.* **13**, (2022).
61. McBride, M. J. *et al.* The NLRP3 inflammasome contributes to sarcopenia and lower muscle glycolytic potential in old mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **313**, E222–E232 (2017).
62. Eggelbusch, M. *et al.* The NLRP3 inflammasome contributes to inflammation-induced morphological and metabolic alterations in skeletal muscle. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **n/a**, (2022).
63. Sert, N. P. du *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology* **18**, e3000410 (2020).

Acknowledgments: We would like to thank the BioImaging Center Lille (BICeL) imaging platform and the Animal Facilities – Lille Biology and Health Research Platforms (PLBS). We thank Alicia Mayeuf-Louchart for her invaluable help with the use of the MuscleJ software. We thank Dr. Ann Marie Schmidt for kindly providing the RAGE knockout mice. We also thank all members of the laboratory and everyone who contributed to the conception and implementation of this work.

Authors and affiliations:

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France

Raphael Romien, Alexandre Pierre, Sarah Ducastel, Arthur Dubech, Jérémy Lemaire, Gaëlle Grolaux, Marie Frimat, Benoit Brassart, Claire Bourel, Michael Howsam, Cécile Yelnik, Eric Boulanger, Raphaël Favory, Sébastien Preau & Steve Lancel

Division of Intensive Care, Hôpital Roger Salengro, CHU de Lille, 59000 Lille, France

Alexandre Pierre, Arthur Dubech, Benoit Brassard, Raphaël Favory & Sébastien Preau

Division of Nephrology, Hôpital Claude Huriez, CHU de Lille, 59000 Lille, France

Marie Frimat

Division of Geriatrics, Hôpital Albert Calmette, CHU de Lille, 59000 Lille, France

Eric Boulanger

Contributions: R.R. and S.L. conceived the study and designed the methodology. S.L. supervised the research. R.R., A.P., C.B., S.D., A.D., G.G., J.L., and B.B. performed the investigations. R.R., S.L., and A.P. were responsible for data visualization. S.L. and M.F. acquired funding. R.R. wrote the original draft. R.R., M.F., M.H. C.Y., E.B., R.F., S.P., and S.L. reviewed and edited the manuscript. All authors discussed the results and contributed to the final version of the manuscript.

Corresponding author:

Correspondence to Steve Lancel.

Fundings: The study was supported by the French National Research Agency (ANR-23-CE14-0063-01 and ANR-22-CE14-0004). R.R. was funded by a Ph.D. scholarship from Lille University and ANR-23-CE14-0063-01. A.P. was funded by a Ph.D. scholarship from Lille University. A.D was funded by Lille University for a Master's degree scholarship.

Ethics declarations: The authors declare no conflicts of interest

Data and materials availability: The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

List of supplementary data

Figure S1: Analysis of senescence-, mitophagy- and autophagy-related genes

Figures S2-S8: Full-length western blots

Table S1: Antibodies used in western blot and immunofluorescence experiments

Table S2: Primer sequences used for qPCR

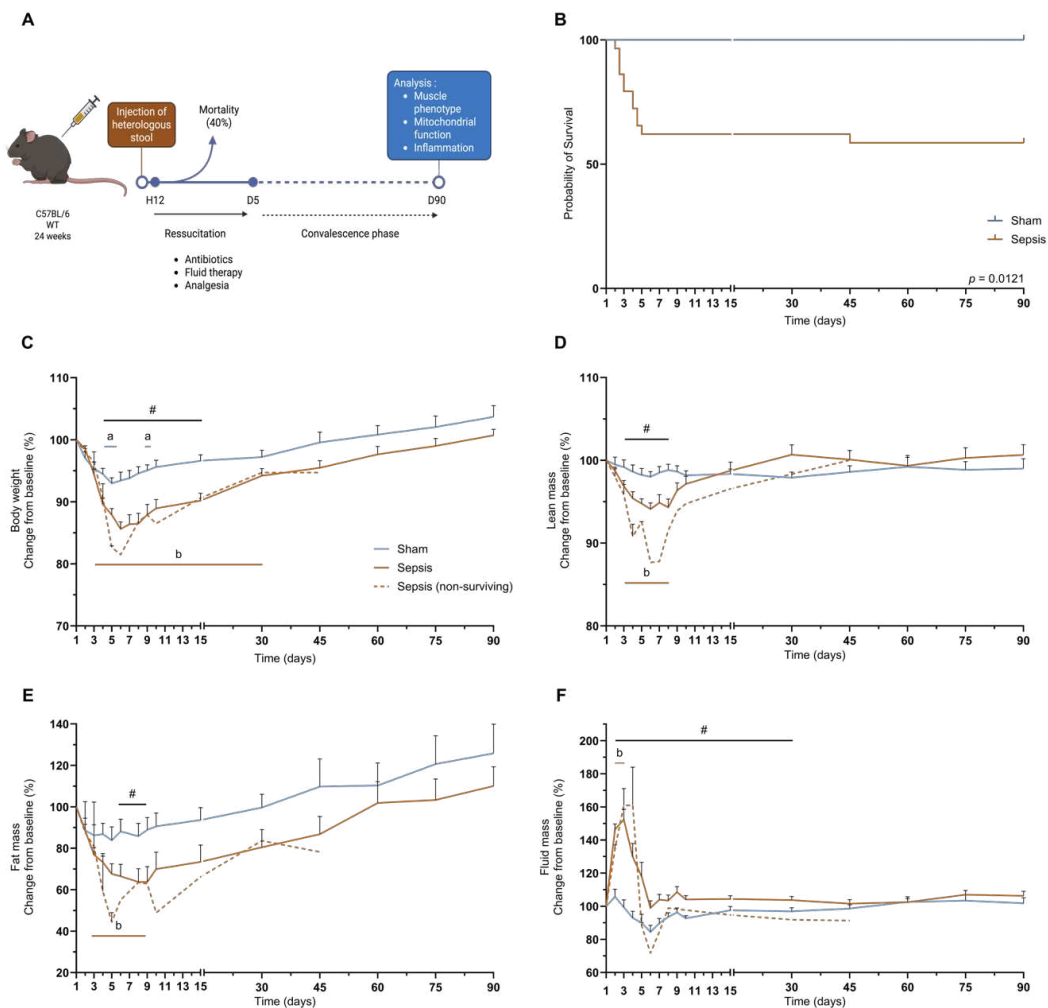


Figure 1. Sepsis does not change body composition in the long term. **A**, Diagram of the protocol enabling long-term analysis of mice surviving sepsis. The mice are injected with heterologous stool, and a resuscitation phase delayed by 12 hours is performed for 5 days. During the resuscitation phase, the mice are injected with antibiotics, analgesia, and hydration. **B**, Kaplan-Meier curves for Sham (n=12) and Sepsis mice (n=29). One mouse was excluded based on the exclusion criteria. Changes compared with baseline in weight (**C**), lean mass (**D**), fat mass (**E**) and fluid mass (**F**) were measured over 90 days for Sham (n=12), Sepsis (n=17) and sepsis non-surviving (n=12). Statistical comparisons are between Sham vs. Sepsis (#), Sham vs. baseline (a), Sepsis vs. baseline (b) (**B**, **C**, **D**, **E**), and Sham vs. Sepsis (*). Data were analysed with log-rank test (**B**), mixed-effects model (REML) (**C**, **D**, **E**, **F**). * p < 0.05.

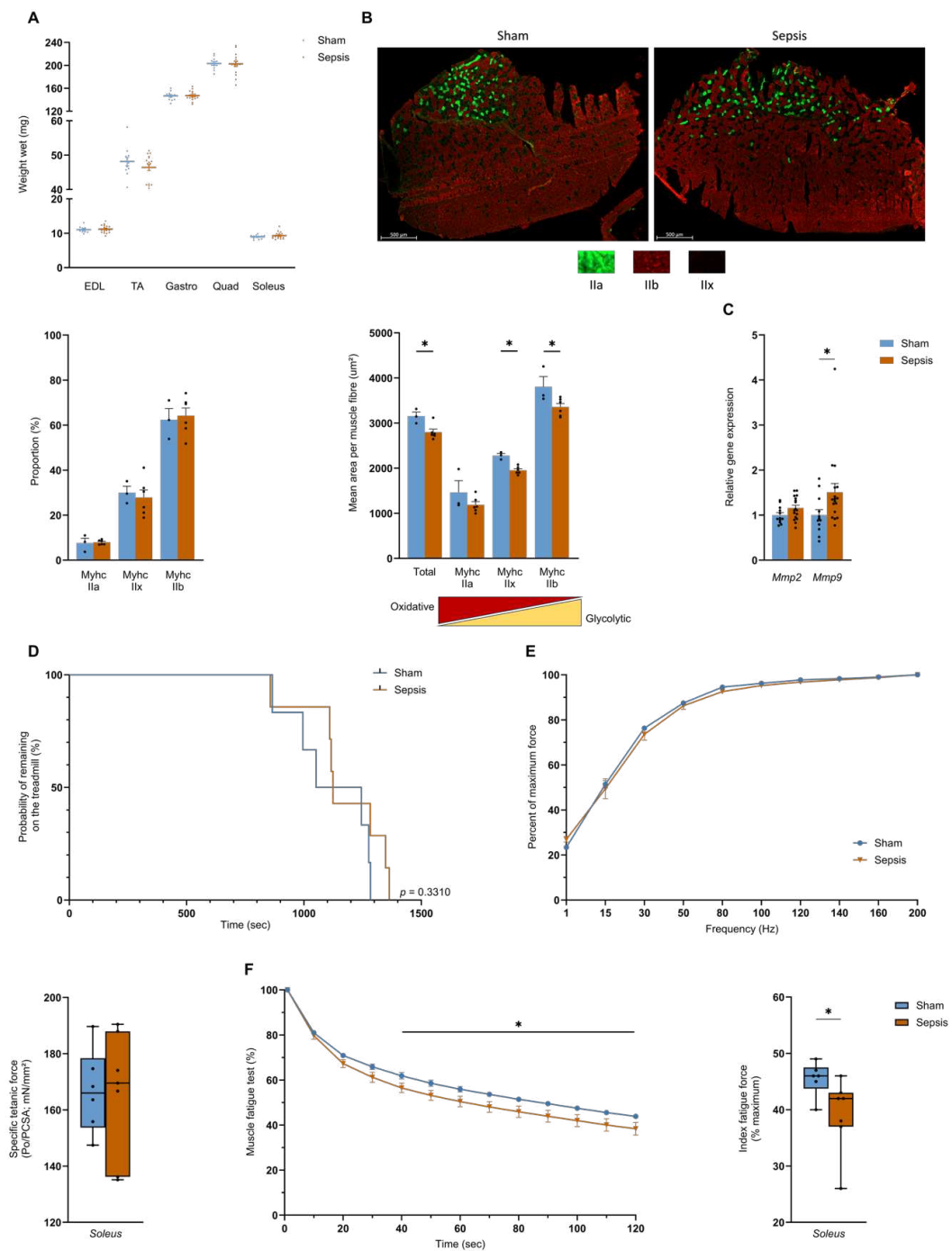


Figure 2. Sepsis induces long-term muscle alterations in surviving mice. **A**, wet weights of *EDL*, *TA*, *gastrocnemius*, *quadriceps*, and *soleus* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17) mice. **B**, representative fluorescence microscopy images of *TA* from Sham (left) and Sepsis (right) mice immunostained for type IIa (green), IIb (red), and IIx fibres (unlabelled). The total surface area of all and each fibre type per muscle section was measured and quantified by the MuscleJ2 (Fiji) plugin for the Sham (n=3) and Sepsis (n=6) groups. **C**, gene expression of *Mmp2* and *Mmp9*, normalised to the Sham group (Sham mice n=12, Sepsis mice n=17). **D**, Kaplan-Meier curves of the probability of a Sham (n=6) or Sepsis (n=7) mouse running. **E**, percentage of maximum contractile force according to frequency. Whisker box plots representing the median, lower and upper quartiles, and minimum and maximum values. The data represent *soleus*-specific tetanic force production in the Sham (n=6) and Sepsis (n=7) groups. **F**, evolution of *soleus* fatigue (expressed as a percentage relative to the initial force) over time during 2 minutes. Whisker box plots representing the median, lower and upper quartiles, and minimum and maximum values. The data represent the percentage of *soleus* fatigue reached after 2 minutes of contraction compared to the initial value in the Sham (n=6) and Sepsis (n=7) groups. Data are expressed as mean with SEM. Statistical comparisons are between Sham vs. Sepsis (*). Data were analysed with log-rank test (**D**), with Mann-Whitney test (**A**, **B**, **C**, **E**, **F**) or mixed-effects model (REML) (**E**, **F**), t-test (**A**, **C**). * p < 0.05.

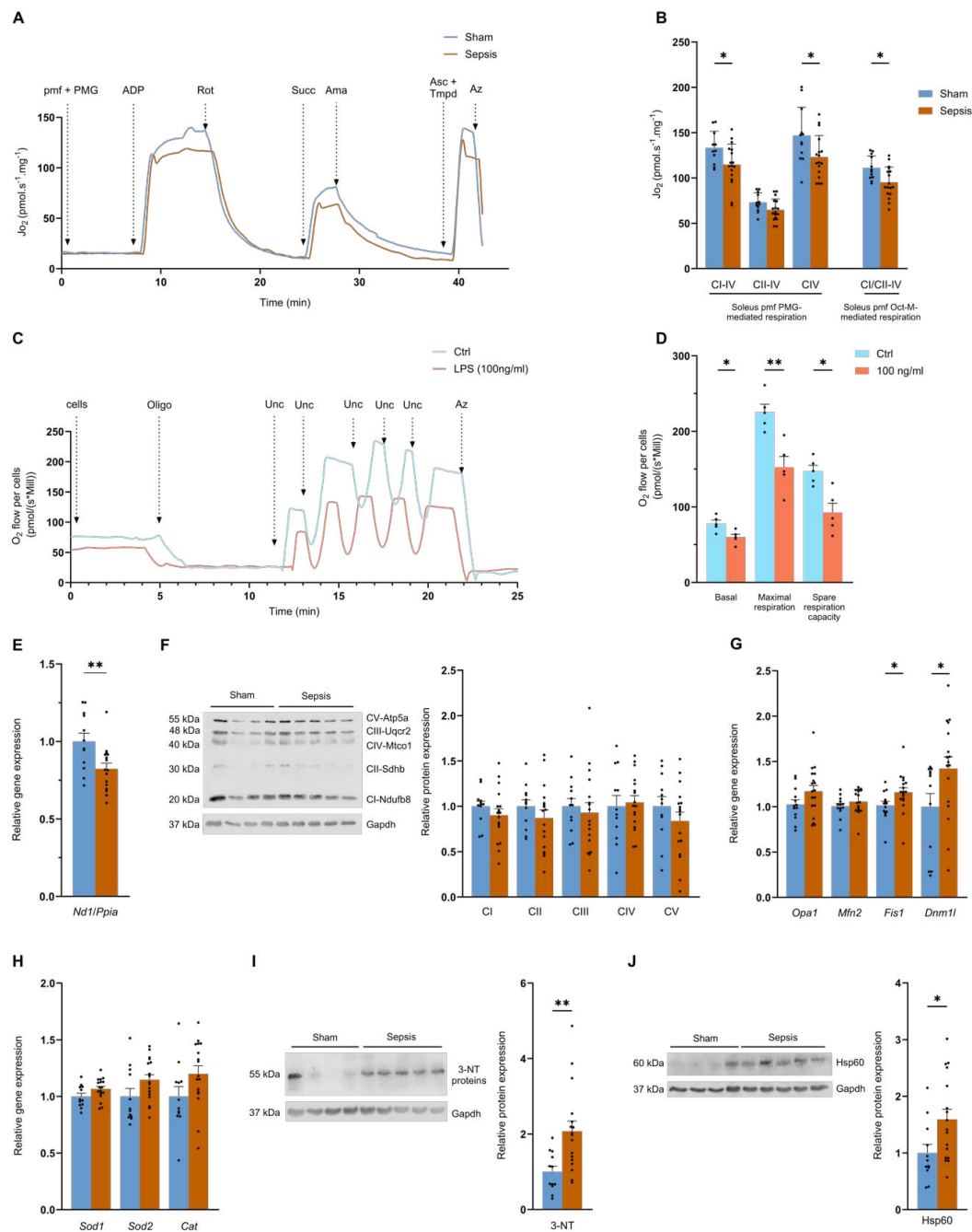


Figure 3. Sepsis induces persistent long-term mitochondrial dysfunction. **A**, Representative curve of the pyruvate-glutamate-malate (PMG) protocol assessing oxygen consumption (J_{O_2}) of permeabilised soleus muscle fibres (pmf) from Sham (blue) and Sepsis (orange) mice by high-resolution respirometry using successive injections: pyruvate (5 mM), malate (2 mM), glutamate (10 mM) (PMG; ADP (5 mM) (CI-IV oxidative phosphorylation state (OXPHOS) driven by complex I); rotenone (Rot, 0.5 μM) and succinate (Succ, 10 mM) (CII-IV OXPHOS state driven by complex II); antimycin A (Ama, 2.5 μM), ascorbate (Asc, 2 mM) and TMPD (0.5 mM) (CIV OXPHOS state driven by CIV) and sodium azide (Azd, 100 mM). **B**, pmf J_{O_2} data from soleus of Sham ($n=12$) and Sepsis ($n=17$) mice in PMG protocols for CI-driven OXPHOS states of respiration at CIV, CII-driven at CIV and CIV and by octanoyl-L-carnitine-malate (Oct-M) protocol for CI- and CII-driven OXPHOS state of respiration at CIV. **C**, Representative curve of the oxygen consumption protocol performed on ctrl (blue) or LPS-treated (pink) myotubes by high-resolution respirometry following successive injections of oligomycin

(oligo, 10 μ M), uncoupler (Unc, 1 μ M), and sodium azide (azd, 100 mM). **D**, oxygen consumption of muscle cells treated with placebo (ctrl) or LPS at 100 ng/ml (LPS) from basal respiration with no substrate or inhibitor supplementation, uncoupled maximal respiration, and free reserve respiration (maximal respiration minus basal respiration) (n=5 per group). **E**, amount of mtDNA measured by normalisation of *Nd1* mRNA on *Ppia* mRNA in *quadriceps* in Sham (n=12) and Sepsis (n=16). **F**, protein expression analysis of Ndufb8 (CI), Sdhb (CII), Uqcrc2 (CIII), Mtco1 (CIV), Atp5a (CV), and Gapdh in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17). mRNA level measured by Quantigene of *Sod1*, *Sod2* and *Catalase* (*Cat*) in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17) groups. **G**, mRNA level measured by Quantigene of *OPA1*, *Mfn2*, *Fis1* and *Dnm1l* in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17) groups. **H**, mRNA level measured by Quantigene of *Sod1*, *Sod2*, and *Cat* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17) groups. **I**, protein expression analysis of 3 nitrotyrosine (3-NT) and Gapdh in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17). **J**, protein expression analysis of Hsp60 and Gapdh in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17). Data are expressed as mean with SEM. Statistical comparisons between Sham vs. Sepsis (*). Data were analysed with a t-test (**B, D, E, F, G, I, J**) or a Mann-Whitney test (**G,F**). * p < 0.05, ** p < 0.01.

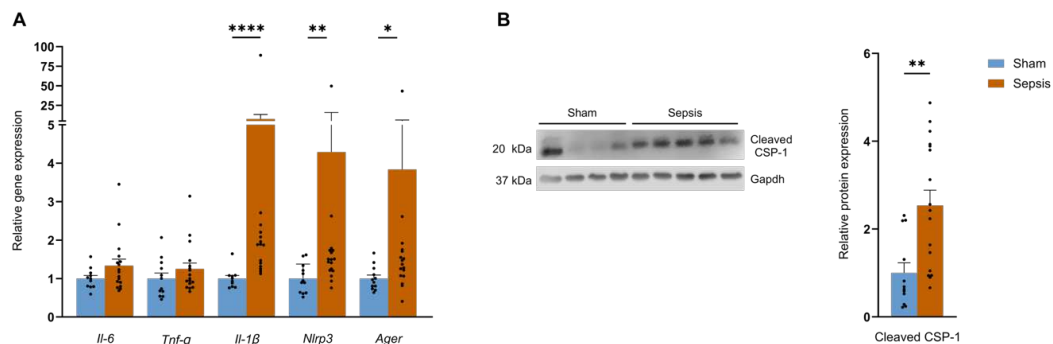


Figure 4. NLRP3 and RAGE-dependent inflammation persists in mouse survivors 3 months after sepsis. A, mRNA levels of *Il-6*, *TNF-α*, *Il-1β*, *Nlrp3*, and *Ager* by Quantigene in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17). **B**, protein expression analysis of cleaved caspase 1 (cleaved CSP-1) and Gapdh in *quadriceps* in Sham (n=12) and Sepsis (n=17). Data are expressed as mean with SEM. Statistical comparisons between Sham vs. Sepsis (*). Data were analysed with a t-test (**A,B**) or Mann-Whitney test (**A**). * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p<0.001.

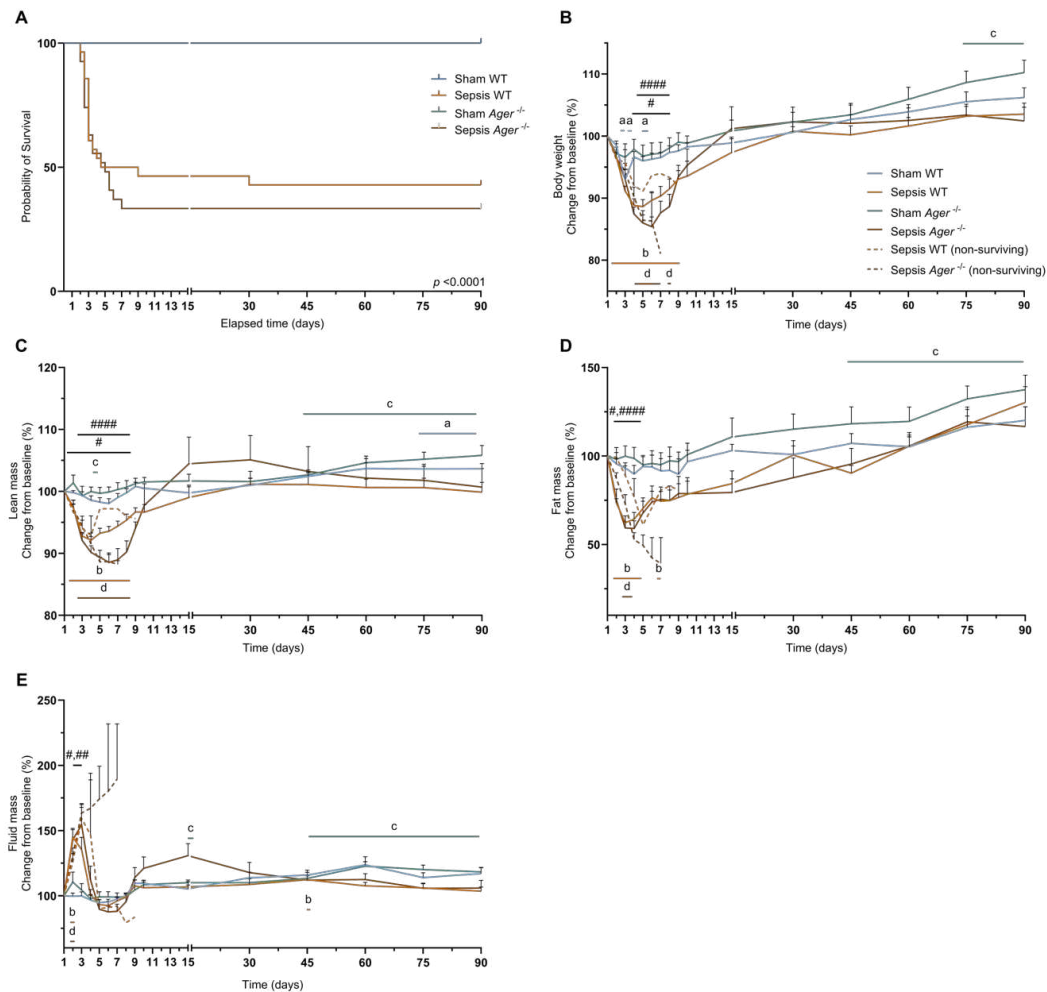


Figure 5. Survival and body composition of *Ager*^{-/-} mice do not differentiate from WT mice. **A**, Kaplan-Meier curves for Sham WT (n=12), Sepsis WT (n=28), Sham *Ager*^{-/-} (n=12), and Sepsis *Ager*^{-/-} (n=27) groups. **B**, **C**, **D**, **E**, baseline changes in weight, fat mass, lean mass and fluid mass were measured over 90 days for Sham WT (n=12), Sepsis WT (n=12), Sham *Ager*^{-/-} (n=12), Sepsis *Ager*^{-/-} (n=7), Sepsis WT non-surviving (n=15) and Sepsis *Ager*^{-/-} non-surviving (n=18). Statistical comparisons are between Sham WT vs. Sepsis WT (#), Sham *Ager*^{-/-} vs. Sepsis *Ager*^{-/-} (####), Sham WT vs. baseline (a), Sepsis WT vs. baseline (b), Sham *Ager*^{-/-} vs. baseline (c) and Sepsis *Ager*^{-/-} vs. baseline (d) (**B**, **C**, **D**, **E**). Data were analysed with a log-rank test (**A**) and mixed-effects model (REML) (**B**, **C**, **D**, **E**). * p < 0.05.

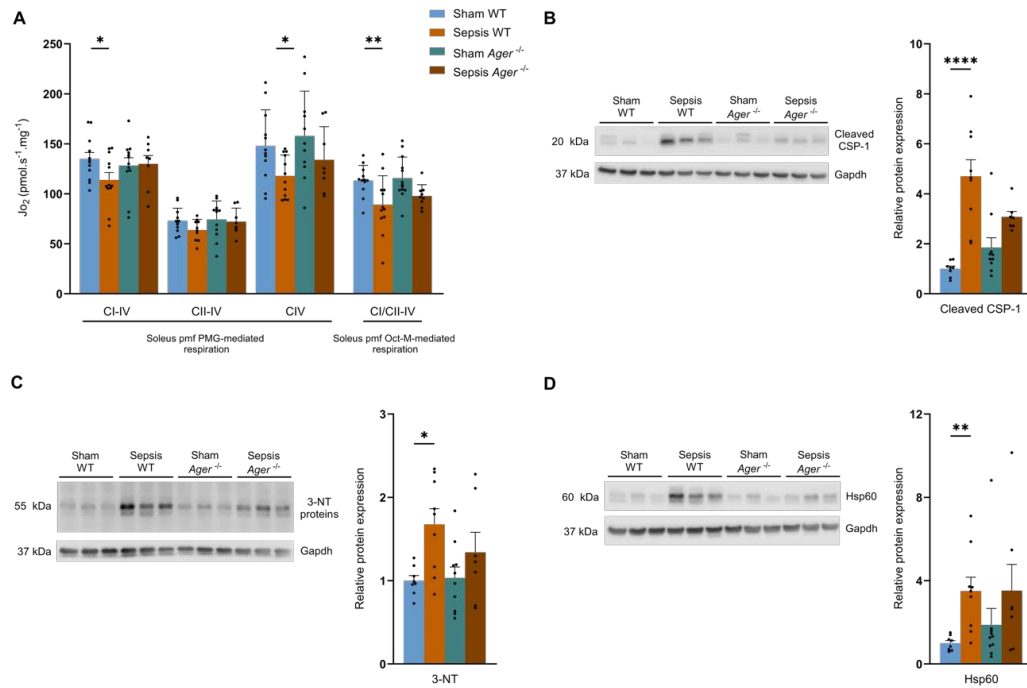


Figure 6. *Ager*^{-/-} sepsis mice survivors do not develop mitochondrial dysfunction and inflammation. **A**, soleus pmf Jo₂ data from Sham WT (n=12), Sepsis WT (n=12), Sham *Ager*^{-/-} (n=12), and Sepsis *Ager*^{-/-} (n=9) mice in PMG protocols for OXPHOS states of respiration driven by CI to CIV, CII to CIV, and CIV, and by the octanoyl-L-carnitine-malate (Oct-M) protocol for the OXPHOS state of respiration conducted by CI and CII to CIV. **B**, protein expression of cleaved caspase-1 (cleaved CSP-1) and Gapdh in *quadriceps* in Sham WT (n=8), Sepsis WT (n=9), Sham *Ager*^{-/-} (n=9), and Sepsis *Ager*^{-/-} (n=7). **C**, protein expression of 3-nitrotyrosine (3-NT) and Gapdh in *quadriceps* in Sham WT (n=8), Sepsis WT (n=9), Sham *Ager*^{-/-} (n=9), and Sepsis *Ager*^{-/-} (n=7). **D**, protein expression of Hsp60 and Gapdh in *quadriceps* in Sham WT (n=8), Sepsis WT (n=9), Sham *Ager*^{-/-} (n=9), and Sepsis *Ager*^{-/-} (n=7). Data are expressed as mean with SEM. Statistical comparisons between Sham WT vs. Sepsis WT vs. Sham *Ager*^{-/-} vs. Sepsis *Ager*^{-/-} (*). Data were analysed with a one-way ANOVA test with Fisher's LSD post-hoc (A), Sidak post-hoc (C), or a Kruskal-Wallis test with Dunn's post-hoc test (B, D). * p<0.05, ** p<0.01, ****p<0.0001.

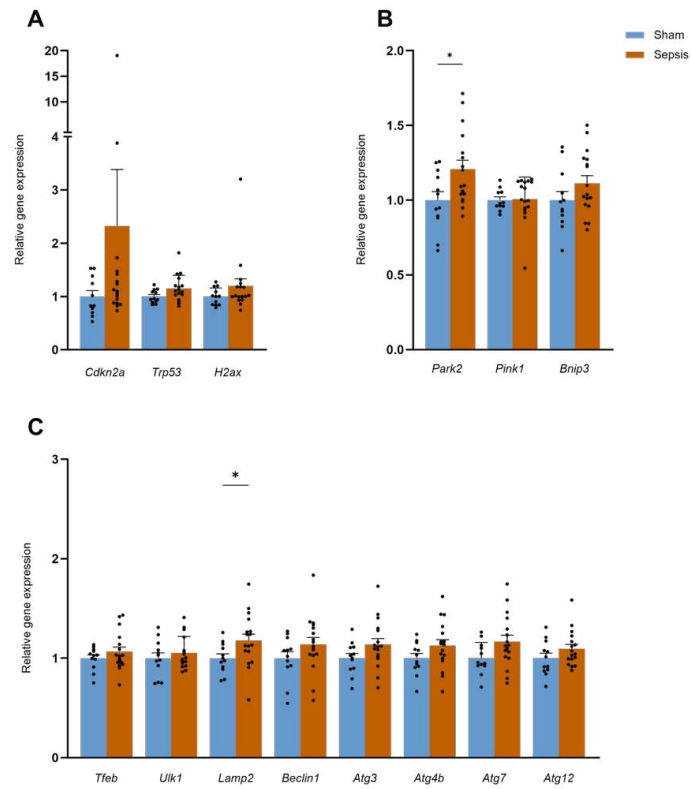


Figure S7. Analysis of senescence-, mitophagy- and autophagy-related genes. **A**, mRNA levels of *Cdkn2a*, *Trp53*, and *H2ax* by Quantigene in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17). **B**, mRNA levels of *Park2*, *Pink1*, and *Bnip3* by Quantigene in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17). **C**, mRNA levels of *Tfeb*, *Ulk1*, *Lamp2*, *Beclin1*, *Atg3*, *Atg4b*, *Atg7* and *Atg12* by Quantigene in *quadriceps* for Sham (n=12) and Sepsis (n=17). Data are expressed as mean with SEM. Statistical comparisons between Sham vs Sepsis (*). Data were analysed with a Mann-Whitney test (**A**, **B**) or with a t-test (**B**, **C**), according to the results of the normality test. * $p < 0.05$.

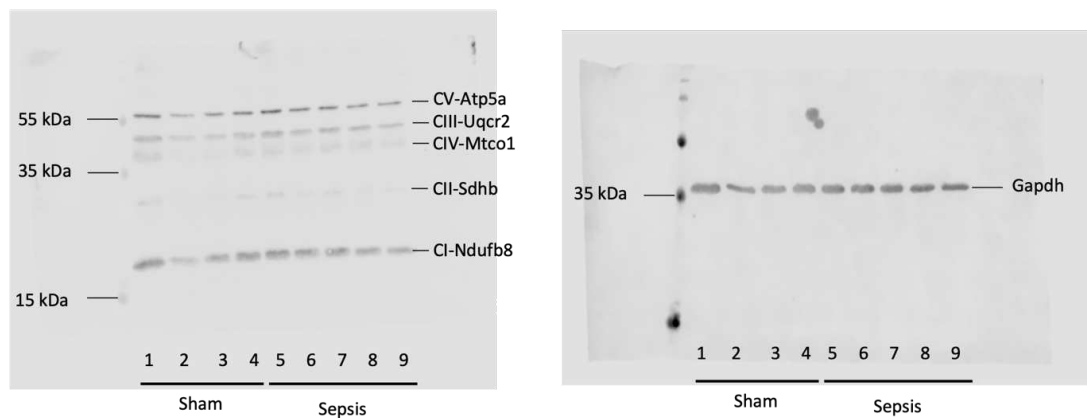


Figure S2. Full-length western blot of OXPHOS (Ndufb8, Sdha, Uqcrl2, Mtco1, Atp5a-left) and Gapdh (right) with molecular weight markers indicated, corresponding to Figure 3F in the main manuscript. Lanes correspond to Sham and Sepsis groups as shown. Exposure time: 2 min.

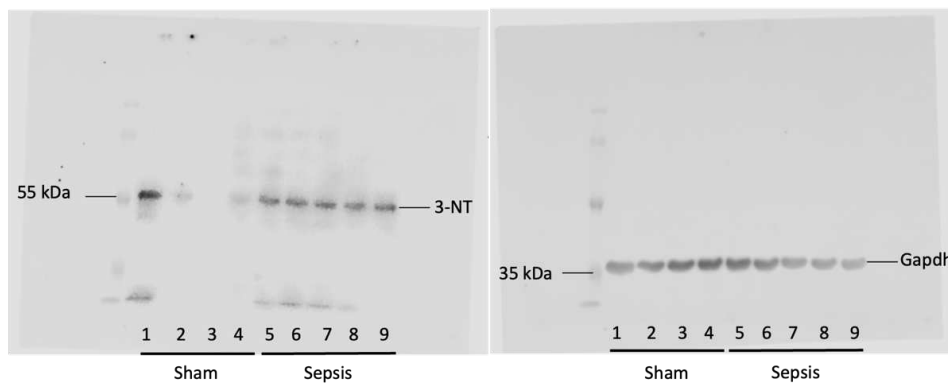


Figure S3. Full-length western blot of 3 Nitrotyrosine (left) and Gapdh (right) with molecular weight markers indicated, corresponding to Figure 3I in the main manuscript. Lanes correspond to Sham and Sepsis groups as shown. Exposure time: 2 min.

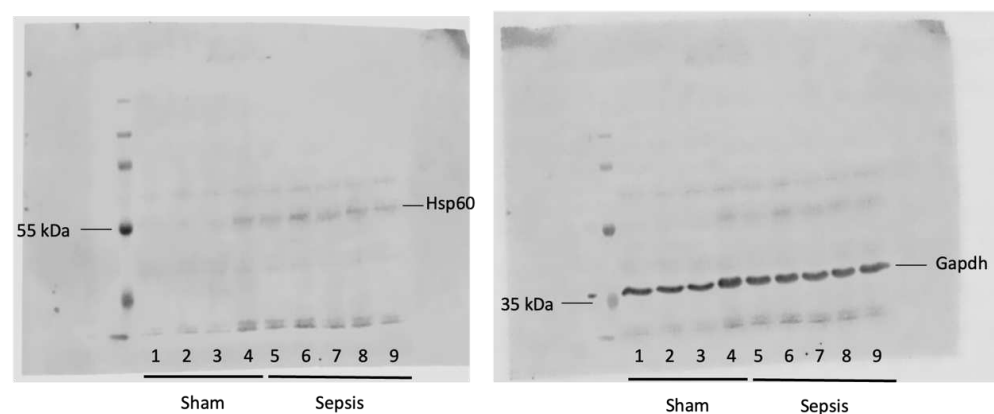


Figure S4. Full-length western blot of Hsp60 (left) and Gapdh (right) with molecular weight markers indicated, corresponding to Figure 3J in the main manuscript. Lanes correspond to Sham and Sepsis groups as shown. Exposure time: 2 min.

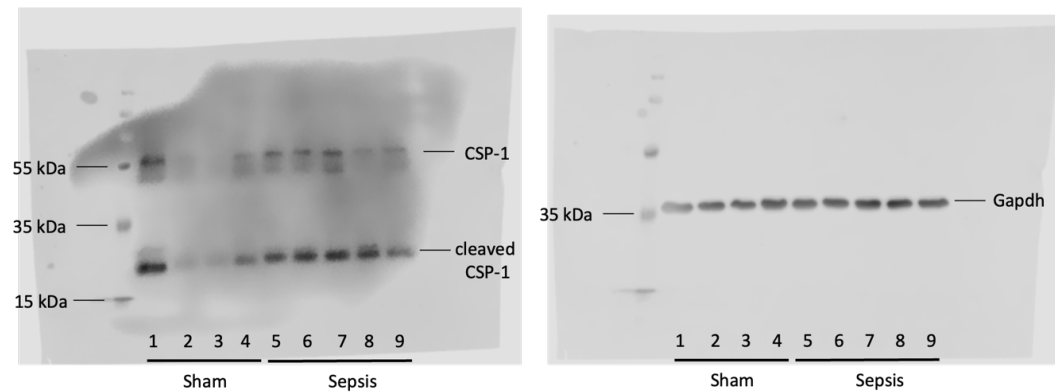


Figure S5. Full-length western blot of cleaved CSP-1 (left) and Gapdh (right) with molecular weight markers indicated, corresponding to Figure 4B in the main manuscript. Lanes correspond to Sham and Sepsis groups as shown. Exposure time: 2 min.

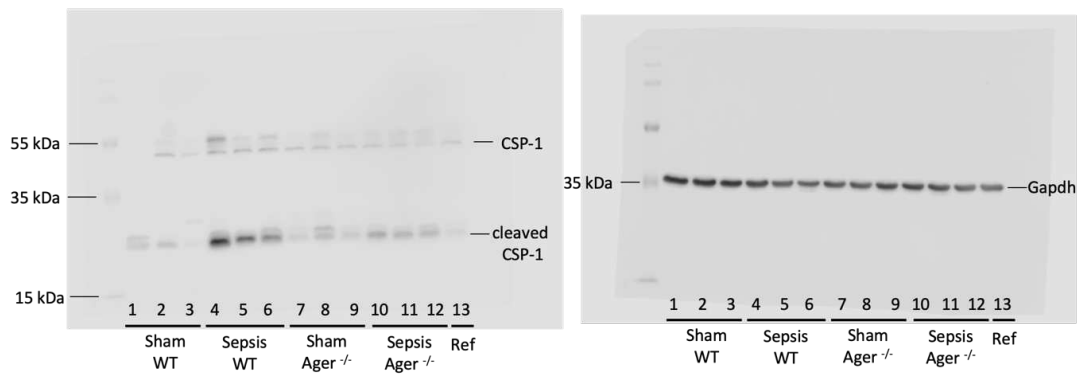


Figure S6. Full-length western blot of cleaved-CSP1 (left) and Gapdh (right) with molecular weight markers indicated, corresponding to Figure 6B in the main manuscript. Lanes correspond to Sham WT, Sepsis WT, Sham Ager^{-/-} and Sepsis Ager^{-/-} groups as shown. Exposure time: 2 min.

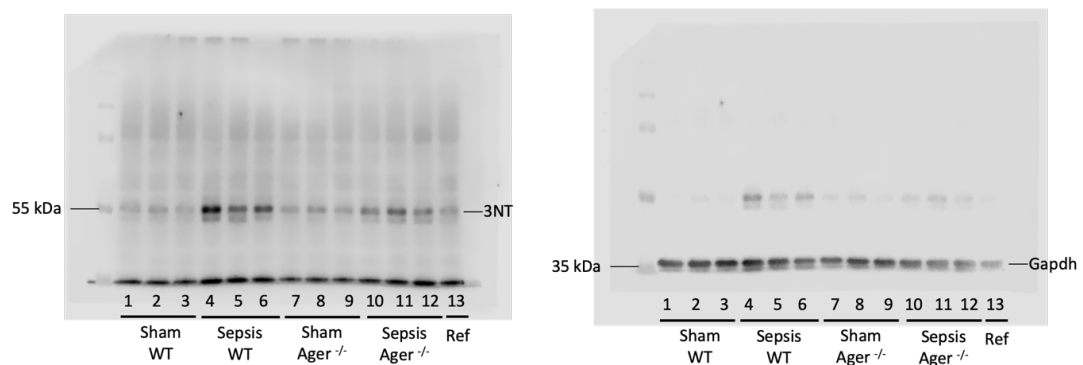


Figure S7. Full-length western blot of 3-NT (left) and Gapdh (right) with molecular weight markers indicated, corresponding to Figure 6C in the main manuscript. Lanes correspond to Sham WT, Sepsis WT, Sham Ager^{-/-} and Sepsis Ager^{-/-} groups as shown. Exposure time: 2 min.

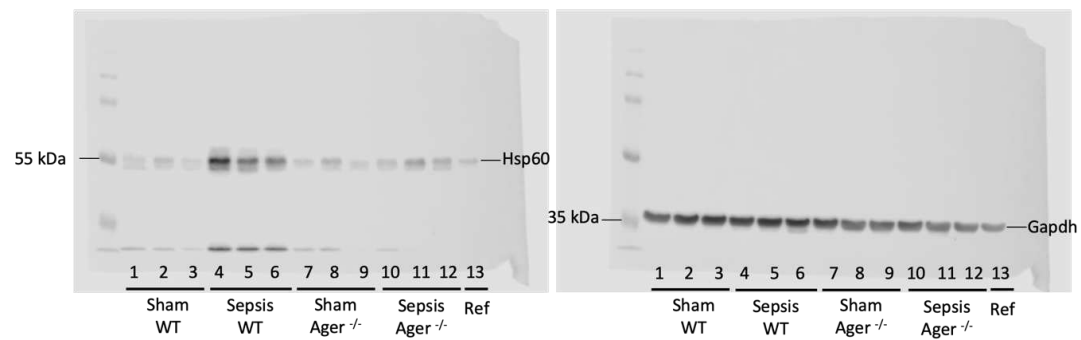


Figure S8. Full-length western blot of Hsp60 (left) and Gapdh (right) with molecular weight markers indicated, corresponding to Figure 6D in the main manuscript. Lanes correspond to Sham WT, Sepsis WT, Sham Ager^{-/-} and Sepsis Ager^{-/-} groups as shown. Exposure time: 2 min.

Target	Reference	Supplier	Dilution
Primary antibody			
OXPHOS	stn-19467	Abcam	1/3000
3-NT	ab-61392	Abcam	1/3000
Hsp60	sc-59567	Santa Cruz Biotechnology	1/3000
Csp-1	AG-20B-0042-C100	AdipoGen Life Sciences	1/3000
MHC IIa	SC-71	DSHB	1/100
MHC IIb	BF-F3	DSHB	1/50
MHC I	BA-D5	DSHB	1/50
Laminin	4h8-2	DSHB	1/100
Secondary Antibody			
Mouse IgG 700	926-68170	Li-Cor	1/10000
Mouse IgG 800	925-32212	Li-Cor	1/10000
Rabbit IgG 700	926-68071	Li-Cor	1/10000
Rabbit IgG 800	827-08365	Li-Cor	1/10000
Mouse IgG1 (Alexa Fluor 488)	A-21121	Thermofisher	1/250
Mouse IgM (Alexa Fluor 555)	A-21426	Thermofisher	1/250
Mouse IgG2b (Alexa Fluor 647)	A-21242	Thermofisher	1/250
Rat IgG (Alexa Fluor 555)	A-48261	Thermofisher	1/250
Mouse IgG-HRP-linked	7076	Cell signaling	1/5000
Rabbit IgG-HRP-linked	7074	Cell signaling	1/5000

Table S1. Antibodies used in western blot and immunofluorescence experiments.

	Forward sequence	Reverse sequence	Accession number
<i>Nd1</i>	TCCGAGCATCTTATCCACGC	GTATGGTGGTACTCCCGCTG	NC_005089.1
<i>Ppia</i>	ACACGCCATAATGGCACTGG	CAGTCTTGGCAGTGCAGAT	NM_008907.2

Table S2. Primer sequences used for qPCR.