



# **Rôle de médiateurs de l'inflammation dans l'altération de la fonction musculaire : étude des effets du sepsis et de la chimiothérapie sur un modèle murin**

Baptiste Jude

## **► To cite this version:**

Baptiste Jude. Rôle de médiateurs de l'inflammation dans l'altération de la fonction musculaire : étude des effets du sepsis et de la chimiothérapie sur un modèle murin. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2017. Français. ⟨NNT : 2017BRES0145⟩. ⟨tel-01762444⟩

**HAL Id: tel-01762444**

**<https://theses.hal.science/tel-01762444v1>**

Submitted on 10 Apr 2018

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

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



HAL Authorization

**THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE**

*Mention : Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale*

**École Doctorale Biologie-Santé**

présentée par

**Baptiste Jude**

Préparée au **Laboratoire de  
Physiologie  
EA 4324 ORPHY**

**Rôle de médiateurs de  
l'inflammation dans l'altération de la  
fonction musculaire: étude des effets  
du sepsis et de la chimiothérapie sur  
un modèle murin**

**Thèse soutenue le 19/12/2017**

devant le jury composé de :

**Dominique DARDEVET**

Rapporteur, DR, INRA, Clermont-Ferrand Theix

**Damien FREYSSINET**

Rapporteur, Pr, Université Jean Monnet, Saint Priest en Jarez

**Silvia BUSQUETS RIUS**

Examinatrice, Pr, Facultat de Biologia, Barcelona

**Karine PICHAVANT-RAFINI**

Examinatrice, MC, EA 4324 ORPHY, Brest

**Jean-Pierre PENNEC**

Directeur de Thèse, MC, EA 4324 ORPHY, Brest

**Marie-Agnès GIROUX-METGES**

Co-Directrice de Thèse, PU-PH, EA 4324 ORPHY, Brest



## Remerciements

Je tiens à remercier les quatre membres du jury d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, Dominique Dardevet, Damien Freyssenet, Sylvia Busquets Rius et Karine Pichavant-Rafini.

Je veux également remercier Marie-Agnès Giroux-Metges et Jean-Pierre Pennec pour m'avoir donné l'opportunité, il y a maintenant 3 ans et demi, de venir défendre un sujet de thèse et de m'avoir accepté dans leur laboratoire.

Merci à Josep Argiles et Silvia Busquets de m'avoir accueilli dans leur laboratoire à la fin de ma thèse pour une expérience très stimulante.

Je remercie La Fayette qui certes n'a été là que la dernière année mais qui a été un vrai souffle d'air frais (ou la rinçade alcoolisée). Je tiens à la remercier aussi pour ses gamelles gargantuesques, ses répliques pertinentes, nos échanges déchainés de levains liquides ou pâteux et peut être un peu la science.

Dans la liste il y a également Miss Sepis reine de l'ISBAM qui est là depuis le début et avec qui c'est toujours un plaisir !

Un très grand merci à Michelle Kerleroux, qui était là pour me faire déstresser avant le concours de l'école doctorale, et qui durant les 3ans de thèse a été littéralement une mère au sein de l'école doctorale.

Merci aux autres membres du labo dont Karelle, et Mickael (tes petits surnoms me manqueront).

Merci à Thomas, mon stagiaire de M2, qui m'a franchement épaté par la qualité de son travail et sa détermination, et qui malgré le contexte a excellé !

Merci à Nathalie, Aline, Karine, Mickael et Christelle qui m'ont permis de faire mes 2 ans de monitorat, avec ma première expérience d'enseignement, et cela dans des conditions excellentes et toujours dans la bonne humeur.

Merci aussi à Christine et Jocelyne qui ont eu à gérer mes demandes toujours plus compliquées ces derniers mois.

Merci à Jean-Philippe Metges qui a pris le temps de me recevoir, de me présenter et de m'aider dans mes recherches, une aide indispensable qui a contribué à développer mon intérêt pour la cachexie cancéreuse.

Merci aussi à Sylvia Redon, qui avec une extrême patience et gentillesse m'a aidé dans les manip. Merci aussi à Arnaud Tanguy d'y avoir contribué.

Merci aussi à Alice, Marie-Astrid et l'équipe Levure pour leurs conseils, leurs petits coups de mains et leur gentillesse, c'est rare et ça fait très plaisir !

Merci à Abcam également, qui grâce à son SAV et ses remises Abtrial, m'a permis d'acheter plein plein plein d'anticorps...

Merci aussi aux vendeurs de crêpes du marché, le fromager, la brûlerie du Léon, le Gueule de bois, le Tara et autres qui ont contribué à me faire aimer la vie sur Brest.

Merci également à Héloïse et Steven qui sont, pour ainsi dire, les premiers amis que j'ai eus sur Brest.

Merci à Mélanie et à Tony qui sont des personnes formidables, rencontrés dans des circonstances douteuses, et qui comptent parmi mes quelques très bons amis de Brest. Et Saliha aussi pour son légendaire franc-parler !

Merci à Karine, que j'ai retrouvé par hasard sur Brest et qui a été mon bout de St Nectaire au pays du beurre.

Merci aux p'tits nouveaux aussi, Pauline, Domitille et Clément, qui sont là depuis un peu plus d'un an grâce aux doctoriales (comme quoi ça sert à quelque chose ce truc).

Merci à la troupe de Clermont d'avoir été là, d'être toujours là et qui sera toujours là.

Merci à ma mère et Serge qui me soutiennent à chaque étape depuis le début.

Et merci à Thierry, la bouffée d'air frais (la vraie).

# Table des matières

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Liste des abréviations</b>                         | <b>9</b>  |
| <b>Liste des illustrations</b>                        | <b>13</b> |
| <b>Liste des communications</b>                       | <b>15</b> |
| <b>Introduction</b>                                   | <b>17</b> |
| <b>I. Généralité sur la physiologie musculaire</b>    | <b>17</b> |
| A. La physiologie du muscle strié                     | 17        |
| 1. Le muscle strié squelettique                       | 17        |
| a. Structure et fonction du muscle strié squelettique | 17        |
| b. Couplage excitation – contraction                  | 23        |
| 2. Spécificités du muscle strié cardiaque             | 27        |
| 3. L'excitabilité membranaire                         | 29        |
| B. Le métabolisme protéique                           | 32        |
| 1. La synthèse protéique                              | 32        |
| a. Généralités                                        | 32        |
| b. Voies de signalisation de la synthèse protéique    | 33        |
| 2. La dégradation protéique                           | 35        |
| a. La voie autophagie-lysosome                        | 35        |
| b. La voie des calpaïnes calcium dépendantes          | 36        |
| c. La voie ubiquitine-protéasome dépendante           | 37        |
| C. Médiateurs impliqués dans l'atrophie musculaire    | 39        |
| 1. Le TNF- $\alpha$                                   | 40        |
| 2. L'IL-1                                             | 41        |
| 3. L'IL-6                                             | 42        |
| 4. La myostatine                                      | 43        |
| <b>II. Le sepsis</b>                                  | <b>45</b> |
| A. Physiopathologie                                   | 45        |
| B. Sepsis et muscle                                   | 47        |
| 1. Diminution de la masse musculaire                  | 47        |
| 2. Diminution de la force de contraction              | 48        |
| 3. Altération du couplage excitation-contraction      | 49        |

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| 4. Dysfonction cardiaque                                      | 49        |
| C. Acteurs du dysfonctionnement musculaire                    | 51        |
| D. Prise en charge du sepsis                                  | 52        |
| <b>III. La cachexie cancéreuse</b>                            | <b>55</b> |
| A. Généralités                                                | 55        |
| B. Les causes de la cachexie cancéreuse                       | 56        |
| 1. L'anorexie                                                 | 56        |
| 2. Modifications du métabolisme                               | 57        |
| a. Métabolisme protéique                                      | 57        |
| b. Métabolisme lipidique                                      | 61        |
| c. Métabolisme glucidique                                     | 62        |
| C. Les médiateurs et les mécanismes de la cachexie cancéreuse | 63        |
| 1. Les médiateurs endogènes                                   | 63        |
| a. Les cytokines                                              | 63        |
| b. Les glucocorticoïdes                                       | 64        |
| c. La myostatine                                              | 64        |
| 2. Les traitements anti-cancéreux                             | 65        |
| D. Les moyens de prise en charge de la cachexie cancéreuse    | 67        |
| <b>Matériels et Méthodes</b>                                  | <b>71</b> |
| <b>I. Protocoles expérimentaux</b>                            | <b>71</b> |
| A. Sepsis                                                     | 71        |
| B. Protocole DanTax                                           | 71        |
| C. Protocole Sepsis TGF- $\beta$                              | 74        |
| <b>II. Techniques utilisées</b>                               | <b>75</b> |
| A. Cœur perfusé                                               | 75        |
| B. Contraction du péronier                                    | 76        |
| C. Contraction du diaphragme                                  | 78        |
| D. Patch clamp                                                | 79        |
| a. Dissociation des cardiomyocytes                            | 79        |
| b. Patch-Clamp                                                | 80        |
| c. Analyse des courants sodiques                              | 82        |
| E. Western blot                                               | 84        |
| a. Extraction des protéines membranaires                      | 84        |

|                                                                                                                                                              |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| b. Extraction des protéines cytosoliques/nucléaires _____                                                                                                    | 84         |
| c. Extraction des protéines totales _____                                                                                                                    | 85         |
| F. Dosage des cytokines _____                                                                                                                                | 88         |
| <b><i>Introduction des travaux de thèse</i></b> _____                                                                                                        | <b>89</b>  |
| I. Article 1 : Effet inotrope négatif rapide du TNF- $\alpha$ sur des cœurs de rats<br>perfusés, associé à l'activation des PKC _____                        | 89         |
| II. Article 2 : L'IL-13 a un effet inotrope positif sur le cœur sain, relié à une<br>augmentation de l'excitabilité cardiaque _____                          | 107        |
| III. Article 3 : La cachexie et la faiblesse musculaire induites par le docétaxel<br>sont prévenues par l'injection de dantrolène _____                      | 137        |
| IV. Article 4 : L'inhibition de la voie des TGF- $\beta$ protège le diaphragme à la fois de<br>l'atrophie et de la faiblesse musculaire lors du sepsis _____ | 163        |
| <b><i>Conclusion générale et perspectives</i></b> _____                                                                                                      | <b>193</b> |
| <b><i>Références</i></b> _____                                                                                                                               | <b>199</b> |



## Liste des abréviations

4E-BP1: 4E-binding protein 1  
AA : Acide arachidonique  
Ac : Anticorps  
AC : Adénylate cyclase  
ActRIIB : Récepteur à l'activine IIB  
AGPI-3 : Acide gras poly insaturé 3  
ALK4 : Activin-like kinase 4  
ALK5 : Activin-like kinase 5  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
ARNt : Acide ribonucléique de transfert  
ATP : Adénosine triphosphate  
BPCO : Broncho pneumopathie chronique obstructive  
BSA : Bovine serum albumine  
CaMKII : Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendantes 2  
CARS : Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome  
C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein  
CICR: Calcium-Induced Calcium Release  
CLP: Cecal Ligation and Puncture (ligature et perforation caecale)  
CRP : Protéine C réactive  
CSA : Cross Section Area  
DAG : Diacylglycerol  
DICR : Depolarization-Induced Ca<sup>2+</sup> Release  
ECL: Enhanced chemiluminescence  
EDL : *Extensor digitorum longus*  
eIF : Eukaryotic initiation factor  
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay  
EPA : Acide eicosapentaénoïque  
ERK 1/2 : Extracellular signal-regulated kinases  
FADD : Fas- associated protein with death domain  
FOXO : Forkhead box O  
GSK3 $\beta$  : Glycogen synthase kinase 3 $\beta$   
HEK-283 : Human embryonic kidney cells 293

HMM : Heavy Mero-Myosin  
 HRP : Horseradish peroxidase  
 HSL : lipase hormone sensible  
 IGF-1 : Insulin-like growth factor-1  
 I $\kappa$ B $\alpha$  : Inhibiteur de kappa B  $\alpha$   
 IKK : I $\kappa$ B kinase  
 IL : Interleukine  
 IP : Intra p $\acute{e}$ riton $\acute{e}$ ale  
 IRS-1 : Insulin receptor substrate-1  
 IV : Intraveineux  
 JAK : Janus kinase  
 KB : Kraftbr $\ddot{u}$ he  
 K $_v$  : Canal potassique voltage d $\acute{e}$ pendant  
 LC : Light Chain  
 LC3B-II : Microtubule-associated protein light chain 3 B-II  
 LLC : Lewis lung carcinoma  
 LMM : Light meromyosin  
 LPL : Lipoprot $\acute{e}$ ine lipase  
 LPS : Lipopolysaccharide  
 MAFbx : Muscle atrophy Fbox  
 MCP-1 : Monocyte chemo-attractant protein-1  
 MHC : Myosine heavy chain  
 mTOR : mammalian target of rapamycin  
 MuRF1 : Muscle ring finger 1  
 Myf-5 : Myogenic factor 5  
 MyoD : Myogenic differentiation 1  
 NCF1: Neutrophil cytosolic factor 1  
 NF $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B  
 NFAT : Nuclear factor of activated T cells  
 NOX2: NADPH oxydase 2  
 NPY: Neuropeptide Y  
 PAF : Platelet- activating factor  
 PGC-1 $\alpha$  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$   
 P $_i$  : Phosphate inorganique  
 PI3K : Phosphatidyl-inositol 3-kinase

PKA : Protéine kinase A  
 PKC : Protéine kinase C  
 PKR : Protéine kinase R  
 PMA: Phorbol 12-myristate 13-acetate  
 PMCA : Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase  
 PNMAR: Polyneuromyopathie acquise en réanimation  
 PVDF : Polyfluorure de vinylidène  
 RAch : Récepteur à l'acétylcholine  
 Rheb : Ras homology enriched brain  
 RIP-1 : Receptor-interacting protein 1  
 ROR : Espèces réactives de l'oxygène  
 RyR : Récepteur à la ryanodine  
 S6K1 : Ribosomal protein S6 kinase of 70 kDa  
 SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase  
 SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome  
 SREBP-1C : Sterol regulatory element-binding protein 1C  
 STAT : Signal transducers and activators of transcription  
 TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances  
 TBST: TBS + Tween 20  
 TG : Triglycérides  
 TGF-β : Transforming growth factor β  
 TGFβR1 : TGF-β récepteur 1  
 TLR4: Toll like receptor 4  
 TNF-α : Tumor necrosis factor α  
 TNFR1 : Récepteur 1 du TNF-α  
 TNFsR : TNF-α Soluble Receptor  
 TRADD : Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain  
 TSC : Tuberous Sclerosis Complex  
 UM: unites motrice  
 UPS : Ubiquitine proteasome systeme  
 VEGF : Vascular endothelium growth factor  
 VLDL : Very low density lipoprotein



# Liste des illustrations

## Liste des Figures

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Schéma de la structure d'un muscle strié squelettique. ....                                            | 18 |
| Figure 2 : Schéma du sarcomère. ....                                                                              | 20 |
| Figure 3 : Structure des filaments d'actine et de myosine .....                                                   | 21 |
| Figure 4 : Image au microscope électronique à transmission de sarcomère. ....                                     | 22 |
| Figure 5 : Différence de profil de contraction force-fréquence entre un muscle rapide et un muscle lent.....      | 22 |
| Figure 6 : Différence de profil de fatigue entre un muscle rapide et un muscle lent. ....                         | 23 |
| Figure 7 : Schéma de la jonction neuromusculaire .....                                                            | 24 |
| Figure 8 : Schéma de l'excitabilité membranaire et contraction musculaire. ....                                   | 25 |
| Figure 9 : Cycle de contraction des sarcomères .....                                                              | 26 |
| Figure 10 : Structure des cardiomyocytes. ....                                                                    | 27 |
| Figure 11 : Schéma de la conduction intracardiaque du potentiel d'action. ....                                    | 28 |
| Figure 12 : Structure des canaux sodiques dépendant du potentiel.....                                             | 30 |
| Figure 13 : Cycle d'activation et d'inactivation du canal sodique voltage dépendant.....                          | 32 |
| Figure 14 : Schéma de l'initiation de la synthèse protéique. ....                                                 | 33 |
| Figure 15 : Voie de signalisation d'IGF-1/PI3K/Akt.....                                                           | 35 |
| Figure 16 : Schéma de la formation des autophagosomes lors de l'autophagie.....                                   | 36 |
| Figure 17 : Activation des calpaïnes au niveau des sarcomères.....                                                | 37 |
| Figure 18 : Schéma du système Ubiquitine-Protéasome.....                                                          | 38 |
| Figure 19 : Voies de signalisation du TNF- $\alpha$ . ....                                                        | 41 |
| Figure 20 : Voies de signalisation de la myostatine dans le muscle strié squelettique. ....                       | 44 |
| Figure 21 : Schéma des différents grades et des définitions du sepsis.....                                        | 46 |
| Figure 22 : Rôle du sepsis dans la dysfonction cardiaque.....                                                     | 51 |
| Figure 23 : Mécanismes impliqués dans l'atteinte musculaire de la polyneuromyopathie acquise en réanimation. .... | 54 |
| Figure 24 : Critères de diagnostic de la cachexie cancéreuse : .....                                              | 56 |
| Figure 25 : Modification du métabolisme protéique lors de la cachexie cancéreuse.....                             | 57 |
| Figure 26 : Modification du métabolisme associé à la cachexie cancéreuse. ....                                    | 60 |
| Figure 27 : Implication des cytokines dans la cachexie cancéreuse.....                                            | 63 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 28 : Protocole Docétaxel-Dantrolène.....                              | 73 |
| Figure 29 : Différents types de forces de contraction du péronier. ....      | 77 |
| Figure 30 : Exemple de tracé de contraction de péronier.....                 | 77 |
| Figure 31 : Image de cardiomyocyte dissocié. ....                            | 81 |
| Figure 32 : Exemple d'enregistrement de courant sodique.....                 | 82 |
| Figure 33 : Caractéristiques de la courbe I-V. ....                          | 83 |
| Figure 34 : Caractéristiques des courbes d'activation et d'inactivation..... | 83 |

### **Liste des Tableaux**

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1 : Caractéristiques contractiles et histochimiques des différentes fibres musculaires<br>.....           | 19 |
| Tableau 2 : Composition du tyrode .....                                                                           | 75 |
| Tableau 3 : Composition des solutions utilisées pour la dissociation et le patch-clamp des<br>cardiomyocytes..... | 80 |
| Tableau 4 : Composition des tampons d'extraction des protéines cytosoliques et nucléaires. ....                   | 85 |
| Tableau 5 : composition du tampon d'extraction des protéines totales. ....                                        | 85 |
| Tableau 6 : Composition des gels d'électrophorèse.....                                                            | 86 |
| Tableau 7 : Composition des tampons du Western blot.....                                                          | 86 |
| Tableau 8 : Liste des anticorps et quantité de protéines utilisés pour le Western blot.....                       | 87 |
| Tableau 9 : Composition du tampon ECL.....                                                                        | 88 |

## Liste des communications

### **The Federation of European Physiological Societies (FEPS), Paris juin 2016 :**

- *Positive inotropic effect of IL-13 on heart is AMPc-PKA-dependent*, Baptiste Jude, Damien Grangier, Karelle Léon, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (poster)
- *Voltage gated sodium channel expression in heart during sepsis*, Baptiste Jude, Karelle Léon, Fabrice Rannou, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (poster)

### **EMC 2016 - 45th European Muscle Conference (MUSCLE), Montpellier Septembre 2016 :**

- *Dantrolene protects muscle against muscle proteolysis by chemotherapy (Taxotere)*, Baptiste Jude, Mickaël Droguet, Karelle Léon, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (poster)
- *Positive inotropic effect of IL-13 on heart is AMPc-PKA-dependent*, Baptiste Jude, Steven Vetel, Karelle Léon, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (poster)
- *Voltage gated sodium channels expression in muscles during sepsis*, Baptiste Jude, Karelle Léon, Fabrice Rannou, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (poster)
- *TNF- $\alpha$  has a negative inotropic effect by NADPH oxidase-PKC pathway activation*, Baptiste Jude, Damien Grangier, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (poster)

### **10<sup>th</sup> International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Wasting Disease (SCWD), Rome décembre 2017 :**

- *Dantrolene can protect muscle from toxicity induced by chemotherapy using docetaxel*, Jude B<sup>1</sup>, Castel T, Tissier F, Léon K, Droguet M, Giroux-Metges MA, Pennec JP (poster)

- *Inhibition of TGF- $\beta$  pathway protects diaphragm from both muscle atrophy and weakness during chronic sepsis*, Jude B, Tissier F, Droguet M, Léon K, Giroux-Metges MA, Pennec JP (poster)

### **Colloque annuelle Institut Bretois Santé Agro-Matière (IBSAM) :**

#### **Année 2016 :**

-*Positive inotropic effect of IL-13 on heart is Ac-PKA-dependent*, Baptiste Jude, Damien Grangier, Karelle Léon, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (poster)

#### **Année 2017 :**

-*Le Dantrolène permet de préserver la masse musculaire lors d'une chimiothérapie (docétaxel)*, Baptiste Jude, Mickael Droguet, Thomas Castel, Florine Tissier, Karelle Léon, Marie-Agnès Giroux-Metges, Jean-Pierre Pennec (**1<sup>er</sup> prix communication orale**).

# **Introduction**

## **I. Généralité sur la physiologie musculaire**

### **A. La physiologie du muscle strié**

Le muscle représente 40% de la masse corporelle chez un individu moyen, et représente également 40% des protéines totales de l'organisme. La principale caractéristique des muscles est de transformer de l'énergie chimique en énergie mécanique. Il existe trois types de muscles au sein de l'organisme : le muscle lisse, le muscle cardiaque et le muscle strié squelettique. Le muscle lisse va être responsable de la tonicité des vaisseaux sanguins, des bronches, du tube digestif... Le muscle cardiaque est un muscle strié particulier de par son organisation ultra-structurale, et constitue l'essentiel du myocarde. Enfin, le muscle strié squelettique, quant à lui, intervient dans diverses fonctions telles que le mouvement, qu'il soit volontaire ou réflexe, le maintien de l'équilibre et la locomotion. Le diaphragme, qui est le muscle respiratoire principal, fait aussi partie des muscles striés squelettiques.

#### **1. Le muscle strié squelettique**

##### ***a. Structure et fonction du muscle strié squelettique***

Les muscles striés squelettiques sont constitués de faisceaux, chacun comportant plusieurs fibres maintenues par du tissu conjonctif (Figure 1). Généralement, ces fibres sont parallèles les unes aux autres (muscle fusiforme). On peut également retrouver une structure penniforme où les fibres vont avoir un angle variable, ou encore une structure en couches dans le cas du diaphragme. Ces fibres sont des syncytiums résultant de la fusion de multiples cellules (myoblastes), et comportent plusieurs noyaux situés à la périphérie. Ces fibres ont un diamètre allant de 10 à 100µm et peuvent atteindre jusqu'à 30cm de longueur chez l'homme.

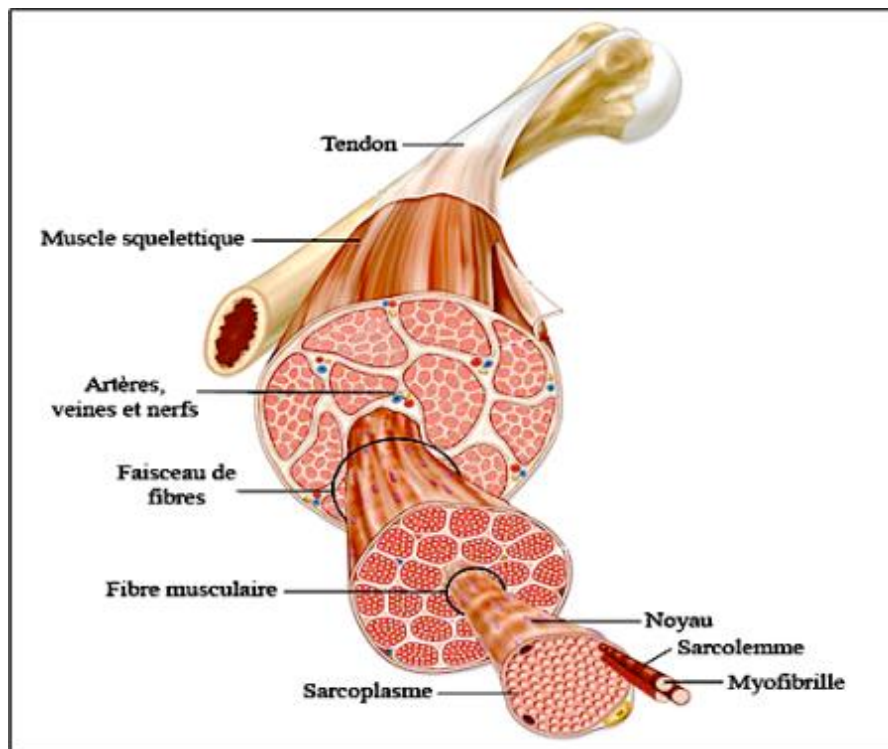


Figure 1 : Schéma de la structure d'un muscle strié squelettique.  
(Source : <http://svtmarcq.e-monsite.com/pages/cellule-musculaire-2.html>)

L'unité fonctionnelle est appelée unité motrice (UM). Elle est constituée d'un motoneurone et des fibres musculaires qu'il innerve (jusqu'à plusieurs centaines). En revanche, une fibre n'est innervée que par un seul motoneurone. Le recrutement de ces unités motrices s'effectue en fonction des besoins en force, et/ou en vitesse du mouvement), selon des programmes moteurs. Il existe 3 types d'unités motrices caractérisées par le nombre de fibres musculaires qui entrent dans leur composition (taille de l'UM) et de nombreuses caractéristiques de ces fibres, telles que le type de l'isoforme de myosine, le métabolisme et les paramètres cinétiques de leur contraction. Les fréquences d'activation physiologiques des UM les plus lentes sont faibles (10-30Hz) alors que pour les fibres rapides les fréquences sont de 80 à 100Hz. Cela est corrélé avec la fréquence de fusion des contractions aboutissant à la téτανisation : fréquence de téτανisation basse pour les UM lentes et élevée pour les UM rapides.

Il existe plusieurs types de fibres musculaires squelettiques qui vont avoir des caractéristiques propres : fibres de type I : lentes, et fibres de II : rapides. Ces fibres vont avoir des propriétés contractiles, métaboliques et histochimiques différentes. Les fibres de type II sont subdivisées en IIA, IIX et IIB (Tableau 1). De plus, il y a une corrélation avec la concentration intracellulaire en calcium ( $0,10-0,3\mu\text{M}$  pour les fibres lentes et  $1-2\mu\text{M}$  pour les

fibres rapides) ce qui permet l'activation de voies de signalisation et facteurs de transcriptions impliqués dans le typage et le métabolisme des fibres musculaires comme CaMKII (Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendantes 2), la calcineurine, NFAT (nuclear factor of activated T cells) et PGC-1 $\alpha$  (PPAR gamma coactivator 1- $\alpha$ ) [1]

Tableau 1 : Caractéristiques contractiles et histochimiques des différentes fibres musculaires

|                                | Type I | Type IIa | Type IIx | Type IIb |
|--------------------------------|--------|----------|----------|----------|
| <b>Propriétés contractiles</b> |        |          |          |          |
| Vitesse de raccourcissement    | +      | ++       | +++      | ++++     |
| Force tétanique                | +      | +        | ++       | ++       |
| Endurance                      | ++++   | +++      | ++       | +        |
| <b>Histochimie</b>             |        |          |          |          |
| Densité mitochondriale         | +++    | +++      | ++       | +        |
| Dimension réticulum            | +      | ++       | +++      | ++++     |
| Vascularisation                | ++++   | +++      | ++       | +        |
| Consommation ATP               | +      | ++       | +++      | ++++     |
| Enzymes oxydatives             | +++    | +++      | ++       | +        |
| Enzymes glycolytiques          | +      | ++       | +++      | ++++     |
| Glycogène                      | +      | ++       | ++       | +++      |
| Diamètre                       | +      | ++       | ++       | +++      |

Il est intéressant de noter que cette spécificité du type de fibre n'est pas définitive mais peut évoluer au cours du temps ou suite à certaines pathologies. Chaque fibre musculaire contient des myofibrilles entourées par le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries qui baignent dans le cytoplasme. L'aspect strié des fibres provient de l'alternance régulière des myofilaments épais de myosine et fins d'actine formant les sarcomères (Figure 2).

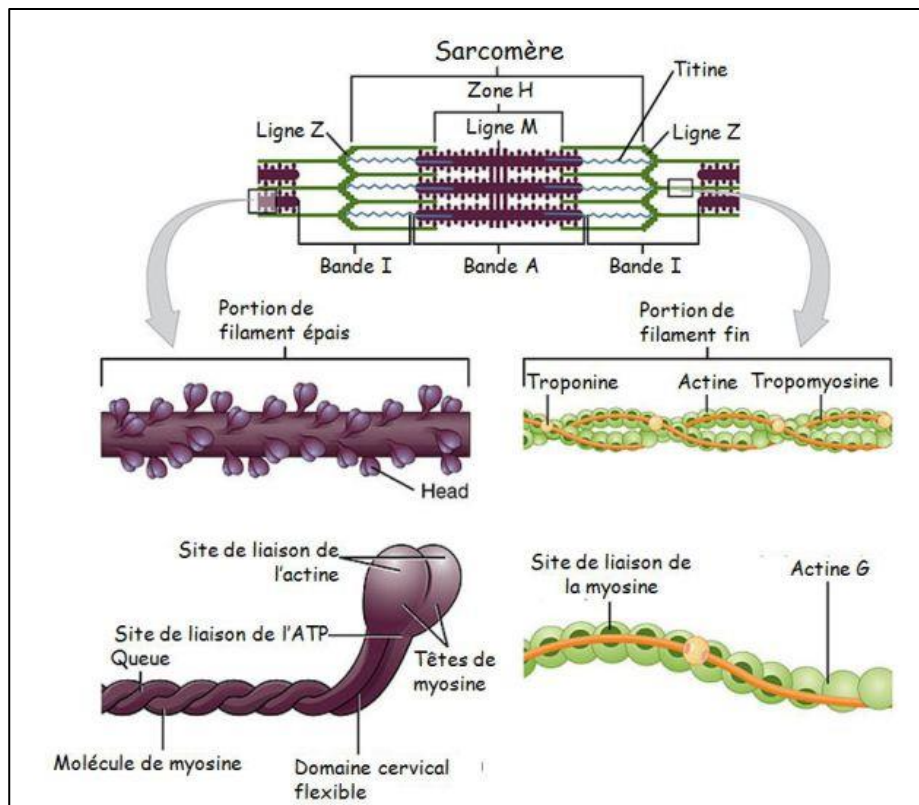


Figure 2 : Schéma du sarcomère.

(Source : <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/2d.html>)

C'est la succession des sarcomères, constitués principalement par les protéines d'actine et de myosine, qui va former les myofibrilles et donner son aspect strié à la fibre. Les sarcomères sont délimités par des disques Z qui correspondent aux points d'ancrage des filaments d'actine. Les filaments d'actine et de myosine constituent la bande A (sombre) et la bande I (claire). La bande A, partie centrale, correspond à la longueur des bâtonnets de myosine, et la bande I aux filaments d'actine. Les filaments épais (bâtonnets) de myosine sont formés d'environ 300 molécules de myosine, elles-mêmes composées de deux molécules de chaîne lourde de myosine (MHC pour Myosine Heavy Chain). La chaîne lourde de myosine est composée de 2 parties. Il y a une partie filamentaire, la light meromyosin (LMM) qui constitue la structure du bâtonnet, et une partie filamentaire associée à une partie globulaire, la heavy meromyosin (HMM) qui comporte les sites de fixation de l'ATP (Adénosine triphosphate) (Figure 3). A cette HMM sont associées des chaînes légères (LC pour Light Chain) qui ont un rôle régulateur. La partie HMM et la partie LMM forment un angle qui peut varier selon que la partie globulaire a fixé un ATP ou non.

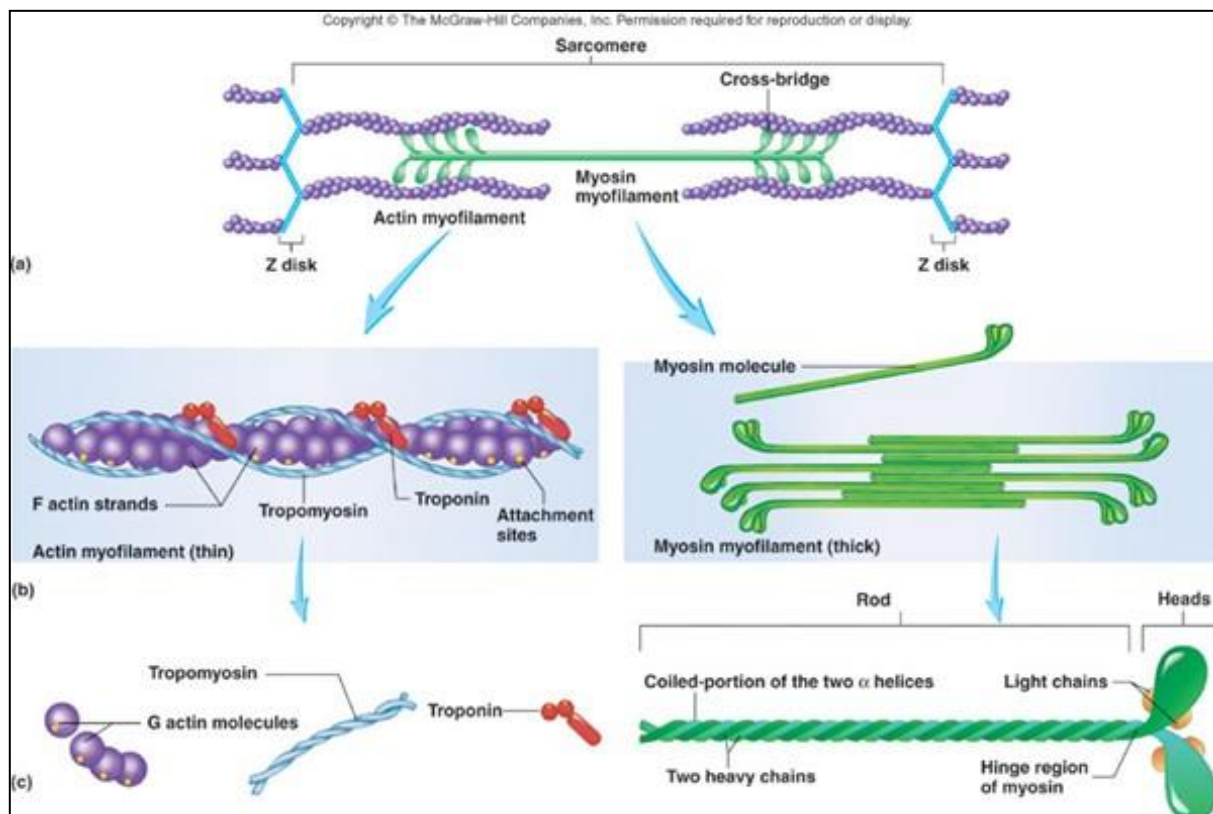


Figure 3 : Structure des filaments d'actine et de myosine  
(Source : <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/2d.html>)

Les filaments fins sont constitués principalement de molécules d'actine assemblés sous forme de chaînes en hélice. Chacune de ces molécules d'actine comporte un site actif capable de se fixer à une tête de myosine. Un complexe de troponine et de tropomyosine est également fixé à l'actine. La troponine est un complexe de 3 sous unités. La troponine T permet la liaison à la tropomyosine, la troponine C, la liaison avec le calcium et la troponine I est inhibitrice à la fois de la liaison actine/myosine et de l'activité ATPasique du complexe actine/myosine. Outre ces protéines responsables du mécanisme de la contraction et ces protéines régulatrices, les myofibrilles sont également composées de protéines structurales comme la titine, la nébuline, la desmine... Elles sont impliquées dans l'alignement, le maintien et l'élasticité de la myofibrille.

Les mécanismes de contraction et de relaxation musculaire sont liés aux mouvements de glissement entre les filaments d'actine et de myosine (Figure 4). Ces mouvements provoquent le raccourcissement de tous les sarcomères et donc de la fibre musculaire selon son axe longitudinal.

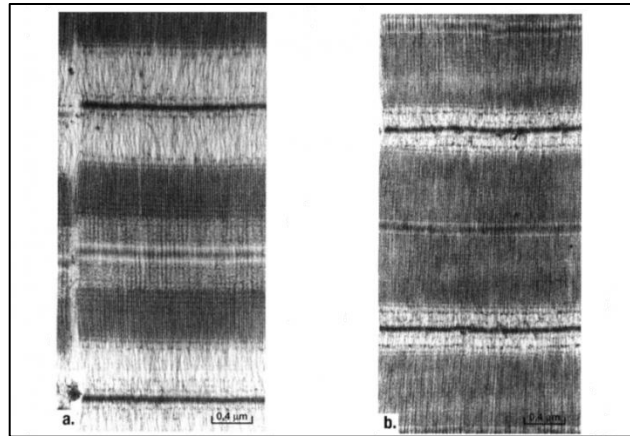


Figure 4 : Image de sarcomère au microscope électronique à transmission.  
Sarcomère au repos (a.) et pendant la contraction (b.). (Source : <http://svtmarcq.e-monsite.com/pages/cellule-musculaire-2.html>)

Ces différentes fibres musculaires vont donner des caractéristiques contractiles au muscle entier (Tableau 1). En effet, on va retrouver des phénotypes de contraction spécifiques : le soléaire principalement composé de fibres lentes de type I, l'EDL (*extensor digitorum longus*) surtout composé de fibres rapides de type IIb et le péronier qui est intermédiaire. Ces différences de profils de contraction sont observés lors de contraction *in vivo* ou *ex vivo* [2]. Comme on peut le voir sur la Figure 5, l'EDL a une force de contraction maximale qui avoisine les 300mN dans ce cas et à 150Hz de stimulation le plateau de force tétanique n'est pas encore atteint. Pour ce qui est du soléaire, la force maximale est inférieure, avec moins de 150mN, et la fréquence de stimulation nécessaire pour obtenir le téтанos est inférieure également.

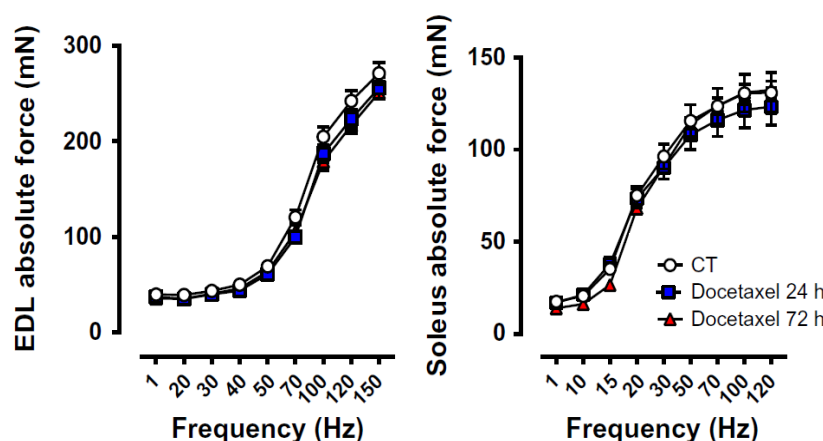


Figure 5 : Différence de profil de contraction force-fréquence entre un muscle rapide et un muscle lent.  
[2]

En plus des effets sur la force de contraction, ces phénotypes des fibres musculaires vont influencer l'endurance du muscle. Il est possible de calculer un index de fatigue ou indice de Burke, par le ratio entre la force maximale finale sur la force maximale initiale d'une série de tétanos. Comme on peut le voir sur la Figure 6, la force de contraction maximale de l'EDL décline plus rapidement que pour le soléaire, en fonction de la répétition des tétanos. Cette particularité est liée au métabolisme du muscle. Les fibres lentes ont un métabolisme préférentiellement aérobie, ce qui se justifie par leur nombre de mitochondries important et leur métabolisme oxydatif (Tableau 1). Les fibres rapides, quant à elles, ont un métabolisme glycolytique.

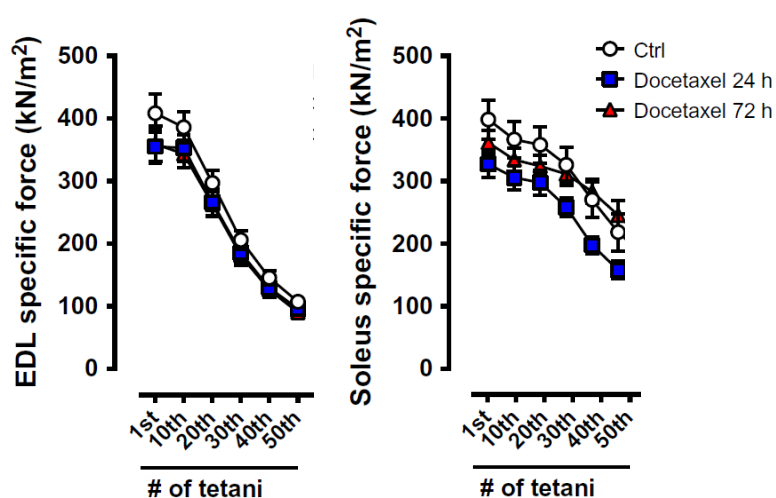


Figure 6 : Différence de profil de fatigue entre un muscle rapide et un muscle lent.  
[2]

### *b. Couplage excitation – contraction*

La contraction musculaire fait suite à une stimulation nerveuse. Le potentiel d'action arrive au niveau de la synapse qui constitue la jonction neuromusculaire, et qui est composée de trois parties (Figure 7) :

- La partie présynaptique, constituée par la terminaison de l'axone du motoneurone, et qui contient des vésicules d'acétylcholine.

- La partie postsynaptique qui est constitué dans ce cas par la plaque motrice. Elle est formée d'invaginations (cryptes) de la membrane cytoplasmique (sarcolemme) de la fibre musculaire. Des récepteurs à l'acétylcholine sont localisés au niveau du sommet des cryptes, et les canaux sodiques voltages dépendants ( $Na_v$ ) se trouvent à la base.

-La fente synaptique comprise entre ces deux parties, est infranchissable par le signal électrique mais permet le passage des neurotransmetteurs.

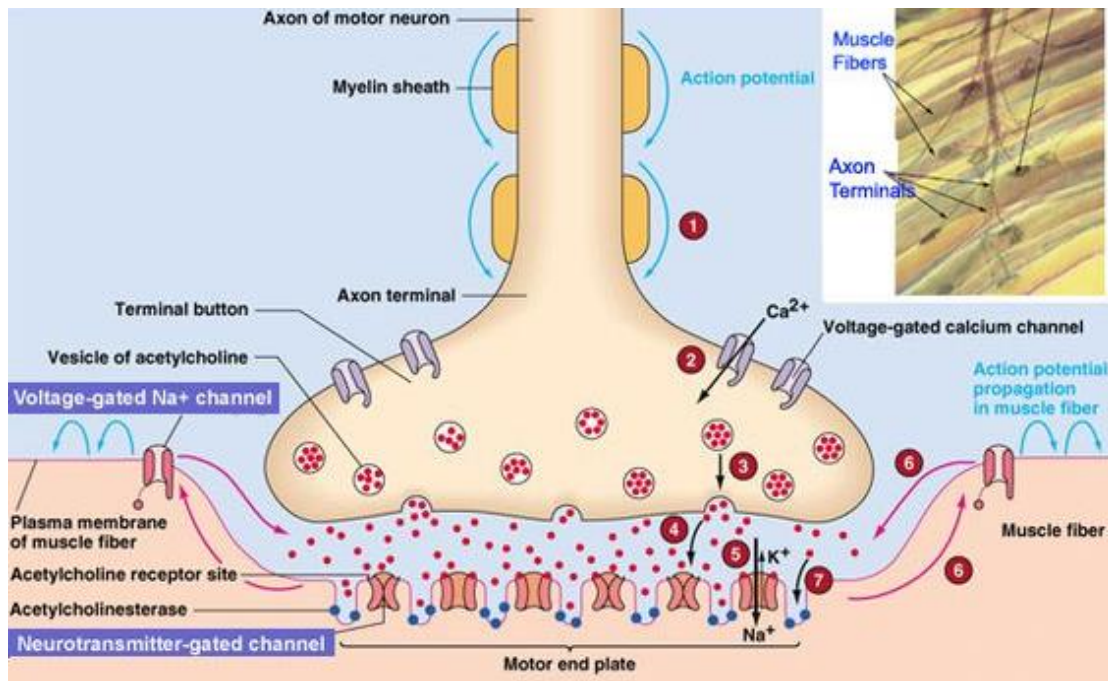


Figure 7 : Schéma de la jonction neuromusculaire  
(Source : <https://www.slideshare.net/danielveladuartemd/neuromuscular-junction>)

L'arrivée du potentiel d'action nerveux au niveau du bouton terminal du motoneurone induit l'ouverture des canaux calciques potentiel dépendants ce qui va conduire à l'exocytose des vésicules d'acétylcholine dans l'espace inter-synaptique. Cette acétylcholine ainsi libérée se fixe sur son récepteur (RACH), à raison de 2 molécules d'acétylcholine pour l'activation d'un récepteur, cela entraîne une dépolarisation localisée de la membrane (potentiel post-synaptique excitateur). L'activation de plusieurs de ces récepteurs permet une dépolarisation membranaire supérieure au seuil nécessaire pour activer les  $Na_v$  de la plaque motrice. Cette activation entraîne une entrée d'ions sodium dans la fibre, augmentant la dépolarisation et permettant une activation de proche en proche des  $Na_v$  situés le long du sarcolemme. Cela permet la propagation du potentiel d'action musculaire et la dépolarisation de l'ensemble de la fibre (Figure 8). L'acétylcholine est ensuite dégradée par l'acétylcholine estérase.

L'excitabilité de la fibre musculaire correspond à sa capacité de se dépolariser à la suite d'une stimulation nerveuse. Elle implique les canaux-récepteurs à l'acétylcholine (RACH) et les canaux potentiel-dépendants principalement les canaux sodiques ( $Na_v$ ) et aussi les canaux potassiques ( $K_v$ ). Ces canaux potentiel-dépendants sont les principaux impliqués dans les

potentiels d'action musculaires. Le potentiel d'action une fois déclenché, va ainsi se propager de proche en proche grâce à la dépolarisation créée par le flux entrant de sodium dû à l'activation des  $\text{Na}_v$ . Ce potentiel va arriver ensuite au niveau des tubules T et va activer des canaux calciques de type L ou récepteurs dihydropyridine (DHPR), localisés au voisinage des citernes terminales du réticulum sarcoplasmique, au niveau de structures particulières : les triades. Dans la membrane de ces citernes du réticulum se trouvent d'autres canaux calciques, les récepteurs à la ryanodine (RyR).

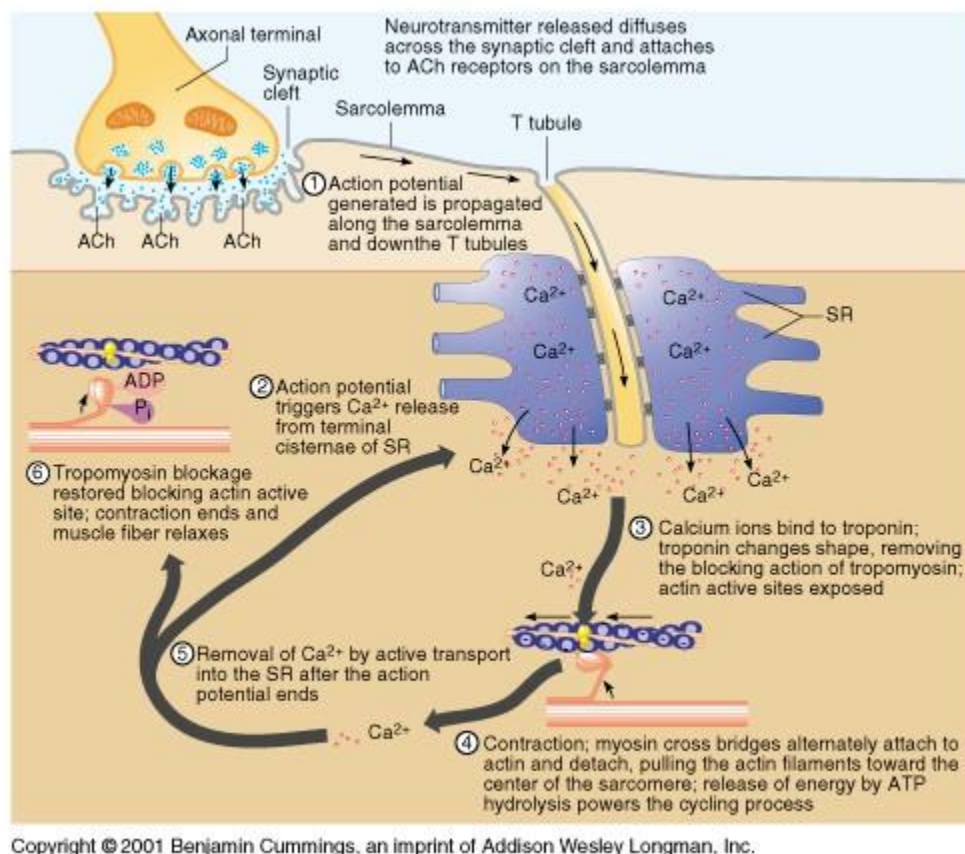


Figure 8 : Schéma de l'excitabilité membranaire et de la contraction musculaire.  
(Source : <http://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/2d.html>)

Au niveau du muscle strié squelettique on va trouver majoritairement l'isoforme RyR1 et au niveau du cœur plutôt l'isoforme RyR2. La dernière isoforme est le RyR3 qui est principalement retrouvée au niveau du cerveau. Ces RyR vont être activés par un couplage direct avec les canaux DHPR grâce à une partie appelée « foot protein » qui assure le lien entre les deux types de canaux. Les DHPR et les RyR sont donc couplés physiquement et c'est la dépolarisation des DHPR qui va entraîner l'activation des RyR, c'est le DICR (depolarization-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release). Le calcium qui est stocké dans le réticulum

sarcoplasmique avec une concentration de 1mM (alors qu'elle n'est que de 100nM dans le sarcoplasme) est lié de façon réversible à la calséquestrine. Cette organisation permet le stockage local et important du calcium dans ce compartiment cellulaire. L'ouverture des RyR permet la libération massive de calcium dans le sarcoplasme à proximité des myofibrilles ce qui va activer la contraction de ces dernières.

Le calcium va se fixer sur les molécules de troponine C (Figure 9). Cela induit un changement de sa conformation et fait basculer le complexe troponine/tropomyosine, libérant ainsi les sites actifs de l'actine qui vont être accessibles aux têtes de myosine. Cela va entraîner le départ d'un phosphate inorganique ( $P_i$ ) puis de l'ADP, liés à la myosine ce qui permet la stabilisation de la liaison actine-myosine et la diminution de l'angle entre la tête et la queue de myosine de  $90^\circ$  à  $45^\circ$ , entraînant le mouvement de glissement des bâtonnets de myosine entre les filaments d'actine. Ensuite, il y a liaison d'une molécule d'ATP sur une tête de myosine ce qui entraîne la dissociation du complexe actine-myosine. L'hydrolyse de cet ATP en ADP +  $P_i$  permet le retour de l'angle formé entre HMM et LMM à  $90^\circ$ . La rupture de la liaison actine-myosine permet la relaxation de la fibre.

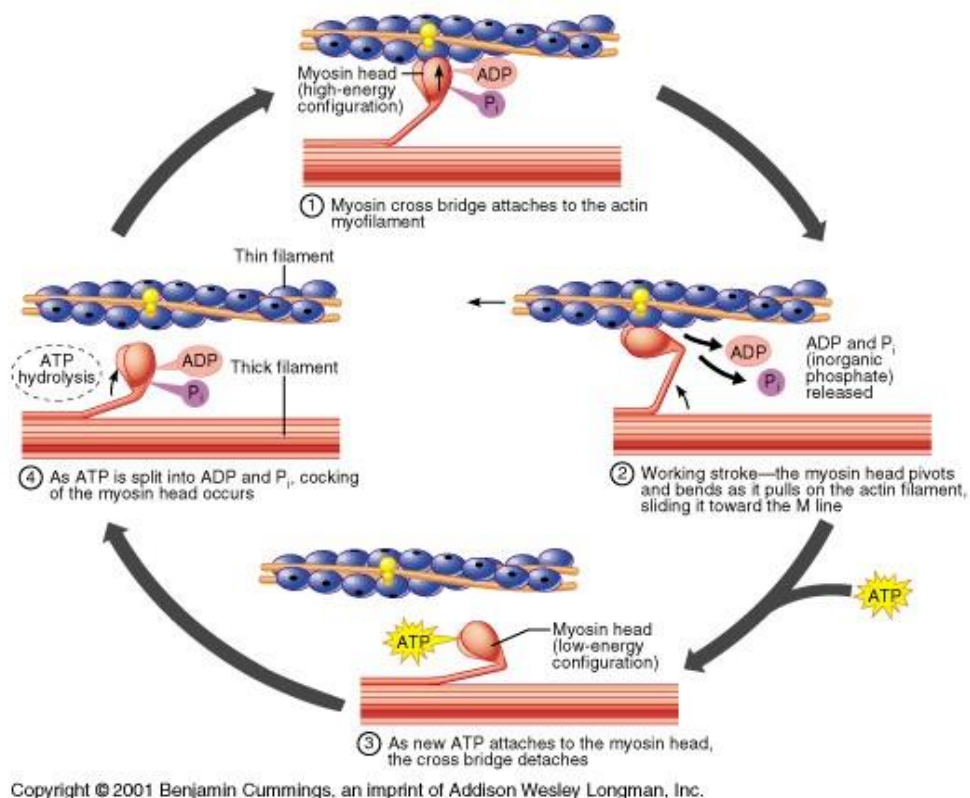


Figure 9 : Cycle de contraction des sarcomères  
(Source : <http://slideplayer.com/slide/4206928/>)

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ne dure que quelques millisecondes et la diminution de concentration entraîne la relaxation musculaire. Ce dernier va être repompé dans le réticulum via l'action des SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase), qui sont des pompes ATP dépendantes et vont permettre de faire passer le calcium contre son gradient de concentration vers la lumière du réticulum. Le calcium va également être expulsé vers le milieu extracellulaire via l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  et la pompe calcium ATP dépendante du sarcolemme (PMCA). Une autre partie pourra être captée par la mitochondrie. Ces derniers mécanismes jouent surtout sur la régulation à long terme du calcium intracellulaire et pas sur la relaxation proprement dite.

## 2. Spécificités du muscle strié cardiaque

Le cœur est un muscle strié de par sa structure. Néanmoins, il va présenter certaines différences structurales et fonctionnelles comparé au muscle strié squelettique. Le muscle cardiaque est composé de cardiomyocytes, qui sont des fibres musculaires ramifiées, et contenant 1 ou 2 noyaux. Ces cardiomyocytes vont être connectés les uns aux autres par des disques intercalaires (Figure 10). Ces disques sont présentent des desmosomes, assurant la cohésion entre les cellules, et des jonctions serrées (*gap junction*), qui sont des canaux permettant des échanges d'ions entre les cellules et le passage de la dépolarisation.

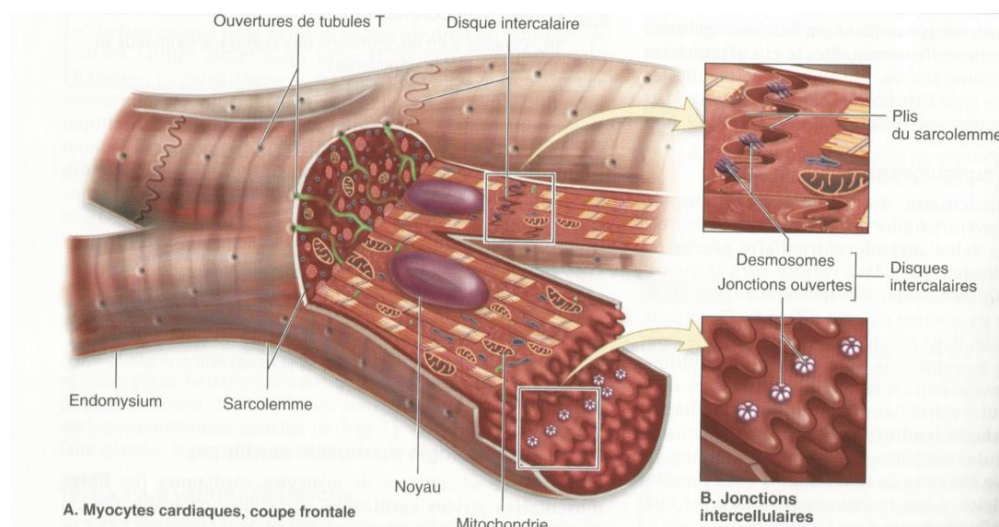


Figure 10 : Structure des cardiomyocytes.  
[3]

Contrairement au muscle strié squelettique, les fibres musculaires du cœur ne sont pas organisées en unités motrices. L'origine du potentiel d'action vient du nœud sinusal, situé

dans l'oreillette droite, qui impose le rythme cardiaque sous l'influence des canaux  $I_f$  et des canaux calciques de type T [4]. Ce potentiel d'action va ensuite passer par le nœud auriculo-ventriculaire, le faisceau de His et le réseau de Purkinje pour se propager dans tout le cœur (Figure 11). Il est important de noter que ce tissu conducteur cardiaque est constitué aussi de cellules musculaires, mais spécialisées dans la conduction du potentiel d'action. Les  $Na_v$ , eux, ne sont pas impliqués dans la rythmicité cardiaque au niveau des nœuds, mais sont présent dans le faisceau de His et le réseau de Purkinje. Ils participent, à ce niveau, à l'efficacité de la conduction du potentiel d'action dans le cœur en modulant son intensité (effet bathmotrope) et sa vitesse (effet dromotrope).

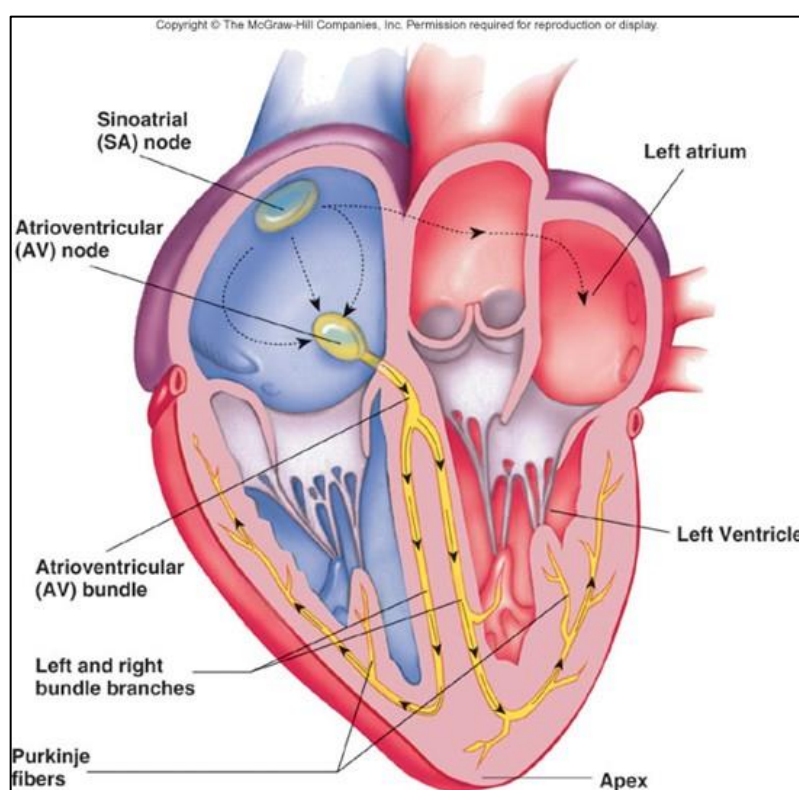


Figure 11 : Schéma de la conduction intracardiaque du potentiel d'action.  
[3]

Le potentiel d'action qui se propage dans le cœur arrive au niveau des cardiomyocytes, va activer les  $Na_v$ , et va entraîner la propagation du potentiel de membrane via les jonctions serrées, d'un cardiomyocyte à l'autre. Au niveau des tubules T, le potentiel d'action va activer les canaux calciques DHPR. Néanmoins, dans le cœur il n'y a pas de couplage direct entre les DHPR et les RYR. C'est le calcium qui entre par les canaux DHPR qui active les RYR : c'est le mécanisme « calcium-induced calcium release » ou CICR. Le mécanisme de la contraction et les acteurs impliqués sont ensuite les mêmes que dans le cas du muscle squelettique.

### 3. L'excitabilité membranaire

L'excitabilité membranaire est indispensable au mécanisme du couplage excitation contraction. C'est elle qui est responsable du potentiel d'action, qui correspond à un changement transitoire de potentiel de membrane et caractérisé par différentes phases : la dépolarisation, la repolarisation. Le courant sodique est responsable de la première phase du potentiel d'action, alors que c'est un courant sortant de potassium qui est responsable de la repolarisation. Bien que l'excitabilité membranaire soit moins étudiée comparée à la contraction qui fait intervenir les flux de calcium, elle est pourtant indispensable pour le fonctionnement de cette dernière. En effet, l'utilisation de tétrodotoxine (TTX), toxine issue du poisson le Tétrodon ou Fugu, entraîne une paralysie des muscles squelettiques en bloquant de manière spécifique l'activation des  $Na_v$  et donc l'excitabilité membranaire. [5].

La famille des  $Na_v$  comprend 9 isoformes. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires faisant partie de la famille des canaux ioniques dépendants du potentiel. Leur structure primaire, d'une masse de 280kDa, est constituée d'environ 2000 acides aminés. Leur structure secondaire, quant à elle, se compose d'une sous unité  $\alpha$  contenant quatre domaines (I à IV) contenant chacun six segments transmembranaires (Figure 12). C'est la sous unité alpha qui représente la partie active et fonctionnelle du canal.

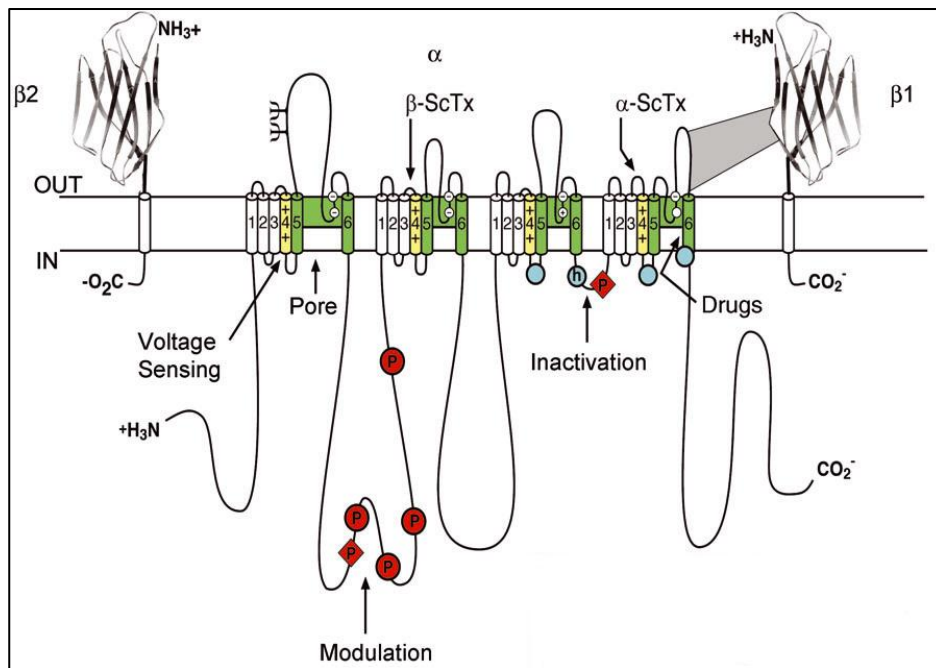


Figure 12 : Structure des canaux sodiques dépendant du potentiel  
Représentation de la sous unité  $\alpha$  et de sous unités  $\beta$  régulatrices, avec certains des sites de phosphorylation de la sous unité  $\alpha$  [6].

Associée à la sous unité  $\alpha$ , il y a les sous unités  $\beta$  régulatrices, qui sont au nombre de 4 ( $\beta 1$  à  $\beta 4$ ). Ces sous unités  $\beta$  jouent un rôle de régulation en modulant les cinétiques d'ouverture et de fermeture du canal. De plus, elle jouent également un rôle dans la localisation et la densité des  $\text{Na}_v$  en jouant sur l'insertion des sous unités  $\alpha$  [7]. Les quatre isoformes sont exprimées au niveau des cellules musculaires cardiaques et squelettiques [8]. Les sous unités  $\beta 1$  et  $\beta 3$  sont liées à la sous unité  $\alpha$  par une liaison non covalente, alors que les sous unités  $\beta 2$  et  $\beta 4$  sont liées par des ponts disulfure.

Il existe 9 isoformes de  $\text{Na}_v$  allant de  $\text{Na}_v 1.1$  à  $\text{Na}_v 1.9$ . L'isoforme  $\text{Na}_v 1.5$  va être l'isoforme majoritaire retrouvée au niveau du cœur alors que pour le muscle strié squelettique c'est l'isoforme  $\text{Na}_v 1.4$ . Les  $\text{Na}_v$  ont des propriétés spécifiques :

- Ils sont dépendants du potentiel de membrane, c'est-à-dire que la dépolarisation de la membrane détermine leur niveau d'activation.

- Ils sont perméables aux ions  $\text{Na}^+$  de façon sélective. L'ouverture de ces canaux correspond à une entrée de sodium dans la fibre, en fonction du gradient électrochimique et se traduit par un courant électrique entrant, dépolarisant et transitoire

-Ils sont activés très rapidement (quelques millisecondes).

-Ils s'inactivent rapidement et spontanément après leur ouverture (3 à 10 millisecondes).

Le canal peut se présenter sous trois configurations : fermé-activable, ouvert et inactivé (fermé) (Figure 13). Le segment S4 est qualifié de « *voltage-sensor* » du canal. L'activation du canal est déclenchée par des modifications de charges électriques au niveau de cette région, ce qui entraîne un changement de conformation de la protéine  $\alpha$  du canal permettant le passage du  $\text{Na}^+$  vers l'intérieur de la cellule selon le gradient électrochimique. Dans le modèle d'Hodgkin et Huxley [9], l'activation du canal correspond à l'ouverture de la porte d'activation (porte m). Cette entrée soudaine de  $\text{Na}^+$  entraîne la dépolarisation de la membrane et par conséquent le potentiel d'action. Vient ensuite l'étape de l'inactivation du canal, correspondant à la fermeture de la porte h dans le modèle d'Hodgkin et Huxley, entraînant la diminution de la conductance sodique. Parallèlement, les canaux potassiques s'ouvrent, permettant une sortie de  $\text{K}^+$  vers le milieu extérieur créant un courant repolarisant. Le potentiel revient alors au niveau du potentiel de repos. Il y a alors fermeture du canal potassique. La pompe Na/K ATPase favorise le retour au potentiel de repos et le maintien à long terme des concentrations intracellulaires en Na et K.

Les  $\text{Na}_v$  jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la propagation du potentiel d'action le long des membranes des cellules excitables. En effet, ils sont activés lors de la phase de dépolarisation du potentiel d'action et permettent la propagation du PA de proche en proche. L'intensité de la dépolarisation conditionne aussi l'activation des DHPR, qui sont aussi dépendant du potentiel, et donc tout le mécanisme du couplage excitation-contraction. Toute inhibition partielle des  $\text{Na}_v$  va engendrer une diminution de l'entrée de sodium dans les cellules et donc une diminution de la vitesse et de l'amplitude de la phase de dépolarisation, et par conséquent une diminution du potentiel d'action. Cela se traduira obligatoirement au niveau des propriétés contractiles du muscle.

Ces canaux sont soumis à un certain nombre de régulations, à différents niveaux, que ce soit transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel. Parmi les régulations post-traductionnelles, il y a des glycosylations et des méthylations, ou encore des phosphorylations. Un certain nombre de sites de phosphorylation sont connus sur les  $\text{Na}_v1.4$  et  $\text{Na}_v1.5$ , avec de manière générale une augmentation du courant sodique après phosphorylation par les PKA (Protéine kinase A) et plutôt une diminution de ce courant lorsque c'est une phosphorylation via les PKC (protéine kinase C) [10].

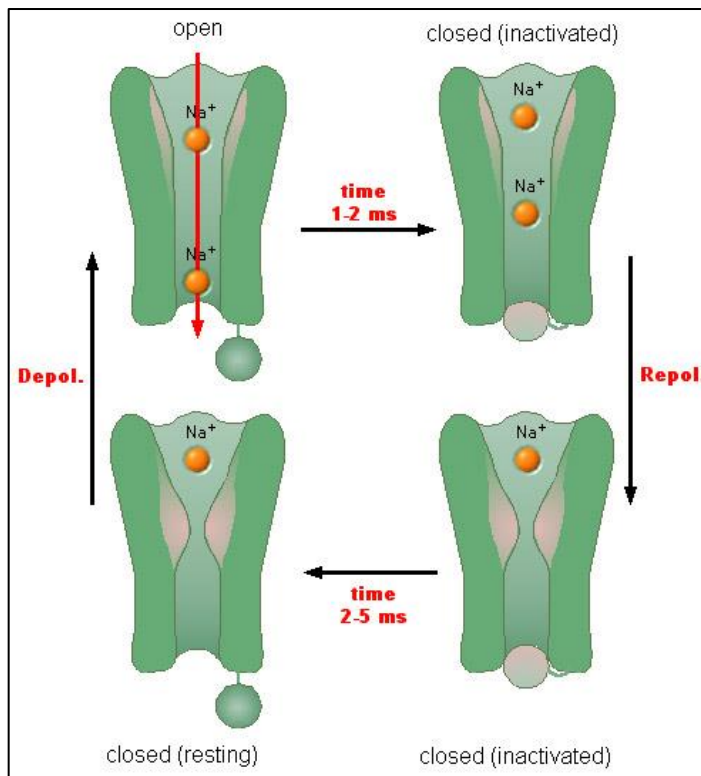


Figure 13 : Cycle d'activation et d'inactivation du canal sodique voltage dépendant. D'après Bourdin [11].

## B. Le métabolisme protéique

### 1. La synthèse protéique

#### a. Généralités

La synthèse protéique consiste en l'assemblage d'acides aminés en chaîne de polypeptides, suivant les informations fournies par l'ARNm (Acide ribonucléique messager). Elle a lieu dans le cytoplasme et nécessite des ribosomes, les ARNm et ARNt (Acide ribonucléique de transfert), des acides aminés et des facteurs de traduction. Elle comporte trois étapes : l'initiation, l'élongation et la traduction.

L'initiation de la traduction correspond à l'assemblage des sous unités 40S et 60S du ribosome au niveau du codon d'initiation de l'ARNm (AUG), ainsi que la fixation de l'ARNt chargé d'une méthionine (1<sup>er</sup> acide aminé de toutes les protéines). Cette étape est sous le contrôle d'un certain nombre de facteurs de traduction. Parmi eux, on va retrouver le facteur eIF (eukaryotic initiation factor) 2 qui est impliqué dans la fixation de l'ARNt initiateur, chargé en méthionine, à la sous unité 40S du ribosome, ce qui forme le complexe de pré-

initiation 43S. Une autre protéine importante, impliquée dans le mécanisme de traduction, est la protéine 4E-BP1 (4E-binding protein 1), qui est l'inhibiteur de la forme active de eIF-4F. 4E-BP1 agit en se fixant au facteur eIF-4G et empêche par conséquent eIF-4E de s'y fixer. Cela empêche la formation du complexe actif eIF-4F, capable de reconnaître et d'associer l'ARNm au complexe de pré-initiation 43S. 4E-BP1 va être inactivée par phosphorylation et constitue un point essentiel de régulation de l'initiation de l'élongation (Figure 14).

La seconde étape est l'élongation. Elle correspond à la synthèse de la chaîne peptidique par ajout de manière cyclique d'un acide aminé correspondant au codon. La dernière étape est la terminaison et correspond à la libération de la chaîne polypeptidique dans le cytoplasme, où elle sera prise en charge par le réticulum sarcoplasmique pour y subir des modifications post-traductionnelles et des maturations diverses.

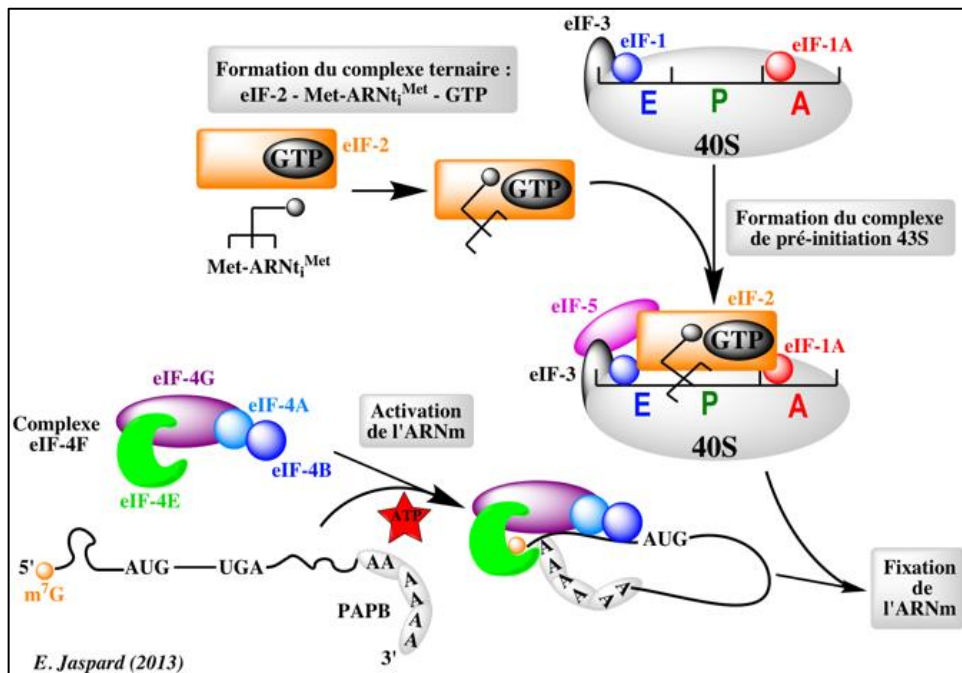


Figure 14 : Schéma de l'initiation de la synthèse protéique.

(Source : <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/7RelStructFonction/2Biochimie/1SyntheseProteines/1SyntheseProt.htm#Inittraduction>)

### *b. Voies de signalisation de la synthèse protéique*

Les acteurs de la synthèse protéique sont soumis à une régulation fine. L'un des acteurs majeurs de cette régulation est la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) qui peut être présente sous forme de complexe. Il existe au sein du muscle squelettique deux types de complexe avec mTORC1 et mTORC2, mais c'est surtout mTORC1 qui va réguler la synthèse

protéique dans les cellules musculaires squelettiques au cours du processus d'hypertrophie [12]. mTOR est impliquée dans l'activation de la protéosynthèse, en induisant la phosphorylation de 4E-BP et de S6K1 (*ribosomal protein S6 kinase* de 70 kDa) ce qui permet l'initiation de la traduction (Figure 15) [13,14]. La protéine S6K1 est impliquée dans l'activation du complexe eIF3, ainsi que de eIF4B, ce qui permet la formation du complexe de pré-initiation [15]. Selon une autre étude, S6K1 serait moins impliquée dans la protéosynthèse que 4E-BP1, mais par contre elle aurait un rôle important dans la biogenèse ribosomale, et serait indispensable à l'augmentation de la force musculaire après stimulation de mTOR. Son KO sur l'animal induit la formation d'agrégats de protéines [16].

La voie mTOR peut être activée par l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*), ce qui induit l'activation de la voie PI3K (*Phosphatidyl-inositol 3-kinase*)/Akt/mTOR. Akt, lorsqu'il est activé par phosphorylation, va activer mTORC1, soit directement par phosphorylation [17], soit indirectement en phosphorylant TSC (*Tuberous Sclerosis Complex 2*), ce qui provoque la dissociation du complexe TSC1-TSC2 et entraîne l'inhibition du facteur Rheb (*ras homology enriched brain*) permettant la levée d'inhibition de ce complexe sur mTOR [18,19]. Akt est également responsable de l'inhibition par phosphorylation de GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), ce qui entraîne la levée de l'inhibition de ce dernier sur le facteur d'initiation de la traduction eIF2B [20].

Par la même occasion, l'activation de la voie PI3K/Akt entraîne la phosphorylation de FOXO (*forkhead box O*) et son inhibition [21]. FOXO est un facteur de transcription qui, lorsqu'il est phosphorylé par Akt, est piégé dans le cytoplasme et voit son activité de régulation de la transcription inhibée en conséquence. Dans le muscle squelettique il a été montré que FOXO3 était impliquée dans l'activation de la protéolyse autophagique via le système UPS (*ubiquitine proteasome system*) via la transcription de MAFbx (*Muscle atrophy Fbox*). Cette protéolyse peut être inhibée par l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR via l'inhibition de FOXO3 [22,23].

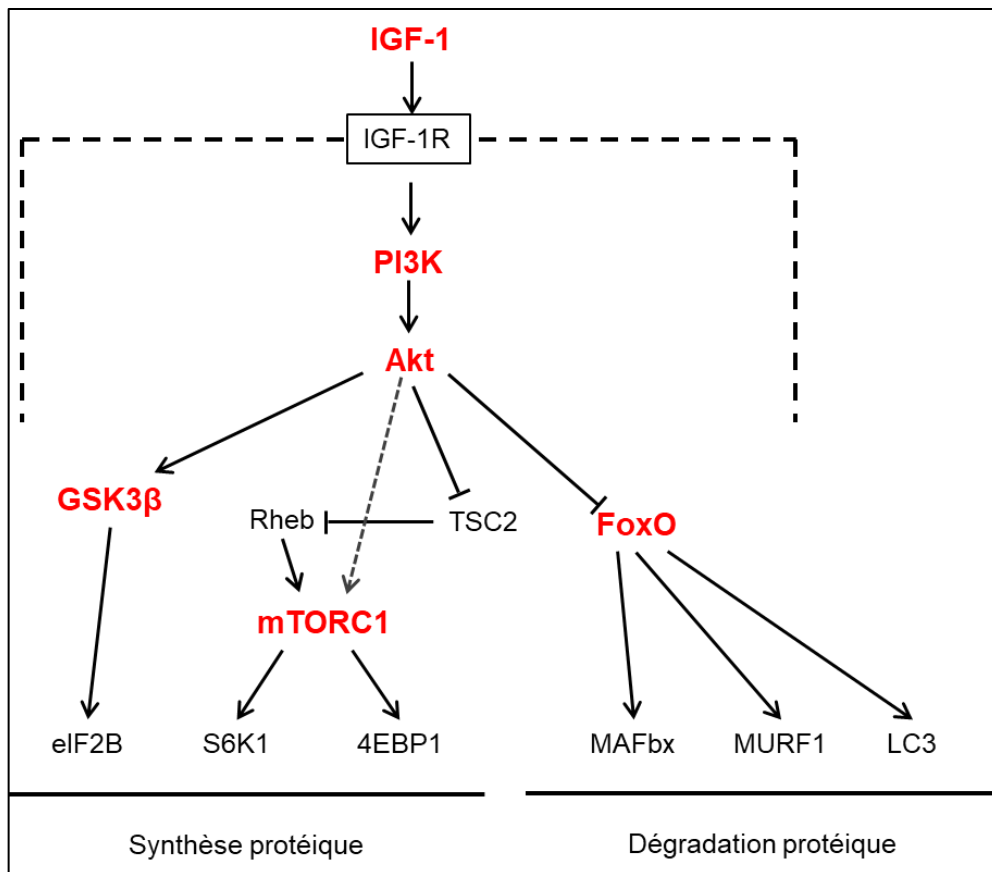


Figure 15 : Voie de signalisation d'IGF-1/PI3K/Akt.  
Modifié d'après [24]

## 2. La dégradation protéique

### a. La voie autophagie-lysosome

L'autophagie va jouer un rôle important dans la dégradation de certains composants cellulaires que ce soit en situation physiologique ou bien après stimulation par des stress cellulaires, des cytokines et des privations en acides aminés. Il existe deux types d'autophagie : la micro-autophagie, qui correspond à l'internalisation de protéines ou agrégats de protéines dans le lysosome pour activer leur dégradation, et la macro-autophagie avec la formation d'une vésicule dérivée du réticulum (autophagosome) qui va fusionner avec les lysosomes pour dégrader le contenu de l'autophagosome.

Les lysosomes ont un pH acide et vont contenir diverses hydrolases de type protéases, lipases, glycosidases, DNases et RNases. Les protéases lysosomales sont appelées cathepsines et au niveau du muscle squelettique on va retrouver principalement les isoformes B, D, H et L [25]. Ces protéases sont surtout impliquées dans la dégradation des protéines

membranaires ou extracellulaires et de façon minoritaire dans la dégradation des protéines myofibrillaires. Les autophagosomes sont des organites formés à partir d'un enroulement de la membrane du réticulum endoplasmique. Des protéines comme Beclin1, sont impliquées dans la régulation de l'autophagie, ou encore comme LC3 qui régule la formation de l'autophagosome (Figure 16).

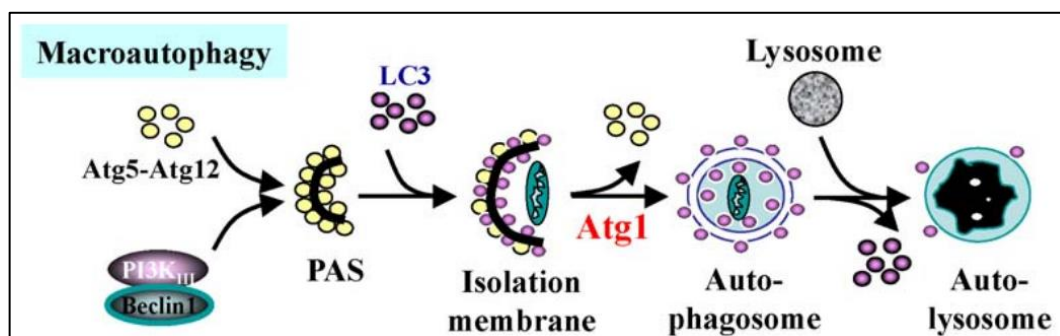


Figure 16 : Schéma de la formation des autophagosomes lors de l'autophagie. [25]

### *b. La voie des calpaïnes calcium dépendantes*

Les calpaïnes sont des cystéines protéases non lysosomales activées par le calcium. Il existe 14 isoformes connues chez les mammifères et, au niveau du muscle squelettique, se trouvent les isoformes 1 et 2, respectivement la  $\mu$ -calpaïne et m-calpaïne qui diffèrent par leur degré de sensibilité au calcium. En effet, les calpaïnes sont inactives en l'absence de stimuli cataboliques, mais en présence de calcium, qui est le principal activateur de ces enzymes, elles vont changer de conformation ce qui entraîne leur activation. L'isoforme  $\mu$ -calpaïne va être sensible à des concentrations calciques de l'ordre du  $\mu$ M, alors que pour la m-calpaïne, c'est de l'ordre du mM. On retrouve également l'isoforme calpaïne 3 exprimée au niveau du muscle squelettique. L'inhibiteur endogène des calpaïnes est la calpastatine.

Les calpaïnes participent, comme l'autophagie, de façon minime à la protéolyse musculaire. Néanmoins, elles ont pour cibles des protéines myofibrillaires tel que la titine, l'actine, la desmine, la tropomyosine et la troponine. En effet, du fait de leur poids moléculaire 10 fois plus faible que le protéasome, elles sont capables de se loger au sein des sarcomères et permettent ainsi le clivage de ces protéines qui, après ubiquitylation, seront prises en charge par le protéasome pour leur dégradation. Cela va entraîner une déstructuration des sarcomères par voie de conséquence (Figure 17) [26–28].

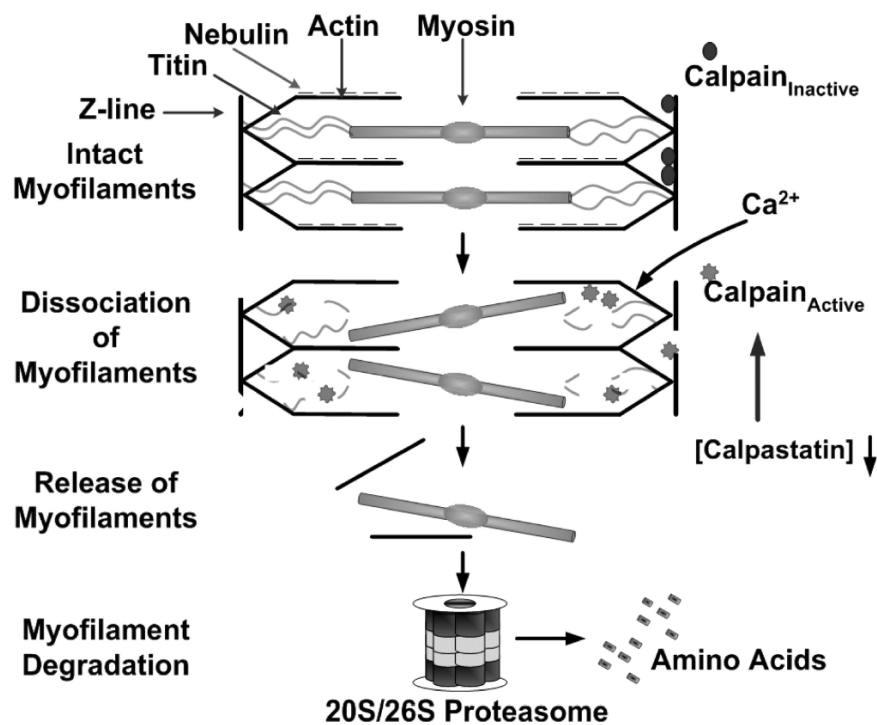


Figure 17 : Activation des calpaïnes au niveau des sarcomères.  
[28]

### *c. La voie ubiquitine-protéasome dépendante*

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est décrit comme un des systèmes majeurs de la protéolyse musculaire, notamment lors de pathologies chroniques impliquant une perte de poids >10% [29]. Il est impliqué dans la dégradation des protéines contractiles telles que l'actine et la myosine [27], et compterait pour environ 80% de la protéolyse totale musculaire [30]. Ce système protéolytique se passe en deux étapes avec l'ubiquitinylation des protéines cibles et la dégradation par le protéasome 26S des protéines marquées. Ces deux étapes sont ATP dépendantes (Figure 18).

L'étape d'ubiquitinylation consiste en la fixation covalente de plusieurs molécules d'ubiquitine sur des résidus lysine de la protéine cible à dégrader. Cela fait intervenir trois séries d'enzymes. Tout d'abord, il y a l'enzyme d'activation (E1) qui active l'ubiquitine de manière ATP dépendante et qui se fixe à elle. Ensuite, il y a l'enzyme de conjugaison (E2) sur laquelle est transférée l'ubiquitine activée associée à E1, ce qui peut, lors d'ajouts successifs d'ubiquitine, former une chaîne de poly-ubiquitine lors de la phase d'élongation. Enfin, l'ubiquitine ligase (E3) permet de transférer la chaîne de poly-ubiquitine de E2 sur la protéine

cible. Une fois la protéine marquée, elle sera prise en charge par le protéasome pour sa dégradation. Le protéasome 26S correspond au complexe actif et il est constitué du protéasome 20S (cœur catalytique) associé à un complexe régulateur 19S qui lui contrôle l'entrée des substrats aux deux extrémités. Le complexe 20S est le siège de l'activité protéolytique à proprement parler. C'est une structure cylindrique composée de quatre anneaux de sept sous-unités, avec deux anneaux de sous-unités  $\beta$  à l'intérieur et deux anneaux de sous-unités  $\alpha$  à l'extérieur. Ce sont les sous-unités  $\beta$  qui possèdent les activités enzymatiques telles que l'activité chymotrypsine-like, trypsine-like ou caspase-like. Le complexe 19S est fixé au protéasome. Il permet la reconnaissance des protéines marquées de chaînes de poly-ubiquitine, le dépliement de ces protéines et leur insertion dans le cœur catalytique tout en libérant l'ubiquitine qui sera recyclée. Cette protéolyse génère des petits peptides qui seront dégradés par des peptidases.

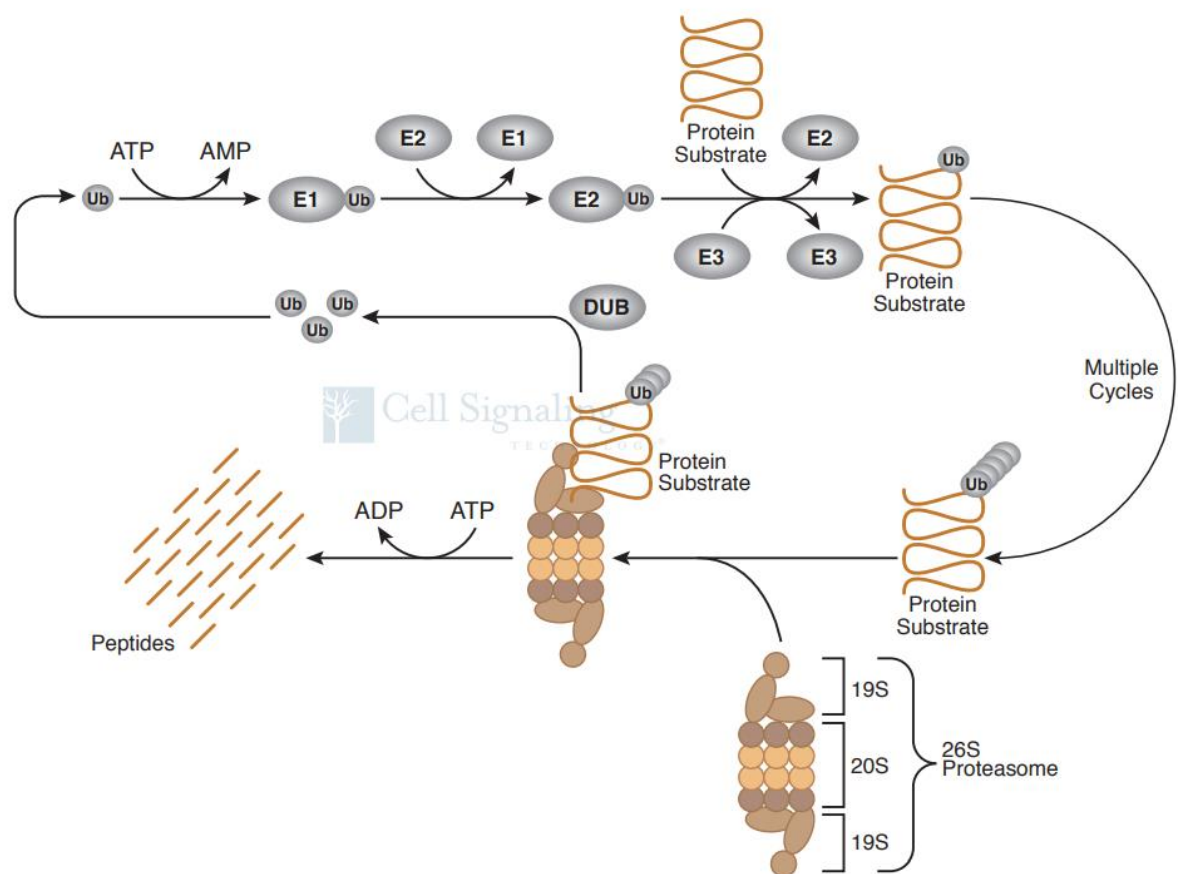


Figure 18 : Schéma du système Ubiquitine-Protéasome.  
(Source : <https://www.cellsignal.com>)

Parmi les acteurs déterminants dans le système UPS au niveau du muscle strié squelettique il y a deux isoformes d'E3 ligases, MAFbx et MuRF1 (*muscle ring finger 1*). Ces

deux isoformes jouent un rôle prépondérant, car elles sont impliquées dans la reconnaissance des protéines cibles à poly-ubiquitiner. Ces deux E3 ligases sont utilisées comme marqueurs de l'atrophie musculaire de par leur action positive sur la protéolyse [31]. Néanmoins, certaines études rapportent que MuRF1 serait plus impliquée dans la reconnaissance des protéines myofibrillaires tel que la myosine [32], alors que MAFbx aurait comme cible des facteurs tels que MyoD (*myogenic differentiation 1*) et eIF3-F qui sont tous deux impliqués dans la protéosynthèse [33]. C'est pourquoi l'effet des E3 ligases sur la masse musculaire passe par une activation de la protéolyse musculaire mais également par une diminution de la protéosynthèse.

### **C. Médiateurs impliqués dans l'atrophie musculaire**

Du fait de ses propriétés contractiles, le muscle intervient dans de nombreuses fonctions physiologiques. Ces propriétés vont être dépendantes à la fois de régulations physiologiques mais aussi de l'équilibre métabolique. Néanmoins, ces mêmes régulations et équilibre peuvent être altérés et conduire à des dysfonctions. Des altérations musculaires observées dans certaines pathologies vont conduire à une altération de l'efficacité contractile en agissant sur le couplage excitation-contraction. Elles peuvent être en relation, sur le plan métabolique, avec un déséquilibre de la balance anabolisme/catabolisme et cela en faveur du catabolisme. Cela va se traduire de façon générale par une faiblesse musculaire. Cela est observé dans un certain nombre de pathologies telles que la cachexie cancéreuse, le SIDA, la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO), la sclérose en plaques, l'insuffisance cardiaque chronique, le sepsis... [26,34,35]. Dans le cadre du présent travail, uniquement deux de ces pathologies seront approfondies, à savoir : la perte de masse et de fonction musculaires dues au sepsis ou à la cachexie cancéreuse. Ces deux pathologies distinctes impliquent une faiblesse musculaire. En effet, une modification de la masse musculaire est observée en liaison avec un catabolisme exacerbé, des modifications de la contraction allant dans le sens d'une diminution de la force de contraction et d'une altération de l'excitabilité membranaire. L'ensemble de ces phénomènes participe à la faiblesse musculaire.

Ces modifications musculaires peuvent se faire suite à une action directe, comme dans le cas de la reconnaissance des parois bactériennes par le muscle via les TLR4 (*toll like receptor 4*), une diminution de l'activité physique pour cause d'alitement, une diminution des apports alimentaires... Un certain nombre de médiateurs sont également capables de moduler directement le capital musculaire et les capacités contractiles. Parmi les médiateurs communs

à ces deux pathologies les cytokines sont les acteurs majeurs de la réponse inflammatoire. Ces cytokines, qui sont retrouvées dans la circulation sanguine lors du sepsis, sont produites par les cellules immunitaires mais également par les fibres musculaires à la suite d'une stimulation bactérienne. Elles sont aussi retrouvées lors de la cachexie cancéreuse où elles peuvent être produites directement par les cellules cancéreuses. D'autres médiateurs tel que les glucocorticoïdes, les TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*  $\beta$ ) qui sont connus pour voir une implication forte dans l'atrophie musculaire sont aussi libérés dans le cas de ces pathologies.

## 1. Le TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*  $\alpha$ ) est une glycoprotéine de 185 acides aminés qui fait partie de la famille des cytokines, et plus précisément des cytokines pro-inflammatoires. Il va être sécrété par les cellules immunitaires après stimulation par de l'endotoxine [36]. Le TNF- $\alpha$  circulant, vient principalement des monocytes et des macrophages [37]. Au niveau tissulaire il y a également des productions locales comme c'est le cas pour le cœur qui est considéré comme son producteur majeur de TNF- $\alpha$  [38].

Cette cytokine va agir au niveau tissulaire via la fixation à son récepteur qui est exprimé de manière ubiquitaire. Il y a deux types de récepteurs membranaires : TNFR1 et TNFR2, et un récepteur soluble qui va être libéré dans la circulation et servir de leurre afin de réduire l'action du TNF- $\alpha$  (TNFsR). L'activation du récepteur TNFR1 entraîne l'activation de voies de signalisation qui vont conduire à une perte de masse musculaire, alors que TNFR2 a plutôt un effet protecteur (Figure 19). Lorsque TNFR1 est activé, il y a activation de TRADD (*tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain*) qui à son tour active d'une part, par l'intermédiaire de FADD (*fas-associated protein with death domain*), la caspase 8 qui est impliquée dans l'apoptose, mais également la RIP-1 (*receptor-interacting protein 1*) qui est impliquée dans l'activation d'IKK (*I $\kappa$ B kinase*). Cette dernière est la kinase responsable de la phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibiteur de kappa B  $\alpha$ ) qui est l'inhibiteur endogène de NF $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*). NF $\kappa$ B est alors libéré et peut migrer dans le noyau pour activer la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation et la protéolyse [39,40]. Il y a également l'activation d'un autre membre de la famille des TRAF par le TNF- $\alpha$ , comme TRAF6 qui est une E3 ligase et qui est impliquée dans l'activation de la protéolyse par le système UPS et l'autophagie [41]. L'expression de TRAF6 est augmentée dans le muscle après dénervation ou inoculation de cellules cancéreuses LLC (*Lewis lung carcinoma*) chez la souris. Son inhibition musculo-spécifique est associée à une diminution de l'expression de MuRF1 [42].

NFκB conduit également à l'inhibition de MyoD qui est un facteur de transcription clé, impliqué dans la différenciation des cellules musculaires striées [43].

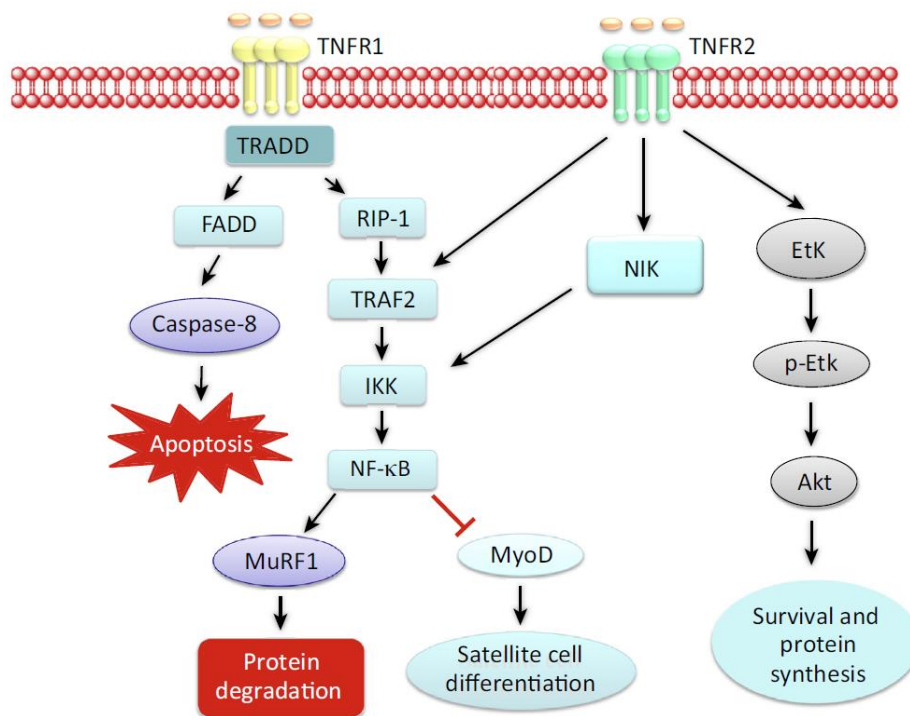


Figure 19 : Voies de signalisation du TNF-α.  
[40]

Le TNF-α entrainerait aussi l'activation de la production de DAG (diacylglycerol) et AA (acide arachidonique), respectivement par les phospholipases C et la phospholipase A2. DAG et AA sont des seconds messagers activateurs des PKC [44], et ces PKC sont capables de participer à l'activation et à la translocation de NFκB [45].

## 2. L'IL-1

La super famille des interleukines (IL)-1 comprend 11 membres, parmi lesquelles l'IL-1α et l'IL-1β qui sont les plus documentées et qui possèdent des effets pro-inflammatoires importants. Elles sont tous les deux codées par des gènes différents, mais vont se fixer sur le même récepteur (IL-1R1), et vont avoir des effets biologiques similaires [46]. Une des différences entre ces deux isoformes vient du fait que l'IL-1α va être présente de manière constitutive dans les cellules épithéliales (le foie, l'intestin, le rein...) et va être libérée suite à de stress cellulaires. A l'inverse, l'IL-1β va être produite par les cellules immunitaires en réponse à l'activation des TLR, par des cytokines comme le TNF-α et l'IL-1 elle-même [47]. Les cellules musculaires sont également capable de produire de l'IL-1β [48].

Au niveau musculaire, l'IL-1 va être impliquée dans la perte de masse associée à une diminution de la protéosynthèse. En effet, la perfusion par voie intraveineuse d'IL-1 $\alpha$  durant 6 jours va induire une diminution de la masse du gastrocnémien associée à une diminution de la quantité de protéines par mg de tissu [49]. Les auteurs montrent également une diminution du taux de synthèse protéique dans le gastrocnémien, mais également dans le soléaire. L'IL-1 induit aussi, sur un modèle utilisant les myotubes C2C12, une diminution de l'actine. Cela est associé à une augmentation de la transcription de MAFbx et MuRF1, de l'activation de p38 et de NF $\kappa$ B.

### 3. L'IL-6

L'IL-6 est une cytokine qui est caractérisée par des effets pro- et anti-inflammatoires. Elle est sécrétée par divers types cellulaires, comme les lymphocytes T, les macrophages et les cellules musculaires squelettiques [50]. Elle va être libérée dans la circulation sanguine et agir au niveau tissulaire via la fixation à son récepteur, qui est formé de l'IL-6R $\alpha$  (ou gp80) qui va reconnaître l'IL-6, entraînant le recrutement et l'homo-dimérisation avec gp130. Cela va permettre la transduction du signal via les activités tyrosine kinases de son domaine intracellulaire et activer les facteurs de transcription JAK/STAT (*janus kinase / signal transducers and activators of transcription*) [51].

Sur des études *in vitro*, l'IL-6 n'a pas montré d'effet sur la protéosynthèse, mesuré par l'incorporation de phénylalanine C<sup>14</sup> dans le soléaire et l'EDL [52]. De plus, les auteurs montrent une augmentation du catabolisme dans ces mêmes muscles incubés avec du plasma de rats septiques alors que l'incubation avec l'IL-6 seul n'a pas d'effet. Goodman et al. ont observé le même effet sur la protéolyse au niveau de muscle incubé *in vitro* avec l'IL-6 [53]. Néanmoins, ces derniers montrent que, lorsqu'ils injectent de l'IL-6 (en IP) à l'animal il y a une augmentation de la libération de tyrosine et de la 3 méthyl-histidine, ce qui reflète une augmentation du catabolisme musculaire. Des études sur des souris C57BL/6J sur-exprimant l'IL-6 montrent que, de manière chronique (12 semaines), l'IL-6 induit une diminution de la masse musculaire, associée à une augmentation de l'expression des ARNm et de l'activité des cathepsines B et L [54]. Les auteurs ont confirmé dans une autre étude que ce mécanisme est dépendant de la fixation de l'IL-6 sur son récepteur, avec pour conséquence l'inhibition de l'atrophie musculaire et l'augmentation de l'expression et de l'activité des cathepsines B et L avec un retour aux valeurs contrôles [55]. Dans un modèle de cachexie cancéreuse (souris Apc<sup>Min/+</sup> qui est un modèle de cancer colorectal spontané) entraînant une perte de masse du

gastrocnémien, l'inhibition de l'IL-6 a permis de ramener la masse du muscle à des valeurs contrôles, et cela associé à une diminution de l'activation par phosphorylation de STAT3 [56]. Même si l'implication de l'IL-6 dans l'atrophie musculaire apparaît évidente, les mécanismes d'action mis en jeu ne sont pas encore élucidés [57]. Dans une étude de 2013, les auteurs montrent que l'IL-6 induit une perte de masse du gastrocnémien, associée à l'inhibition des voies de la protéosynthèse, à la diminution de la phosphorylation de mTOR, 4E-BP1 et S6K1 et à une activation de STAT3, et cela de manière dose dépendante [58].

#### 4. La myostatine

La myostatine, connue aussi sous le nom de GDF-8, est une protéine de 376 acides aminés qui appartient à la super famille des TGF- $\beta$  identifiée en 1997 pour ses effets sur la masse musculaire [59]. En effet, les auteurs montrent que l'inhibition de la myostatine grâce à un modèle de KO conduit à une augmentation de la masse musculaire. Par ailleurs, ils montrent que l'expression de la myostatine est quasi exclusivement musculaire, avec des variations de taux d'expression en fonction du muscle.

La myostatine se fixe avec une forte affinité à son récepteur ActRIIB, qui est sous forme de dimère, ce qui entraîne la phosphorylation et l'activation du récepteur 1 TGF $\beta$ R1 (de type ALK4 et ALK5 pour *Activin-like kinase* 4 et 5) présent également sous forme de dimère (Figure 20) [60]. Du fait de l'activité kinase des récepteurs ALK4 et ALK5, SMAD2 et SMAD3 vont être phosphorylés et activés, ce qui entraîne leur dimérisation, leur association à SMAD4 et leur translocation au noyau afin d'agir en tant que facteur de transcription [60–62]. Ce complexe peut être néanmoins inhibé par SMAD7, ce qui se traduit par un effet bénéfique sur la masse musculaire [63]. Le complexe SMAD2/3/4 est capable de moduler la transcription de gènes, néanmoins à ce jour aucun mécanisme prouvant une action directe de ce complexe sur l'atrophie n'a été mis en évidence. En revanche, il est capable de diminuer l'expression des facteurs MyoD, Myf-5 (*myogenic factor* 5) ou encore de la myogénine qui sont impliqués dans l'activation des cellules satellites, leur prolifération en myoblastes et leur différenciation en myotubes [64]. En plus de cette action directe de la myostatine, dite canonique, il y a également des voies d'action non canoniques qui vont contribuer à la perte de masse musculaire. En effet, il y a d'une part une activation des MAPK, avec p39 et ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases* 1/2) qui sont impliqués dans l'inhibition de la myogénèse, mais également une inhibition de la voie PI3K/Akt /mTOR ce qui va contribuer à

l'inhibition de la protéosynthèse et, en même temps, une levée de l'inhibition de FOXO qui va activer la transcription des atrogènes comme MAFbx et MuRF1 [65].

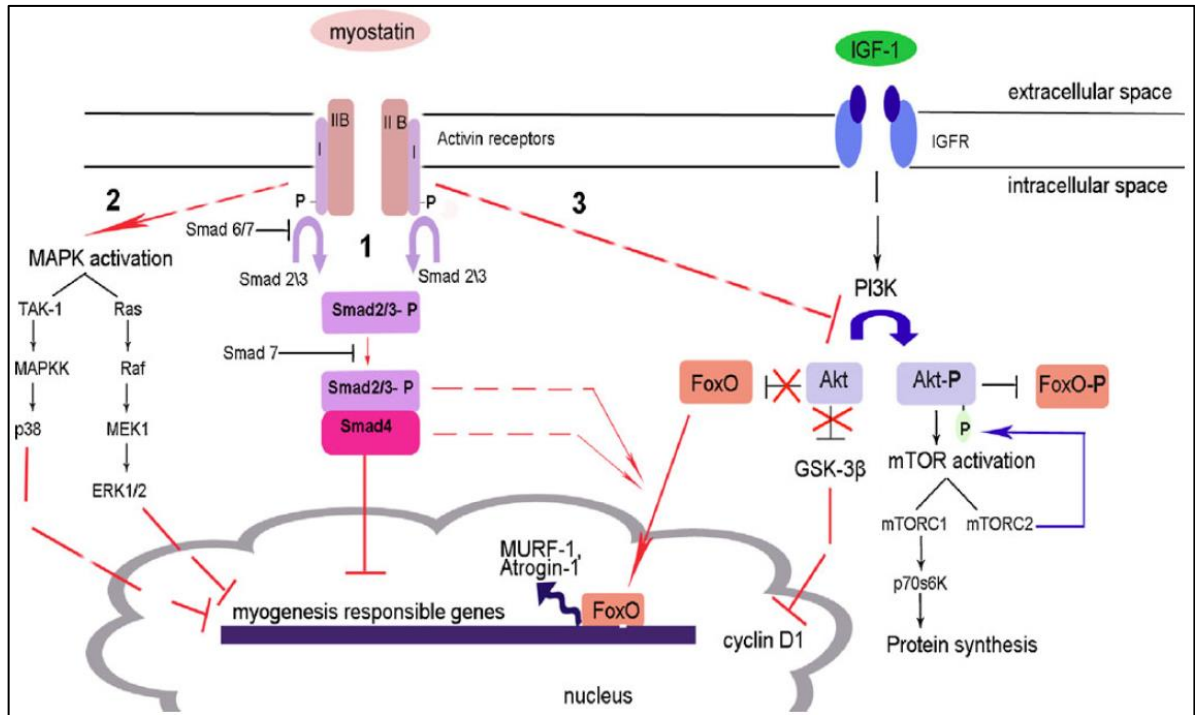


Figure 20 : Voies de signalisation de la myostatine dans le muscle strié squelettique. [65]

## **II. Le sepsis**

### **A. Physiopathologie**

La polyneuromyopathie acquise en réanimation (PNMAR) est une pathologie observée majoritairement en unité de soins intensifs. Initialement décrite en 1892 comme une rapide perte de masse musculaire chez les patients présentant un sepsis prolongé [66], elle a été caractérisée par Bolton en 1986, qui la différencie du syndrome de Guillain-Barré, et met en évidence une faiblesse musculaire des membres ainsi qu'une difficulté de sevrage ventilatoire [67]. La PNMAR se manifeste par une faiblesse musculaire, due à une atteinte musculaire et/ou nerveuse, en relation avec des modifications de l'excitabilité membranaire, un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme et une atteinte métabolique [68]. L'incidence de la PNMAR est variable. Elle peut aller de 20 à 50% selon les études, et peut augmenter en fonction de la gravité de l'état des patients à leur arrivée en soins intensifs [68]. Parmi les facteurs de risques conduisant à la PNMAR on va retrouver principalement le sepsis et la réaction inflammatoire associée, la ventilation mécanique et l'immobilisation, ainsi que la malnutrition, les stéroïdes et les agents neuromusculaires bloquants (même si ces derniers ne sont quasiment plus utilisés) [50].

Le sepsis est caractérisé par la présence d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS pour *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) associé à une infection [69]. Le SIRS est caractérisé par une anomalie d'au moins 2 des 4 critères suivants : la température, le rythme cardiaque et respiratoire et la numération sanguine [70] (Figure 21). Le sepsis peut également évoluer en sepsis sévère s'il y a dysfonction d'organe en plus, voire en choc septique avec dans ce cas un risque vital important[71].

|                                                |                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Systemic inflammatory response syndrome</b> | ≥ 2 of the following:                                                                                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Body temperature &gt;38,5°C or &lt; 35°C.</li> <li>• Heart rate &gt;90 beats per minute.</li> <li>• Respiratory rate &gt;20 breaths per minute or arterial CO<sub>2</sub> tension &lt;32 mm or need for mechanical ventilation.</li> <li>• White blood cell count &gt;12000/mm<sup>3</sup> or &lt;4000/mm<sup>3</sup> or immature forms &gt;10%.</li> </ul>                                                                                                                   |
| <b>Sepsis</b>                                  | Systemic inflammatory response syndrome + documented infection                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Severe sepsis</b>                           | Sepsis and at least one sign of organ hypoperfusion or organ dysfunction:                                                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Areas of mottled skin.</li> <li>• Capillary refilling time ≥ 3 s.</li> <li>• Urinary output &lt;0,5 mL/kg for at least 1 h or renal replacement therapy.</li> <li>• Lactate &gt;2 mmol/L.</li> <li>• Abrupt change in mental status or abnormal electroencephalogram.</li> <li>• Platelet counts &lt;100000/mL or disseminated intravascular coagulation.</li> <li>• Acute lung injury or acute respiratory distress syndrome.</li> <li>• SIMD (echocardiography).</li> </ul> |
| <b>Septic shock</b>                            | Severe sepsis and one of the following:                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Systemic mean blood pressure &lt;60 mmHg (&lt;80 mmHg if previous hypertension) after 20-30 mL/kg starch or 40-60 mL/kg serum saline, or pulmonary capillary wedge pressure between 12 and 20 mmHg.</li> <li>• Need for dopamine &gt;5 µg/kg per min or norepinephrine or epinephrine &lt;0,25 µg/kg per min to maintain mean blood pressure above 60 mmHg (80 mmHg if previous hypertension).</li> </ul>                                                                     |
| <b>Refractory septic shock</b>                 | Need for dopamine >15 µg/kg per min or norepinephrine >0,25 µg/kg per min to maintain mean blood pressure above 60 mmHg (80 mmHg if previous hypertension). |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

Figure 21 : Schéma des différents grades et des définitions du sepsis.  
[71]

Les modèles d'étude de cette pathologie peuvent être présentés en 3 grands groupes : la ventilation mécanique prolongée, l'immobilisation musculaire et le sepsis. Dans nos études nous avons choisi d'utiliser le sepsis.

L'induction du sepsis va être principalement réalisée par ligature et perforation caecale (CLP pour *Cecal Ligation and Puncture*), ou bien par injection de LPS (lipopolysaccharide) ou Zymozan®. Les modèles CLP et LPS sont couramment utilisés. Le LPS a l'avantage de pouvoir être reproductible du fait de son injection dosée et contrôlée, soit en IP (intra péritonéal), soit en IV (intraveineux), alors que le CLP nécessite une chirurgie et peut présenter une certaine variabilité de réponses inter individuelles. Néanmoins, le LPS engendre surtout une réaction inflammatoire plus précoce et plus importante, avec des taux de cytokines, comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6, supérieurs à ce qui est observé avec la CLP, ce qui peut présenter un biais et majorer la réaction inflammatoire du sepsis [72]. Nous avons utilisé le modèle de sepsis induit par CLP car il permet d'obtenir un sepsis chronique avec un départ péritonéal, ce qui est un modèle plus proche de ce qui est observé en clinique. Cependant, en unité de soins intensifs, le sepsis peut aussi avoir une origine pulmonaire, en particulier lié à la ventilation mécanique, mais cette initiation du sepsis est plus délicate à reproduire chez l'animal.

## B. Sepsis et muscle

### 1. Diminution de la masse musculaire

Concernant le muscle strié squelettique, le premier changement physiologique du muscle lors de la phase initiale du sepsis va être la réduction de sa force de contraction [73]. Néanmoins, très rapidement, apparaît une perte de masse musculaire qui résulte d'un déséquilibre entre synthèse et dégradation protéique en faveur de la protéolyse. Ainsi, il y a une diminution de la masse du *tibialis anterior* et du gastrocnémien de 15% au bout de 2 jours, alors que dans les groupes *pair-fed* (nourris de façon identique) il n'y a pas de diminution du poids de ces muscles [74]. Cette perte de masse se poursuit 6 et 11 jours après le sepsis. Le sepsis permet d'induire une diminution de 65% de la protéosynthèse musculaire dans le gastrocnémien, 24h après le CLP [75], tandis que dans une autre étude une diminution de 50% après un CLP de 16h est observée [76]. Cela est associé à une diminution de la formation du complexe eIF-4F, à la diminution de la phosphorylation de 4E-BP1 ou de la phosphorylation de mTOR, le tout conduisant à une diminution de l'activation de la protéosynthèse [75]. La phosphorylation de 4E-BP1 apparaît dans le muscle périphérique (*tibialis anterior*) et respiratoire (diaphragme) dès 24h, mais semble perdurer davantage dans le *tibialis anterior* [77]. Vary *et al.*, ont montré que dans un modèle de sepsis avec inoculation en intra péritonéal d'*Escherichia coli* et de *Bacteroides fragilis*, il y avait au niveau du gastrocnémien une augmentation de la phosphorylation d'eIF-2B d'environ deux fois à 3 jours post-infection et trois fois à 5 jours post-infection, ce qui limite par conséquent l'initiation de la traduction [78].

Concernant la dégradation des protéines musculaires, le sepsis est responsable d'une augmentation de la protéolyse des protéines totales de 25% et de la protéolyse des protéines myofibrillaires de 300% [76]. Il a été montré qu'il y a une augmentation de l'activité du protéasome chez les patients septiques, au niveau du muscle respiratoire (intercostal) et d'un muscle de la cuisse (*Vastus lateralis*) [79]. On note également une augmentation précoce de l'activité de la chymotrypsine dans le diaphragme (24h-48h) et plus tardive, mais très importante, dans le *tibialis anterior* (+250%) [77]. De la même manière, l'activité du protéasome est augmentée après CLP chez le rat [80,81]. Une augmentation de l'activité trypsine et chymotrypsine apparaît aussi après 6 jours d'injection de zymosan® dans le gastrocnémien latéral (muscle à prédominance de fibres rapides) mais pas dans le soléaire (muscle à prédominance de fibres lentes) [74]. Pour l'activité des calpaïnes, selon certaines

études, le sepsis peut induire une augmentation de l'activité totale des calpaïnes de +300% caractérisée par une augmentation de l'expression des calpaïnes 1 et 2 et une diminution de la calpastatine [82]. Supinski *et al.*, ont montré dans un modèle de CLP, qu'il y avait à 24h une augmentation de 500% de l'activité des calpaïnes dans le diaphragme [83]. Cependant, dans une autre étude, l'activité des calpaïnes n'est pas changée [76].

Par ailleurs, il y a également une augmentation de l'autophagie lors du sepsis par CLP, avec l'augmentation de l'expression (ARNm et protéique) de LC3B-II (microtubule-associated protein light chain 3 B-II) dans le diaphragme et surtout dans le *tibialis anterior*, avec un pic à 48h [77]. Il y a également, après une injection de LPS (24h), une augmentation de l'expression aux niveaux ARNm et protéique de LC3B-II dans le diaphragme, le soléaire et surtout le *tibialis anterior* [84].

## 2. Diminution de la force de contraction

De nombreuses études montrent une atteinte de la force de contraction musculaire lors du sepsis. En effet, il y a une diminution force de contraction d'une contraction isolée (*twitch*) de -60% et -70% de la force tétnique de l'EDL après un CLP de 16h chez le rat [85]. Les auteurs trouvent également une diminution de 35% de la force de la contraction isolée au niveau du soléaire mais pas de modification de force tétnique maximale. De plus, ils trouvent une augmentation des temps de contraction et de demi-relaxation pour l'EDL mais aucun effet sur le soléaire. D'autres études montrent aussi une diminution de la force de contraction du diaphragme avec une diminution de la force de contraction isolée de 70% environ, comme pour la force tétnique maximale [82]. Les auteurs montrent également une diminution des vitesses de contraction et de relaxation de plus de 70%. Il semblerait qu'il y ait une atteinte préférentielle des fibres rapides. En effet, il y a une diminution de la surface transversale (CSA pour *cross section area*) des fibres de type 2A et 2B de 34% dans le *tibialis anterior* après injection de zymosan®, alors que pour les fibres de type 1 la diminution n'est que de 21% [74]. De la même manière, dans le soléaire, il y a une diminution de la CSA de 22% et 28% pour respectivement les fibres de type 1 et 2A. Etant donné qu'il y a une corrélation positive entre la CSA des fibres musculaire et la force générée, cela pourrait expliquer en partie la perte de force musculaire [86]. Néanmoins, beaucoup d'études montrent une diminution de la force de contraction rapportée à la CSA, ce qui suggère que la diminution de la taille des myofibrilles n'est pas le seul mécanisme impliqué.

### 3. Altération du couplage excitation-contraction

Comme expliqué précédemment, l'excitabilité membranaire est un élément clé permettant la contraction musculaire. Lors du sepsis, il a été noté chez les patients une altération de la conduction nerveuse (neuropathie périphérique) ce qui se manifeste par une dégénérescence axonale et une dénervation [87]. On note également des anomalies du nerf phrénique chez les patients difficiles à sevrer de la ventilation mécanique [68]. Dans nos études nous nous intéressons particulièrement à l'excitabilité membranaire du muscle strié, ce qui fait intervenir les  $Na_v$ . Chez les patients atteints de PNMAR il y a une atteinte de l'excitabilité membranaire musculaire [68]. Cette atteinte est précoce et est liée à une dysfonction des  $Na_v$ . Il a été montré chez le rat que le sepsis induit une diminution de l'amplitude de potentiel d'action musculaire de manière précoce [88] et tardive [89,90]. Parmi les mécanismes responsables de la modification du courant sodique voltage dépendant il y aurait des modifications post-traductionnelles des canaux. En effet certaines kinases, via des sites de phosphorylation spécifiques des canaux, peuvent phosphoryler les  $Na_v$  avec des effets différents. Ainsi les PKA peuvent entraîner une augmentation du courant sodique, alors que les PKC entraînent une diminution du même courant [6]. Il a été montré aussi que le  $TNF-\alpha$  était capable d'induire une hypoexcitabilité des cellules musculaires de péronier et cela de manière PKC dépendante [91].

Après un CLP de 7 jours chez le rat nous avons montré une diminution de l'expression membranaire de  $Na_v1.4$  pour le soléaire, l'EDL et le péronier d'environ 25%, ce qui peut entre-autre expliquer la diminution de de courant sodique que l'on observe sur les fibres isolées au laboratoire [89,90]. Ces résultats ne sont pas inclus dans les publications soumises.

### 4. Dysfonction cardiaque

L'atteinte cardiaque durant le sepsis est reconnue comme une dysfonction d'organe. Le sepsis est caractérisé par une hypotension artérielle générale et persistante, conséquence d'une importante vasodilatation périphérique ce qui va entraîner une hypovolémie relative (Figure 21). Durant le sepsis par CLP sur l'animal, il a été montré qu'il y a une hypo-perfusion périphérique au niveau de l'EDL par exemple après 6h et ce, jusqu'à 48H au moins. Cela n'était pas dû à une compression causée localement par l'œdème musculaire [92]. En plus de cela, il y a un moindre transfert de l'oxygène au niveau musculaire ce qui augmente le

phénomène d'ischémie [93]. Un cercle vicieux peut s'amorcer du fait d'une hypoperfusion coronaire entraînant une souffrance cardiaque.

La défaillance cardiaque qui peut apparaître lors du choc septique est précoce, dès les premières 24h, mais elle est également réversible, avec un retour à la normale au bout de 5 à 7 jours chez les patients qui récupèrent [94,95]. Elle va se manifester par une réduction de la fraction d'éjection ventriculaire due à la fois à une augmentation du volume télé diastolique (fin de relaxation cardiaque) et télé systolique (fin de contraction) [96]. Cela traduit une dilatation bi-ventriculaire au cours du sepsis causé par une diminution de la contractilité cardiaque. Cette défaillance cardiaque septique est multifactorielle. Elle peut être causée par hypo-perfusion des coronaires. De plus, il y a une libération de substances cardio-dépressives telles que les endotoxines, les cytokines, le NO. Il y a aussi une dysrégulation de la voie  $\beta$ -adrénergique qui, en situation normale a un effet inotrope positif. En effet, le choc septique est associé à une sous-régulation de la réponse aux catécholamines. Cela peut être également causé par des endotoxines [97] et des cytokines [98] (Figure 22).

Dans la phase aiguë du sepsis, l'organisme met en place des mécanismes de compensation, mais ceux-ci sont dépassés rapidement, entraînant des dommages membranaires, une dérégulation des concentrations ioniques, une fuite d'enzymes lysosomales et une activation des protéases, ainsi qu'une diminution des réserves énergétiques et *in fine* la mort cellulaire [99]. La nécessité de prise en charge hémodynamique rapide des patients en état de sepsis sévère et choc septique est primordiale, afin de restaurer le plus rapidement possible une perfusion tissulaire optimale.

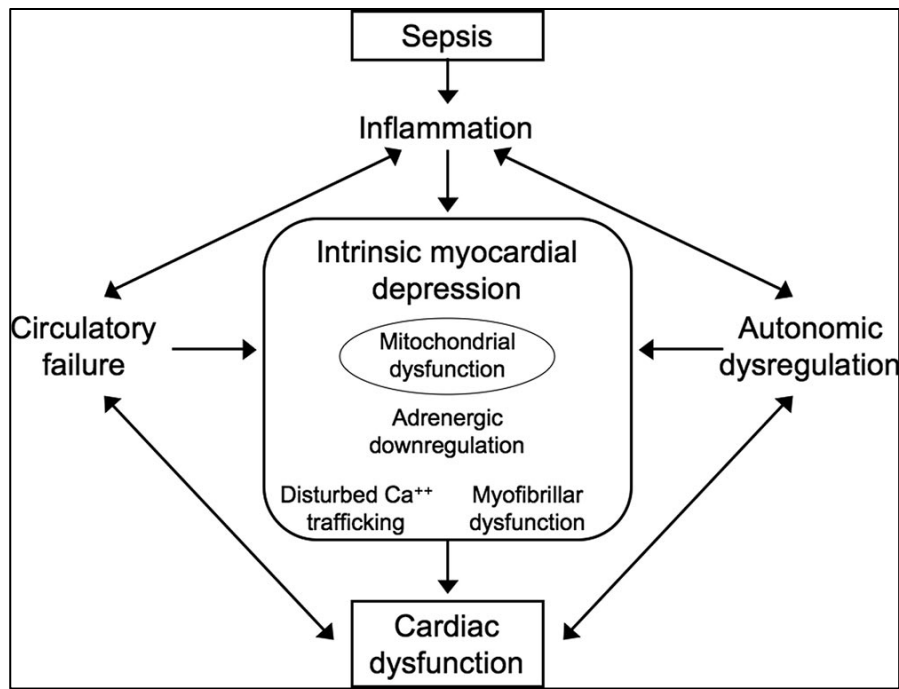


Figure 22 : Rôle du sepsis dans la dysfonction cardiaque.  
[95]

### C. Acteurs du dysfonctionnement musculaire

Parmi les médiateurs impliqués dans la dysfonction musculaire lors du sepsis, les cytokines ont une place prédominante [100]. Cette libération massive de cytokines est appelée le SIRS, et correspond à la réaction dite pro-inflammatoire. Il comporte des cytokines telles que le  $\text{TNF-}\alpha$  et l' $\text{IL-1}\beta$  qui sont libérés de manière précoce, puis l' $\text{IL-6}$  [70]. Parallèlement se met en place également une réaction anti-inflammatoire endogène appelée CARS (pour *Compensatory Anti-Inflammatory Response Syndrome*) qui va comprendre l' $\text{IL-10}$ , et le  $\text{TNFsR}$  ( $\text{TNF-}\alpha$  soluble receptor) qui agit comme un piège à  $\text{TNF-}\alpha$  circulant et réduit son activité.[101]. Historiquement, le SIRS est caractérisé par une apparition précoce, puis le CARS vient après, mais cette chronologie est remise en cause.

Les mécanismes d'action sont relativement bien documentés actuellement. Un de ces mécanismes passe par la modulation de la concentration intracellulaire en calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). Comme exposé précédemment, lors de la contraction musculaire, le calcium est libéré par les RyR, il permet la contraction et est recapté par le réticulum sarcoplasmique via les SERCA. La variation de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est hautement régulée. Néanmoins, il arrive que cette homéostasie soit dérégulée. En effet, lors du sepsis par CLP, il a été montré que très rapidement (16h) il y a dans les fibres musculaires une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  qui est environ doublée [76]. Ce calcium va devenir un élément important dans la signalisation cellulaire et va permettre

l'activation de voies comme celles impliquant les PKC, mais également de protéases comme les calpaïnes. Il a été montré que l'utilisation de dantrolène, un inhibiteur spécifique des RyR, permet de normaliser cette  $[Ca^{2+}]_i$ , et également de réduire l'activation des systèmes protéolytiques ainsi que la concentration plasmatique en TNF- $\alpha$  [76,81,102]. De plus, il a été montré également que le dantrolène pouvait réduire la faiblesse diaphragmatique lors du CLP, en association avec une diminution de l'activité protéolytique [82]. Ces propriétés anti-inflammatoire du dantrolène, et de protection du muscle contre le catabolisme, ont été utilisées lors de ce travail qui concerne l'étude avec le docétaxel, et qui fait l'objet d'une publication insérée dans ce manuscrit.

L'implication des TGF- $\beta$  dans l'atteinte musculaire lors du sepsis n'est à ce jour pas mise en évidence. En effet, les études de la myostatine, ou de l'activine A par exemple ont fait l'objet de nombreuses publications en relation avec d'autres pathologies relatives à une perte de masse musculaire telle que la cachexie cancéreuse, la sarcopénie, le SIDA ou la BPCO [103]. Cependant, les hypothèses vont dans le sens d'une implication de cette voie dans la perte de masse musculaire lors du sepsis. Il a été montré qu'il y a une augmentation du taux plasmatique des TGF- $\beta$  lors du sepsis chez les patients [104], mais également d'activine A [105]. L'activine A, au même titre que la myostatine, est capable d'induire le catabolisme musculaire en utilisant des voies de signalisation proches de celle de la myostatine [106]. De plus, différentes études ont montré les variations de myostatine lors du sepsis chez l'animal, par CLP ou par injection de zymosan®, ainsi que les taux d'ARNm, de protéines et des taux circulants de myostatine [107–109]. Les résultats sont assez divers quant aux cinétiques et aux différents taux, mais aucune de ces études n'a utilisé d'inhibiteur afin de vérifier l'implication de la myostatine ou un autre membre des TGF- $\beta$  sur le muscle lors du sepsis.

## **D. Prise en charge du sepsis**

A ce jour il n'y a pas de réel traitement curatif ou préventif de la PNMAR. Le sepsis étant un élément clé de la pathologie, la prise en charge de ce dernier peut avoir un intérêt majeur. Le « guide international de la prise en charge du sepsis et du choc septique » (édition 2016) recommande par exemple une caractérisation du sepsis avec une évaluation de sa source, afin d'émettre le meilleur diagnostic et d'appliquer l'antibiothérapie la mieux adaptée. De plus il faut mettre en œuvre une restauration hémodynamique avec administration de fluide pour palier à l'hypovolémie avec ou sans vasopresseurs, une utilisation modérée de

glucocorticoïdes, une dialyse s'il y a défaillance rénale, le contrôle de la glycémie et une prise en charge nutritionnelle des patients, que ce soit en nutrition entérale ou parentérale [110].

Du fait de l'importance de la réaction inflammatoire, de nombreux essais cliniques ont étudié la possibilité d'utiliser des inhibiteurs spécifiques. Cela a été fait avec des anti-TNF- $\alpha$  (anticorps (Ac) contre le TNF- $\alpha$  ou contre son récepteur), des anti IL-1, des anti PAF (pour platelet-activating factor), des anti LPS, ou l'utilisation de pentoxifylline (inhibiteur de la libération de TNF- $\alpha$  [111]. Aucune de ces études n'a obtenu de résultats encourageants pour permettre une utilisation thérapeutique. Seuls les anti-TNF- $\alpha$  (Ac anti TNF- $\alpha$ ) ont permis d'obtenir une réduction de la mortalité de 3% [49].

L'utilisation de la pharmaco-nutrition peut également avoir un intérêt dans la prise en charge du sepsis. Des effets bénéfiques ont été observés avec les AGPI-3 (Acide gras poly insaturé 3) chez les patients en service de réanimation, avec diminution de la mortalité et des infections [113]. Chez l'animal, les AGPI-3 ont un effet anti inflammatoire à la fois local, intestinal et plasmatique avec diminution de la quantité d'IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-6. Néanmoins, dans une étude utilisant de la dexametasone, il a été montré que les AGPI-3 n'avaient pas d'effets bénéfiques sur la perte de masse musculaire, et même majoraient fortement l'expression de MAFbx et MuRF1 [114]

L'utilisation des antagonistes  $\beta$ 2-adrenergiques peut être une voie d'action intéressante dans la prise en charge de la perte de masse musculaire lors du sepsis [115]. La stimulation des  $\beta$ 1-adrenergiques, qui ont un effet opposé à celui des  $\beta$ 2-adrenergiques, a montré des effets délétères sur la survie des patients en réanimation et sur la fonction cardiaque [116]. A l'opposé, l'utilisation de  $\beta$ 2-adrenergiques dans d'autres pathologies a montré des effets bénéfiques sur la masse musculaire, comme lors de cachexie cancéreuse sur l'animal avec du formoterol [117], mais également suite à l'injection d'endotoxine sur 5 jours avec du clenbuterol [118]. Il y a aussi des effets bénéfiques sur la dysfonction diaphragmatique lors du sepsis (CLP de 16h) avec la terbutaline qui augmente la force de contraction ainsi que la vitesse de contraction [119].

Concernant les TGF- $\beta$ , il n'y a ce jour aucune étude qui ait montré l'impact d'un inhibiteur de cette voie, ou d'une molécule comme la myostatine, sur la masse musculaire lors du sepsis. Du fait de son intérêt dans d'autres pathologies impliquant la perte de masse musculaire, comme expliqué précédemment, nous avons choisi d'étudier cette voie. Elle constitue la thématique du dernier article présenté dans cette thèse.

En conclusion, l'altération de la fonction musculaire est la résultante de plusieurs facteurs tels que l'atteinte de l'excitabilité membranaire, une modification de l'homéostasie calcique ou encore des modifications du métabolisme. L'ensemble de ces éléments est représenté dans la Figure 23.

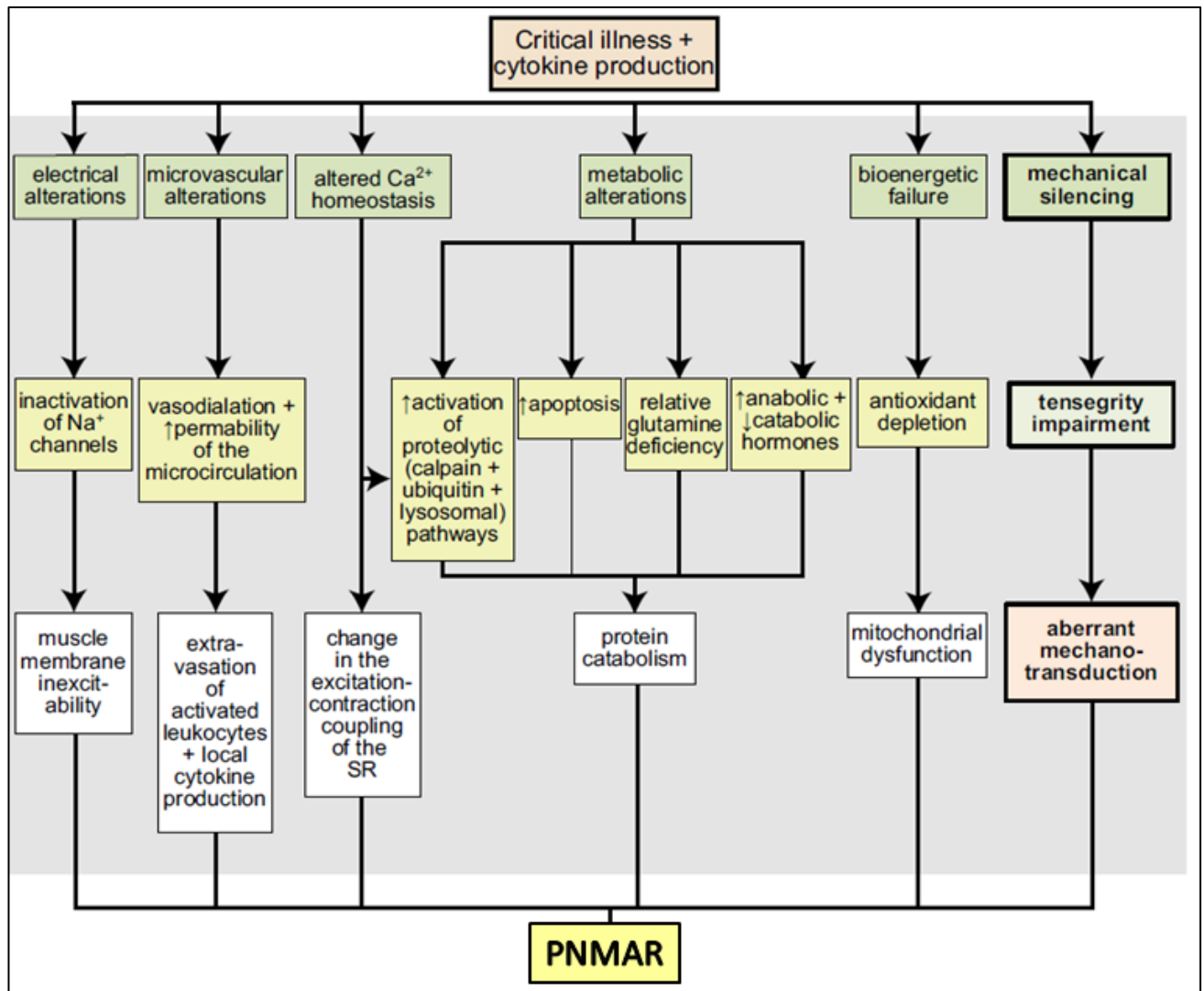


Figure 23 : Mécanismes impliqués dans l'atteinte musculaire de la polyneuromyopathie acquise en réanimation.  
[120]

### III. La cachexie cancéreuse

#### A. Généralités

Le terme cachexie vient du Grec « kakos » et « hexis » qui signifie « mauvais état ». Elle se définit comme un syndrome multifactoriel clinique et métabolique entraînant une perte de poids progressive. La cachexie peut apparaître dans de nombreuses pathologies chroniques telle que l'insuffisance cardiaque chronique, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'insuffisance rénale chronique, le sepsis et le cancer [121].

En 2011, Fearon propose une définition de la cachexie cancéreuse : « *Cancer cachexia is defined as a multifactorial syndrome characterised by an ongoing loss of skeletal muscle mass (with or without loss of fat mass) that cannot be fully reversed by conventional nutritional support and leads to progressive functional impairment. The pathophysiology is characterised by a negative protein and energy balance driven by a variable combination of reduced food intake and abnormal metabolism* » [122]. Cette cachexie cancéreuse est indirectement responsable de 30% de la mortalité des patients atteints de cancer et par ailleurs, plus de 50% des patients qui meurent suite à leur cancer, présentent une cachexie [123]. Sa prévalence peut aller jusqu'à 83% pour les cancers de l'estomac et du pancréas, 79% pour le cancer de l'œsophage et 50-66% pour le cancer du poumon [124], avec une corrélation négative entre le pourcentage de perte de masse et la survie [125].

Chez ces patients, la cachexie va induire une augmentation des effets secondaires des traitements, l'incapacité de traiter les patients avec des cycles complets de thérapies, la réduction de la réponse aux traitements et par conséquent une diminution de la survie [126]. A cela il faut rajouter une diminution dramatique de l'activité physique qui impacte directement la qualité de vie des patients [127]. Les signes cliniques caractéristiques qui vont apparaître sont : une fatigue générale (asthénie), une anorexie, une modification du métabolisme entraînant une perte de poids, avec une perte de masse grasse et surtout la perte de masse musculaire qui entraîne un épuisement musculaire. Son diagnostic est rendu d'autant plus difficile que la première définition de la cachexie n'a été établie qu'en 2008, caractérisée par un panel de scientifiques [121]. Ils ont identifié comme critères la perte de poids >5% dans les 12 mois (ou IMC<20), associé à au moins 3 des 5 critères suivants : diminution de la force musculaire, fatigue, anorexie, indice de masse maigre faible et biochimie anormale (marqueurs de l'inflammation élevés (CRP (protéine C réactive), IL-6), anémie et faible albuminémie) (Figure 24). Un autre système de notation a été proposé en 2011 : le Cachexie SCOré (CASCO) [128], validé en 2017 sur un panel de 281 patients [129]. Ce score prend en

compte des paramètres tels que le degré de perte de masse, les marqueurs de l'inflammation, l'activité physique et un questionnaire sur la qualité de vie des patients. Cet index a même été proposé sous une forme simplifiée (MiniCASCO) afin d'éviter un nombre trop important de mesures à effectuer par le personnel de santé sur ces patients qui pourrait limiter son utilisation.

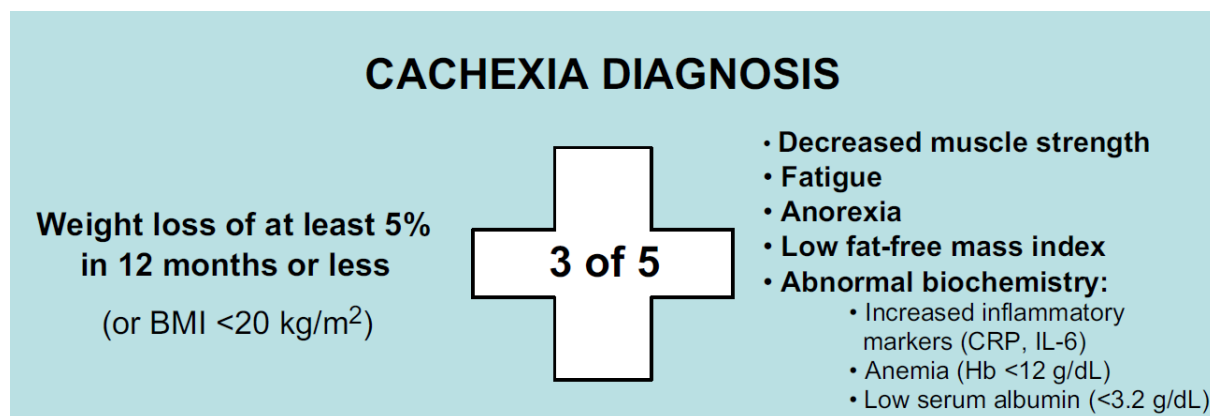


Figure 24 : Critères de diagnostic de la cachexie cancéreuse.  
Proposition selon par Evans et al. [121].

## B. Les causes de la cachexie cancéreuse

### 1. L'anorexie

L'anorexie se définit comme une diminution, voire une perte du désir de manger. Elle est souvent diagnostiquée par des symptômes comme l'aversion pour certains aliments (tels que le poisson et la viande), une perte de l'odorat et du goût, une satiété précoce, des nausées et des vomissements. Son origine peut être mécanique, comme dans le cas de l'obstruction du tractus gastro-intestinal par la tumeur elle-même, mais peut également faire suite à des modifications physiologiques. En effet, il peut y avoir une altération cérébrale avec inhibition des voies orexigènes et activation des voies anorexigènes régulant la prise alimentaire [130]. La réponse inflammatoire, par le biais de certaines cytokines comme l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-6 ou le TNF- $\alpha$  est capable d'induire ce déséquilibre, [131]. Cela conduit à la diminution de la production du NPY (neuropeptide Y), un puissant orexigène du système nerveux central, et *in fine* diminue la prise alimentaire. Les traitements comme les chimiothérapies et les radiations sont également capables d'induire une anorexie chez les patients [132]. Néanmoins, comme ils sont capables d'induire également la libération de cytokines la part de leur action directe ou indirecte est difficile à déterminer [133].

## 2. Modifications du métabolisme

### a. Métabolisme protéique

L'altération du métabolisme protéique, qui entraîne une perte de protéines myofibrillaires, est un élément clé dans la cachexie et conduit à une perte de masse et de force musculaire ainsi qu'à une augmentation de la fatigue. Cela va associer une perturbation de l'équilibre synthèse/dégradation protéiques musculaires, avec une diminution de la synthèse protéique et une augmentation de la protéolyse [134], ainsi que des anomalies dans le métabolisme des acides aminés (Figure 25).

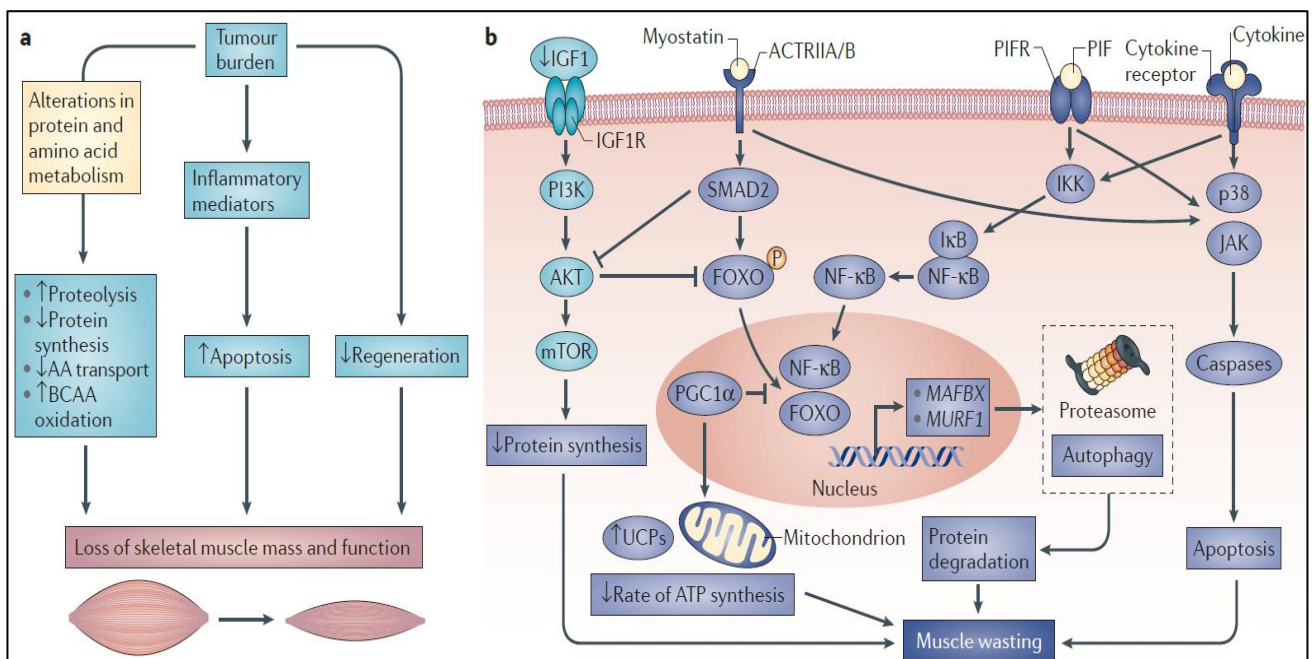


Figure 25 : Modification du métabolisme protéique lors de la cachexie cancéreuse. [135]

Au niveau du muscle strié squelettique, cette diminution de la protéosynthèse est retrouvée à la fois chez l'homme et chez l'animal [117,134,136], associée à la modulation de certains facteurs de traduction. Eley *et al.* ont montré que sur des souris NMRI inoculées avec un fragment de tumeur MAC16, il y avait phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  dans le soléaire, et cela de manière PKR (protéine kinase R) dépendante [137]. Cela conduit à l'inhibition de la formation du complexe de pré-initiation de la traduction et par conséquent à la diminution de la protéosynthèse musculaire. Ils ont également montré une corrélation inverse entre le taux de phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et la protéosynthèse musculaire. Sur la souris inoculée avec la

lignée LLC on peut observer une diminution de la phosphorylation de 4E-BP1 par l'inoculation de cellules tumorales [138]. 4E-BP1, lorsqu'il est hypo-phosphorylé, bloque l'assemblage du complexe eIF4F (complexe d'initiation de la traduction) par compétition avec eIF4G. Il se lie à eIF4E avec un effet négatif sur la traduction des ARNm en protéines.

A l'inverse de la protéosynthèse, durant la cachexie cancéreuse il y a une forte augmentation du catabolisme musculaire, et cela à la fois chez l'homme et les modèles animaux [137–139]. Différents mécanismes sont impliqués dans cette protéolyse, comme l'activation de la voie UPS, les calpaïnes et la voie lysosomale.

Le système UPS est impliqué dans la perte de la masse musculaire lors de la cachexie cancéreuse. Il y a une augmentation de l'activité du protéasome dans le muscle après inoculation de cellules cancéreuses Walker 236 (cellules cancéreuses ovariennes) [140], ou de cellules AH-130 (cellules cancéreuses du foie) [141]. De plus, certaines cibles sont utilisées pour caractériser cette activation, comme les E3 ligases MAFbx et MuRF1, qui sont de bons marqueurs. Il y a une augmentation de l'expression musculaire de ces deux E3 ligases lors de la cachexie sur l'animal [117,138,142,143], avec une corrélation entre transcription et expression protéique après inoculation de cellules cancéreuses C26 (cellules cancéreuses du colon) [144]. De plus il est à noter que l'on observe dans ces études une corrélation inverse entre le taux d'expression de ces marqueurs et la masse musculaire. Zhang *et al.*, ont publié en 2013 une étude sur la cachexie cancéreuse et l'administration de MG132, un inhibiteur spécifique du protéasome [144]. Ils montrent des effets bénéfiques avec diminution de la progression tumorale, une moindre atrophie musculaire, une diminution des triglycérides plasmatiques, une diminution de moitié des taux plasmatiques de TNF- $\alpha$  et IL-6 d'environ -75% dans le muscle, ainsi qu'une amélioration de la survie des animaux. Néanmoins, une étude de 2016 utilisant également un inhibiteur du protéasome (bortezomib) n'a pas montré d'effet bénéfique sur la masse musculaire, et cela avec deux types de cancer (AH-130 et C26) [145].

Les calpaïnes sont également impliquées dans la protéolyse musculaire. En effet, il y a une augmentation de l'expression des isoformes 1 et 2 dans le muscle squelettique de l'animal cachectique [117,143,146]. Néanmoins, concernant l'isoforme 3, il semblerait que celle-ci soit régulée différemment car, sur l'animal inoculé avec la lignée AH-130, il y a une diminution de moitié de la transcription de cette dernière comparée aux contrôles, alors que pour l'isoforme 2 celle-ci est bien augmentée d'environ 200% [147]. Avec la lignée C26 il n'y a pas de modulation de l'expression de l'isoforme 3 alors que les isoformes 1 et 2 sont bien augmentées [146]. Certaines études ont étudié justement le rôle potentiel des calpaïnes dans la

cachexie cancéreuse en les inhibant. Lin et Chen ont publié en 2017 la liste des effets de différents inhibiteurs de calpaïnes sur la cachexie cancéreuse. Ils montrent une préservation de la masse musculaire, surtout avec la combinaison des trois inhibiteurs utilisés, associée à une diminution de l'activité enzymatique des calpaïnes (alors que l'expression des calpaïnes 1 et 2 n'augmentent pas avec l'inoculation des cellules cancéreuses) et *in fine* ils observent une meilleure survie des animaux [148]. Néanmoins, dans une autre étude de 2017 également, l'inhibition des calpaïnes par le dantrolène n'a pas d'effet sur la perte de masse ou sur l'augmentation de la protéolyse musculaire induite par l'inoculation d'AH-130 [149]. De la même manière la surexpression de la calpastatine n'a pas d'effets bénéfiques. Il est à noter que ce genre d'étude cherche généralement uniquement à protéger la masse musculaire lors de la cachexie cancéreuse, or le but est de trouver des nouvelles thérapies complémentaires des thérapies anti-cancéreuses et par conséquent il faut que la protection de la masse musculaire ne vienne pas favoriser la progression tumorale. Les calpaïnes, par exemple, sont à la fois impliquées dans l'angiogenèse et dans le phénomène métastatique, ce qui en fait des cibles d'intérêt en cancérologie [150]. Néanmoins, elles sont également impliquées dans l'apoptose et dans le mode d'action de certaines chimiothérapies comme le cisplatine. Ce genre de résultats reste à relativiser tant que les effets sur les cellules tumorales restent inconnus, d'autant plus que l'inoculation de cellules tumorales en sous cutané avec une croissance rapide reste un modèle animal efficace pour la cachexie, mais pas forcément proche de la réalité clinique.

Le système autophagie-lysosomale est le troisième système protéolytique impliqué dans le catabolisme musculaire. Contrairement aux deux précédents celui-ci est moins documenté. En effet, alors que les taux d'E3 ligases et calpaïnes (1 ou 2) sont bien corrélés avec leurs activités enzymatiques respectives et la perte de masse musculaire, dans la cachexie cancéreuse, la voie autophagique semble impliquée mais avec une certaine dispersion dans les résultats. Il a été montré qu'il y a une augmentation de l'autophagie chez les patients atteints de cancer et que son intensité est corrélée au pourcentage de perte de poids lors de cancer gastro-intestinal (et du poumon chez l'homme également) [151]. De plus, dans cette étude, les auteurs mentionnent que l'autophagie serait stimulée par la production d'IL-6 directement par les cellules tumorales. D'autres études montrent l'augmentation musculaire de la transcription des cathepsines impliquées dans l'autophagie, comme les cathepsines L, B, D [143,152,153]. Penna *et al.*, ont étudié l'expression de certaines protéines impliquées dans l'activation de l'autophagie et cela dans trois modèles de cachexie cancéreuse [152]. Les auteurs montrent que l'expression protéique de Beclin1, LC3-II et p62 est augmentée dans le muscle par la

tumeur de C26, mais de manière plus importante à 11 jours qu'à 14 jours, et cela plus ou moins en corrélation avec les taux d'ARNm, par contre, l'activité des cathepsines B et L reste inchangée. Une augmentation de l'expression protéique de LC3-II et p62 est observée après inoculation d'AH-130, et de Beclin1 et p62 après inoculation de LLC. De plus, les auteurs montrent qu'après traitement à la dexametasone, un agoniste des glucocorticoïdes, l'expression protéique de ces cibles est modifiée alors que les taux ARNm ne changent pas et qu'il n'y a aucun effet sur l'activité enzymatique. Enfin, ils ont montré que l'inhibition de l'autophagie, sur les souris inoculées avec les cellules C26, n'avait pas d'effet bénéfique sur la préservation de la masse musculaire. Ces résultats, sur des modèles multiples, montrent bien la complexité de l'étude de l'implication de l'autophagie dans la cachexie cancéreuse et de la détermination de bons marqueurs.

En plus de la modification des mécanismes de la protéosynthèse et de la protéolyse musculaire, il y a également des altérations dans le métabolisme des acides aminés et leur disponibilité musculaire (Figure 26).

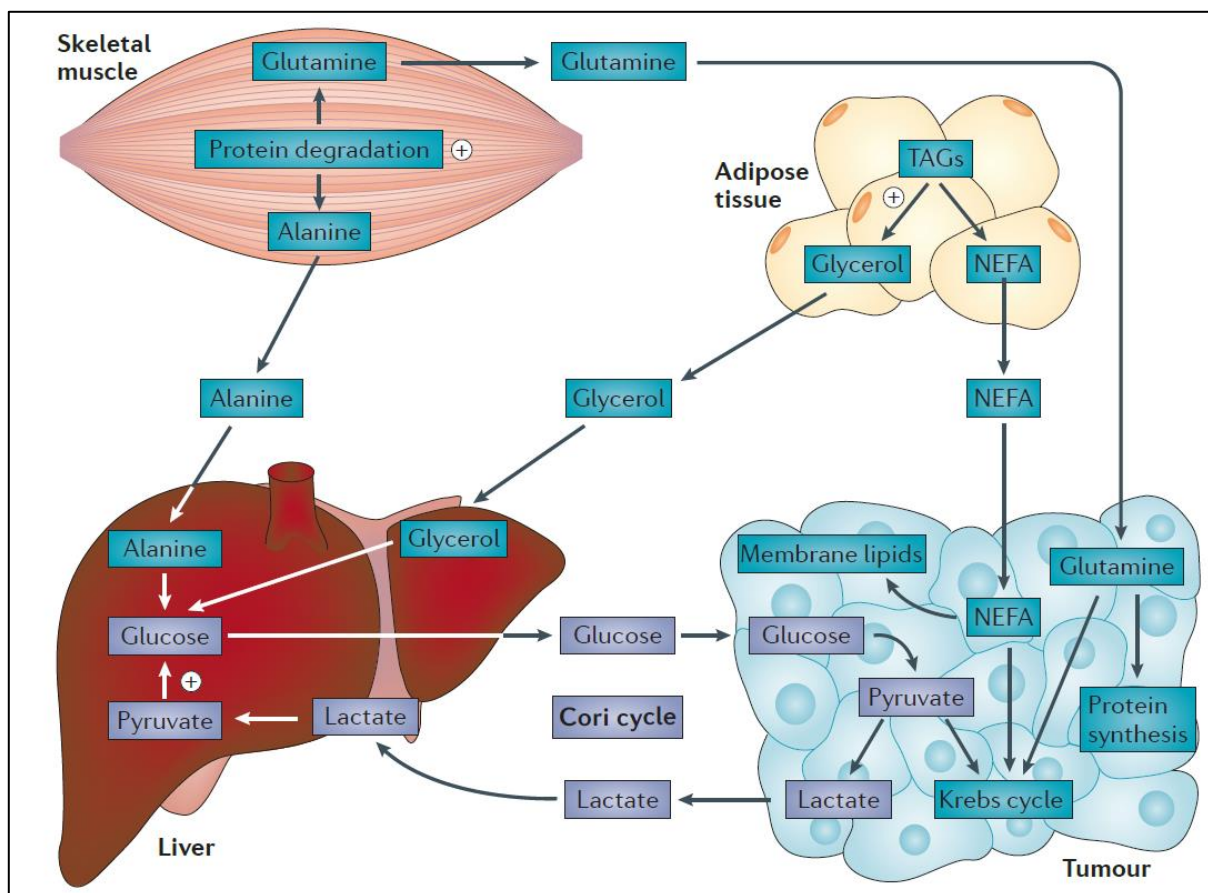


Figure 26 : Modifications du métabolisme associées à la cachexie cancéreuse.  
[135]

L'inoculation de cellules LLC va entraîner une augmentation du pool d'acides aminés plasmatiques, et surtout d'alanine et de glycine [138], ce qui est le reflet de l'augmentation de la protéolyse musculaire. La disponibilité tissulaire va être changée également avec une diminution de l'absorption des acides aminés par le muscle squelettique et le cœur alors qu'il y a une augmentation de la capture par le foie et les cellules tumorales [154]. Le foie va utiliser ces acides aminés pour l'augmentation de sa synthèse protéique, dont celle des protéines de la phase aiguë impliquées dans la réponse inflammatoire [135]. De plus il y a une augmentation de la néoglucogenèse à partir d'alanine (en plus du glycérol provenant de l'hydrolyse des triglycérides). Le glucose ainsi produit ira ensuite en direction des cellules tumorales. Celles-ci vont également utiliser la glutamine, qui est utilisée à la fois comme source énergétique, comme précurseur d'acides nucléiques et qui entre dans la protéosynthèse, ce qui favorise la prolifération des cellules tumorales.

### *b. Métabolisme lipidique*

Lors de la cachexie cancéreuse, il y a généralement une atteinte du métabolisme lipidique. La majeure partie des réserves d'acides gras de l'organisme est localisée dans les adipocytes qui constituent le tissu adipeux. Ces acides gras sont stockés sous forme de triglycérides constitués d'un glycérol estérifié par 3 acides gras. La perte de tissu adipeux viscéral, sous-cutané et total est associée à une moindre survie chez les patients et est un facteur prédictif de mortalité [155].

La perte de ce tissu adipeux lors de la cachexie cancéreuse est un phénomène retrouvé à la fois chez l'homme et dans les modèles animaux. Même si la diminution de la prise alimentaire contribue à cette perte de masse grasse, il a été montré que celle-ci n'y contribuait pas majoritairement [156]. Elle est la résultante de multiples facteurs combinant la diminution de l'adipogenèse, la diminution des entrées en acides gras dans les adipocytes, la diminution de la lipogenèse, une augmentation de la lipolyse et une augmentation de l'oxydation des acides gras libres [157].

L'adipogenèse est réduite grâce à la diminution dans le tissu adipeux blanc des facteurs de l'adipogenèse tel que C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$* ) et C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1C (*sterol regulatory element binding protein 1C*) [156]. Concernant l'entrée des acides gras dans l'adipocyte permettant l'estérification en TG, c'est la LPL (lipoprotéine lipase) qui en est responsable. Présente au niveau de l'épithélium vasculaire du tissu adipeux (et un peu du muscle strié), elle permet l'hydrolyse des TG (triglycérides) présents dans les

VLDL (*very low density lipoprotein*) et chylomicrons. Son activité est diminuée dans le tissu adipeux blanc dans un modèle animal et cela dès 48h après l'inoculation de la tumeur [158]. La cause principale de la perte de tissu adipeux dans la cachexie cancéreuse est l'augmentation de la lipolyse au sein des adipocytes. [157]. Les deux enzymes majeures responsables de l'hydrolyse de TG dans le tissu adipeux blanc sont la lipase hormono-sensible (HSL) et la triglycéride lipase adipeuse (ATGL), qui vont permettre l'hydrolyse des TG en glycérol et en acide gras libres et leur passage dans la circulation. Une augmentation plasmatique du glycérol et des acides gras libres est observée après inoculation de la tumeur, et cela dès 4 jours post-inoculation [158]. Le glycérol va être ensuite utilisé par le foie et entrer dans le processus de néoglucogenèse, alors que les acides gras libres seront utilisés par les cellules tumorales. Il est intéressant de noter que dans une étude de 2011, Das *et al.*, ont induit une cachexie cancéreuse sur des animaux KO à l'ATGL ou à l'HSL et montrent une diminution des effets délétères sur le tissu adipeux blanc chez ces animaux [159]. En effet, l'inhibition de l'HSL permet d'inhiber la perte de tissu adipeux blanc 14 jours et 21 jours après l'inoculation de cellules LLC. L'inhibition de l'ATGL, quant à elle, restaure complètement la masse du tissu adipeux. Cela est associé à l'inhibition de la libération de glycérol et d'acides gras libres dans la circulation. De plus, l'inhibition de l'ATGL permet également de stopper l'atrophie musculaire (du gastrocnémien) induite par les cellules cancéreuses en diminuant l'activité du protéasome et des caspases. Cela met en évidence la relation entre le tissu adipeux et le muscle squelettique, soit par le relargage de glycérol et d'acides gras libres et/ou des médiateurs comme les adipokines et les myokines.

### *c. Métabolisme glucidique*

Chez les patients ayant une cachexie cancéreuse, il est observé des troubles du métabolisme glucidique. Cela va toucher l'ensemble des organes et en particulier le foie. En effet, les cellules tumorales utilisent principalement du glucose et des acides aminés tels que la glutamine. Le glucose dans les cellules tumorales est surtout transformé en lactate : c'est l'effet Warburg [160]. Il est ensuite libéré dans la circulation sanguine et reconverti en glucose au niveau hépatique : c'est le cycle de Cori. Ce dernier cycle est fortement consommateur d'ATP pour retransformer le lactate en glucose : il faut 6 molécules d'ATP pour une de glucose, ce qui participe à l'augmentation de la dépense énergétique totale et contribue à la perte de poids [35]. La production de glucose hépatique va être également augmentée à cause de l'insulino-résistance et de la levée de l'inhibition de la glucogenèse par

l'insuline [161]. Il est à noter qu'il y a également une insulino-résistance périphérique qui est due à une diminution de l'expression des transporteurs GLUT-4 responsables de la capture du glucose par le muscle, et que ce mécanisme est corrélé à l'augmentation de la transcription du TNF- $\alpha$  [162].

## C. Les médiateurs et les mécanismes de la cachexie cancéreuse

### 1. Les médiateurs endogènes

#### a. Les cytokines

La cachexie musculaire résulte de différents mécanismes mis en place par les cellules tumorales. L'action de ces cellules sur le muscle se fait grâce à la libération de médiateurs dans la circulation. Parmi ces médiateurs, il y a les cytokines (Figure 27). On retrouve en effet une augmentation des taux circulants de cytokines telles que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 chez les patients atteints de cancer et présentant une cachexie. Cette étude montre une corrélation entre le taux d'IL-6 et le stade de cachexie [163]. Dans les modèles animaux de cachexie une augmentation de la production de TN- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 est également observée [142,159].

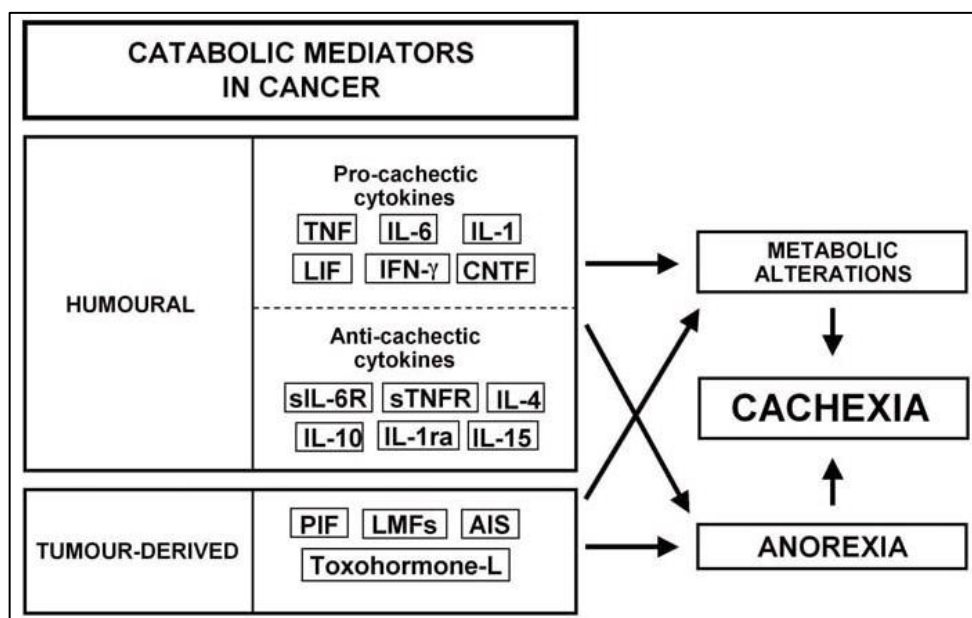


Figure 27 : Implication des cytokines dans la cachexie cancéreuse. [164]

Le TNF- $\alpha$  est considéré comme une des cytokines pro-inflammatoires majeures. Son action catabolisante sur le muscle a été décrite précédemment. Les cellules tumorales sont

également capables d'augmenter le taux de TNF- $\alpha$  à la fois en induisant une production par les cellules saines de l'organisme, et une production directement par ces cellules tumorales elles-mêmes [165]. Dans une étude de 1989, Sherry *et al.*, ont montré que l'injection d'un anticorps anti-TNF- $\alpha$  avait des effets bénéfiques sur le tissu adipeux et normalisait le taux de TG libérés dans la circulation sanguine [166]. Dans une autre étude, avec un modèle de cachexie induit par des cellules AH-130, l'administration de pentoxifylline, un inhibiteur de la synthèse du TNF- $\alpha$ , permet de prévenir la perte de masse musculaire et l'augmentation de la protéolyse musculaire [167]. Dans une autre étude encore, concernant les effets de la doxorubicine sur la fonction musculaire, les auteurs ont montré que cette chimiothérapie, administrée en IP à 20mg/kg, induisait une diminution de la force de contraction et l'augmentation de la fatigue de l'EDL à 72h [168]. De plus, en utilisant un modèle de KO pour le récepteur 1 du TNF- $\alpha$  (TNFR1), ils montrent que les effets observés suite à l'administration de doxorubicine sont abolis, ce qui montre bien le rôle important de cette cytokine.

### *b. Les glucocorticoïdes*

Outre les cytokines, il y a d'autres facteurs impliqués dans la cachexie cancéreuse. Parmi eux on peut noter les glucocorticoïdes. L'administration d'un cocktail de chimiothérapie (cyclophosphamide, doxorubicine et 5-fluorouracile) entraîne une augmentation de 2,5 fois de la concentration de corticostérone à 4h et une perte de masse du gastrocnémien 18h seulement après l'injection [169]. De plus les auteurs montrent que cela est également associé à une augmentation de la transcription de MAFbx et MuRF1, et que le même traitement sur un modèle de KO pour le récepteur aux glucocorticoïdes spécifiquement dans le muscle permet d'atténuer les expressions de ces E3 ligases et de préserver la masse musculaire.

### *c. La myostatine*

La myostatine apparaît également comme un des acteurs majeurs régulant la perte de masse musculaire au cours de la cachexie cancéreuse. De nombreuses équipes de recherche ont étudié les effets de son inhibition dans cette pathologie, que ce soit par des modèles de KO à la myostatine, par l'inhibition du récepteur ActRIIB (Récepteur à l'activine IIB ) avec des antagonistes ou des anticorps solubles, ou des anticorps dirigés contre la myostatine [117,138,142,170,171]. En effet, l'utilisation d'un anticorps soluble anti-myostatine permet de

retrouver une masse similaire à des valeurs contrôles pour le gastrocnémien et le *tibialis*, et de supprimer l'atrophie induite par l'inoculation de cellules LLC chez la souris C57BL/6 [142]. Il y a également une suppression de l'augmentation de la protéolyse musculaire, mais sans effet bénéfique sur l'expression de MAFbx ou MuRF1 [117]. Une autre étude utilisant le même composé sur des souris inoculées avec des cellules LLC montre des effets similaires sur la masse musculaire, mais également sur le poids total, cet inhibiteur conduit donc à une augmentation de la survie [142]. Il est intéressant de noter que dans ces deux études, la diminution de la masse grasse et l'augmentation des cytokines dans la circulation (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6), induites par les cellules tumorales, restent inchangées avec ou sans l'inhibiteur. Dans une autre étude utilisant un modèle de KO à la myostatine, les auteurs montrent que l'inhibition de la myostatine conduit à des effets bénéfiques sur la masse musculaire, à une diminution de la concentration plasmatique en acides aminés, et à une nette diminution des taux d'ARNm de MAFbx, MuRF1 et FOXO3 [138]. Néanmoins, ils ne notent pas d'effet sur les protéines impliquées dans la protéosynthèse (4E-BP1, S6K1), ni sur la masse grasse. Une autre étude, utilisant un inhibiteur du récepteur ActRIIB, montre des effets bénéfiques sur la masse musculaire du *tibialis*, du gastrocnémien et du quadriceps chez la souris Balb/cJRj inoculée avec des cellules cancéreuses CT-26 mais également avec l'injection de cisplatine seul ou d'une thérapie ciblée anti-mTOR (Everolimus) [171]. De manière générale, l'amélioration et la prise en charge de la perte de masse musculaire dans ces études sont associées à une amélioration de la survie des animaux.

## 2. Les traitements anti-cancéreux

La cachexie cancéreuse peut intervenir suite à la libération par la tumeur de médiateurs tels que les cytokines, comme exposé dans la partie précédente. Ces facteurs vont permettre de stimuler le catabolisme et sont également impliqués dans la diminution de la prise alimentaire, ce qui conduit à un déséquilibre énergétique et entraîne la cachexie, aussi bien chez les patients que dans les modèles animaux. Néanmoins, chez les patients, les traitements oncologiques, de par leurs modes d'actions sur les cellules cancéreuses, peuvent également avoir un impact délétère sur le tissu sain, et peuvent contribuer à la cachexie. Il a été montré par exemple que le Sorafenib, un inhibiteur de kinases telles que celles couplées au récepteur du VEGF (*vascular endothelium growth factor*), induisait une perte de poids total et de masse musculaire chez l'homme [172]. De surcroît, ces effets sont majorés dans le cas de traitements de longue durée, avec en plus une atteinte de la masse grasse. Des résultats similaires ont été

observés sur modèle animal (rat) : l'injection de Sorafenib induit une diminution de la prise alimentaire et de la masse musculaire [143,171]. Parmi la liste des anti-néoplasiques impliqués dans l'atrophie musculaire, le cisplatine [173], la doxorubicine [174] sont utilisés, ainsi que les combinaisons de traitements (5-fluorouracile, doxorubicine et cyclophosphamide) [169] qui sont utilisées dans le cancer du sein, par exemple.

Il est intéressant de noter que dans certaines études, les effets des traitements anti-tumoraux montrent parfois des effets sur la cachexie analogues à ceux des cellules tumorales elles-mêmes, avec une activation des voies de signalisation identiques, comme la voie NFκB par le cisplatine et l'inoculation de cellules tumorales de colon C26 [175], ou bien le traitement Folfiri (mélange de fluorouracile, Leucovorine et Irinotecan) et la lignée C26 [176]. Cela indique que l'étude de la cachexie sur l'animal peut se faire avec l'administration de chimiothérapie seule, indépendamment de l'injection de cellules tumorales.

Les mécanismes par lesquels ces traitements vont induire une perte de masse musculaire sont divers. En effet, cela va dépendre d'une part de la réaction inflammatoire que ceux-ci vont causer, et d'autre part du mode d'action de la molécule utilisée. Le cisplatine est capable d'induire une augmentation de la production de TNF-α, d'IL-6 et d'IL-1β [177]. Le paclitaxel (analogue du docétaxel) induit une augmentation de la production d'IL-6 chez les patients, de TNF-α et d'IL-1β [178]. Le 5-fluorouracile augmente également la production de ces 3 cytokines. La doxorubicine permet l'augmentation de l'IL-1β, du TNF-α et du MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*). En plus de ces cytokines, d'autres médiateurs circulants peuvent intervenir. Ainsi, le mélange de 5-fluorouracil, doxorubicine et cyclophosphamide induit une augmentation du taux de cortisol de +200% [169]. De plus, les auteurs montrent que la perte de masse musculaire par le traitement est totalement reversée sur un modèle animal de KO aux récepteurs des glucocorticoïdes spécifiques du muscle, ce qui montre l'importance de ce médiateur sur l'atrophie musculaire induite par cette chimiothérapie. En conclusion, les chimiothérapies sont capables d'augmenter la production de cytokines contribuant à l'effet cachectisant.

De plus, ce type de traitement anti-néoplasique a un mode d'action non spécifique et va affecter les cellules d'autant plus qu'elles sont en phase de multiplication intense. Enfin, de nombreux nouveaux médicaments sont développés actuellement, comme les immunothérapies ou les thérapies ciblées qui sont focalisés sur un récepteur, une protéine ou une activité enzymatique. En fonction du type de cible visée on pourra avoir des effets secondaires entraînant une cachexie. C'est potentiellement le cas avec des thérapies ciblant l'anabolisme. En effet, les cellules tumorales ont un anabolisme important ce qui en fait une cible

thérapeutique intéressante, comme pour le cancer de l’ovaire, avec des inhibiteurs de la voie PI3k-Akt-mTORC1/2. Néanmoins, cela peut également inhiber l’anabolisme musculaire et ainsi stimuler davantage la cachexie cancéreuse [179]. La plupart des études se focalisent sur les mécanismes induisant la perte de masse musculaire mais certaines concernent directement les effets des traitements sur la force musculaire. Gilliam *et al.*, par exemple, a montré que l’injection de doxorubicine induisait une diminution de la force tétanique maximale du diaphragme [180], de l’EDL [168] et du soléaire [181].

Les études concernant la cachexie cancéreuse sur l’animal, présentent quelques biais. La croissance tumorale est généralement très rapide et peut induire la mort de l’animal en quelques semaines, ce qui est plus drastique que ce qui est observé chez l’homme. En plus de cela, très peu d’études respectent la localisation de la tumeur et préfèrent une inoculation sous cutanée pour des raisons de facilité expérimentale (inoculation, surveillance et mesures plus simples). De plus, concernant les traitements, les posologies et les voies d’administration peuvent différer de ce qui est applicable à l’homme. En effet, l’injection de doxorubicine en IP montre des effets plus délétères qu’une injection en IV [181], sachant que chez l’homme la voie IP n’est pas utilisée. D’autres études montrent l’effet de l’injection de docétaxel sur la masse musculaire et des marqueurs de l’inflammation avec une injection en IP à 20mg/kg 2 ou 4 fois en 5 jours [182], alors que cette molécule est généralement administrée 1 fois toutes les 3 semaines en IV chez les patients.

#### **D. Les moyens de prise en charge de la cachexie cancéreuse**

Comme expliqué précédemment, la prise en charge de la cachexie cancéreuse est rendue d’autant plus difficile que sa caractérisation est récente. L’approche thérapeutique qui peut être mise en place par le personnel de santé peut s’orienter autour de trois aspects : l’augmentation/amélioration de la prise alimentaire, la diminution du catabolisme et l’augmentation de l’anabolisme musculaire.

Une étude menée en 2010 montre bien l’importance de la prise en charge nutritionnelle dans la protection du capital musculaire avec le mégestrol, un composé capable de stimuler la prise alimentaire [183]. Les auteurs montrent que sur le modèle de cachexie avec inoculation de cellules AH-130 l’administration de mégestrol est capable à elle seule d’augmenter la prise alimentaire de 20%, cela est associé à une augmentation de la masse musculaire du cœur (+12%), du soléaire (+13%), du *tibialis* (+6%) et du gastrocnémien (+10%). Cela permet également de diminuer les taux d’ARNm de MuRF1, MAFbx et de la calpaïne 2. Dans une

autre étude sur le même modèle de cachexie, les auteurs montrent que les animaux avec une tumeur et une chimiothérapie (Sorafenib), ont une perte de masse musculaire (gastrocnémien, *tibialis*, soléaire, EDL, diaphragme et cœur), alors que dans le groupe bénéficiant en plus de l'injection de formoterol (un agoniste des  $\beta_2$ -adrénergiques) il y a une amélioration globale de la masse de ces muscle. De plus c'est dans le groupe ayant l'association tumeur / chimiothérapie / formoterol et mégestrol que les valeurs des masses musculaires sont les plus proches de celles du groupe contrôle [143]. Les études cliniques concernant la prise en charge nutritionnelle sont assez discordantes. Certaines études rapportent un effet bénéfique sur la survie des patients à 2 ans avec une augmentation de l'apport énergétique ( $>5000\text{kcal/jour}$ ) [184], alors que dans d'autres études, aucun effet n'a été noté [185]. Néanmoins on peut noter que dans ces deux études la première est sur un panel de 20 sujets d'une moyenne d'âge de 31-55 ans et avec un apport alimentaire doublé, comparé à des apports nutritionnels normaux alors que, dans la seconde étude, il s'agit de 336 patients d'une moyenne d'âge de 77 ans et avec un apport alimentaire « normal » ( $30\text{kcal/kilo/jour}$ ). L'utilisation de nutriments spécifiques comme des acides gras polyinsaturés omega3, avec principalement l'EPA (acide eicosapentaénoïque), suscite un fort intérêt pour les effets bénéfiques sur la masse musculaire [182]. Néanmoins, du fait de la disparité des études cliniques, que ce soit sur le profil des patients, l'âge et la prise en charge nutritionnelle, le bénéfice net d'une supplémentation en omega3 dans la prise en charge de la cachexie cancéreuse ne peut être mis en avant [186].

Concernant la prise en charge pharmacologique, de nombreuses cibles thérapeutiques sont envisageables en fonction de leur degré d'implication dans la cachexie cancéreuse. Par exemple, dans un essai clinique, l'utilisation d'étanercept, qui est capable d'inhiber la production de  $\text{TNF-}\alpha$ , a montré qu'il permettait de diminuer la fatigue ressentie chez les patients traités au docétaxel et améliorait la tolérance au traitement [187]. De la même manière, la thalidomide, qui a des propriétés anti-inflammatoires surtout concernant le  $\text{TNF-}\alpha$  et l'IL-6 avec en plus l'inhibition de  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , a permis d'inhiber la perte de masse corporelle mais également de masse maigre sur 4 et 8 semaines, dans un essai clinique chez des patients atteints de cancer du pancréas [188]. Il y a également comme agent pharmacologique, les agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques qui sont capable en situation normale d'induire une hypertrophie musculaire. Dans une étude préclinique, l'administration de formoterol a permis de préserver la masse musculaire sur un modèle de cachexie avec l'inoculation de cellules LLC [117]. Les inhibiteurs de la voie de la myostatine sont également des cibles intéressantes, pour les raisons évoquées précédemment. Plusieurs essais cliniques sont en cours pour lutter contre la

cachexie cancéreuse. En effet, on trouve par exemple le LY2495655 (Lilly) testé contre la cachexie chez des patients ayant un cancer du pancréas, ou encore le BYM338 (Novartis) pour le cancer du poumon et du pancréas [189]. Il est intéressant de noter que des inhibiteurs de TGF- $\beta$  font déjà l'objet d'études de thérapies anti-cancéreuses directes car les TGF- $\beta$  sont impliqués dans certains cancers, comme celui du pancréas, du poumon et de l'estomac, et interviennent dans la suppression immunitaire du micro-environnement tumoral, la prolifération tumorale, l'angiogenèse et le processus métastatique, ce qui en fait des molécules d'intérêt [190].



# **Matériels et Méthodes**

## **I. Protocoles expérimentaux**

### **A. Sepsis**

Parmi les modèles animaux qui ont été utilisés pour l'étude des polyneuromyopathies acquises en réanimation, le modèle animal de sepsis par ligature-perforation caecale (CLP) est le plus approprié pour répondre à nos objectifs car c'est celui qui se rapproche le plus des situations cliniques observées chez l'homme. Cette technique, décrite par Wichterman en 1980 [191] est réalisée sous anesthésie générale par administration en IP du mélange xylazine (12mg/kg – Rompun®) et Kétamine (80mg/kg – Imalgène®). L'animal est placé sur une plaque thermostatée durant l'intervention. La paroi abdominale est incisée sur 10mm et le caecum est d'abord repéré puis externalisé à l'aide d'une pince chirurgicale non crantée pour ne pas léser l'organe. Une ligature sub-occlusive est réalisée au moyen d'un fil non coupant et non résorbable (fil tressé 2-0) au niveau de la valvule colo-caecale. Dix perforations calibrées (aiguille 24G) sont pratiquées dans le caecum. Pour les animaux « sham », il y a uniquement ouverture de la paroi abdominale, mais pas de ligature ni de perforation. Le caecum est alors replacé dans la cavité abdominale. L'incision est suturée en deux plans: musculaire (monofil résorbable) et cutané (tressé résorbable). Dans ces conditions, un sepsis chronique est obtenu avec une bonne survie des animaux à 8 jours. L'utilisation d'un fil non résorbable pour la ligature de la valvule colo-caecale est ici indispensable car la ligature doit perdurer une semaine, le temps du sepsis chronique. L'analgésie post-opératoire est assurée par l'administration par voie sous cutanée de buprénorphine (0,10mg/kg) dès la fin de l'intervention chirurgicale et ensuite chaque jour, de façon systématique, jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour. Tous les animaux sont sacrifiés au terme du protocole de 7 jours. Les animaux reçoivent une injection en IP de pentobarbital (100mg/kg), puis après vérification de la profondeur de l'anesthésie (pincement interdigital de la patte postérieure), la mise à mort se fait par élongation des cervicales suivie d'une exsanguination par section des carotides.

### **B. Protocole DanTax**

L'hypothèse de recherche pour cette étude était que le docétaxel était capable d'induire de manière précoce l'activation des systèmes protéolytiques au niveau musculaire, associé à un relargage de cytokines (surtout pro-inflammatoires), et que dans le cas d'une étude

chronique (7 jours) il y avait une atrophie musculaire et une diminution de la force de contraction. L'ajout de dantrolène permettrait d'inhiber ces effets indésirables. Pour ce faire nous avons constitué 2 types d'études dans ce protocole : une en aigu et une en chronique (Figure 28).

La dose de 10mg/kg de docétaxel est choisie par analogie avec la posologie administrée chez les patients, avec un facteur de correction permettant de passer d'une posologie adaptée à l'homme à une adaptée au rat [192]. La voie d'administration est la voie intraveineuse comme chez les patients. Le dantrolène est injecté 2h avant le docétaxel, à 10mg/kg en IP, en accord avec la littérature [76,81,82,102].

L'étude en aigu (lot A) a comporté 4 groupes :

Groupe 1A: injection de NaCl (NaCl à 0,9% dans tous les cas) en IV à J0, et injection en intrapéritonéale (IP) de NaCl à 2 heures avant et 8 heures après l'injection IV.

Groupe 2A: une dose de docétaxel en IV à 10mg/kg à J0, et injection en IP de NaCl 2 heures avant et 8 heures après l'injection IV.

Groupe 3A: injection de NaCl en IV à J0, et une dose de dantrolène en IP à 10mg/kg 2 heures avant et une 8 heures après l'injection IV.

Groupe 4A: une dose docétaxel (10mg/kg) en IV à J0, et dantrolène (10mg/kg) en IP 2 heures avant et 8 heures après l'injection IV.

L'étude en chronique (lot B) a comporté 5 groupes :

Groupe 1B : une injection de NaCl en IV à J0, et injection en IP de NaCl à J0 (2 heures avant et 8 heures après l'injection IV) puis de J1 à J6 une dose par jour.

Groupe 2B : une dose de docétaxel en IV à raison de 10mg/kg à J0, et injection en IP de NaCl à J0 (2 heures avant et 8 heures après l'injection IV) puis de J1 à J6 une dose par jour.

Groupe 3B : injection de NaCl en IV à J0, et 1 dose de dantrolène en IP à 10mg/kg à J0 (2 heures avant et 8 heures après l'injection IV) puis de J1 à J6 une dose par jour.

Groupe 4B : une dose docétaxel (10mg/kg) en IV à J0, et dantrolène (10mg/kg) en IP à J0 (2 heures avant et 8 heures après l'injection IV) puis de J1 à J6 une dose par jour.

Groupe 5B : une dose docétaxel (10mg/kg) en IV à J0, de dantrolène en IP à 10mg/kg à J0 (2 heures avant et 8 heures après l'injection IV), puis une injection en IP de NaCl à J1 à J6.

Pour les animaux du lot A, il y a un prélèvement de sang 3h après l'injection de docétaxel, par la veine de la queue et sous anesthésie à l'isoflurane. Cet échantillon de sang servira au dosage des cytokines. Au bout d'un jour, les animaux sont sacrifiés, le sang, les muscles (cœur, diaphragme, soléaire, péronier et EDL) sont prélevés pour analyses. Pour les animaux du lot B, en plus du suivi quotidien avec les injections, une pesée de la nourriture et des rats est effectuée. Au bout de 7 jours, les contractions du péronier sont enregistrées *in vivo* puis après le sacrifice des animaux les enregistrements des contractions cardiaques sont réalisées *ex vivo*, ainsi que les prélèvements de sang, des muscles (diaphragme, soléaire, péronier et EDL) et du tissu adipeux viscéral.

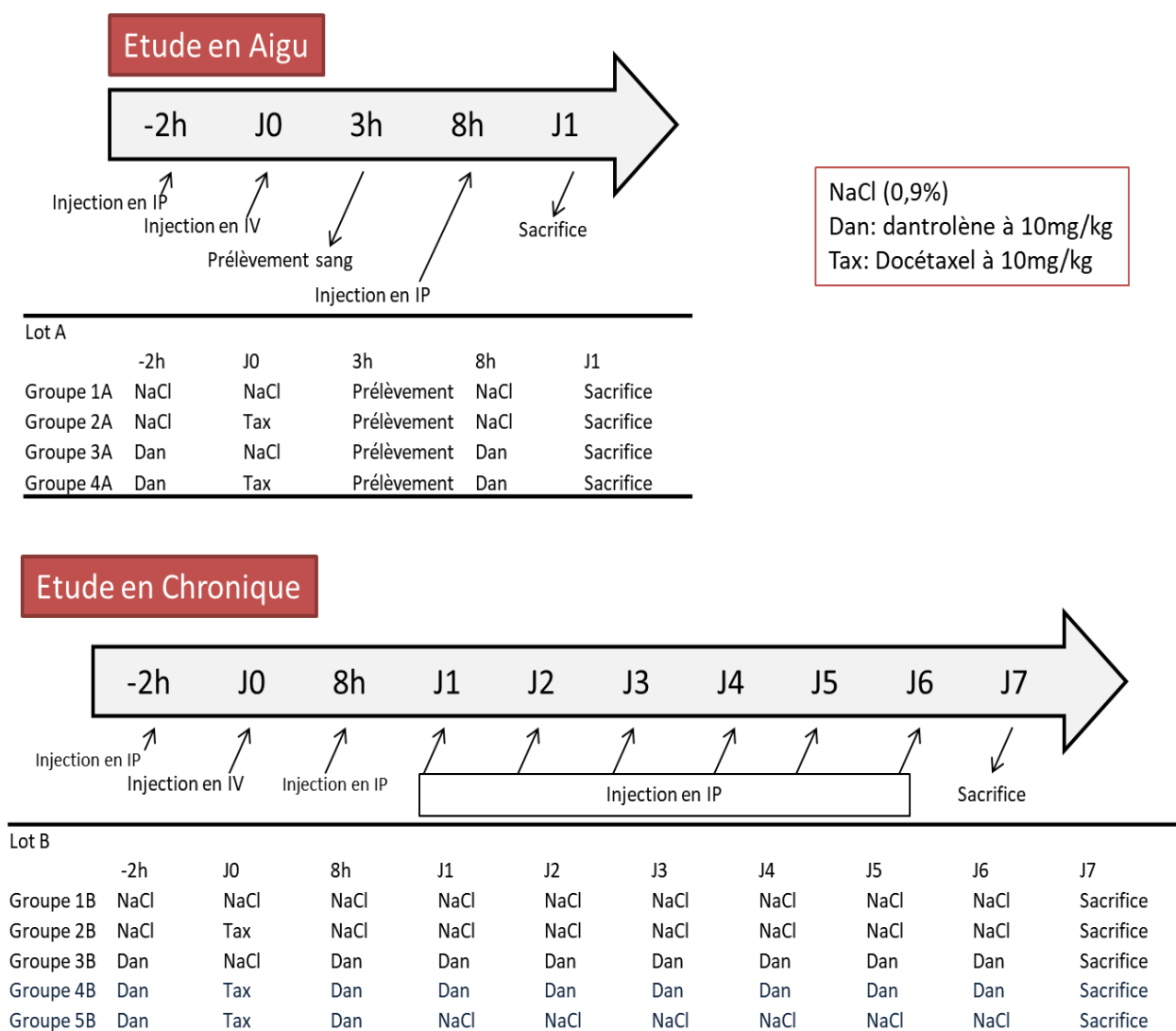


Figure 28 : Protocole Docétaxel-Dantrolène.

## C. Protocole Sepsis TGF- $\beta$

Ce travail se base sur les effets bénéfiques de l'inhibition de la myostatine sur l'atrophie musculaire dans des pathologies impliquant un catabolisme exacerbé, comme la cachexie cancéreuse ou la BPCO (cf. introduction). Les mécanismes induisant la perte de masse musculaire dans ces pathologies sont similaires à ceux retrouvés dans la perte de masse musculaire lors du sepsis. Nous avons voulu étudier l'inhibition de la voie de la myostatine dans cette pathologie.

L'inhibiteur sélectionné est le LY364947, qui est un inhibiteur compétitif du récepteur TGF- $\beta$ R1 (sur les activités ALK4 et ALK5), qui est nécessaire à la transduction du signal après fixation de la myostatine à son récepteur ActRIIB. Sa posologie retenue est de 1mg/kg en IP, en accord avec la littérature [193–196]. Nous avons décidé de faire un premier groupe avec l'inhibiteur administré juste avant (1h) le déclenchement du sepsis, et un second qui reçoit l'inhibiteur seulement 24h après le déclenchement du sepsis. Cela correspond à la situation des patients en service de réanimation, présentant un sepsis qui s'est déclaré plusieurs heures auparavant, par conséquent sans possibilité de prise en charge préventive.

Nous avons constitué 4 groupes :

Groupe A : opérés, non septiques, injection IP de NaCl (0,9%) de J0 à J6.

Groupe B : septiques, injection en IP de NaCl (0,9%) de J0 à J6.

Groupe C : septiques, injection en IP de LY364947 à 1mg/kg de J0 à J6.

Groupe D : septiques, injection en IP de LY364947 à 1mg/kg de J1 à J6.

Les animaux sont suivis quotidiennement durant la procédure, avec pesée des rats et de l'alimentation et injections. Au terme des 7 jours les animaux sont sacrifiés. Les enregistrements des contractions du péronier, du diaphragme et du cœur sont réalisés selon les techniques décrites ci-après. On prélève également le sang, le soléaire, l'EDL et le tissu adipeux viscéral.

## II. Techniques utilisées

### A. Cœur perfusé

La technique du cœur perfusé en système de Langendorff permet d'étudier *ex vivo* les contractions cardiaques en mesurant des paramètres tels que la fréquence, la force de contraction ou bien le débit des coronaires. L'organe est prélevé sur l'animal après euthanasie par surdose de pentobarbital (100mg/kg), élongation des cervicales et exsanguination (section des carotides). La sternotomie est réalisée et le cœur est prélevé le plus vite possible afin de limiter au maximum l'hypoxie. Le cœur est dans un premier temps plongé dans une solution de tyrode (Tableau 2), refroidi et hépariné (0,1 ml d'héparine Choay à 5000 UI/ml dans 100 ml de tyrode), afin d'éviter la coagulation et l'obstruction des vaisseaux. L'aorte est séparée du tissu conjonctif environnant, puis elle est canulée. La canule est reliée à un ballon contenant du tyrode hépariné et placé en hauteur (80 cm) afin d'exercer une pression équivalente à la pression artérielle moyenne chez le rat. Le tyrode est bullé à l'O<sub>2</sub> pur (Air liquide). Le système de perfusion utilisé dans cette étude est équipé d'un thermostat (HAAKE) pour maintenir la température constante pendant toute la durée de la perfusion (37°C), d'un piège à bulles en amont de la canule pour éviter le passage de bulles dans la circulation coronaire et d'une pompe péristaltique (Pharmacia fine chemicals) pour imposer le débit coronaire si besoin.

Tableau 2 : Composition du tyrode

| Tyrode            |        |                   |        |
|-------------------|--------|-------------------|--------|
| NaCl              | 140 mM | MgCl <sub>2</sub> | 1,8 mM |
| KCl               | 5,4 mM | HEPES             | 10 mM  |
| CaCl <sub>2</sub> | 1,8 mM | Glucose           | 11 mM  |
| Ajuster à pH=7,4  |        |                   |        |

L'enregistrement des contractions du myocarde s'effectue à l'aide d'une jauge de contrainte (Harvard - 100g) raccordée à l'apex du cœur par un petit crochet. La jauge est connectée à un ordinateur par l'intermédiaire d'une unité Biopac MP35. Les enregistrements sont réalisés toutes les 5 minutes. Les mesures sur les 20-25 premières minutes servent de contrôle, pour vérifier si la contraction cardiaque est normale et en particulier l'absence d'arythmies. Il y a progressivement une diminution de la fréquence et une augmentation de la force de contraction. L'expérimentation proprement dite est faite ensuite quand les contractions du cœur sont devenues stables. Les molécules d'intérêt qui sont testées, tel que l'IL-13 et le TNF- $\alpha$ , sont ajoutées directement dans le ballon contenant le Tyrode. Les

enregistrements sont analysés à l'aide du logiciel Biopac Student Lab PRO. La fréquence cardiaque et la force de contraction sont déterminées directement à partir des tracés d'enregistrement bruts. Les vitesses de contraction et de relaxation sont calculées à partir des dérivées des tracés d'enregistrement. Le débit coronaire, quant à lui, est mesuré à l'aide de la jauge à bille placée dans le dispositif de perfusion. Le cœur n'est pas stimulé : il bat spontanément.

## **B. Contraction du péronier**

Après anesthésie au Pentobarbital en IP à 80 mg/kg, l'animal est placé sur le montage de contraction du péronier qui est thermostaté à 37°C. Après ouverture de la peau de l'animal au niveau de la face latérale de la patte gauche, le péronier est mis en évidence avec son tendon distal. Ce tendon est attaché à la jauge de contrainte (WPI - UK) puis sectionné distalement. Le nerf sciatique poplité externe est mis en évidence et l'électrode de stimulation (électrode bipolaire en argent) est placée juste sous le nerf. Les enregistrements se font grâce au logiciel WinWCP.

Les premières stimulations (0,5msec, 5V) vont permettre de déterminer la L0, qui correspond à la longueur du muscle pour laquelle on observe la force active maximale, avec une force passive négligeable. Cela est réalisé en étirant progressivement le muscle, en déplaçant la jauge au moyen d'une vis micrométrique graduée, tout en enregistrant des contractions isolées. Sur un enregistrement de contraction musculaire le tracé de la force musculaire totale comprend la force active et la force passive. La force active correspond à la force générée par le muscle lors de sa contraction, alors que la force passive correspond à la force élastique du muscle qui augmente de manière proportionnelle à la tension mécanique appliquée. Elle est due à l'étirement des fibres de collagène et des protéines comme la titine en particulier. La force totale est la résultante de ces deux forces, avec dans un premier temps la contribution de la force active puis, en augmentant l'élongation du muscle, la force passive augmente tandis que la force active tend vers 0 (Figure 29).

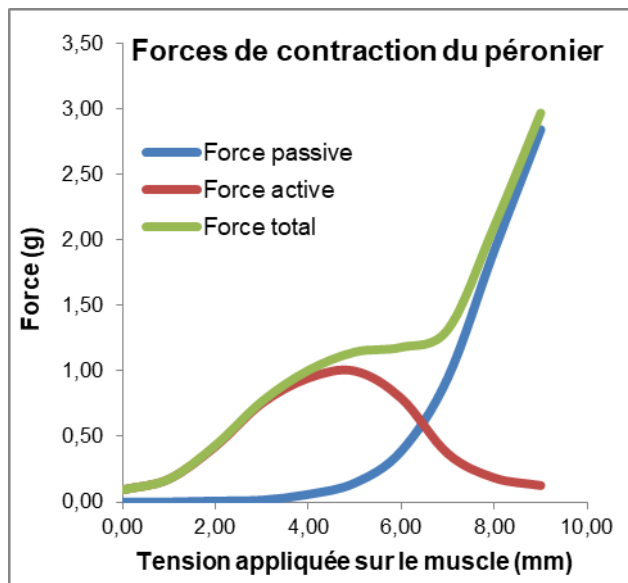


Figure 29 : Différents types de forces de contraction du péronier.

Le premier enregistrement est une contraction isolée (*twitch*), qui se fait sur 3 stimulations isolées (5V de 0,5ms) chacune espacées de 2s. Généralement 2 enregistrements sont faits à la suite pour vérifier la répétabilité des enregistrements. Avec l'enregistrement obtenu on pourra calculer la force de contraction, ainsi que les temps de contraction et de demi-relaxation (Figure 30).

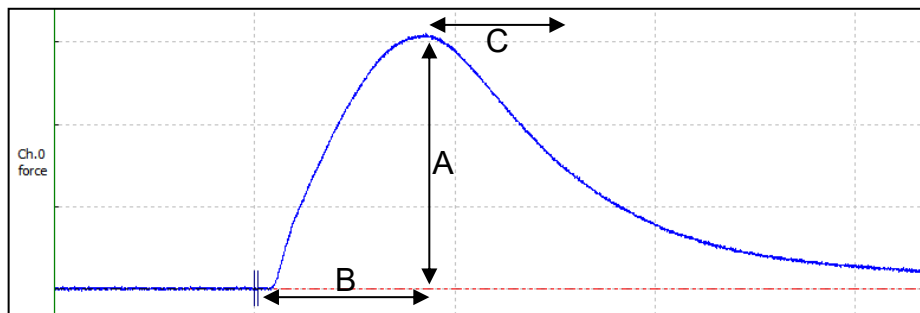


Figure 30 : Exemple de tracé de contraction de péronier.

A, amplitude de contraction (g) ; B, temps de contraction (ms) ; C, temps de demi-relaxation (ms).

Ensuite la relation Force-Fréquence est déterminée en traçant la courbe donnant l'amplitude de la contraction en fonction de la fréquence. Cela permet de caractériser le phénotype musculaire car les muscles lents vont tétaiser pour des fréquences plus basses que pour les muscles rapides. Des stimulations de 5V d'amplitude et de 0,5ms sont appliquées au nerf aux fréquences de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80, 100 Hz et sur une période de

400ms. Il y a un enregistrement pour chaque fréquence avec un temps de récupération entre chaque de 30 secondes.

Un enregistrement de contraction isolée est réalisé ensuite pour vérifier que les caractéristiques de la contraction sont conservées puis la détermination de l'index de fatigue est réalisée suivant un protocole inspiré de celui de Burke. Cela consiste en une répétition de téтанos pour fatiguer le muscle. Pour ce faire, le muscle est stimulé pour obtenir un téтанos imparfait (12 stimulations de 5V d'amplitude sur 0,5ms, espacées de 25ms soit une fréquence de 40Hz). Il y a 120 répétitions, avec 1s entre chaque train de stimulations. Pour le calcul de l'indice de Burke, on calcule le rapport entre l'amplitude de la force du dernier enregistrement (120<sup>ème</sup>) sur le premier. Plus ce ratio est proche de 1 moins le muscle sera considéré comme fatigable.

### **C. Contraction du diaphragme**

Le protocole de contraction du diaphragme est analogue à celui du péronier mais ici c'est une contraction *ex-vivo*. Après euthanasie de l'animal (cf. partie contraction du cœur), le diaphragme est retiré du thorax du rat avec un anneau costal afin de préserver au mieux le muscle. Celui-ci est plongé dans du Tyrode glucosé (Tableau 2) puis coupé selon un axe antéro-dorsal médian en 2 morceaux équivalents. Ces morceaux sont à nouveau coupés pour obtenir 2 quarts de diaphragme (en forme de triangles), localisés dans la partie antérieure du muscle, qui sont utilisés pour la contraction. Le reste du muscle (les 2 quarts postérieurs) est congelé pour des analyses. Pour la contraction, les parties sectionnées des côtes sur lesquelles le muscle est accroché servent à fixer la préparation sur le fond de la cuve expérimentale qui est recouvert de silicone. La partie centrale tendineuse du diaphragme est attachée à la jauge de contrainte au moyen d'un fil inextensible. La cuve est baignée dans le tyrode glucosé, thermostaté à 37°C, oxygéné et renouvelé en continu grâce à une pompe péristaltique. L'électrode de stimulation (monopolaire en argent) est placée sur le diaphragme au niveau de la zone costale. Une électrode de référence (Ag/AgCl) est placée dans la cuve. De la même manière que pour la contraction du péronier, la L0 est déterminée avant les mesures.

Le protocole de stimulation pour le « *twitch* » est identique à celui utilisé pour le péronier. Même chose pour le protocole force-fréquence, à la seule différence que pour le diaphragme nous avons stimulé aux fréquences 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 Hz. Pour le test de Burke, en revanche le protocole est légèrement différent : le diaphragme est stimulé 50 fois au lieu de 120, avec des trains de 12 stimulations de 5V

d'amplitude sur 0.5ms, mais espacées de 20s car le diaphragme *ex vivo* est un muscle beaucoup plus fatigable que le péronier *in vivo*.

## **D. Patch clamp**

Le Patch clamp est une technique qui permet d'étudier les courants ioniques qui traversent la membrane cellulaire. Ici c'est le courant sodique qui traverse la membrane plasmique des cardiomyocytes isolés. Dans notre étude cela a pour intérêt d'étudier l'excitabilité membranaire qui est la première étape dans le couplage excitation-contraction qui conditionne la contraction musculaire.

### *a. Dissociation des cardiomyocytes*

La dissociation des cardiomyocytes se fait avec le système de perfusion en Langendorff comme expliqué précédemment. Le cœur est perfusé avec du tyrode sur le montage pendant 15-20min, puis il est perfusé avec du tyrode sans calcium (Tyrode 0Ca) à 37°C pendant 5min (Tableau 3). Cela va entraîner l'arrêt des contractions cardiaques et favorise également la rupture des jonctions intercellulaires. Le cœur est ensuite perfusé avec la solution enzymatique (collagénase de type II Gibco et protéase XIV Sigma-Aldrich) sans calcium (environ 70ml) pendant 2min puis, on ajoute 2ml de CaCl<sub>2</sub> à 100mM, le calcium étant nécessaire à l'action de la collagénase. La perfusion est poursuivie pendant encore 18min, puis le cœur est débranché du système de perfusion pour être plongé dans la solution enzymatique que l'on récupère. On coupe les oreillettes afin de ne garder que le myocarde ventriculaire. Le myocarde est dissocié mécaniquement tout d'abord à l'aide d'une lame de bistouri, puis par flux et reflux à l'aide d'une micropipette de 1ml, à cône élargi afin de ne pas abimer les cellules. La suspension cellulaire est plongée dans 20ml de Kraftbrühe (KB) afin de permettre aux cellules de reconstituer l'intégrité de leur membrane. Cette suspension est centrifugée 1min à 1000g. Le culot est prélevé et resuspendu dans 20ml de tyrode 0Ca. Cette solution est recalciée progressivement par ajout de CaCl<sub>2</sub> à 100mM (5 fois 40µl sur 20min) pour éviter les contractures irréversibles des cellules les rendant inutilisables (paradoxe calcique). La suspension est aliquotée en boîte de Pétri de 35mm traitées culture, ce qui favorise l'adhésion des cardiomyocytes au plastique et la réalisation du patch clamp par la suite. Les boîtes sont placées 2 à 3h à 4°C. Les mesures sont ensuite réalisées dans les 12h qui suivent la dissociation, à température de la pièce (22°C +/- 1°C).

Tableau 3 : Composition des solutions utilisées pour la dissociation et le patch-clamp des cardiomyocytes.

| Tyrode            |        |                   |        |
|-------------------|--------|-------------------|--------|
| NaCl              | 140 mM | MgCl <sub>2</sub> | 1,8 mM |
| KCl               | 5,4 mM | HEPES             | 10 mM  |
| CaCl <sub>2</sub> | 1,8 mM | Glucose           | 11 mM  |
| Ajuster à pH=7,4  |        |                   |        |

| Solution enzymatique (70 ml) |            |             |          |
|------------------------------|------------|-------------|----------|
| Tyrode 0Ca                   | 70 ml      | Collagénase | 500U m/l |
| Protéase XIV                 | 0,104 U/ml |             |          |

| Solution de CaCl <sub>2</sub> |        |
|-------------------------------|--------|
| CaCl <sub>2</sub>             | 100 mM |
| Ajuster à pH=7,4              |        |

| Milieu CsCl      |        |                   |       |
|------------------|--------|-------------------|-------|
| CsCl             | 145 mM | MgCl <sub>2</sub> | 1 mM  |
| EDTA             | 5 mM   | HEPES             | 10 mM |
| Ajuster à pH=7,4 |        |                   |       |

| Tyrode sans calcium (0Ca) |        |                   |        |
|---------------------------|--------|-------------------|--------|
| NaCl                      | 140 mM | MgCl <sub>2</sub> | 1,8 mM |
| KCl                       | 5,4 mM | HEPES             | 10 mM  |
| Taurine                   | 20 mM  | BSA               | 1 g/l  |
| Glucose                   | 11 mM  |                   |        |
| Ajuster à pH=7,4          |        |                   |        |

| Kraftbrühe                      |         |                     |        |
|---------------------------------|---------|---------------------|--------|
| KCL                             | 70 mM   | EGTA                | 0,5 mM |
| Glutamate                       | 5 mM    | Créatinine          | 5 mM   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 20 mM   | Na <sub>2</sub> ATP | 5 mM   |
| MgSO <sub>4</sub>               | 5 mM    | taurine             | 20 mM  |
| CaCl <sub>2</sub>               | 0,08 mM | HEPES               | 20 mM  |
| BSA                             | 4 g/l   | Glucose             | 10 mM  |
| Ajuster à pH=7,4                |         |                     |        |

### *b. Patch-Clamp*

Les enregistrements sont réalisés grâce à des micropipettes en verre borosilicaté (Phymep) avec un diamètre de 1,5mm. Elles sont étirées puis polies à l'aide d'une étireuse (Zeitz Instruments) afin d'obtenir une pointe de 3µm de diamètre. L'apposition de la micropipette sur la membrane s'effectue grâce à un manipulateur hydraulique (Narishige) sous contrôle d'un microscope optique inversé (Olympus) muni d'une caméra (Sony). Le microscope est placé sur une table anti-vibration et sous une cage de Faraday afin d'éviter tout parasitage mécanique ou électrique.

Les cellules sont placées dans un milieu chlorure de césium CsCl (1ml ajouté pour 1ml de suspension cellulaire) ce qui bloque les canaux potassiques et supprime le potentiel de membrane. Le milieu CsCl contient également de l'EDTA qui est un chélateur de Ca<sup>2+</sup> et permet de bloquer les canaux calciques afin de mesurer uniquement les courants sodiques. La micropipette de mesure utilisée contient du milieu normal (Tyrode tamponné à l'Hepes). Les enregistrements sont réalisés à l'aide du logiciel WinWCP. Les cellules utilisables sont reconnaissables avec leur aspect irrégulier et leurs striations nettes (Figure 31).

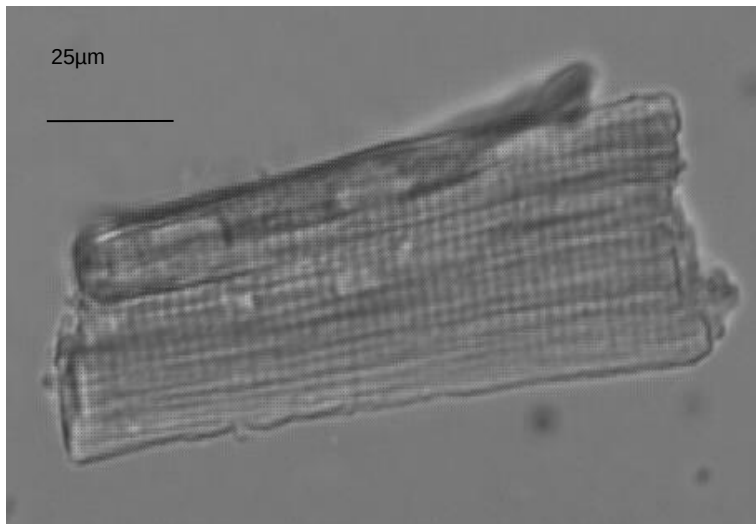


Figure 31 : Image de cardiomyocyte dissocié.  
Image prise au microscope inversé à contraste interférentiel.

Pour le protocole de stimulation, le potentiel de membrane des cardiomyocytes est fixé à  $-120\text{mV}$  car ce sont des cellules ayant un potentiel de repos élevé, de l'ordre de  $-90\text{ mV}$ . Le fait d'imposer un potentiel de membrane de  $-120\text{ mV}$  permet d'avoir la quasi-totalité des canaux sodiques à l'état activable (plus le potentiel est faible, plus il y a de canaux inexcitables). Un premier protocole de stimulation (*INa new* sur le logiciel WinWCP) est appliqué pour mesurer le courant sodique maximal et déterminer l'activation des canaux sodiques: des impulsions de potentiel de  $-80$  à  $+110\text{ mV}$  sont appliquées par incrément de  $10\text{ mV}$  sur une durée de  $20\text{ ms}$ . Un second protocole de stimulation (*INa050* sur le logiciel WinWCP) est utilisé pour déterminer l'inactivation des canaux sodiques : des pré-potentiels de  $50\text{ ms}$  de  $-140$  à  $-10\text{ mV}$  par incrément de  $10\text{ mV}$  sont appliqués, avant le *pulse-test* proche de la valeur permettant d'obtenir le courant maximum. Pour tester les effets de molécules sur les courants, tel que des cytokines, les enregistrements sont réalisés en condition contrôle puis, après ajout de la molécule à la concentration voulue, les enregistrements sont réalisés à nouveau à différents intervalles de temps ( $5, 10, 15, 20\text{min}...$ ).

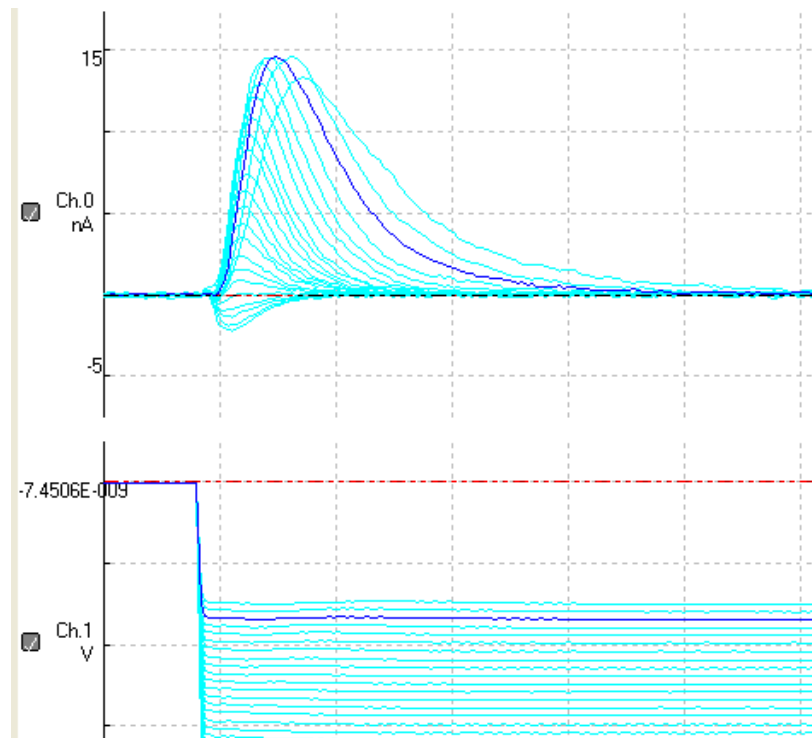


Figure 32 : Exemple d'enregistrement de courant sodique.

Copie d'écran représentant en haut les courants sodiques (inversés), et en bas les différents potentiels imposés (inversés).

### *c. Analyse des courants sodiques*

La courbe Intensité-Voltage ou courbe I-V représente la relation entre l'intensité du courant sodique (en nA) en fonction de la valeur de potentiel imposé (en mV) (Figure 33). Elle permet de déterminer plusieurs paramètres: le courant sodique maximal ( $I_{Na_{max}}$  en nA) donné par le pic de la courbe, la conductance sodique maximale ( $g_{Na_{max}}$  en nS) représentée par la pente de la courbe et le potentiel d'équilibre du sodium ( $E_{Na}$  en mV) donné par le point d'intersection entre la courbe et l'axe représentant les différentes valeurs de potentiels imposées.

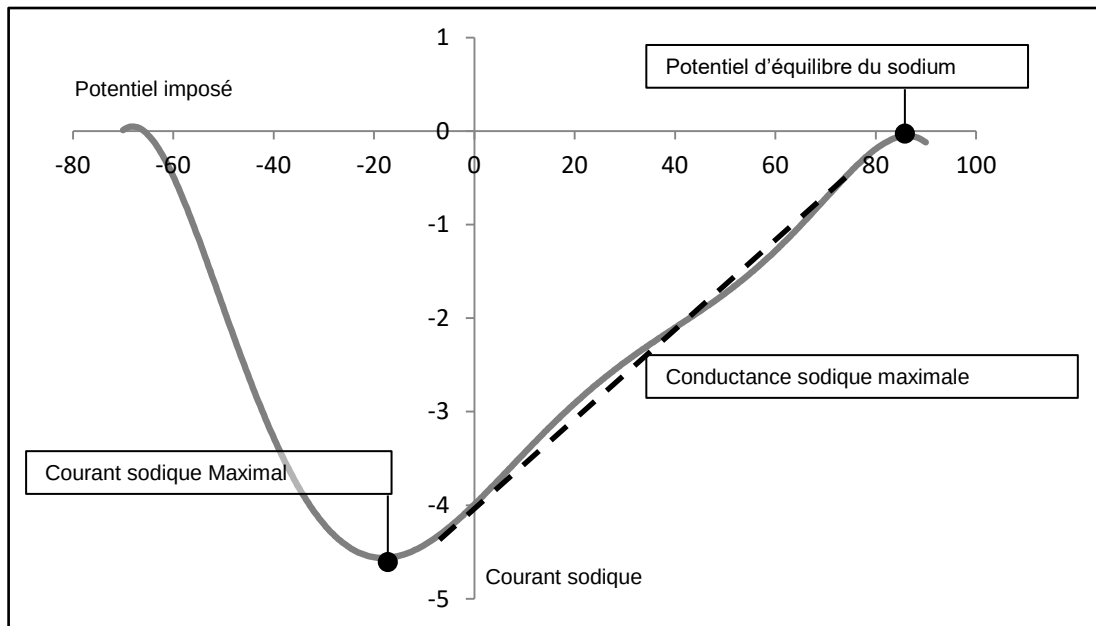


Figure 33 : Caractéristiques de la courbe I-V.

L'activation et l'inactivation des canaux sodiques sont deux propriétés dépendantes de la valeur de potentiel imposé (Figure 34 : Caractéristiques des courbes d'activation et d'inactivation. Figure 34). La courbe d'activation représente la probabilité d'ouverture des canaux sodiques et s'exprime par le rapport  $g_{Na}/g_{Na_{max}}$ . La courbe d'inactivation, quant à elle, donne la probabilité de fermeture des canaux sodiques et s'exprime par le rapport  $I_{Na}/I_{Na_{max}}$ . Pour chacune des courbes, il est possible de déterminer le  $V_{1/2}$ , ou  $V_{inflexion}$ , correspondant à la valeur de potentiel imposée pour laquelle 50% des canaux sont à l'état ouvert.

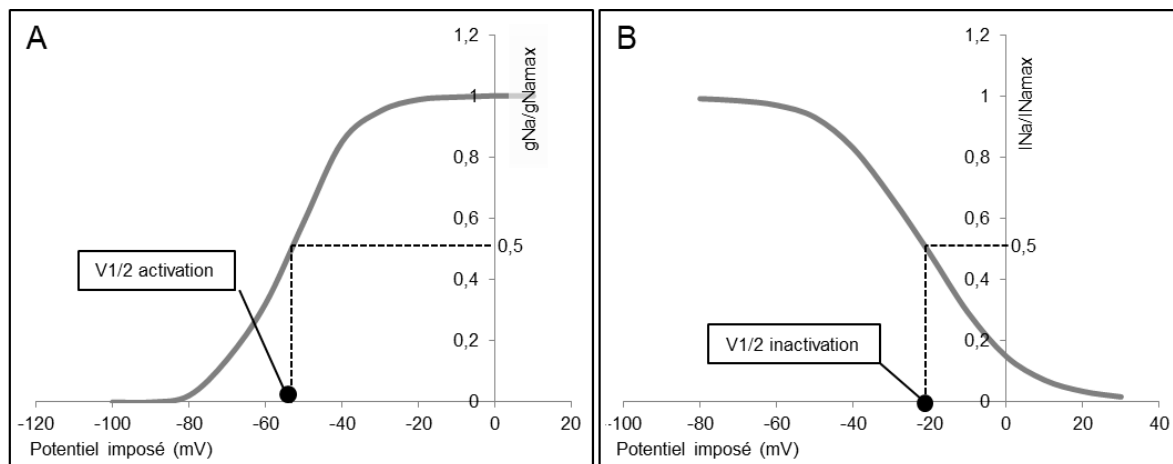


Figure 34 : Caractéristiques des courbes d'activation et d'inactivation.

## E. Western blot

Le western-blot a été utilisé pour étudier les taux d'expression des protéines d'intérêt car c'est une technique commune et simple à mettre en œuvre et, de plus, il existe un grand nombre d'anticorps spécifiques.

L'extraction des protéines a été faite selon différentes conditions : l'utilisation d'un kit pour séparer les protéines membranaires des protéines cytosoliques, un tampon pour séparer les protéines cytosoliques des protéines nucléaires, et enfin un dernier tampon pour les protéines totales.

### *a. Extraction des protéines membranaires*

Pour quantifier les  $Na_v$  et en particulier le *pool* actif de canaux, c'est à dire ceux qui sont ancrés dans la membrane, il fallait différencier les protéines membranaires des protéines cytosoliques, contrairement à d'autres études qui quantifient les protéines totales. Nous avons utilisé le kit « *Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction* » car il permet d'obtenir un lysat de protéines membranaires sans passer par une étape d'ultracentrifugation et qu'il est simple d'utilisation. Nous avons suivi les recommandations du kit pour l'extraction des protéines des muscles.

### *b. Extraction des protéines cytosoliques/nucléaires*

Ce protocole a été utilisé initialement afin de séparer les protéines cytosoliques des protéines nucléaires pour déterminer si certaines pouvaient être adressées au noyau, tels que des facteurs de transcription, suite à des conditions particulières comme la chimiothérapie.

Procédure :

Entre 100mg et 200mg de tissu sont broyés à l'Ultra Turrax dans 1,5ml tampon de lyse 1 (Tableau 4), puis placé 15min dans la glace pour une meilleure lyse. L'homogénat est centrifugé 5min à 100g puis 1min à 200g, le tout à 4°C. Le surnageant est aliquoté (protéines cytosoliques) et le culot est remis en suspension avec 750µL de tampon2. Après 15min d'incubation dans la glace les échantillons sont centrifugés 20min à 15000g à 4°C, puis le surnageant est aliquoté également (protéines nucléaires).

Tableau 4 : Composition des tampons d'extraction des protéines cytosoliques et nucléaires.

| Tampon 1           |              | Tampon 2           |             |
|--------------------|--------------|--------------------|-------------|
| HEPES pH 7.9 (KOH) | 10 mM        | HEPES pH 7.9 (KOH) | 20 mM       |
| MgCl <sub>2</sub>  | 1.5 mM       | MgCl <sub>2</sub>  | 1.5 mM      |
| KCl                | 10 mM        | NaCl               | 420 mM      |
| DTT                | 0.5 mM       | DTT                | 0.5 mM      |
| Igepal             | 0.5% vol/vol | EDTA               | 0.2 mM      |
|                    |              | Glycerol           | 25% vol/vol |

### c. Extraction des protéines totales

Procédure :

Environ 100mg de muscle sont broyés à l'Ultra Turrax dans 1ml tampon de lyse (Tableau 5). L'homogénat est placé dans la glace pendant 15min puis centrifugé à 12000g pendant 10min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines totales est alors aliquoté.

Tableau 5 : Composition du tampon d'extraction des protéines totales.

|                |            |
|----------------|------------|
| Tris HCL       | 20 mM      |
| NaCl           | 150 mM     |
| EDTA           | 2 mM       |
| EGTA           | 2mM        |
| Igepal         | 1% vol/vol |
| pH final : 7,9 |            |

La détermination de la concentration protéique des extraits est réalisée grâce au test de Bradford : 4µL d'échantillon (dilué au 1/10) est mélangé à 200µL de réactif de Bradford (Sigma) en plaque 96 puits, et une gamme étalon de BSA (*bovine serum albumine*) est réalisée sur la même plaque (de 1mg/ml à 0mg/ml). La lecture de la DO est faite en une seule lecture à 595nm.

Pour le Western-blot la même procédure a été suivie à chaque fois avec des spécificités pour certaines protéines. Les échantillons ont été mélangés avec du Laemmli contenant du β-mercapthoéthanol (10%). Le volume à déposer est calculé à partir de la concentration protéique des échantillons. Nous sommes ici à quantité constante de protéine. Elle peut dépendre de la protéine elle-même, de son abondance tissulaire et de l'efficacité de l'anticorps

primaire (Tableau 8). Le volume à déposer est aliquoté, chauffé à 95°C pendant 4min, sauf pour les Na<sub>v</sub>1.4 et Na<sub>v</sub>1.5.

Nous avons utilisé le système de western blot BIO-RAD Mini-PROTEAN avec le système de 4 gels de 1,5mm d'épaisseur. La composition du gel de séparation est différente en fonction de la taille de la protéine étudiée (Tableau 6 ; Tableau 7). Pour les Na<sub>v</sub>1.4 et Na<sub>v</sub>1.5 nous avons utilisé des gels à 6% d'acrylamide, pour β1/ β3/ β4 des gels à 12% d'acrylamide, et pour les autres protéines des gels à 9% d'acrylamide.

Tableau 6 : Composition des gels d'électrophorèse

| 4 gels de séparation à 6% |        | 4 gels de séparation à 9% |        |
|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| 40% Acrylamide            | 5,4 ml | 40% Acrylamide            | 8,2 ml |
| Bis-Acrylamide            | 2,3 ml | Bis-Acrylamide            | 3,3 ml |
| H2O                       | 20 ml  | H2O                       | 16 ml  |
| Séparation 4X             | 9,3 ml | Séparation 4X             | 9,2 ml |
| APS 10%                   | 200 µl | APS 10%                   | 200 µl |
| TEMED                     | 30 µl  | TEMED                     | 30 µl  |

| 4 gels de séparation à 12% |         | 4 gels de concentration |         |
|----------------------------|---------|-------------------------|---------|
| 40% Acrylamide             | 11 ml   | 40% Acrylamide          | 4 ml    |
| Bis-Acrylamide             | 4,5 ml  | Bis-Acrylamide          | 1,5 ml  |
| H2O                        | 12,4 ml | H2O                     | 11,8 ml |
| Séparation 4X              | 9,2 ml  | Concentration 8X        | 2,5 ml  |
| APS 10%                    | 150 µl  | APS 10%                 | 100 µl  |
| TEMED                      | 20 µl   | TEMED                   | 20 µl   |

Tableau 7 : Composition des tampons du Western blot

| Tampon de séparation 4X   |       | Tampon de concentration 8X |       |
|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| Tris-base                 | 1,5 M | Tris-base                  | 1 M   |
| SDS                       | 0,50% | SDS                        | 1,00% |
| Ajuster à pH 8,8 avec HCl |       | Ajuster à pH 6,8 avec HCl  |       |

| Tampon de migration 10X |        | TBS 10X                   |        |
|-------------------------|--------|---------------------------|--------|
| Tris-base               | 0,25 M | Tris base                 | 200 mM |
| Glycine                 | 1,92 M | NaCl                      | 1,5 M  |
| SDS                     | 1%     | Ajuster à pH 7,5 avec HCl |        |

| Tampon de transfert (1 l) |        | TBST (1l) |        |
|---------------------------|--------|-----------|--------|
| Tampon de migration 10X   | 100 ml | TBS 1X    | 1 l    |
| Ethanol                   | 200 ml | Tween 20  | 500 µl |
| Eau                       | 700 ml |           |        |

Les gels sont déposés dans la cuve avec le tampon de migration 1X. Après le dépôt des échantillons et du marqueur de taille (*Precision plus protein standards dual color* de chez BIO-RAD), la migration est lancée à 70-80V pendant quelques heures. Le temps de migration est ajusté en fonction de la taille de la protéine afin que celle-ci se retrouve vers le tiers inférieur du gel. Ensuite le transfert se fait sur membrane de PVDF (Polyfluorure de vinylidène) (Immobilon, pores de 0,45µm) dans le tampon de transfert, 1h à 110V. Les membranes sont lavées 10min dans du TBST (*Tris Buffered Saline* + Tween 20) sur agitation, ensuite incubées 1heure dans du TBST avec 5% de lait écrémé. Après 2x10min de rinçage dans du TBST les membranes sont incubées dans une solution de TBST+lait 1% avec l'anticorps d'intérêt. La concentration de l'anticorps primaire varie en fonction de la « qualité » de ce même anticorps, déterminée lors de sa mise au point dans les conditions expérimentales (Tableau 8). L'incubation avec l'anticorps primaire se fait durant 12h à 4°C sous agitation douce. Les membranes sont rincées ensuite pendant 3x20min dans du TBST, puis vient l'incubation avec l'anticorps secondaire couplé au HRP (*Horseradish peroxidase*) dilué au 1/2000 dans du TBST+lait 1% à température ambiante 1h.

Tableau 8 : Liste des anticorps et quantité de protéines utilisés pour le Western blot.

|                             | Anticorps           | µg de protéines | Dilution 1/ | Référence       |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|-------------|-----------------|
| <b>Anticorps primaire</b>   | Na <sub>v</sub> 1.4 | 80              | 200         | Alomone lab     |
|                             | Na <sub>v</sub> 1.5 | 80              | 1000        | Sigma-Aldrich   |
|                             | β1                  | 20              | 1000        | Abcam: ab86931  |
|                             | β3                  | 20              | 2000        | Abcam: ab48552  |
|                             | β4                  | 20              | 1000        | Abcam: ab80539  |
|                             | PKC-α               | 60              | 1000        | Abcam: ab32376  |
|                             | PKC-ε               | 60              | 500         | Abcam: ab124806 |
|                             | Calpain 1           | 50              | 1000        | Abcam: ab155677 |
|                             | Calpain 2           | 50              | 1000        | Abcam: ab155666 |
|                             | MAFbx               | 50              | 1000        | Abcam: ab168372 |
|                             | SMAD3               | 50              | 5000        | Abcam: ab40854  |
|                             | p-SMAD3             | 50              | 2000        | Abcam: ab52903  |
|                             | GAPDH               | 50              | 10000       | Abcam: ab9484   |
| <b>Anticorps secondaire</b> | HRP anti-rabbit     |                 | 2000        | Abcam: ab6802   |
|                             | HRP anti-mouse      |                 | 2000        | Abcam: ab6728   |

Après 3x20min dans du TBST les membranes sont placées dans du TBS. La révélation se fait par ECL (*enhanced Chemiluminescence*) après incubation 30sec-1min dans le tampon ECL (Tableau 9), grâce au système d'acquisition Vilber-Lourmat Fusion SL. Les images sont ensuite analysées avec le logiciel Image Studio Lite (LI-COR, Biosciences).

Tableau 9 : Composition du tampon ECL

| Tampon ECL (10 ml)                    |                                            |
|---------------------------------------|--------------------------------------------|
| 10 ml tampon Tris-HCl                 | Tris-HCl 100mM ph 8,5                      |
| 3µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% |                                            |
| 50µl luminol                          | 0,886g de luminol dans 20ml DMSO           |
| 25µl d'acide p-coumarique             | 0,148g d'acide p-coumarique dans 10ml DMSO |

## F. Dosage des cytokines

Le dosage des cytokines a été réalisé à l'aide du kit « *Rat Inflammation Antibody Array (10 Targets) – Quantitative* » de chez Abcam (ab197484). Le principe utilisé est le même que pour l'ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), sauf que les Ac primaires sont fixés sous forme de *spot* sur une lame de verre, et qu'il y aura quantification de l'intensité de fluorescente de ces *spots* à l'aide d'un scanner. 80µl de plasma ont été utilisés pour ce dosage. La lecture des lames a été effectuée avec un scanner de type Agilent G2539A, et les résultats ont été analysés avec le logiciel Agilent également.

# **Introduction des travaux de thèse**

## **I. Article 1 : Effet inotrope négatif rapide du TNF- $\alpha$ sur des cœurs de rats perfusés, associé à l'activation des PKC**

Accepté à la publication dans le journal Cytokine.

## Introduction

Le TNF- $\alpha$  est considéré comme une des cytokines majeures de la réponse pro-inflammatoire lors du sepsis. Son impact péjoratif sur l'excitabilité membranaire a déjà été étudié au laboratoire sur des fibres d'EDL et de péronier [197], par ailleurs ses effets chronotrope et inotrope négatifs sur la fonction cardiaque sont déjà connus [198,199]. Néanmoins, son mécanisme d'action n'est pas totalement identifié et aucune étude n'a porté directement sur l'effet de cette cytokine sur l'excitabilité membranaire cardiaque. C'est pourquoi, pour cette étude, nous avons perfusé des cœurs de rat en système de Langendorff, avec du TNF- $\alpha$  à 20ng/ml qui est la concentration moyenne trouvée dans la littérature. Cette cytokine est capable de diminuer l'excitabilité membranaire des fibres de péronier, et cela de manière PKC dépendante. Nous avons donc réalisé l'extraction des protéines sur les cœurs perfusés avec le TNF- $\alpha$  pour confirmer l'activation des mêmes mécanismes. L'expression des isoformes PKC- $\alpha$  et PKC- $\epsilon$ , connues pour leur implication dans la dysfonction cardiaque, a été mesurée par Western-blot. De plus, des mesures de courants ont été réalisées sur des cardiomyocytes isolés avec le TNF- $\alpha$  par patch clamp, afin de déterminer si cette cytokine diminuait l'excitabilité membranaire des cardiomyocytes.

# **Rapid negative inotropic effect induced by TNF- $\alpha$ in rat heart perfused related to PKC activation**

**Authors:** Jude B<sup>1</sup>, Vetel S<sup>1</sup>, Giroux-Metges MA<sup>1,2</sup> Pennec JP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie - EA 4324 ORPHY, IBSAM, Université de Bretagne Occidentale, Brest - France.

<sup>2</sup> Explorations Fonctionnelles Respiratoires, CHRU de Brest, Brest – France.

**Corresponding author:** Baptiste Jude

Laboratoire de Physiologie – EA4324 ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, 22 Avenue Camille Desmoulins 29238 Brest, Cedex 3 France

Telephone: +33(0)2 98 01 64 62

Email address: [bjude@outlook.fr](mailto:bjude@outlook.fr)

## **Abstract:**

Myocardial depression, frequently observed in septic shock, is mediated by circulating molecules such as cytokines. TNF- $\alpha$  appears to be the most important pro-inflammatory cytokine released during the early phase of a septic shock. It was previously shown that TNF- $\alpha$  had a negative inotropic effect on myocardium. Now, the aim of this study was to investigate the effects of the activation of PKC by TNF- $\alpha$  on heart function, and to determine if this cytokine could induce a decrease of membrane excitability. Isolated rat hearts (n=6) were perfused with Tyrode solution containing TNF- $\alpha$  at 20ng/ml during 30min by using a Langendorff technique. Expressions of PKC- $\alpha$  and PKC- $\epsilon$  were analysed by western blot on membrane and cytosol proteins extracted from ventricular myocardium. Patch clamp was performed on freshly isolated cardiomyocytes (n=8).

Compared to control situation, 30 min of TNF- $\alpha$  perfusion led to cardiac dysfunction with a decrease of the heart rate (-83%), the force (-20%) and speed of relaxation (-18%) and the coronary flow (-25%). This is associated with an activation and a membrane targeting of both PKC- $\alpha$  and PKC- $\epsilon$  isoforms in ventricle with respectively +123% and +54% compared to control hearts. Nevertheless, TNF- $\alpha$  had no significant effect on voltage-gated sodium current ( $109.0\% \pm 12.5$ ) after addition of the cytokine when compared to control.

These results showed that TNF- $\alpha$  had a negative inotropic effect on the isolated rat heart and can induce PKC activation leading to an impaired contractility of the heart. However the early heart dysfunction induced by the cytokine was not associated to a decrease of cardiomyocytes membrane excitability as it has been evidenced in skeletal muscle fibres.

### **Keywords**

TNF- $\alpha$ ; Heart; PKC; Membrane excitability

### **Abbreviations**

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$ ; PKC: Protein kinase C; SERCA-2: sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2; Nav: voltage gated sodium channels.

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## **Introduction**

Septic choc is one of the major cause of death in intensive care units [1]. It is associated to vasodilation, decreased arterial and venous resistance, acute myocardial depression [2], all these effects leading to the decrease of blood pressure which in turn induces impaired organs perfusion and organs failure. This myocardial depression is mediated by circulating depressant substances, which until now have been incompletely characterized [3]. Most of the studies have shown the influence of cytokines on isolated cardiomyocytes, and deduced their role on contractility and left ventricular function (4), but only few have focused on the effects of cytokines on the whole heart. Experimental studies, in both human and animal, indicate that tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is among the most important pro-inflammatory cytokines released during sepsis [4], particularly during the early phase of septic shock.

Protein kinase C (PKC) are serine-threonine protein calcium and/or lipid activation dependent, which are involved in wide signal transduction pathways [5]. A loss of cardiac efficiency in the early phase of heart failure is associated with an increase of PKC activity [6]. Inhibition of the PKC- $\alpha$  isoform has been associated with a positive action in this case [7]. Nevertheless the mechanisms involved in PKC activation remains poorly understood. The aim of this study is to determine if myocardial dysfunction induced by TNF- $\alpha$  is related to PKC activation and the link with a possible negative effect on the heart contractile force and on the membrane excitability of cardiomyocytes.

## **Materials and Methods**

### Animals

Female wistar rats (average 250g) were used for the experimentations. All the animals were purchased from Janvier (Le Genest SaintIsle, France) and housed in the same place at 23°C, with a 12-hr daylight cycle and fed *ad libitum* with standard rat pellets. The experiments (protocol No. 02076.01) were performed according to our ethical regional committee ("Comité d'éthique Finistérien en expérimentation animale") with the departmental agreement No. A29-019-03, and realized according to the recommendation of the European Community directive No. 2010/63/EU.

### Isolated Rat Heart Preparations and Recordings

The rats were anesthetized with pentobarbital (100mg/kg, intraperitoneal), then killed by cervical dislocation and exsanguination. Rapidly, the heart and lungs were removed after sternotomy. Lungs were separated from the heart, and the aorta was cannulated according to the Langendorff technique. Heart was perfused at 37°C with modified Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 10 mM; glucose 11 mM all purchased from Sigma-Aldrich), adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub>. The Tyrode was supplemented with Heparin (1000 UI) during the first minutes of the perfusion in order to rinse the coronary system and to avoid thrombus formation. The heart was hooked by the apex to a strain gauge connected to a computer via a Biopac MP35 interface (CEROM, France). Hearts were allowed to beat spontaneously throughout the experiment. Biopac Student lab software (BSL Pro, CEROM, France) was used to record and analyze heart contractions for 30 sec periods, every 5 min, and during a total duration of 30 min. All the hearts were perfused at constant pressure (80 cm of water). Coronary flow was not imposed

but was monitored with a ball flowmeter. After 20 min of control recording, recombinant TNF- $\alpha$  (Sigma-Aldrich) was added to the Tyrode to obtain a final concentration of 20ng/ml. This concentration was chosen according to the publication of Edmunds et al, [8]. Heart rate (bpm) and contraction amplitude (g) were recorded and analysed with Biopac Student lab software (BSL Pro, CEROM, France). Similarly, speeds of contraction ( $+dF/dt_{\max}$ ) (g/s) and relaxation ( $-dF/dt_{\min}$ ) (g/s) were calculated from the derivative of the contraction recordings.. At the end of the experimentation, the hearts were quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses.

### Western Blot analyses

Approximatively 200mg of the ventricle myocardium (around apex) were homogenized in Mem-PER<sup>TM</sup> Plus Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the instructions of the purveyor, in order to separate cytosolic and membrane proteins. The protein content was measured with the Bradford method. Briefly, 5  $\mu$ L of sample diluted (1:10) were added to 250 $\mu$ L of Bradford reagent (Sigma-Aldrich) in a 96 wells plate, and read at 595nm. Proteins were diluted in Laemmli Buffer 4x (Biorad) with 10% 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). 60 $\mu$ g of proteins of each sample were run on 6% SDS-polyacrylamide gels then proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (0.45 $\mu$ m, Millipore). The nitrocellulose membrane was then incubated in a blocking buffer (20mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl; TBS) supplemented with 0.05% v/v Tween 20 (TTBS) containing 5% w/v skimmed milk powder overnight at 4°C followed by 2x20 min washes in TTBS. Blots were then incubated with both anti-PKC- $\alpha$  (1:1000) (Abcam) and anti-PKC- $\epsilon$  (1:500) (Abcam) in TTBS containing 1% w/v skimmed milk powder during 60 min at room temperature. The blots were washed 2x20min in TTBS and incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (1:2000 dilution) (Abcam) for 60 min. Finally, blots were washed 2x20 min in TTBS rinsed in TBS and exposed to ECL-reagents composed of 10ml buffer TrisHCL 100mM (Sigma-Aldrich) at pH=8.5, 3 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (Sigma-Aldrich) 50 $\mu$ L of solubilized luminol (Sigma-Aldrich) in DMSO (Sigma-Aldrich) (44.3mg/ml DMSO) and 25 $\mu$ L of p-coumaric acid (Sigma-Aldrich) in DMSO (14.8mg/ml DMSO). Membranes were exposed for 1 min then analyzed by using a Vilber-Lourmat Fusion SL image acquisition system, and Image Studio Lite (LI-COR Biosciences) which allows precise quantification of the signals.

### Cardiomyocyte isolation

Langendorff system was used for the cardiomyocytes dissociation. Hearts were obtained as previously explained and were perfused at 37°C with modified Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 10 mM; glucose 11 mM), adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub>. The Tyrode was supplemented with Heparin (1000 UI) during the first minutes of the perfusion in order to rinse the coronary system and to avoid thrombus formation. The heart was hooked by the apex. After 5min of spontaneous contractions with the Tyrode, the heart was perfused with Tyrode 0Ca ( NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; MgCl<sub>2</sub> 1.8mM; HEPES 5mM, glucose 10mM, taurine 20mM (Sigma-Aldrich); BSA at 1g/l (Euromedex)) adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub> during few minutes until contractions stopped. Then the heart was perfused with enzymatic oxygenated solution (70 ml of Tyrode 0Ca supplemented with 169mg of collagenase (Gibco) and 2mg of protease (Sigma-Aldrich) during 3 minutes. Then CaCl<sub>2</sub> was added to the enzymatic solution to reach a final concentration of 1mM and the perfusion was carried out for an additional period of 15min. The heart was then removed from the system and placed in a Petri dish containing 1mL of the enzymatic solution. Atria were removed and the ventricle minced thoroughly. The medium containing cardiomyocytes was pipetted and added to 20ml of Kraftbrühe medium (KCl 70mM; glutamate 5mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM; MgSO<sub>4</sub> 5mM; CaCl<sub>2</sub> 0.08mM; EGTA 0.5mM; Creatine 5mM; Na<sub>2</sub>ATP 5mM; taurine 20mM; HEPES 10mM and BSA at 4g/l all purchased from Sigma-Aldrich) then it was centrifuged at 1000 rpm during 1min. The supernatant was discarded and the pellet resuspended with 20ml of Tyrode 0Ca then 200µl of CaCl<sub>2</sub> at 100mM was progressively added (aliquots of 40µl at 5 minutes intervals).

### Macro-patch clamp

As previously described [9], fast sodium currents were recorded by a macro-patch clamp technique at room temperature (22±1°C) in a cell-attached configuration with a GeneClamp 500B amplifier and a CV-5-100MU headstage (Axon Instruments, Foster City, CA). Micropipettes were pulled and polished from GC150TF-10 borosilicate glass (Harvard Apparatus, MA) with a DMZ-Universal puller (Zeitz Instruments, Germany). Pipettes had resistance averaging 1.7MΩ when filled with the recording solution (standard Tyrode). Voltage-clamp protocols and data acquisition were performed by using WinWCP V4.17 software (University of Strathclyde, UK) through a 16 bits data acquisition card (National

Instruments, USA). Currents were low pass filtered at 5 kHz and digitized at 100kHz. To eliminate residual capacitance, transient and leak currents, a P/4 procedure was used. Approach of the micropipette and realization of the seal was made by using hydraulic micro-manipulators (Narishige) on an inverted microscope (Olympus IX70) equipped with a progressive-scan digital camera (XC8500CE, Sony). Before recording, ventricle cardiac myocytes were placed in CsCl-containing medium (145 mM CsCl, 5mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES, pH 7.4), which brings membrane to a resting potential value close to zero by blocking the potassium channels. Only the sodium current was recorded in the CsCl-EGTA containing medium. The holding potential was fixed at -120 mV. At this potential, almost all the sodium channels are in closed but activated state, leading few sodium channels to be nonconductive during the depolarizing pulses [10].

A pulse protocol was then applied to the membrane patch, to activate sodium currents. The first stimulation protocol was a cycle of 20-ms test pulses from -60 to +100mV in 10mV increments. Each test pulse was preceded by four hyperpolarizing pulses allowing leak current calculation (P/4 protocol). The interval between each test pulse was long enough (3s) to allow complete recovery of the sodium channels from slow inactivation. This protocol was repeated at least three times for each patch to be sure of the sodium current stability. A second program was used to determine the inactivation curve of the sodium channels by applying 50ms depolarizing pulses to the membrane before application of a 100mV test pulse from the holding potential, thus giving a membrane potential of 0mV. This value of the membrane potential was selected because it was close to the value corresponding to the maximum sodium current. The patches with no reliable peak current amplitude were discarded.

The current was recorded in control condition on cardiomyocytes, then TNF- $\alpha$  (Sigma) was added to the medium at a final concentration of 20ng/ml. Each cardiomyocyte served as its own control. This concentration was already used in previous studies, carried out in *peroneus longus* [10]. The recordings were performed after 30 min following TNF- $\alpha$  addition.

### Analysis of the results

#### Current voltage curve and maximal sodium conductance

$I_{Na \text{ max}}$  represents the maximal sodium current related to membrane area under the patch pipette and is expressed by its absolute value (nA). The current-voltage relationship or  $I$ - $V$

curve represents the relationship between imposed membrane potentials and corresponding sodium currents.

### Data analysis and statistics

Excel® (Microsoft, Redmond, WA) was used to analyze the experimental data and to perform Boltzmann curve fittings. All values are expressed by mean value  $\pm$  SEM. Statistical differences were determined by using paired Student's *t*-test or the Aspin-Welsh test as appropriated after checking the normality of distribution (Lilliefors test). A *p* value  $< 0.05$  was considered as statistically significant.

## **Results**

The cardiac parameters were recorded in perfused rat hearts in control conditions by using Langendorff technique. Then, to determine the effects of TNF- $\alpha$  on these cardiac parameters, the cytokine was perfused at 20ng/ml. In this case, each heart represents its own control and data can be expressed in percentage of the control values measured at *t*<sub>0</sub> just before TNF- $\alpha$  addition. After 30min of TNF- $\alpha$  perfusion, the cytokine induced a decrease of the heart rate of  $16.9 \pm 9\%$  compared to control (Fig. 1). In the same manner, heart force was decreased by  $19.5 \pm 8.9\%$  by TNF- $\alpha$ . Concerning the speed of contraction, the TNF- $\alpha$  had no effect ( $-5 \pm 9.5\%$  vs control hearts,  $p < 0.22$ ), whereas the speed of relaxation was decreased by  $18.4 \pm 9.6\%$ . The coronary flow was monitored in order to investigate a possible effect of TNF- $\alpha$  on heart perfusion. The TNF- $\alpha$  induced a strong decrease of the coronary flow ( $-25.2 \pm 3\%$ ) compared to the control value before cytokine addition.

PKC activation in the myocardium was determined by western blot as the membrane targeting of two PKC isoforms, corresponding to the activation of these kinases. Thirty min of perfusion with TNF- $\alpha$  led to an increase of membrane expression of both PKC- $\alpha$  ( $+54.2 \pm 16.6\%$ ) and PKC- $\epsilon$  ( $+98.7 \pm 26.7\%$ ), suggesting that a strong and rapid activation was induced by the cytokine (Fig. 2).

In order to know if the cytokine can modulate membrane excitability similarly to force contraction, patch clamp analyses was realized on isolated cardiomyocytes. The results showed that TNF- $\alpha$  at 20ng/ml had no effect on sodium current, as evidenced by the similar values of maximal sodium currents:  $-3.5 \pm 0.8$  nA before and  $-3.9 \pm 0.9$  nA after TNF- $\alpha$  addition (Fig. 3).

## Discussion

TNF- $\alpha$  is among the most important pro-inflammatory cytokine released during septic shock [200]. Our study aimed to evaluate the effects of TNF- $\alpha$  on the contractile properties, and PKC expression in the perfused whole rat heart and in membrane excitability of freshly isolated cardiomyocytes.

Acute TNF- $\alpha$  perfusion at 20ng/ml was associated to a decrease of about 20-25% of the heart parameters, except for the speed of contraction which was not modified. The effects of this cytokine had already been investigated, in order to know if sepsis could induce myocardial dysfunction, but many of these studies involved a chronic exposure to TNF- $\alpha$  leading to the activation of others mediators such as reactive oxygen species or nitric oxide species [11,12]. In this study we investigated an acute perfusion of the cytokine and showed that heart dysfunction can appear after only 30min of perfusion with TNF- $\alpha$  containing medium. The decrease of heart contractile properties was associated to an increase of PKC- $\alpha$  and PKC- $\epsilon$  activation, as evidenced by an increase of their membrane targeting. These two isoforms of PKC are known to be involved in cardiac dysfunction. PKC- $\alpha$  is able to promote indirectly the interaction between phospholamban and the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2 (SERCA-2), leading to the decrease of cardiac contractility and especially cardiac relaxation [7]. This is in agreement with the decrease of force and speed of relaxation induced by TNF- $\alpha$  in our study. In addition, the inhibition of PKC by chelerythrine was able to suppress the cardiomyocyte contractility depression, which is also supporting our results [13]. The decrease of the contractile force and speed of relaxation can be associated to an enhanced diastolic volume of the ventricles leading to impaired systolic ejection which is clinically observed in patients in septic shock [14].

Moreover, the TNF- $\alpha$  perfusion led to a decrease of 25% of the coronary flow. This result is in agreement with the publication of Edmunds and Woodward where they found that the decrease of coronary circulation by TNF- $\alpha$  at 20ng/ml was dependent of ceramide production [15]. They found that the inhibition of ceramidase contribute to protect the heart from decrease of the contractile force induced by TNF- $\alpha$  [8]. The coronary vasoconstriction inducing a decrease of the coronary flow can participate to the observed decrease of the contractile properties, however experiments performed with imposed constant coronary flow showed that a decrease in cardiac force was still observed in presence of TNF- $\alpha$ .

Membrane excitability is a key phase of the excitation-contraction coupling. It has been shown that tetrodotoxin, a specific inhibitor of  $\text{Na}_v1.4$ , results in a significant decrease of the heart contractile force, thus demonstrating the importance of membrane excitability and the involvement of sodium channels in the determination of the heart muscle contractile force [16]. In our study,  $\text{TNF-}\alpha$  had no significant effect on sodium current whereas it induced a decrease of the heart force related to the activation of PKC. We have already published that, on *peroneus longus* isolated fibers,  $\text{TNF-}\alpha$  was able to decrease sodium current via PKC activation [9]. Nevertheless in the present study, measurements carried out in fresh isolated cardiomyocytes led to hypothesize that, in the heart, the mechanism of the force decrease is different, even if in the skeletal muscle this decrease of sodium current was also PKC dependent. We supposed that, in heart, voltage gated sodium channels  $\text{Na}_v$  may have a different sensibility to PKC induced phosphorylation. In skeletal muscle, the  $\text{Na}_v1.4$  is the predominant isoform expressed while in heart it is the  $\text{Na}_v1.5$  isoform which represents most of the sodium channels [17]. It has been reported that PKC activation induced the phosphorylation of voltage gated sodium channels leading to the decrease of sodium current with  $\text{Na}_v1.5$  [18,19]. However, many of these studies investigated PKC activation on transfected  $\text{Na}_v1.5$  in (HEK)-293 cell line and *Xenopus* oocyte. In our study, sodium current was analyzed in native and functional cardiomyocytes freshly isolated from adult rat heart. Watson and Gold published in 1997 that in isolated ventricular cells, activation of PKC had no effect on maximal sodium current, suggesting that cell signaling of phosphorylation and regulation of  $\text{Na}_v1.5$  by PKC can be cell type specific and depends on the intracellular crosstalk and also possibly on the  $\beta$ -subunits associated to the channels [20]. Altogether, these results indicated that  $\text{TNF-}\alpha$  can impair the cardiac function by reducing the maximum contractile force and the speed of relaxation thus reducing the ejection volume and the cardiac efficiency. These effects are related to PKC activation. However these effects are not related to an alteration of cardiomyocytes excitability because  $\text{TNF-}\alpha$  failed to alter the fast sodium current.

## Conclusion

To conclude, the present study shows that a perfusion of isolated rat heart with a medium containing 20ng/ml of  $\text{TNF-}\alpha$  can induce a rapid alteration of cardiac function indicating that  $\text{TNF-}\alpha$  can be involved in the triggering of cardiac failure observed in septic shock. The effect of  $\text{TNF-}\alpha$  is related to PKC activation. However, in the opposite of what was observed in

skeletal muscle, it is not related to an alteration of the membrane excitability because TNF- $\alpha$  failed to decrease the fast voltage gated sodium current.

**Conflicts of interest:** none

## References

- [1] G.S. Martin, D.M. Mannino, S. Eaton, M. Moss, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1546–1554. doi:10.1056/NEJMoa022139.
- [2] A. Vieillard-Baron, V. Caille, C. Charron, G. Belliard, B. Page, F. Jardin, Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock, *Crit. Care Med.* 36 (2008) 1701–1706. doi:10.1097/CCM.0b013e318174db05.
- [3] J.E. Parrillo, C. Burch, J.H. Shelhamer, M.M. Parker, C. Natanson, W. Schuette, A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance, *J. Clin. Invest.* 76 (1985) 1539–1553. doi:10.1172/JCI112135.
- [4] T. van der Poll, S.J. van Deventer, Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13 (1999) 413–426, ix.
- [5] E. Churchill, G. Budas, A. Vallentin, T. Koyanagi, D. Mochly-Rosen, PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets?, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 48 (2008) 569–599. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.121806.154902.
- [6] N. Bowling, R.A. Walsh, G. Song, T. Estridge, G.E. Sandusky, R.L. Fouts, K. Mintze, T. Pickard, R. Roden, M.R. Bristow, H.N. Sabbah, J.L. Mizrahi, G. Gromo, G.L. King, C.J. Vlahos, Increased protein kinase C activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive isoforms in the failing human heart, *Circulation.* 99 (1999) 384–391.
- [7] J.C. Braz, K. Gregory, A. Pathak, W. Zhao, B. Sahin, R. Klevitsky, T.F. Kimball, J.N. Lorenz, A.C. Nairn, S.B. Liggett, I. Bodi, S. Wang, A. Schwartz, E.G. Lakatta, A.A. DePaoli-Roach, J. Robbins, T.E. Hewett, J.A. Bibb, M.V. Westfall, E.G. Kranias, J.D. Molkentin, PKC- $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure, *Nat. Med.* 10 (2004) 248–254. doi:10.1038/nm1000.
- [8] N.J. Edmunds, H. Lal, B. Woodward, Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: possible mechanisms for a decline in cardiac function, *Br. J. Pharmacol.* 126 (1999) 189–196. doi:10.1038/sj.bjp.0702294.
- [9] M. Guillouet, G. Gueret, F. Rannou, M.-A. Giroux-Metges, M. Gioux, C.C. Arvieux, J.-P. Pennec, Tumor necrosis factor- $\alpha$  downregulates sodium current in skeletal muscle by protein kinase C

activation: involvement in critical illness polyneuromyopathy, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) C1057-1063. doi:10.1152/ajpcell.00097.2011.

[10] S. Roberge, J. Roussel, D.C. Andersson, A.C. Meli, B. Vidal, F. Blandel, J.T. Lanner, J.-Y. Le Guennec, A. Katz, H. Westerblad, A. Lacampagne, J. Fauconnier, TNF- $\alpha$ -mediated caspase-8 activation induces ROS production and TRPM2 activation in adult ventricular myocytes, *Cardiovasc. Res.* 103 (2014) 90–99. doi:10.1093/cvr/cvu112.

[11] X. Chen, B.T. Andresen<sup>1</sup>, M. Hill, J. Zhang, F. Booth, C. Zhang, Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction, *Curr. Hypertens. Rev.* 4 (2008) 245–255.

[12] J.N. Simon, S.A.K. Chowdhury, C.M. Warren, S. Sadayappan, D.F. Wieczorek, R.J. Solaro, B.M. Wolska, Ceramide-mediated depression in cardiomyocyte contractility through PKC activation and modulation of myofilament protein phosphorylation, *Basic Res. Cardiol.* 109 (2014) 445. doi:10.1007/s00395-014-0445-6.

[13] J.D. Hunter, M. Doddi, Sepsis and the heart, *Br. J. Anaesth.* 104 (2010) 3–11. doi:10.1093/bja/aep339.

[14] N.J. Edmunds, B. Woodward, Effects of tumour necrosis factor-alpha on the coronary circulation of the rat isolated perfused heart: a potential role for thromboxane A2 and sphingosine, *Br. J. Pharmacol.* 124 (1998) 493–498. doi:10.1038/sj.bjp.0701863.

[15] A. Koesters, K.L. Engisch, M.M. Rich, Decreased cardiac excitability secondary to reduction of sodium current may be a significant contributor to reduced contractility in a rat model of sepsis, *Crit. Care Lond. Engl.* 18 (2014) R54. doi:10.1186/cc13800.

[16] M. Guillouet, G. Gueret, F. Rannou, M.-A. Giroux-Metges, M. Gioux, C.C. Arvieux, J.-P. Pennec, TNF $\alpha$  increases resting potential in isolated fibres from rat peroneus longus by a PKC mediated mechanism: involvement in ICU acquired polyneuromyopathy, *Cytokine.* 56 (2011) 149–152. doi:10.1016/j.cyto.2011.05.023.

[17] R.E. Westenbroek, S. Bischoff, Y. Fu, S.K.G. Maier, W.A. Catterall, T. Scheuer, Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 64 (2013) 69–78. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.08.004.

[18] H. Hallaq, D.W. Wang, J.D. Kunic, A.L. George, K.S. Wells, K.T. Murray, Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na<sup>+</sup> channels, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302 (2012) H782-789. doi:10.1152/ajpheart.00817.2010.

[19] G.Q. Xiao, Y. Qu, Z.Q. Sun, D. Mochly-Rosen, M. Boutjdir, Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Na(+) channels, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281 (2001) C1477-1486.

[20] C.L. Watson, M.R. Gold, Modulation of Na<sup>+</sup> current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells, *Circ. Res.* 81 (1997) 380–386.

## Figure Captions

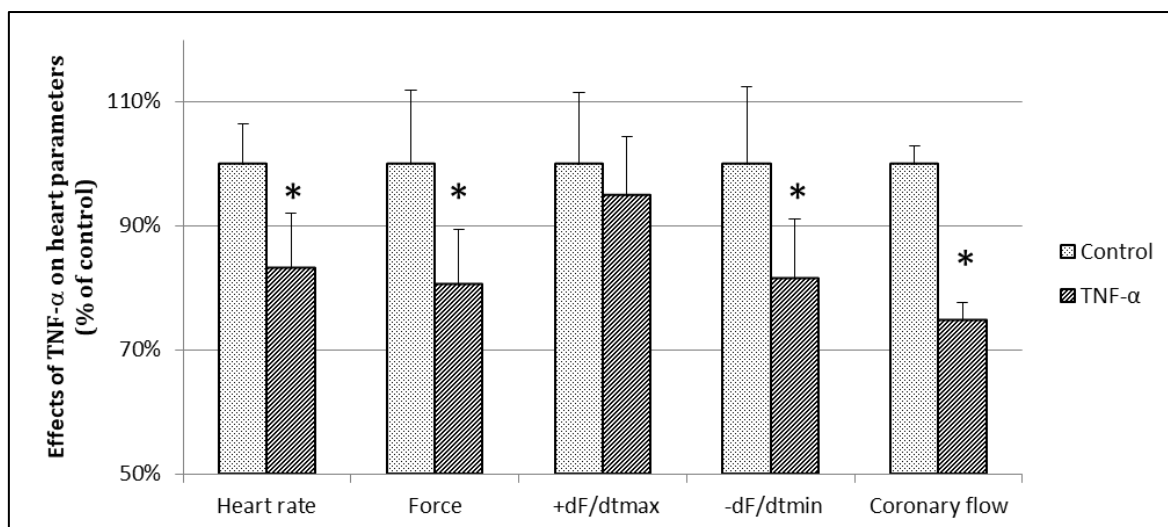


**Figure 1:** Effects of TNF- $\alpha$  on heart parameters. Heart rate (bpm), contractile force (g), maximum speed of contraction (+dF/dt<sub>max</sub>) (g/s) and relaxation (-dF/dt<sub>min</sub>) (g/s), and coronary flow (ml/min) are represented. Each heart represents its own control during control recording beats before and after TNF- $\alpha$  perfusion (n=6). Data are mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs control.

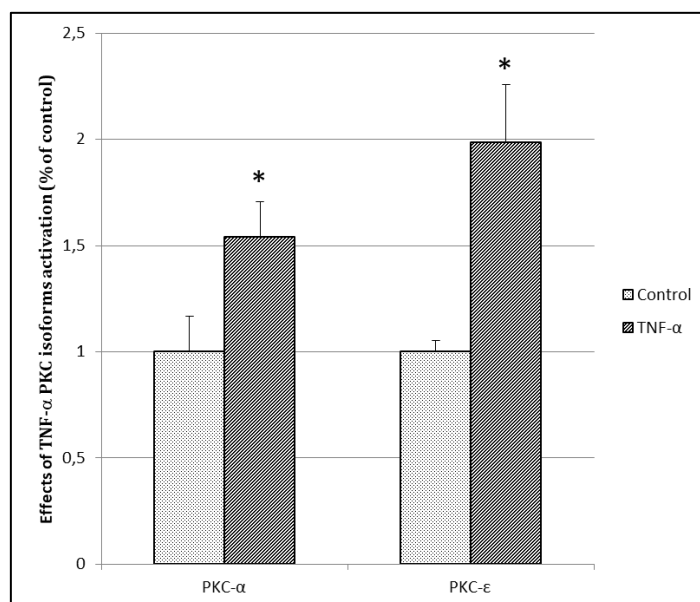


**Figure 2:** Involvement of TNF- $\alpha$  on PKC- $\alpha$  and PKC- $\epsilon$  membrane targeting. Protein expression from control hearts perfused tyrode alone (n=6) and heart perfused with TNF- $\alpha$  at 20ng/ml 30min (n=6). Densitometric quantification of PKC- $\alpha$  and PKC- $\epsilon$  membrane expression level expressed as percentage compared to control. Data are mean values  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs control,

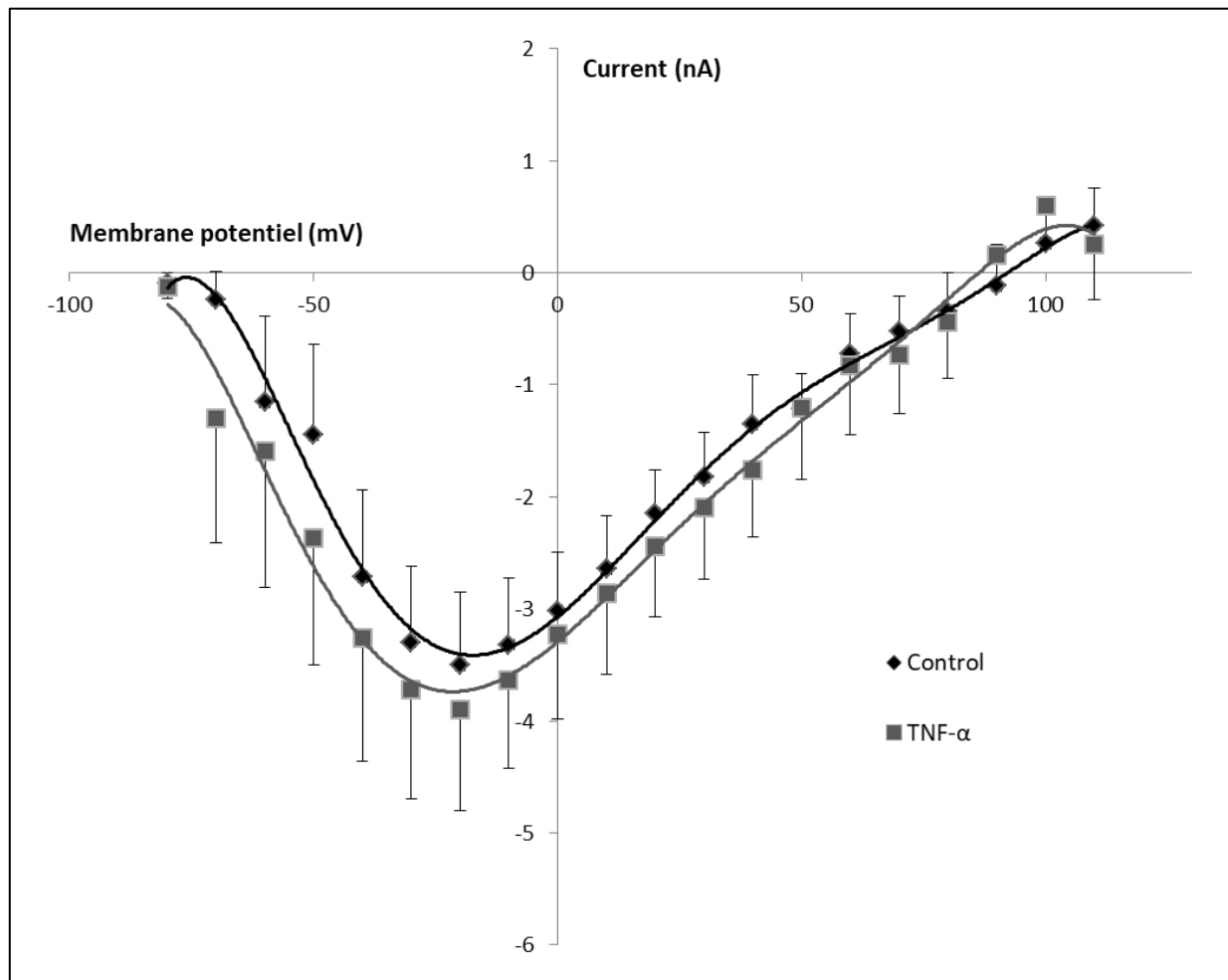


**Figure 3:** TNF- $\alpha$  had no effect on membrane excitability of cardiomyocytes. Sodium current voltage relationship (I/V curves) from cardiomyocytes before (control) and after TNF- $\alpha$  at 20ng/ml during 30min (n=8).

## Discussion des résultats

Les résultats obtenus montrent un effet chronotrope et inotrope négatifs du TNF- $\alpha$  sur le cœur au bout de 30min de perfusion. Ces effets sont associés à une augmentation de l'activation des isoformes PKC- $\alpha$  et PKC- $\epsilon$ . Néanmoins, et de manière surprenante, la cytokine n'a pas d'effet sur l'excitabilité des cardiomyocytes isolés. Les effets du TNF- $\alpha$  sur la fonction cardiaque sont déjà connus [201], mais ici on peut noter qu'il y a une diminution de la vitesse de relaxation alors qu'il n'y a pas d'effet sur la vitesse de contraction. Ces deux mécanismes font intervenir le relargage du calcium du réticulum par les RyR pour la phase de contraction, et sa recapture par les SERCA en relation avec le phospholambane pour la relaxation. Nous observons ici une hétérogénéité dans la cinétique de réponse à la cytokine. En effet, l'activation des PKC est connue pour entraîner une dysrégulation des SERCA [202], alors qu'aucun lien n'est établi dans la littérature entre les PKC et les RyR, ce qui est en accord avec les résultats obtenus. Néanmoins, lors de l'expérience, nous avons vu qu'avec un temps de perfusion supérieur (40min) il y a une majoration des effets chronotropes et inotropes négatifs et également une diminution de la vitesse de contraction qui n'apparaissait pas initialement. L'intérêt de cette étude est le choix d'un temps de perfusion court de 30min qui permet d'imputer les effets observés directement au TNF- $\alpha$ . En effet, certains messagers secondaires, tels que les céramides, peuvent être activés et être impliqués dans la diminution de la fonction cardiaque en plus des effets propres du TNF- $\alpha$  [201]. De plus, la production de ROS peut également contribuer à la diminution de la fonction cardiaque. Initialement, nous avons émis l'hypothèse que le TNF- $\alpha$  pouvait activer les PKC et entraîner une activation de la NADPH oxydase responsable de la production de ROS. La quantification par Western blot de la forme active de NADPH oxydase a été réalisée et montre une nette activation après 30min de perfusion de TNF- $\alpha$  (+69% pour l'isoforme NCF1 et +51% pour Nox2). Néanmoins le dosage indirect des ROS par le dosage des TBARS ne permet pas de confirmer l'hypothèse car il y a une diminution de la concentration en TBARS après TNF- $\alpha$ . En conclusion Le TNF- $\alpha$  active les PKC et le complexe actif de NADPH oxydase, sans pouvoir déterminer le lien de causalité. Cela pourrait être étudié avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des PKC comme la chelerythrine, ou bien de la NADPH oxydase comme l'apocynine.

Pour ce qui est de l'excitabilité membranaire, le résultat obtenu est surprenant par rapport aux effets observés sur le muscle squelettique car, dans nos conditions expérimentales, le TNF- $\alpha$  n'induit pas d'hypoexcitabilité membranaire. Nous avons déjà publié que le TNF- $\alpha$  induisait une diminution du courant sodique sur des fibres isolées de

péronier et cela de manière PKC dépendante [197]. Cela est en accord également avec des études montrant une diminution des courants sodiques après stimulation des PKC, à la fois sur des cellules HEK-293 ou sur des œufs de xénope transfectés avec le gène codant pour  $\text{Na}_v1.5$  [203,204]. Néanmoins, dans cette étude nous utilisons des cardiomyocytes isolés et l'hypothèse que nous émettons est qu'il peut y avoir des voies de signalisation différentes. L'isoforme majeur présent au niveau du muscle strié squelettique est le  $\text{Na}_v1.4$ , et on peut également supposer une différence de réponse dépendante de l'isoforme avec des sites de phosphorylation différents, même si les PKC sont connues pour diminuer le courant sur les deux isoformes [6]. Nous avons testé sur quelques cardiomyocytes isolés une stimulation avec du PMA (un activateur de PKC) mais sans obtenir effet sur le courant. D'autres études confirment que l'activation de PKC sur des cardiomyocytes matures n'induit pas de diminution du courant sodique [205]. L'intérêt de ce travail est de montrer que le  $\text{TNF-}\alpha$  est capable d'induire un effet inotrope et chronotrope négatif rapide sur le cœur, mais qu'il ne semble pas altérer les courants sodiques potentiel dépendants.

Il est à noter que la fréquence cardiaque ne dépend pas réellement de ces canaux sodiques, ceux-ci étant inhibés dans les cellules sinusales du fait du faible potentiel de repos. La fréquence cardiaque est dépendante des canaux  $I_f$  eux-mêmes influencés par l'AMPc, et des canaux calciques de type T. L'effet chronotrope négatif sur le cœur isolé, observé avec le  $\text{TNF-}\alpha$  pourrait donc être lié à une action sur ces canaux.



## **II. Article 2 : L'IL-13 a un effet inotrope positif sur le cœur sain, relié à une augmentation de l'excitabilité cardiaque**

Cet article est actuellement en révision pour le journal Physiological Report.

## Introduction

L'IL-13 est une cytokine libérée dans la circulation lors du sepsis. Une étude chez la souris a montré que durant un sepsis, l'inhibition de l'IL-13 entraînait une augmentation de la mortalité ce qui suggère un rôle protecteur important de cette cytokine [206]. Elle est produite dès le 1<sup>er</sup> jour du sepsis et sa concentration reste stable avec un taux entre 5 et 20ng/ml [207]. C'est pour cette raison que lors de cette étude nous avons choisi de travailler avec la concentration de 10ng/ml. L'IL-13 est connue pour son action broncho-constrictive dans l'asthme [208]. Néanmoins, il n'y a quasiment aucune étude concernant son action sur le muscle strié (squelettique et cardiaque). Une étude de Takahashi *et al.*, montre cependant que l'IL-13 a un effet bénéfique sur la diminution de la force de contraction du diaphragme 4 heures après une injection de LPS chez le rat, sans pour autant augmenter la force de contraction en condition contrôle [209]. La question qui nous a intéressés a donc été de savoir si l'IL-13 pouvait avoir un effet sur 2 muscles striés squelettiques (locomoteur : le péronier et respiratoire : le diaphragme) et sur le cœur. Pour cette étude nous nous sommes focalisés sur la fonction cardiaque. Pour ce faire, une première série d'expérimentations a été réalisée sur des cœurs isolés de rat normaux qui ont été perfusés en système de Langendorff avec IL-13 à 10ng/ml, une deuxième série d'expérimentations a aussi été menée sur cardiomyocytes isolés pour déterminer si cette cytokine avait un effet sur les courants sodiques. La voie de signalisation de l'IL-13 sur la fonction cardiaque a été étudiée en utilisant des inhibiteurs des voies déjà connues pour leur action inotrope positive. Dans un second temps, l'IL-13 a été testée sur cœurs perfusés et cardiomyocytes de rats septiques (CLP de 7 jours).

# **IL-13 has an inotropic effect associated with an increase of membrane excitability on healthy rat heart.**

**Authors:** Jude B<sup>1</sup>, Vermeersch V<sup>1,2</sup>, Vetel S<sup>1</sup>, Léon K<sup>1</sup>, Droguet M<sup>1</sup>, Pennec JP<sup>1</sup>, Giroux-Metges MA<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie - EA 4324 ORPHY, IBSAM, Université de Bretagne Occidentale, Brest - France.

<sup>2</sup> Département d'Anesthésie Réanimation, CHU la Cavale Blanche, Brest - France

<sup>3</sup> Explorations Fonctionnelles Respiratoires, CHRU de Brest, Brest – France

**Corresponding author:** Baptiste Jude

Laboratoire de Physiologie – EA4324 ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, 22 Avenue Camille Desmoulins 29238 Brest, Cedex 3 France

Telephone: +33(0)2 98 01 64 62

[bjude@outlook.fr](mailto:bjude@outlook.fr)

## **Abstract:**

Interleukin 13 (IL-13) is a cytokine produced during sepsis. The pro- and/or anti-inflammatory effects of IL-13 still remain elusive, especially at the heart level. In this study, we elucidated the impact of IL-13 on (i) the heart contraction; and on (ii) the voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 which are responsible for the membrane excitability, an essential function for the excitation/contraction coupling. Here, rat hearts were perfused *ex vivo* with IL-13 at 10ng/ml, in Langendorff columns, for 15 min. Contractile force, heart frequency and coronary flow were recorded. The expression and translocation of Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 were analysed by western blot after membrane and cytosol proteins were extracted from the rats' ventricular cells. Results showed that IL-13 induced an increase of the contractile force (+28.3%), as well as of the maximal speeds of contraction (+35.5%) and relaxation (+38.9%). By using specific inhibitors, we also demonstrated that IL-13 was acting

via a pathway involving  $\beta$ 1-adrenergic - adenylyl cyclase - PKA activation. An increase in sodium current was also shown to be regulated by the same pathway. The hearts perfused with IL-13 had more Na<sub>v</sub>1.4 (+37.4%) and Na<sub>v</sub>1.5 (+52.2%) at the membrane, and the ratios of membrane/cytosol proteins were also increased after IL-13 perfusion for Na<sub>v</sub>1.4 (+281.4%) and Na<sub>v</sub>1.5 (+214.4%). This study shows that IL-13 has a positive inotropic effect on perfused heart and that IL-13 can also increase Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 membrane targeting, therefore increasing the heart membrane excitability. However IL-13 was shown to lose its inotropic effects in chronic septic hearts.

### **Keywords**

Contractile force, IL-13, Isolated heart, Sepsis, Rat, Voltage gated sodium channels.

**Running Title** : IL-13 : a new inotropic cytokine ?

## **Introduction**

Critical illness polyneuromyopathy (CIP) is one of the most frequently observed pathology in hospitalized patients, which can be acquired in intensive care unit (ICU) (Friedrich et al., 2015). The main and most dangerous symptoms are a decrease of muscle excitability and force. In certain patients, the diaphragm can also be affected which can cause difficulties in weaning from mechanical ventilation, leading to a prolonged time in ICU and an increase of hospital costs. In severe forms, CIP can lead to cardiac dysfunction (Drosatos et al., 2015). Even if a certain level of recovery occurs, sequels can have lasting effects, thus impairing the quality of life of the patients. Many risk factors have been reported, especially sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). When sepsis occurs, mediators of inflammation, such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1beta (IL-1 $\beta$ ) or 6 (IL-6) are released in the early stages of illness and have pro-inflammatory effects. TNF-  $\alpha$  has been reported to cause a decrease of the cardiac contractility (Edmunds et al., 1999) and to impair the membrane excitability in skeletal muscles by a rapid post-translational effect involving a protein kinase C (PKC) pathway activation (Guillouët et al., 2013).

IL-13, a potent anti-inflammatory cytokine produced by Lymphocyte T helper 2 (Th2) cells, natural killer cells or mast cells (Burd et al., 1995, p. 13; Hoshino et al., 1999), has also been detected in patients with sepsis. The severity of symptoms has been correlated with the

levels of IL-13 (Collighan et al., 2004). An animal study of sepsis by caecal ligation and puncture (CLP) showed that the production of endogenous IL-13 has a positive effect on the survival of the animals (Matsukawa et al., 2000). Yet, IL-13 can also act as a pro-inflammatory cytokine, especially in patients with asthma (Wills-Karp et al., 1998), as it can stimulate an eosinophilic inflammation and induce the contraction of the tracheal ring in the airway smooth muscle cells (Matsumoto et al., 2012; Tliba et al., 2003). In the diaphragm, IL-13 can also protect muscle contraction by preventing the decrease of force-frequency curves and twitch during endotoxemia (Takahashi et al., 1999). Although IL-13 is involved in many immune and anti-inflammatory pathways in response to various illnesses and disorders, its effects on healthy and septic hearts are still poorly understood. In fact, to our knowledge, there is no report of the intrinsic effect of IL-13 on hearts. Here, our main focus was to characterize the effects of IL-13 on the functions of a healthy heart by performing a set of experiments on isolated perfused rat hearts and isolated cardiomyocytes. Those analyses focused on (i) whether IL-13 could induce a positive inotropic effect associated with an increased excitability of the heart membrane; and (ii) determining which molecular pathway was involved in activating IL-13. Whether IL-13 had similar effects on septic hearts was also investigated to assess if IL-13 had a protective function of the heart function during sepsis.

## **Materials and Methods**

### Animals

Female wistar rats averaging 250g were used for the experimentation. All the animals were purchased from Janvier (Le Genest SaintIsle, France) and housed in the same location at 23°C, with a 12-hr daylight cycle and fed ad libitum with standard rat pellets. The experiments were realized according to the recommendations of the European Community directive No. 2010/63/EU, which are equivalent to NIH recommendations. Experimental protocol, animal care, anesthesia, analgesia and sacrifice methods were approved by our ethical regional committee (CEFEA: "*Comité d'éthique Finistérien en expérimentation animale*" - departmental agreement No. A29-019-03) and validated by the French ministry in charge of animal experimentation and welfare (protocol No. 02076.01).

### Sepsis induction

The sepsis was induced by CLP according to method previously described (Rossignol et al., 2008). Briefly, rats were anesthetized with intraperitoneal (IP) injection of Xylazine

(12mg/kg) and Ketamine (80mg/kg). After laparotomy, the cecum was exposed carefully. 10 punctures were performed in the caecum with a 21G needle, avoiding vessels. Gentle pressure was applied to the caecum in order to exude a small amount of feces. The cecum was sub-occlusively ligatured at its base below the valve and replaced into the abdominal cavity. The muscular layer and the skin were sutured separately with absorbable suture. Analgesia was carried out after the surgery by daily buprenorphine injection (0.1mg/kg) during the 7 days of procedure.

#### Isolated Rat Heart Preparations and Recordings

The rats were anesthetized with pentobarbital (50mg/kg), killed by cervical dislocation and exsanguination. Rapidly, the heart and lungs were removed after sternotomy. Lungs were separated from the heart, and the aorta was cannulated according to the Langendorff technique. Heart was perfused at 37°C with modified Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 10 mM; glucose 11 mM all purchased from Sigma-Aldrich), adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub>. The Tyrode was supplemented with Heparin (1000 UI) during the first minutes of the perfusion in order to rinse the coronary system and to avoid thrombus formation. The heart was hooked by the apex to a strain gauge connected to a computer via a Biopac MP35 interface (CEROM, France). Hearts were allowed to beat spontaneously throughout the experiment. Biopac Student lab software (BSL Pro, CEROM, France) was used to record and analyze heart contractions for 30 sec periods, every 5 min. All the hearts were perfused at constant pressure (80 cm of water). Coronary flow was not imposed but was monitored by a ball flowmeter. After 25 min of control recording, recombinant IL-13 (Sigma-Aldrich) was added to the Tyrode to obtain a final concentration of 10ng/ml. The dose of 10ng/ml was chosen according to the publication of Colligan indicating that during sepsis the concentration of IL-13 was between 5-20ng/ml in human plasma (Collighan et al., 2004). For the inhibitors, we used 0.3µg/ml of KT5720, a selective PKA inhibitor (Alomone lab) added to the Tyrode, during 20 min before IL-13 addition. Similarly we used 100µM of SQ22536, a selective adenylyl cyclase (Ac) inhibitor (Abcam), and Esmolol at 1µM, a selective β<sub>1</sub> adrenergic receptor inhibitor (Abcam). All hearts were perfused with IL-13 or an inhibitor and IL-13 only once time and were frozen for further analysis. Heart rate (bpm) and contraction amplitude (g) were recorded and analysed with Biopac Student lab software (BSL Pro, CEROM, France) and speeds of contraction ( $+dF/dt_{\max}$ ) (g/s) and relaxation ( $-dF/dt_{\min}$ ) (g/s) were calculated based

upon the derivative of contraction tracing. Coronary flow (ml/min) was monitored. At the end of experimentation, all hearts were frozen in liquid nitrogen until further analyses.

### Western Blot analyses

Approximatively 200mg of the ventricles (around apex) were homogenized in Mem-PER™ Plus Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the instructions of the purveyor in order to separate cytosolic and membrane proteins. The protein content was measured with the Bradford method. Briefly, 5 µL of sample diluted (1:10) were added to 250µL of Bradford reagent (Sigma-Aldrich) in 96 wells plate, and read at 595nm. Proteins were diluted in Laemmli Buffer 4x (Biorad) with 10% 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). 40-120µg of proteins of each sample were run on 6% SDS-polyacrylamide gels then proteins were transferred onto nitrocellulose membrane (0.45µm, Millipore). The nitrocellulose membrane was then incubated in a blocking buffer (20mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl; TBS) supplemented with 0.05% v/v Tween 20 (TTBS) containing 5% w/v skimmed milk powder overnight à 4°C followed by 2x20 min washes in TBST. Blots were then incubated with both anti-Nav<sub>v</sub>1.4 (1:200) (Alomone lab) and anti-Nav<sub>v</sub>1.5 (1:1000) (Sigma-Aldrich) in TTBS containing 1% w/v skimmed milk powder during 60 min at room temperature. The blots were washed 2x20min in TTBS and incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (1:2000 dilution) (Abcam) for 60 min. Finally, blots were washed 2x20 min in TTBS rinsed in TBS and exposed to ECL-reagents composed of 10ml buffer TrisHCL 100mM (Sigma-Aldrich) at pH=8.5, 3µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (Sigma-Aldrich) 50µL of solubilized luminol (Sigma-Aldrich) in DMSO (Sigma-Aldrich) (44.3mg/ml DMSO) and 25µL of p-coumaric acid (Sigma-Aldrich) in DMSO (14.8mg/ml DMSO). Membranes were exposed for 1 min and analyzed by using a Vilber-Lourmat Fusion SL image acquisition system, then Image Studio Lite (LI-COR Biosciences) which allows precise quantification of the signal.

### Cardiomyocytes isolation

Langendorff system was used for the cardiomyocytes dissociation. Heart was obtained as previously explained and was perfused at 37°C with modified Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 10 mM; glucose 11 mM), adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub>. The Tyrode was supplemented with Heparin (1000 UI) during the first minutes of the perfusion in order to rinse the coronary system and to avoid thrombus formation. The heart was hooked by the apex. After 5min of contraction with normal Tyrode, the heart was perfused with Tyrode 0Ca ( NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; MgCl<sub>2</sub>

1.8mM; HEPES 5mM, glucose 10mM, taurine 20mM (Sigma-Aldrich); BSA at 1g/l (Euromedex)) adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub> during few minutes, until contractions stopped. Then the heart was perfused with enzymatic solution oxygenated (70 ml of Tyrode 0Ca with 169mg of collagenase (Gibco) and 2mg of protease (Sigma-Aldrich) during 3 minutes then 1ml of 200 mM CaCl<sub>2</sub> was added to the enzymatic solution and the perfusion carried out for an additional period of 15min. The heart was then removed from the system and placed in a Petri dish containing 1mL of the enzymatic solution. Atriums were removed and the ventricle minced. The medium containing cardiomyocytes was pipetted and added to 20ml of KB (KCl 70mM; glutamate 5mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20mM; MgSO<sub>4</sub> 5mM; CaCl<sub>2</sub> 0.08mM; EGTA 0.5mM; Creatine 5mM; Na<sub>2</sub>ATP 5mM; taurine 20mM; HEPES 10mM all purchased from Sigma-Aldrich, BSA at 4g/l) then it was centrifuged at 1000 rpm during 1min. The pellet was resuspended with 20ml of Tyrode 0Ca then 200µl of CaCl<sub>2</sub> at 100mM was progressively added (aliquots of 40µl at 5 minutes intervals).

#### Macro-patch clamp

As previously described (Guillouet *et al.*, 2011), fast sodium currents were recorded by a macro-patch clamp technique at room temperature (22±1°C) in a cell-attached configuration with a GeneClamp 500B amplifier and a CV-5-100MU headstage (Axon Instruments, Foster City, CA). Micropipettes were pulled and polished from GC150TF-10 borosilicate glass (Harvard Apparatus, USA) with a DMZ-Universal puller (Zeitz Instruments, Germany). Pipettes had resistance averaging 1.7MΩ when filled with the recording solution (standard Tyrode). Voltage-clamp protocols and data acquisition were performed with WinWCP V4.17 (Whole Cell program, University of Strathclyde, Glasgow, UK) through a 16 bits data acquisition card (National Instruments, USA). Currents were low pass filtered at 5 kHz and digitalized at 100kHz. To eliminate residual capacitance, transient and leak currents, a P/4 procedure was used. Approach of the micropipette and realization of the seal was made by using hydraulic micro-manipulators (Narishige) on an inverted microscope (Olympus IX70) equipped with a progressive-scan digital camera (XC8500CE, Sony). Before recording, ventricle cardiac myocytes were placed in CsCl-containing medium (145 mM CsCl, 5mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, and 10 mM HEPES, pH 7.4), which brings membrane to a resting potential value close to zero by blocking the potassium channels. Only the sodium current was recorded in the CsCl-EGTA containing medium. The holding potential was fixed at -120 mV. At this potential, almost all the sodium channels are in closed

but activable state, leading few sodium channels to be nonconductive during the depolarizing pulses (Guillouet et al., 2011).

A pulse protocol was then applied to the patch membrane to record sodium currents. The first stimulation protocol was a cycle of 20-ms test pulses from -60 to +100mV in 10mV increments. Each test pulse was preceded by four hyperpolarizing pulses allowing leak current calculation (P/4 protocol). The interval between each test pulse was long enough (3s) to allow complete recovery of the sodium channels from slow inactivation. This protocol was repeated at least three times for each patch to ensure sodium current stability. A second program was used to determine the inactivation curve of the sodium channels by applying 50ms depolarizing pulses to the membrane before application of a 100mV test pulse from the holding potential, thus giving a membrane potential of 0mV. This value of the membrane potential was selected because it was close to the value corresponding to the maximum sodium current. The patches with no reliable peak current amplitude were discarded.

The currents were recorded in control condition on cardiomyocytes, then IL-13 (Sigma) was added to the medium at a final concentration of 10 ng/ml. Each cardiomyocyte served as its own control. This concentration was already used in previous studies, carried out in *peroneus longus*. The recordings were performed after 15 min following IL-13 addition. The PKA inhibitor KT5720 was added to a final concentration of 0.3µg/ml, currents were recorded during 15min then IL-13 was added too and the recording was done 15min after the cytokine addition.

#### Data and statistical analyses

Current voltage curve and maximal sodium conductance:  $I_{Na \max}$  represents the maximal sodium current related to membrane area under the patch pipette and is expressed by recorded value (nA). The current-voltage relationship or  $I$ - $V$  curve represents the relationship between imposed membrane potential and maximal sodium current registered. The maximal sodium conductance ( $g_{Na \max}$ ) is given by the slope of the quasilinear part of the current-voltage relationship.

Activation curve determination: The normalized activation curve was plotted according to the relationship between  $g_{Na \max}$  in the -60 to +30 mV range according to the relationship:

$$g_{Na} / g_{Na \max} = I_{Na} / [g_{Na \max}(E_m - E_{Na})]$$

where  $E_m$  is imposed membrane potential and  $E_{Na}$  is the Nernst potential for sodium determined from the  $I$ - $V$  curve.

The obtained activation curve can be fitted onto the Boltzmann equation:

$g_{Na} / g_{Na \max} = 1 / \{ 1 + \exp((E_m - V_{m1/2}) / K_m) \}$  to determine  $V_{m1/2}$  corresponding to the potential at which half of the channels are activated and  $K_m$  which is the slope factor.

**Fast inactivation curve determination:** The fast inactivation curve was obtained by plotting the ratio  $I_{Na} / I_{Na \max}$  as a function of the membrane potential.  $I_{Na}$  was obtained according to the inactivation program previously described. The obtained inactivation curve was fitted onto a Boltzmann equation to determine  $V_{h1/2}$  and  $K_h$ .

**Time constants determination:** Time constants corresponding to activation ( $\tau_m$ ) and inactivation ( $\tau_h$ ) of the sodium current were calculated by fitting  $I_{Na \max}$  onto the following Hodgkin-Huxley relation:

$$I_{Na \max(t)} = A [1 - \exp(-t/(\tau_m))]^p \cdot [h_{inf} - (h_{inf} - 1) \cdot \exp(-t/\tau_h)]$$

Where  $A$  is the voltage-dependent part of the current,  $P$  is exponent of  $m$ ,  $h_{inf}$  is the equilibrium value reached by  $h$  according to the potential, and  $t$  is the time. This was carried out by using the curve fitting menu of the WCP program.

All experimental were analyzed using Excel® (Microsoft, Redmond, WA) to perform Boltzmann curve fittings. All values are expressed by mean value  $\pm$  SEM (Standard Error Mean). Statistical differences were determined by using paired Student's  $t$ -test or the Aspin-Welsh test after checking the distribution normality (Lilliefors test). A  $p$  value  $<0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

Positive inotropic effect of IL-13 on the cardiac function of healthy rats occurs via the activation of  $\beta_1$ -A - Ac - PKA pathway

To be able to accurately assess the effect of IL-13 on septic hearts, its effect on healthy hearts and their cardiac parameters had first to be determined. The impact of IL-13 on the heart rate, maximum contraction and relaxation speeds and coronary flow was assessed ex

vivo by perfusing IL-13 in healthy hearts isolated using the Langendorff system. When the hearts were perfused with IL-13 for 15 min, the contractile force, the maximum contraction speed, and the maximum relaxation speed were increased by 26.5%, 34.7%, and 38.8% respectively (Fig 1). Yet, IL-13 had no effect on the heart rate nor the coronary flow (Fig 1).

To determine which pathway may be involved in the positive inotropic effect of IL-13 has on normal hearts, selective inhibitors targeting either protein kinase A (PKA), adenylyl cyclase (Ac) or  $\beta_1$  adrenergic ( $\beta_1$ -A) receptor were independently perfused in the rats' healthy hearts for 20 min prior to adding IL-13 into the perfusion. Hearts were perfused with KT5720, a PKA inhibitor, which abolished all the effects of IL-13 on abolishing the contractile force, maximum contraction and relaxation speeds previously observed (Fig 2.A). A slight (-15%) decrease of the coronary flow also observed with KT5720 (Fig.2 A). Hearts were perfused with SQ22536, an adenylyl cyclase (Ac) inhibitor, which had a similar effect than KT5720 but also caused a decrease of the heart rate of 4% (Fig.2 B). This suggests that the inotropic effect of IL-13 is mediated via the activation of an Ac-PKA pathway. Finally, hearts were perfused with esmolol, a specific  $\beta_1$ -A receptor inhibitor prior to adding IL-13. The cytokine had negative inotropic effect on heart suggesting  $\beta_1$  receptors activation in the positive inotropic action of IL-13 (Fig.2 C). In conclusion, Ac activation by IL-13 seems to be due to  $\beta_1$ -A - Ac - PKA pathway activation.

#### IL-13 induces an Ac-dependent increase of the cardiomyocytes membrane excitability and sodium current in healthy hearts.

To determine the effect of IL-13 on the excitability of the heart membrane, macropatch clamp measurements were performed on their isolated ventricular myocytes from healthy rat hearts. This showed that IL-13, at a 10ng/ml concentration, was inducing an increase in the sodium current as shown on I/V curve (Fig.3 A and B). At this concentration, IL-13 also induced an increase of the maximal current  $-4.8 \pm 0.9$  to  $-7.49 \pm 1.6$  nA which represent an increase of approximately 35% (Fig.3 B). Interestingly, IL-13 caused the activation curve to shift toward a negative potential which led to the opening of the sodium channels creating more negative potential (Fig.3 C ). This was associated with an even more negative potential for the  $V_{1/2}$  activation, from  $-46.4 \pm 4$  to  $-50.2 \pm 2.7$  mV (Fig.3 E). Contrary to the activation curve, IL-13 had no effect on the inactivation curve of the heart membrane (Fig.3 D and E).

To assess whether this increase in sodium current and membrane excitability were Ac-dependent, cardiomyocytes were pre-treated with PKA inhibitor KT5720 for 15min at 0.3µg/ml, leading to the blockade of the increase in sodium current by IL-13, suggesting that IL-13 effect on the membrane is Ac-dependent (Fig.3F).

### **IL-13 induces the translocation of Na<sub>v</sub>1.5 and Na<sub>v</sub>1.4 from the cardiomyocyte cytosol to its membrane**

Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels are membrane proteins responsible for the membrane excitability and essential for excitation/contraction coupling. The two main isoforms in ventricular myocytes are Na<sub>v</sub>1.5 and Na<sub>v</sub>1.4, composing respectively 77.5% and 8.7% of all the Na<sub>v</sub> present in the ventricle (Westenbroek et al., 2013). To determine whether Na<sub>v</sub>1.5 and Na<sub>v</sub>1.4 are involved in the positive inotropic effect of IL-13 on healthy hearts, western blots were performed on the membrane proteins, corresponding to the “active pool of Na<sub>v</sub>”, of the ventricular myocytes. We used heart perfused with Tyrode only (without cytokine or inhibitor) as a control group, and hearts perfused with IL-13 presented previously.

Membrane proteins were extracted and western blot targeting Na<sub>v</sub>1.5 and Na<sub>v</sub>1.4 performed. Hearts perfused with IL-13 showed an increase in Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 protein abundance at the membrane of approximately +37% and +52% for Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 respectively (Fig.4). To quantitatively assess the enrichment of membrane Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 after perfusion of IL-13, membrane and cytosolic proteins were separately extracted and a membrane Na<sub>v</sub> vs cytosolic Na<sub>v</sub> ratio was calculated using Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 membrane and cytosolic abundances. In the control group, membrane Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 were shown to be 90 % and 133 % respectively more abundant than cytosolic Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 (Fig 5). Whereas, when IL-13 was perfused for 15 min, those ratios much greater with an approximately 2.5-fold (254 %) increase for Na<sub>v</sub>1.4 and 2.5-fold (286 %) increase for Na<sub>v</sub>1.5 (Fig 5). All these data suggest that IL-13 may induce the translocation of both Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 from the cytosol to the membrane of the cardiomyocytes. To determine if Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 translocation was also Ac-dependent, hearts perfused with IL-13 were treated with Ac inhibitor SQ22536. No increase in Na<sub>v</sub>1.4 and Na<sub>v</sub>1.5 translocation occurred when perfused hearts were pre-treated with Ac inhibitor; suggesting that the translocation of these two proteins is Ac-dependent (Fig 6).

### IL-13 has no positive nor negative inotropic effect on septic hearts

Our data, so far, suggest that IL-13 has a positive inotropic effect on healthy hearts (Fig 1-5). To determine whether IL-13 has similar or opposite effects on septic hearts, hearts from rats undergoing CLP-induced chronic sepsis for 7 days were harvested and perfused with IL-13 and the same experiments were performed under the same condition as for the healthy hearts.

Contrary to healthy hearts, IL-13 had no effect on the contractile force nor the contraction and relaxation speeds of the septic hearts (Fig 7). IL-13 caused a slight yet significant decrease of the heart rate (- 6%) and coronary flow (- 14%) (Fig 7). To assess the standard sodium current and activation curves in healthy (control) and septic hearts, macropatch clamp measurements of the isolated ventricular myocytes of septic and healthy hearts were first performed without perfusing IL-13. Results showed no significant difference in sodium current, with an  $I_{Na \text{ max}}$  of  $4.5 \pm 0.5 \text{ nA}$  and  $3.8 \pm 0.5 \text{ nA}$  for control (healthy) and septic hearts respectively, nor in the activation curve between control (healthy) and septic hearts (Fig 8 A-C). To determine the effect of IL-13 on the sodium current of septic heart, macropatch clamp measurements were performed on septic cardiomyocytes before and after IL-13 infusion following the same condition previously stated. Here results showed that IL-13 had no significant effect on the sodium current with an  $I_{Na \text{ max}}$  of  $5.4 \pm 1.1 \text{ nA}$  and  $5.7 \pm 0.3 \text{ nA}$  before and after IL-13 infusion respectively. These results suggest that, in septic heart, IL-13 positive inotropic effect is either lost or inhibited.

## **Discussion**

During sepsis, acute heart dysfunction is one of the major predictors of morbidity and mortality (Blanco et al., 2008). It is characterized by an impairment of both left ventricular systolic and diastolic functions (Parker et al., 1984), associated with vasodilatation and decreased arterial and venous resistance (Vieillard-Baron et al., 2008) thus inducing a decrease in arterial pressure. All these effects can lead to organ failure and eventually to heart failure.

Many cytokines have been shown to be released during sepsis and to be predominant in myocardial depression, with for example  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  which are known to

be cardio-depressing, with additional effects on calcium transients (Prabhu, 2004). IL-13 is involved in various illnesses and disorders such as asthma, CLP, or endotoxemia and depending on its location in the body and the illness, IL-13 can either have a pro- or anti-inflammatory function (Collighan et al., 2004; Matsukawa et al., 2000; Matsumoto et al., 2012; Tliba et al., 2003, p. 13; Wills-Karp et al., 1998).

Although the role of IL-13 in time of illness has been extensively studied, its effect on healthy hearts still remains elusive. Here, we showed that IL-13 had a positive inotropic effect on healthy hearts. The cardiac contractile force and the maximum contraction and relaxation speeds were all increased without affecting the heart rate or the coronary flow when healthy rat hearts were perfused with IL-13 (Fig 1).

$\beta$ 1-A receptors along with  $\beta$ 2-A receptors are primarily present in the heart, composing respectively 75-80% and 20-25% of the cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors (Madamanchi, 2007).  $\beta$ 1-A receptors can be stimulated either by adrenaline/noradrenaline or pharmacologic molecules such as isoprenaline.  $\beta$ 1-A activation leads to the stimulation of a G stimulatory protein subunit  $\alpha$  ( $G_{\alpha_s}$ ), which generates the second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP) by activation of the Ac. Increasing of cAMP level activate cAMP dependent protein kinase A (PKA), which can phosphorylate a wide range of protein such as phospholamban (PLB), troponin I or ryanodine receptor (RyR), strongly involved in cardiac contraction (Li et al., 2000). PKA also can induce the phosphorylation of dihydropyridine receptor (DHPR) calcium channels thus inducing an increase in calcium current by phosphorylation (Bünemann et al., 1999).

Our results indicate that the same pathway can lead to an increase in sodium currents. Moreover, activation of sodium current by IL-13 may be involved in the inotropic effect. Sodium current is clearly involved in heart contractility. Hearts perfused with Tetrodotoxin, a specific  $\text{Na}^+$  channel blocker ( $\text{Na}_v1.4$ -specific), showed a 40 % decrease of contractility compared to their control (Koesters et al., 2014). This highlights the importance of the sodium currents for the heart contractility. In addition, the up-regulation of the sodium current can increase the conduction velocity in non-nodal tissues which is associated with an increase in contraction speed. Our findings are consistent with these previous studies as, here, IL-13 increased the contractile force as well as the contraction and relaxation speeds of healthy hearts (Fig.1). Moreover, by using  $\beta$ 1-A receptors - Ac - PKA-specific inhibitors, we showed that IL-13 positive inotropic effect was abolished (Fig 2 A-C) suggesting that IL-13 positive

inotropic effect occurs via the  $\beta_1$ -A - Ac - PKA dependent pathway. When  $\beta_1$ -A receptors were inhibited, a decrease of the contractile force and the contraction and relaxation speeds was observed in IL-13 perfused hearts which suggests that another mechanism or pathway may be activated by the cytokine. This also suggests that IL-13 may have a negative inotropic action on healthy hearts when another pathway is involved. We hypothesized that IL-3 could activate all three  $\beta$ -adrenergic receptors and that  $\beta_1$ -A inhibition could have unmasked the activation of  $\beta_2$  and  $\beta_3$  which are known to induce negative inotropic effects. A non-selective  $\beta$ -adrenergic receptor propranolol was tested with IL-13 in a Langendorff system but results were similar to what was observed with esmolol suggesting that another mechanism may be activated by IL-13 leading to the negative down-regulation of Ac - PKA (data not shown).

We first hypothesized that IL-13 may activate the insulin receptor substrates (IRS) 1 and 2 when binding to the IL-13R $\alpha_1$  receptor; which leads to the activation of phosphoinositol 3 kinase (PI3K) (Hershey, 2003). PI3K, the  $\alpha$  isoform in particular, is known to increase the contraction force and both maximum contraction and relaxation speeds of the heart (Yano et al., 2008). However, this hypothesis was ruled out as the  $\beta_1$ -A - Ac - PKA dependent pathway was shown to be the primary pathway involved in IL-13 positive inotropic effect. Adrenergic stimulation was shown to stimulate heart force and frequency as well as increase the depolarisation rate in sinoatrial node cells under isoprenaline treatment (DiFrancesco, 2006). This was associated with an increase of  $I_f$  current under cAMP-mediated control responsible for the heart rate. Yet, in this study, the cytokine perfusion had only an inotropic effect which supports the hypothesis of IL-13 receptors being expressed in ventricular cells only and not in sinoatrial node cells. Although, our findings show that IL-13 positive inotropic effect is caused by the activation of the  $\beta_1$  pathway, which is known to also activate PI3K (Zhang et al., 2011), the mechanism behind the activation of  $\beta_1$  receptor by IL-13 still remains poorly understood.

Previous studies performed in our laboratory have showed that cytokines were able to modify the sodium current in the heart. Pro-inflammatory TNF- $\alpha$  and ciliary neurotrophic factor (CNTF) were shown to decrease the sodium current by activating the PKC pathway (Guillard et al., 2013; Guillouet et al., 2011). Here, we showed, via macropatch-clamp experiments measuring the sodium current ( $I_{Na\ max}$ ) of hearts perfused with IL-13, that  $I_{Na\ max}$  was increased by 35% (Fig 3). This was in agreement with an up-expression of 37% and 52% for membrane Na $_v$ 1.4 and Na $_v$ 1.5 sodium channels respectively (Fig 4). It should also be noticed that the activation curve was shifted toward a more negative potential with  $V_{1/2}$  from -

46.43 to -50.21 mV by IL-13, which suggests that the  $\text{Na}_V1.5/\text{Na}_V1.4$  ratio in the total channels population was modified by IL-13 in favour of  $\text{Na}_V1.5$  channels. The shift toward a hyperpolarized potential in the activation curve also confirmed previous findings from our laboratory showing that  $\text{Na}_V1.5$  had an activation potential more negative than  $\text{Na}_V1.4$  (Rannou et al., 2011); but also that this shift was associated with an increased excitability of the membrane as the opening of the channels occurs from a more negative potential (Rush et al., 2005). This was also shown to be in agreement with the enhanced targeting of membrane  $\text{Na}_V1.5$  by IL-13 (Fig 4)

Here, we showed that IL-13 was responsible for a significant increase in both  $\text{Na}_V1.4$  and  $\text{Na}_V1.5$  translocation to the cardiomyocyte membrane (Fig 4 and 6).  $\text{Na}_V1.5$  abundance was shown to be greater than the one observed for  $\text{Na}_V1.4$  which corresponds to an increase in the  $\text{Na}_V1.5/\text{Na}_V1.4$  ratio.  $\text{Na}_V1.4$  and  $\text{Na}_V1.5$  translocation seems to occur quickly post-perfusion of IL-13 which supports the hypothesis of a post-translational mechanism. Previous studies demonstrated a direct link for PKA mediated trafficking of  $\text{Na}_V1.5$  to the plasma membrane via the stimulation of PKA in HEK 293 cell line transfected with  $\text{Na}_V1.5$  gene, using three PKA-specific activators, including forskolin, a strong Ac activator (Hallaq et al., 2006). Although,  $\text{Na}_V$  proteins and their roles in sodium and other ion currents have been previously described, our study shows for the first time that a rapid increase in  $\text{Na}_V$  proteins translocation to the cardiomyocyte membrane occurs following the perfusion of IL-13 into isolated heart. Heart perfused with Ac inhibitor and then IL-13 did not show any translocation of either  $\text{Na}_V$  proteins supporting the hypothesis that the  $\beta 1\text{-A} - \text{Ac} - \text{PKA}$  dependent pathway is involved in the increase of  $\text{Na}_V1.4$  and  $\text{Na}_V1.5$  translocation caused IL-13.

An increase in the abundance of  $\text{Na}_V$  proteins, especially of  $\text{Na}_V1.5$ , at the membrane seems to be correlated to a better excitability of the heart, but also of the intra-cardiac conduction speed and the amplitude/duration of the action potentials. Moreover, the  $\alpha$  subunit of the  $\text{Na}_V$  can be directly phosphorylated by both PKC and PKA (Catterall, 2012, p.). PKC phosphorylation was shown to cause a decrease in the sodium current (Guillouet et al., 2011; Talon et al., 2005). Oppositely, PKA was shown to phosphorylate serine amino acids, such as Ser525 and 528, in the I-II inter-domain linker (Zhou et al., 2002), leading to a slow increase of the sodium current. Yet, PKA main role in the regulation of sodium current was shown to be in the translocation  $\text{Na}_V1.5$  to the cell membrane (Zhou et al., 2000). To determine how important the increase of excitability by IL-13 is for the heart force, we intended to use nonensin, a non-specific inhibitor disrupting the cell membrane trafficking, in order to know

the importance of the increase of the membrane excitability by IL-13 on heart force. However, due to its non-specificity, nonensin was ruled out as it may have also affected the effect of IL-13 on calcium channel trafficking; IL-13 positive inotropic effect being also partly mediated by the PKA activation-induced phosphorylation of the different calcium channels and pumps.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers, also regulated by PKA, are known to regulate the intracellular concentration of calcium. The inotropic effect caused by  $\beta$ -adrenergic stimulation was reduced when  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers were inhibited (Saini et al., 2006). However, IL-13 induced no modification of the heart rate. It implies that IL-13 does not induce an increase in cAMP levels in sinus node cells and do not stimulate  $I_f$  channels which are responsible for the regulation of the heart rate. We can either hypothesized that no IL-13 receptors are present at the surface of sinus node cells or that the PKA activation observed in ventricular cardiomyocytes does not occur in sinus node cells.

In this study, the initial hypothesis was that IL-13 positive inotropic effect could reverse the cardiac dysfunction observed in a chronic sepsis induced by CLP. However, IL-13 was shown to have lost its positive inotropic effect in septic heart (Fig 7). These findings strongly support previous studies stating that the heart function is impaired during sepsis (Drosatos et al., 2015). Cardiac dysfunction has been linked to the decrease of  $\beta_1$  receptor expression, for both mRNA and protein, and to a decrease of cAMP production by Ac with  $\beta_1$  stimulation by dobutamine (Thangamalai et al., 2014). cAMP production has been shown to decrease during myocardial infraction and to be related to the decrease of Ac 5 and 6 isoforms expression (Swaney et al., 2007). Moreover, sepsis and septic shock in particular have also been shown to induce an increase of plasma catecholamines concentration (Thangamalai et al., 2014). We therefore hypothesized that  $\beta_1$  pathway was already overstimulated in the heart and could not respond to an IL-13 stimulation. This would explain the lack of response and inotropic effect in septic hearts. Another explanation would be that the abundance of IL-13 receptors decreases in the ventricle of septic hearts. However, IL-13 production was shown to be increased during sepsis; beside, its inhibition was shown to cause a significant decrease of the survival of mice with a seven-day CLP-induced sepsis (Matsukawa et al., 2000), which suggests that IL-13 may have a crucial protective role during sepsis. Here, we focused on the rapid effect of IL-13 on the heart contractile force to determine whether IL-13 could be considered as a beneficial cytokine for the heart function. Yet, neither the possible synergic action of IL-13 with another mediator of inflammation, such as TGF- $\beta_1$ , nor the effects on others tissues / organs were investigated in the present study (Zhou et al., 2012). Similar

results were observed with patch clamp on septic cardiomyocytes. IL-13 was responsible for the increase in sodium current in the control groups but this effect was lost in septic hearts (Fig 3 and 8). Sodium currents recorded in control and septic cardiomyocytes showed that the membrane excitability was similar in both healthy and septic hearts (Fig 8) which suggests that the lack of effect of IL-13 on sodium current in septic cardiomyocyte may not be due to a decrease in membrane excitability induced by sepsis. Both membrane excitability and force contraction have been shown to be regulated by PKA activation in healthy hearts. However, PKA activation was shown to be impaired during chronic sepsis which supports previous findings on septic heart contraction.

Here, we showed that IL-13 fails to increase the membrane excitability and contractile force of septic hearts. Yet, the lack of an IL-13-induced positive inotropic effect during sepsis could also be considered as a positive point. Sepsis induces the excessive stimulation of  $\beta$  adrenergic stimulation by increasing plasma catecholamines which can induce deleterious effects.  $\beta_1$  stimulation by dobutamine has been shown to increase the mortality rate in critically ill patients (O'Connor et al., 1999); therefore, the lack of a  $\beta_1$  response to IL-13 could be considered as a protective effect during sepsis. Similarly, selective  $\beta_1$  antagonists have been shown to reduce pro inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  (Suzuki et al., 2005), but also to increase heart performance (Hagiwara et al., 2009), and improve the survival (Ackland et al., 2010). Contrary to  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ -adrenergic stimulation can prevent myocardial apoptosis and damages (Patterson et al., 2004).

## Conclusion

In this study, we showed for the first time that IL-13 induces a positive inotropic effect on isolated and healthy hearts; but also that the increase of contractile force was associated with an increase of voltage-dependent  $\text{Na}^+$  channels  $\text{Na}_v1.4$  and  $\text{Na}_v1.5$  translocation to the membrane of cardiomyocytes. We also showed that both effects were regulated by the  $\beta_1$ -A - Ac – PKA dependent pathway. In addition, IL-13 induces an increase in the heart sodium current which is essential for the excitation/contraction coupling mechanism. Yet, its effect on septic hearts still remains elusive as IL-13 has no positive inotropic effects on membrane excitability and force contraction.

### **Conflict of interest:**

The authors declare that no conflict of interest exists.

This research was not funded by any private, industrial, public nor non-profit organisations or agencies.

### **Abbreviations:**

Adenylyl cyclase (Ac);  $\beta 1$  adrenergic receptor ( $\beta 1$ -A); Cyclic adenosine monophosphate (cAMP); Critical illness polyneuromyopathy (CIP); Cecal ligation and puncture (CLP); Ciliary neurotrophic factor (CNTF); Dihydropyridine receptor (DHPR); Intensive care unit (ICU); Interleukin (IL); Phosphoinositol 3 kinase (PI3K); Protein kinase A (PKA); Protein kinase C (PKC); Standard error mean (SEM); Systemic inflammatory response syndrome (SIRS); Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ); Voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel (Na<sub>v</sub>)

## **References**

- Ackland, G.L., Yao, S.T., Rudiger, A., Dyson, A., Stidwill, R., Poputnikov, D., Singer, M., Gourine, A.V., 2010. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit. Care Med.* 38, 388–394. doi:10.1097/CCM.0b013e3181c03dfa
- Blanco, J., Muriel-Bombín, A., Sagredo, V., Taboada, F., Gandía, F., Tamayo, L., Collado, J., García-Labattut, A., Carriedo, D., Valledor, M., De Frutos, M., López, M.-J., Caballero, A., Guerra, J., Alvarez, B., Mayo, A., Villar, J., Grupo de Estudios y Análisis en Cuidados Intensivos, 2008. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit. Care Lond. Engl.* 12, R158. doi:10.1186/cc7157
- Bünemann, M., Gerhardstein, B.L., Gao, T., Hosey, M.M., 1999. Functional regulation of L-type calcium channels via protein kinase A-mediated phosphorylation of the beta(2) subunit. *J. Biol. Chem.* 274, 33851–33854.
- Burd, P.R., Thompson, W.C., Max, E.E., Mills, F.C., 1995. Activated mast cells produce interleukin 13. *J. Exp. Med.* 181, 1373–1380.
- Catterall, W.A., 2012. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J. Physiol.* 590, 2577–2589. doi:10.1113/jphysiol.2011.224204

- Collighan, N., Giannoudis, P.V., Kourgeraki, O., Perry, S.L., Guillou, P.J., Bellamy, M.C., 2004. Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis. *Br. J. Surg.* 91, 762–768. doi:10.1002/bjs.4521
- DiFrancesco, D., 2006. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol. Res.* 53, 399–406. doi:10.1016/j.phrs.2006.03.006
- Drosatos, K., Lymperopoulos, A., Kennel, P.J., Pollak, N., Schulze, P.C., Goldberg, I.J., 2015. Pathophysiology of sepsis-related cardiac dysfunction: driven by inflammation, energy mismanagement, or both? *Curr. Heart Fail. Rep.* 12, 130–140. doi:10.1007/s11897-014-0247-z
- Edmunds, N.J., Lal, H., Woodward, B., 1999. Effects of tumour necrosis factor-alpha on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: possible mechanisms for a decline in cardiac function. *Br. J. Pharmacol.* 126, 189–196. doi:10.1038/sj.bjp.0702294
- Friedrich, O., Reid, M.B., Van den Berghe, G., Vanhorebeek, I., Hermans, G., Rich, M.M., Larsson, L., 2015. The Sick and the Weak: Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill. *Physiol. Rev.* 95, 1025–1109. doi:10.1152/physrev.00028.2014
- Guillard, E., Gueret, G., Guillouet, M., Vermeersch, V., Rannou, F., Giroux-Metges, M.-A., Pennec, J.-P., 2013. Alteration of muscle membrane excitability in sepsis: possible involvement of ciliary nervous trophic factor (CNTF). *Cytokine* 63, 52–57. doi:10.1016/j.cyto.2013.04.023
- Guillouet, M., Gueret, G., Rannou, F., Giroux-Metges, M.-A., Gioux, M., Arvieux, C.C., Pennec, J.-P., 2011. Tumor necrosis factor- $\alpha$  downregulates sodium current in skeletal muscle by protein kinase C activation: involvement in critical illness polyneuromyopathy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301, C1057-1063. doi:10.1152/ajpcell.00097.2011
- Guillouët, M., Rannou, F., Giroux-Metges, M.-A., Droguet, M., Pennec, J.-P., 2013. Tumor Necrosis Factor alpha induced hypoexcitability in rat muscle evidenced in a model of ion currents and action potential. *Cytokine* 64, 165–171. doi:10.1016/j.cyto.2013.07.007
- Hagiwara, S., Iwasaka, H., Maeda, H., Noguchi, T., 2009. Landiolol, an ultrashort-acting beta1-adrenoceptor antagonist, has protective effects in an LPS-induced systemic inflammation model. *Shock* Augusta Ga 31, 515–520. doi:10.1097/SHK.0b013e3181863689
- Hallaq, H., Yang, Z., Viswanathan, P.C., Fukuda, K., Shen, W., Wang, D.W., Wells, K.S., Zhou, J., Yi, J., Murray, K.T., 2006. Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells. *Cardiovasc. Res.* 72, 250–261. doi:10.1016/j.cardiores.2006.08.007
- Hershey, G.K.K., 2003. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111, 677–690; quiz 691.
- Hoshino, T., Winkler-Pickett, R.T., Mason, A.T., Ortaldo, J.R., Young, H.A., 1999. IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 162, 51–59.
- Koesters, A., Engisch, K.L., Rich, M.M., 2014. Decreased cardiac excitability secondary to reduction of sodium current may be a significant contributor to reduced contractility in a rat model of sepsis. *Crit. Care Lond. Engl.* 18, R54. doi:10.1186/cc13800
- Li, L., Desantiago, J., Chu, G., Kranias, E.G., Bers, D.M., 2000. Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H769-779.
- Madamanchi, A., 2007. Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure. *McGill J. Med. MJM Int. Forum Adv. Med. Sci. Stud.* 10, 99–104.
- Matsukawa, A., Hogaboam, C.M., Lukacs, N.W., Lincoln, P.M., Evanoff, H.L., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., 2000. Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 2738–2744.

- Matsumoto, H., Hirata, Y., Otsuka, K., Iwata, T., Inazumi, A., Niimi, A., Ito, I., Ogawa, E., Muro, S., Sakai, H., Chin, K., Oku, Y., Mishima, M., 2012. Interleukin-13 enhanced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations in airway smooth muscle cells. *Cytokine* 57, 19–24. doi:10.1016/j.cyto.2011.10.014
- O'Connor, C.M., Gattis, W.A., Uretsky, B.F., Adams, K.F., McNulty, S.E., Grossman, S.H., McKenna, W.J., Zannad, F., Swedberg, K., Gheorghiade, M., Califf, R.M., 1999. Continuous intravenous dobutamine is associated with an increased risk of death in patients with advanced heart failure: insights from the Flolan International Randomized Survival Trial (FIRST). *Am. Heart J.* 138, 78–86.
- Parker, M.M., Shelhamer, J.H., Bacharach, S.L., Green, M.V., Natanson, C., Frederick, T.M., Damske, B.A., Parrillo, J.E., 1984. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann. Intern. Med.* 100, 483–490.
- Patterson, A.J., Zhu, W., Chow, A., Agrawal, R., Kosek, J., Xiao, R.P., Kobilka, B., 2004. Protecting the myocardium: a role for the beta2 adrenergic receptor in the heart. *Crit. Care Med.* 32, 1041–1048.
- Prabhu, S.D., 2004. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ. Res.* 95, 1140–1153. doi:10.1161/01.RES.0000150734.79804.92
- Rannou, F., Pennec, J.-P., Morel, J., Guéret, G., Leschiera, R., Droguet, M., Gioux, M., Giroux-Metges, M.-A., 2011. Na v1.4 and Na v1.5 are modulated differently during muscle immobilization and contractile phenotype conversion. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 111, 495–507. doi:10.1152/japplphysiol.01136.2010
- Rossignol, B., Guéret, G., Pennec, J.-P., Morel, J., Rannou, F., Giroux-Metges, M.-A., Talarmin, H., Gioux, M., Arvieux, C.C., 2008. Effects of chronic sepsis on contractile properties of fast twitch muscle in an experimental model of critical illness neuromyopathy in the rat. *Crit. Care Med.* 36, 1855–1863. doi:10.1097/CCM.0b013e318176106b
- Rush, A.M., Dib-Hajj, S.D., Waxman, S.G., 2005. Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones. *J. Physiol.* 564, 803–815. doi:10.1113/jphysiol.2005.083089
- Saini, H.K., Tripathi, O.N., Zhang, S., Elimban, V., Dhalla, N.S., 2006. Involvement of  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger in catecholamine-induced increase in intracellular calcium in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H373–380. doi:10.1152/ajpheart.00613.2005
- Suzuki, T., Morisaki, H., Serita, R., Yamamoto, M., Kotake, Y., Ishizaka, A., Takeda, J., 2005. Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. *Crit. Care Med.* 33, 2294–2301.
- Swaney, J.S., Patel, H.H., Yokoyama, U., Lai, N.C., Spellman, M., Insel, P.A., Roth, D.M., 2007. Adenylyl cyclase activity and function are decreased in rat cardiac fibroblasts after myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3216–3220. doi:10.1152/ajpheart.00739.2007
- Takahashi, Y., Katayose, D., Shindoh, C., 1999. Interleukin-13 prevents diaphragm muscle deterioration in a septic animal model. *Tohoku J. Exp. Med.* 189, 191–202.
- Talon, S., Giroux-Metges, M.-A., Pennec, J.-P., Guillet, C., Gascan, H., Gioux, M., 2005. Rapid protein kinase C-dependent reduction of rat skeletal muscle voltage-gated sodium channels by ciliary neurotrophic factor. *J. Physiol.* 565, 827–841. doi:10.1113/jphysiol.2005.084681
- Thangamalai, R., Kandasamy, K., Sukumarn, S.V., Reddy, N., Singh, V., Choudhury, S., Parida, S., Singh, T.U., Boobalan, R., Mishra, S.K., 2014. Atorvastatin prevents sepsis-induced downregulation of myocardial  $\beta_1$ -adrenoceptors and decreased cAMP response in mice. *Shock Augusta Ga* 41, 406–412. doi:10.1097/SHK.0000000000000138

- Tliba, O., Deshpande, D., Chen, H., Van Besien, C., Kannan, M., Panettieri, R.A., Amrani, Y., 2003. IL-13 enhances agonist-evoked calcium signals and contractile responses in airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1159–1162. doi:10.1038/sj.bjp.0705558
- Vieillard-Baron, A., Caille, V., Charron, C., Belliard, G., Page, B., Jardin, F., 2008. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Crit. Care Med.* 36, 1701–1706. doi:10.1097/CCM.0b013e318174db05
- Westenbroek, R.E., Bischoff, S., Fu, Y., Maier, S.K.G., Catterall, W.A., Scheuer, T., 2013. Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 64, 69–78. doi:10.1016/j.yjmcc.2013.08.004
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., Donaldson, D.D., 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258–2261.
- Yano, N., Tseng, A., Zhao, T.C., Robbins, J., Padbury, J.F., Tseng, Y.-T., 2008. Temporally controlled overexpression of cardiac-specific PI3K $\alpha$  induces enhanced myocardial contractility--a new transgenic model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H1690–1694. doi:10.1152/ajpheart.00531.2008
- Zhang, W., Yano, N., Deng, M., Mao, Q., Shaw, S.K., Tseng, Y.-T., 2011.  $\beta$ -Adrenergic receptor-PI3K signaling crosstalk in mouse heart: elucidation of immediate downstream signaling cascades. *PloS One* 6, e26581. doi:10.1371/journal.pone.0026581
- Zhou, J., Shin, H.-G., Yi, J., Shen, W., Williams, C.P., Murray, K.T., 2002. Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. *Circ. Res.* 91, 540–546.
- Zhou, J., Yi, J., Hu, N., George, A.L., Murray, K.T., 2000. Activation of protein kinase A modulates trafficking of the human cardiac sodium channel in *Xenopus* oocytes. *Circ. Res.* 87, 33–38.
- Zhou, X., Hu, H., Balzar, S., Trudeau, J.B., Wenzel, S.E., 2012. MAPK regulation of IL-4/IL-13 receptors contributes to the synergistic increase in CCL11/eotaxin-1 in response to TGF- $\beta$ 1 and IL-13 in human airway fibroblasts. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 188, 6046–6054. doi:10.4049/jimmunol.1102760

## Figure Captions

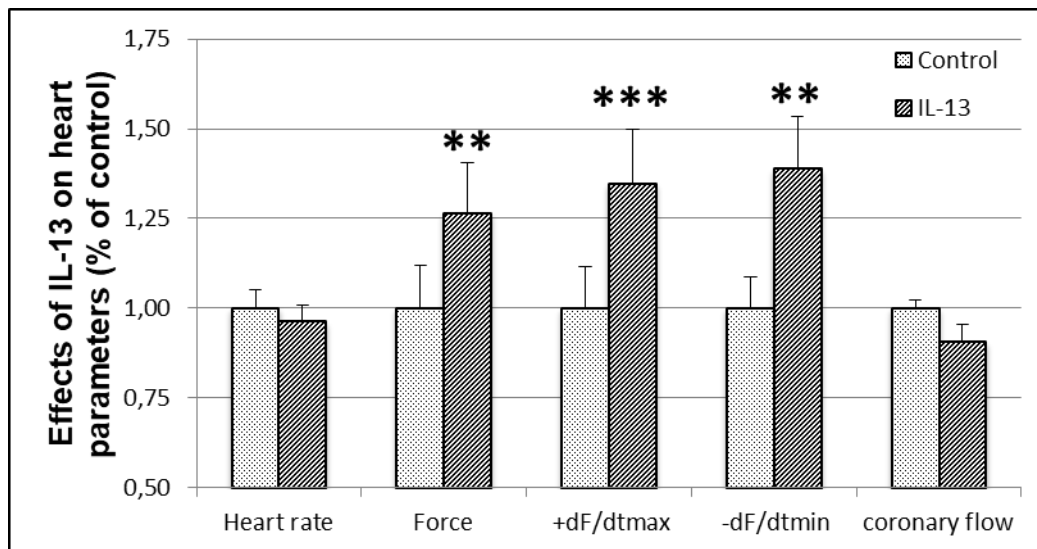


Figure 1: Cardiac function after IL-13 treatment. n=7 hearts were treated with IL-13 at final concentration 10ng/ml for 15min. Heart rate, contractile force, maximum speed of contraction and relaxation, and coronary flow are represented. Each heart represents its own control during control recording beats. Data are mean values  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01 vs control, \*\*\*P<0.001 vs control.

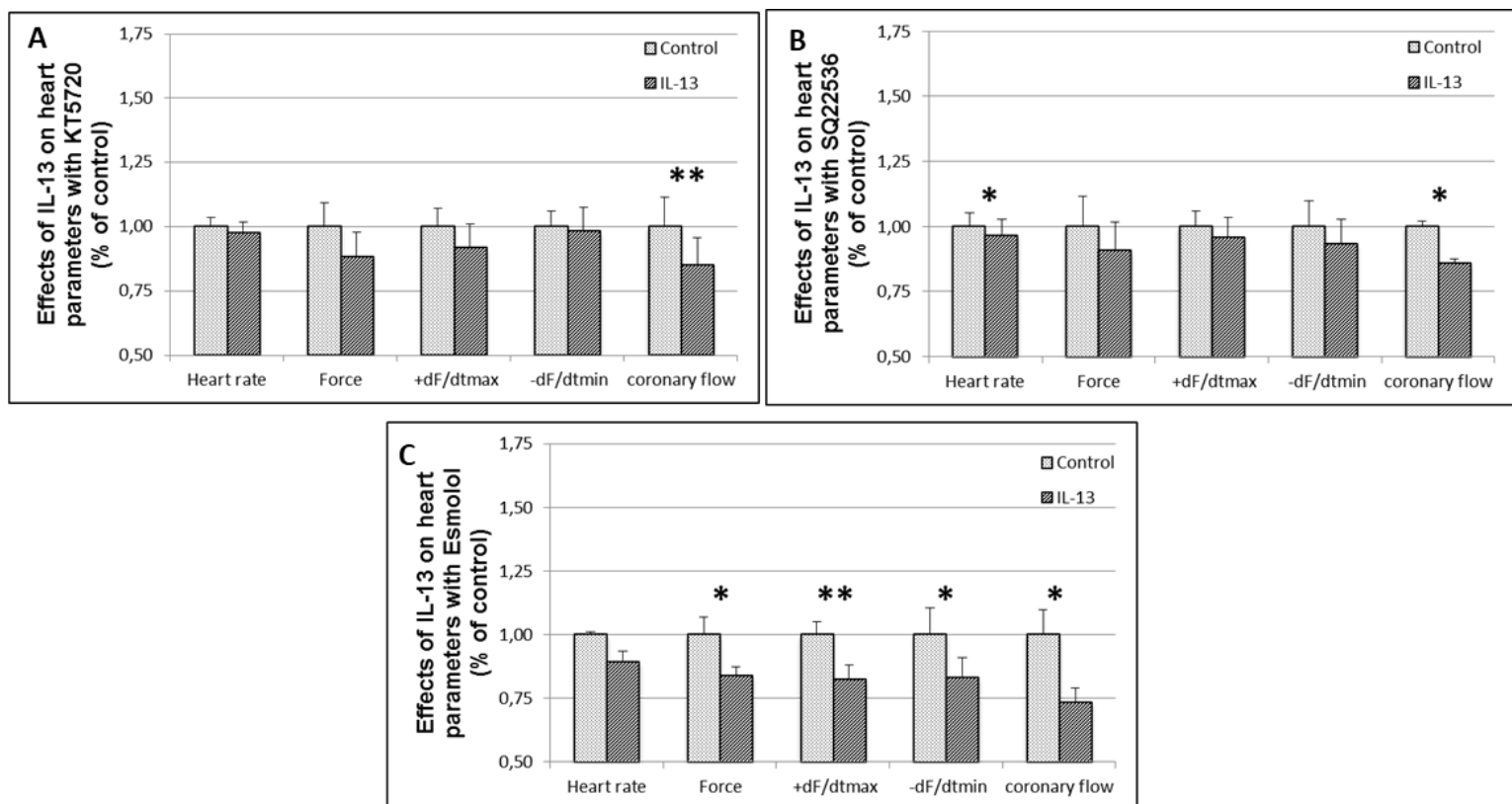


Figure 2: Effect of PKA inhibitor KT5720 (A) (n=4), Adenylyl cyclase inhibitor SQ22536 (B) (n=4),  $\beta_1$  adrenoreceptor adrenergic antagonist Esmolol (C) (n=3) on IL-13 perfused heart. Contractile force, maximum speed of contraction and relaxation, and coronary flow are represented. Each heart represents its own control during control recording beats. Data are mean values  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs control, \*\*P<0.01 vs control.

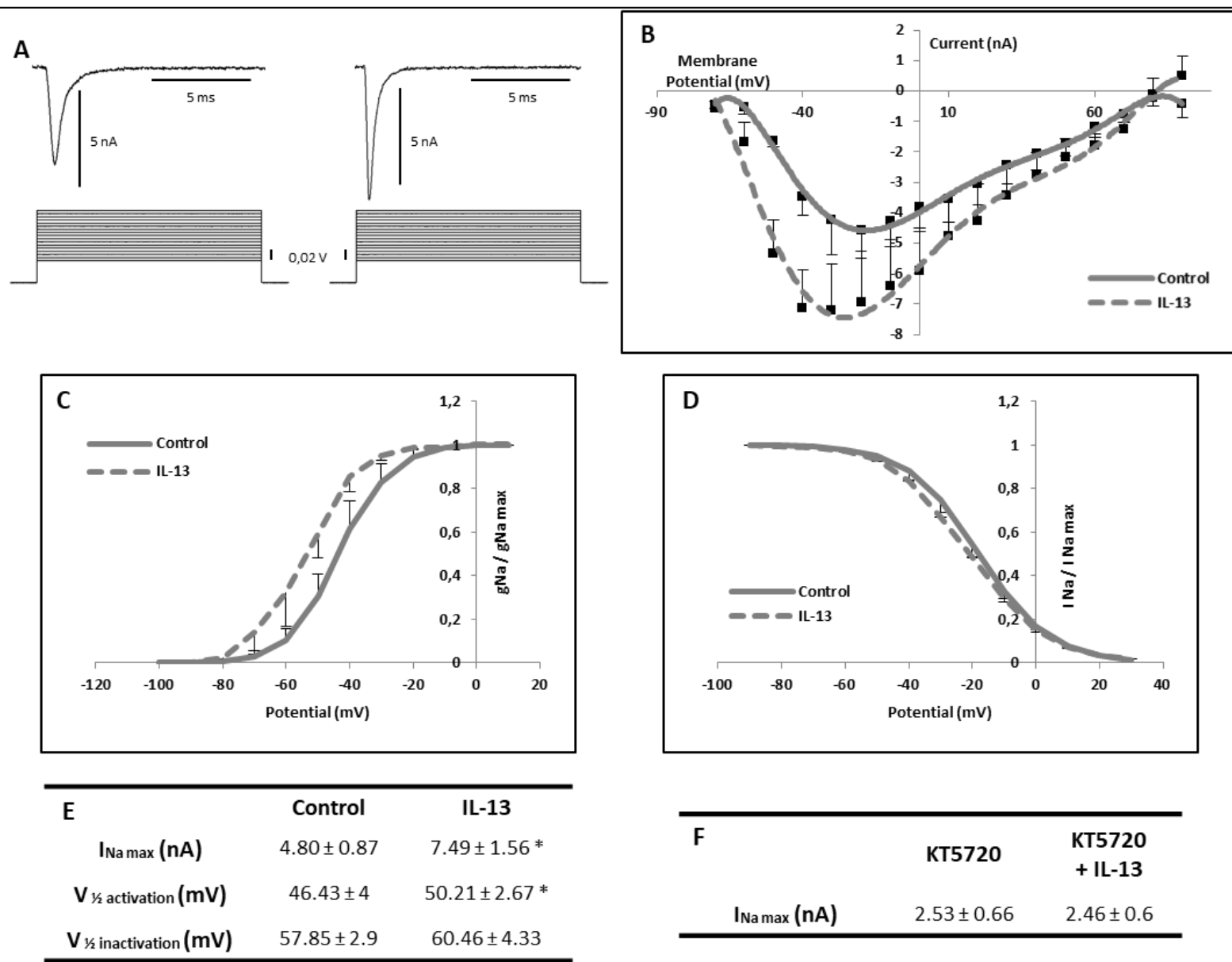


Figure 3: IL-13 at 10ng/ml increase sodium current in cardiomyocytes. A, examples of sodium currents recorded in control condition (left) and after IL-13 addition (right) on upper, the lower traces represents imposed membrane potentials. B, effects of IL-13 on the sodium current voltage relationship (I/V curves). C, activation relationship of sodium current corresponding to ratio  $g_{Na}/g_{Na \max}$ . D, inactivation relationship of sodium current corresponding to ratio  $I_{Na}/I_{Na \max}$ . E, IL-13 increases  $I_{Na \max}$  and decreases the potential of  $V_{1/2}$  for the activation curve. F, effects of IL-13 on  $I_{Na \max}$  on cardiomyocytes incubated with KT5720. (n=5). Data are mean values  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs control.

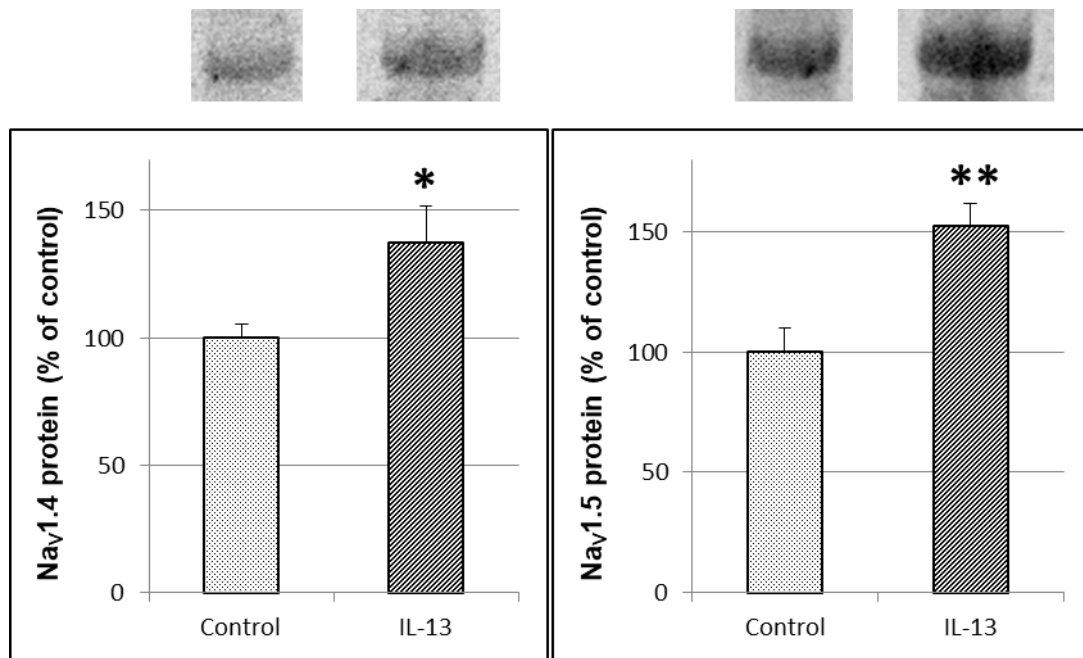


Figure 4: IL-13 effects on Nav<sub>1.4</sub> and Nav<sub>1.5</sub> expression in membrane cardiomyocyte. IL-13 hearts were perfused during 15min with 10ng/ml IL-13 (n=6). Densitometric quantification of NaV 1.4 and 1.5 membrane expression level expressed as percentage compared to control. Data are mean values  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs control, \*\*P<0.01 vs control.

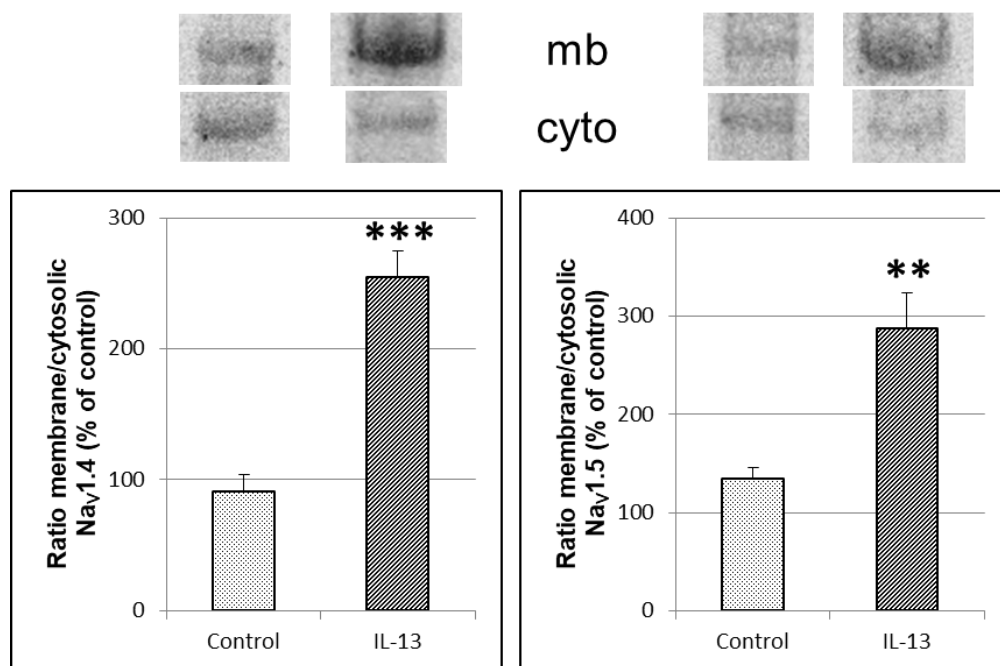


Figure 5: Involvement of IL-13 in membrane translocation of Nav 1.4 and Nav 1.5 in ventricular heart. IL-13 hearts were perfused during 15min with 10ng/ml IL-13 (n=6). Densitometric quantification of membrane vs cytosolic protein expression ratio expressed as percentage compared to control. Data are mean values  $\pm$  SEM. \*\*P<0.01 vs control, \*\*\*P<0.001 vs control.

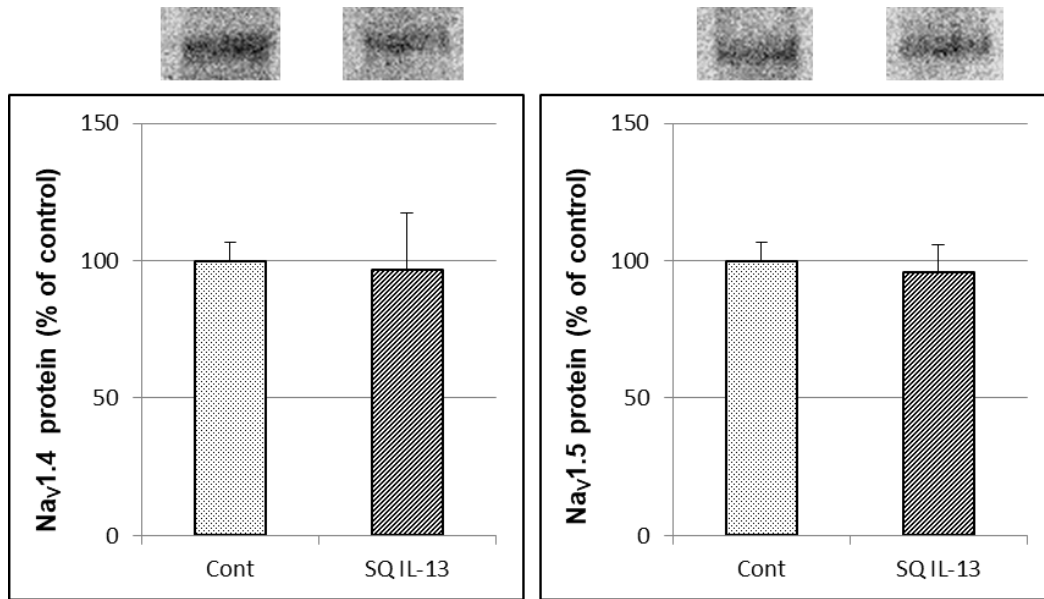


Figure 6:  $\text{Na}_V1.4$  and  $\text{Na}_V1.5$  membrane translocation by IL-13 is Ac dependent in heart. IL-13 hearts were perfused during 15min with 10ng/ml IL-13 (n=3). Densitometric quantification of membrane to cytosolic protein expression ratio expressed as percentage compared to control. Data are mean values  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs control.

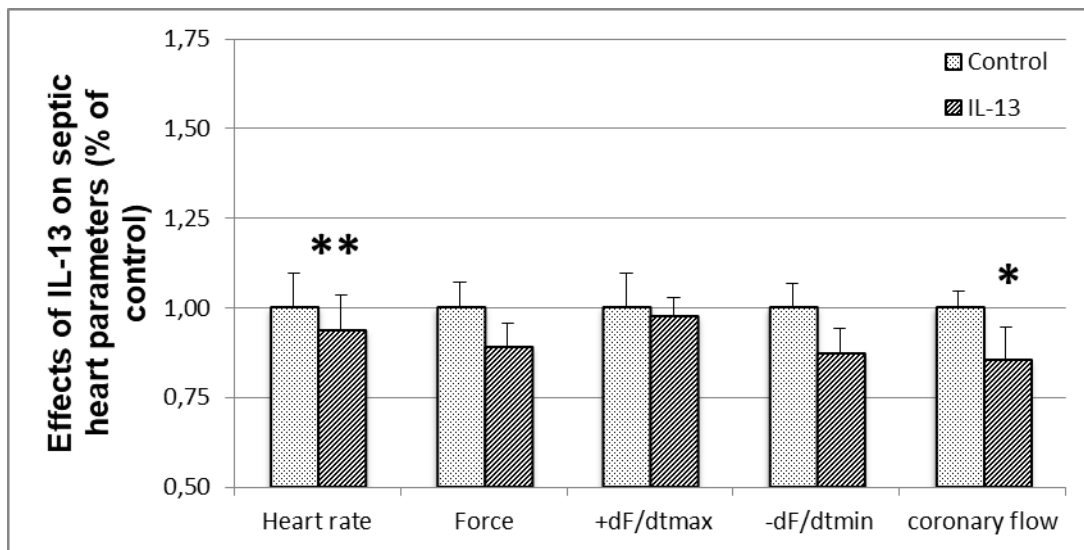
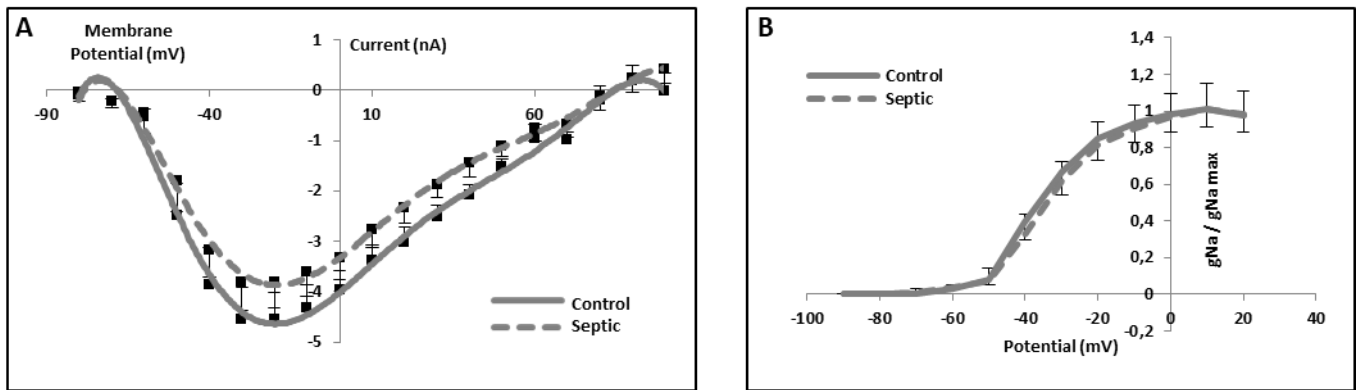


Figure 7: Cardiac function of septic heart after IL-13 treatment. n=7 septic hearts were treated with IL-13 at final concentration 10ng/ml during 15min. Heart rate, Contractile force, maximum speed of contraction and relaxation, and coronary flow are represented. Each heart represents its own control during control recording beats. Data are mean values  $\pm$  SEM. \*P<0.05 vs control, \*\*P<0.01 vs control.



| C                  | Control       | Septic        |
|--------------------|---------------|---------------|
| $I_{Na \max}$ (nA) | $4.5 \pm 0.5$ | $3.8 \pm 0.5$ |

| D                  | Septic        | Septic + IL-13 |
|--------------------|---------------|----------------|
| $I_{Na \max}$ (nA) | $5.4 \pm 1.1$ | $5.7 \pm 0.9$  |

Figure 8: Membrane excitability after chronic sepsis remains constant. A, sodium current voltage relationship (I/V curves) between control (n=11) and septic (n=11) conditions. B, activation relationship of sodium current corresponding to ratio  $g_{Na}/g_{Na \max}$  (n=11). C, maximal sodium current in control (n=11) and septic (n=11) cardiomyocytes. D, maximal sodium current in septic cardiomyocytes before and after IL-13 at 10ng/ml (n=2).

## Discussion des résultats

Les résultats montrent que 20 minutes de perfusion avec l'IL-13 augmentent la force de contraction des cœurs perfusés de 28,3%, ainsi que la vitesse de contraction et de relaxation de respectivement 35,5% et 38,9%. De plus, en utilisant des inhibiteurs spécifiques, nous avons montré que l'action de la cytokine passait par l'activation de la voie  $\beta$ 1-adrénérique ( $\beta$ 1-A), l'adénylate cyclase (AC) et les PKA. L'étude de l'excitabilité membranaire par patch clamp sur cardiomyocytes isolés a montré une augmentation du courant sodique maximal de 35% après perfusion d'IL-13 à 10ng/ml pendant 15 minutes. La quantification des  $\text{Na}_v1.4$  et  $\text{Na}_v1.5$  membranaires par Western blot a permis également de montrer que l'IL-13 induisait une augmentation de la quantité des isoformes des canaux à la membrane des cardiomyocytes de 37,4% pour les  $\text{Na}_v1.4$  et 52,2% pour les  $\text{Na}_v1.5$ . Enfin, nous avons testé l'IL-13 dans les mêmes conditions sur des cœurs perfusés isolés de rats septiques et sur des cardiomyocytes isolés de cœurs septiques. De façon surprenante, les résultats montrent que l'IL-13 perd ses effets bénéfiques sur le cœur dans cette condition.

Concernant le mode d'action de cette cytokine sur la fonction cardiaque sur cœur sain, nous montrons ici que la voie de signalisation activée est celle des  $\beta$ 1-A qui, *in fine*, active les PKA qui sont déjà connues pour leur effet inotrope positif [210,211]. Le mécanisme d'action permettant l'activation des récepteurs  $\beta$ 1-A reste néanmoins inconnu. Initialement nous avons émis l'hypothèse que l'action inotrope de la cytokine se faisait *via* l'activation de l'IRS1, qui est couplé au récepteur de l'IL-13, et entraîne l'activation des PI3K qui ont une action inotrope positive également [212,213]. Cependant, c'est la voie  $\beta$ 1-A - AC - PKA qui a été mise en évidence ici, mais le couplage entre le récepteur à l'IL13 et la voie  $\beta$ 1 reste indéterminé. Nous pouvons affirmer sans trop de réserves que l'IL-13 ne se fixe pas directement sur le récepteur  $\beta$ 1-A car, il n'y a pas d'action chronotrope positive de l'IL-13, ce qui serait le cas si les récepteurs  $\beta$ 1-A étaient activés au niveau sinusal ; les récepteurs de la cytokine seraient donc présents sur les cardiomyocytes ventriculaires, mais pas au niveau du tissu nodal, qui responsable de la fréquence cardiaque.

L'IL-13 a ensuite été testée sur l'excitabilité membranaire afin de déterminer si l'augmentation de la force de contraction était associée ou non à une augmentation du courant sodique voltage dépendant. C'est effectivement ce que nous avons observé puisqu'après 15 minutes de perfusion avec l'IL-13 à 10ng/ml, il apparaît une augmentation du courant sodique maximal de 35%. De plus, en pré-perfusant les cardiomyocytes isolés avec du KT5720, un inhibiteur de PKA, l'augmentation de courant sodique est annulée, suggérant également

l'implication des PKA dans la transduction du signal de l'IL-13 sur l'excitabilité membranaire. Les  $\text{Na}_v1.4$  et  $\text{Na}_v1.5$  ont des sites de phosphorylation par les PKA qui sont bien identifiés maintenant et qui sont responsables d'une augmentation du courant sodique [6]. Nous avons également vérifié par Western-blot si la quantité de canaux était modifiée, et en effet, la cytokine entraîne bien une augmentation de l'adressage à la membrane de  $\text{Na}_v1.4$  et  $\text{Na}_v1.5$  de respectivement 37% et 52%. De plus l'augmentation du ratio protéines membranaires sur protéines cytosoliques, et le temps court de perfusion de la cytokine, nous indique que cela est dû à une augmentation de l'adressage plus qu'à une augmentation de synthèse *de novo*. Une autre étude, utilisant des cellules HEK-293 transfectées avec le gène codant  $\text{Na}_v1.5$  indique que l'activation des PKA augmente le courant sodique maximal également dans ce modèle [214]. De plus, les auteurs montrent que cette augmentation de courant est très majoritairement due à l'augmentation du nombre de canaux à la membrane. Nous obtenons le même type de résultat ici avec une augmentation de l'adressage à la membrane des  $\text{Na}_v1.4$  et  $\text{Na}_v1.5$ , de manière PKA dépendante. Nous avons pensé utiliser un inhibiteur de la translocation membranaire, la réserpine, sur des cœurs perfusés afin de déterminer la part d'implication de l'augmentation du courant sodique dans la force de contraction du cœur. Néanmoins, cet inhibiteur non spécifique aurait entraîné également l'inhibition de l'adressage à la membrane d'autres canaux, tel que les DHPR et les RyR par exemple, responsables également de la contraction et l'effet observé n'aurait pas été spécifique à l'excitabilité membranaire. En conclusion, l'IL-13 entraîne, sur le cœur sain, une augmentation de la force de contraction associée à une augmentation de l'excitabilité membranaire, *via* la voie  $\beta1\text{-A}$  – PKA.

Comme indiqué au début, le taux plasmatique d'IL-13 est augmenté lors du sepsis, et son inhibition lors d'un sepsis chronique entraîne une diminution de la survie, laissant supposer un effet bénéfique général. Nous avons donc réalisé des sepsis chronique de 7 jours par CLP sur des rats, pour vérifier s'il y avait un effet bénéfique sur les cœurs d'animaux septiques. L'IL-13 perd de façon surprenante tous ses effets positifs sur la force de contraction du cœur isolé. Nous avons pensé que cela pouvait venir d'une action non spécifique de l'IL-13 sur les récepteurs  $\beta$  adrénergiques. En effet, l'IL-13 est impliquée dans l'asthme pour son action sur les récepteurs  $\beta2\text{-A}$ , qui ont dans une action relaxante sur les cellules musculaires lisses. Dans le cœur sain, les récepteurs  $\beta1\text{-A}$  représentent 75-80% et les  $\beta2\text{-A}$  20-25% des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques [210], ce qui expliquerait que l'IL-13 ait une activité préférentiellement *via* les récepteurs  $\beta1\text{-A}$  sur le cœur sain. Lors du sepsis, il y a une diminution de l'expression (ARNm et protéine) des récepteurs  $\beta1\text{-A}$  [215], et une forte

augmentation de l'expression des récepteurs  $\beta 2$ -A et  $\beta 3$ -A [216]. Une des hypothèses était que les effets de l'IL-13 passaient essentiellement par les récepteurs  $\beta 1$ -A et non par les  $\beta 2$ . A l'appui de cette hypothèse en présence d'un inhibiteur spécifique des récepteurs  $\beta 2$ -A, l'IL-13 n'a toujours aucune action sur les cœurs septiques. Un autre élément est l'absence d'une augmentation du débit coronaire induite par une vasodilatation résultant normalement de l'activation des récepteurs  $\beta 2$ . Parmi les autres hypothèses que nous pouvons formuler, on peut supposer que le nombre de récepteurs à la cytokine au niveau du ventricule puisse être diminué lors du sepsis. Nous avons réalisé des Western-blots sur ces récepteurs en condition contrôle et septique, sans obtenir de résultats concluants. Autre hypothèse possible, la sur-activation de la voie  $\beta 1$ -A [217]. En effet, lors du sepsis il a été noté une augmentation des taux de catécholamines, entraînant une sur-stimulation de la voie  $\beta 1$ -A, et par conséquent l'IL-13 n'aurait pas d'effet du fait d'une activation déjà maximale de cette voie. Cependant cette sur-activation  $\beta 1$ -A a cependant un effet délétère sur la fonction cardiaque et entraîne également une diminution de la survie des patients [217]. Il est donc possible de considérer que, dans ces conditions, l'absence de réponse de l'IL-13 sur le cœur septique puisse être considérée comme un point positif. Les effets observés sur l'excitabilité membranaire sont similaires à ceux sur la force de contraction au niveau des cœurs septiques car, ils sont tous deux activés par les PKA, or cette voie de signalisation est altérée lors du sepsis.

### **III. Article 3 : La cachexie et la faiblesse musculaire induites par le docétaxel sont prévenues par l'injection de dantrolène**

Cet article est actuellement en soumission pour le Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.

## Introduction

Cette étude est le fruit de l'ouverture de la thématique initiale de la thèse, à savoir : l'altération de la fonction musculaire lors du sepsis. En effet cette altération passe aussi par l'apparition d'une cachexie. L'intérêt était alors d'ouvrir l'axe de recherche à d'autres types de cachexie comme la cachexie cancéreuse, mais tout en utilisant les mêmes techniques d'études. La cachexie cancéreuse se définit brièvement comme une perte de masse et de fonction musculaire qui impacte directement la qualité de vie et la survie des patients atteints de cancer. Elle est multifactorielle et peut être causée par le cancer mais également les traitements tels que les chimiothérapies. Elle est généralement la résultante d'un profil inflammatoire exacerbé et de l'activation des voies protéolytiques en même temps que de l'inhibition des voies anabolisantes dans le muscle. Les mécanismes de cette cachexie sont décrits de manière analogues dans le sepsis, d'où notre intérêt pour cette pathologie. Le but de ce travail était d'étudier une chimiothérapie, le docétaxel (largement utilisé pour traiter le cancer de l'estomac, du sein ou du colon), et cela sur la masse et la fonction musculaire. De plus, nous avons testé une molécule pouvant avoir un effet bénéfique dans notre modèle : le dantrolène. Il est décrit dans la littérature comme ayant un effet bénéfique sur le muscle lors du sepsis (obtenu par CLP sur l'animal), par son effet inhibiteur de certains systèmes protéolytiques comme les calpaïnes.

La première question a été de déterminer si le docétaxel induisait un stress inflammatoire systémique associé à une augmentation de l'activité protéolytique dans le muscle, comme c'est le cas avec d'autres chimiothérapies comme la doxorubicine. Dans un second temps, nous avons voulu vérifier si le dantrolène pouvait contrecarrer ces effets délétères.

Deux lots d'animaux ont été constitués : le 1<sup>er</sup> pour une étude en aigu sur 24h afin de déterminer les effets des traitements sur le profil inflammatoire systémique (cytokines plasmatiques) et certaines voies de signalisations activées précocement dans le muscle. Dans ce premier lot 4 groupes ont été réalisés : Contrôle, docétaxel seul (Tax), dantrolène seul (Dant), dantrolène + docétaxel (DanTax). Le docétaxel a été administré en une seule fois en IV, car c'est la voie classique d'administration chez le patient, à la dose de 10mg/kg, qui est la dose équivalente à celle utilisée chez l'homme. Le dantrolène a été administré en IP à 10mg/kg, 2h avant et 8h après l'injection de chimiothérapie, comme décrit également dans la littérature. Ce point est intéressant car cela en fait un traitement préventif étant donné que le moment d'injection de la chimiothérapie est connu.

La seconde expérimentation s'est effectuée sur 7 jours afin de déterminer les effets à plus long terme de la chimiothérapie et du dantrolène sur la masse des muscles et du tissu adipeux, mais aussi sur la contraction de cœur et du péronier. Dans ce second lot 5 groupes ont été constitués : Contrôle, docétaxel seul (Tax), dantrolène seul (Dant), dantrolène + docétaxel (DanTax). Dans ce second lot, il y a eu deux posologies d'administration du dantrolène : docétaxel le 1<sup>er</sup> jour et dantrolène toute la semaine, et un autre groupe avec le docétaxel et le dantrolène uniquement le 1<sup>er</sup> jour.

# **Docetaxel induced cachexia and muscle weakness are prevented by dantrolene injection**

**Authors:** Jude B<sup>1</sup>, Castel T<sup>1</sup>, Droguet M<sup>1</sup>, Tissier F<sup>1,2</sup>, Redon S<sup>3,4</sup>, Léon K<sup>1</sup>, Giroux-Metges MA<sup>1,2</sup>, Pennec JP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie - EA4324 ORPHY, IBSAM, Université de Bretagne Occidentale, Brest - France.

<sup>2</sup> Explorations fonctionnelles respiratoires, CHRU de Brest, Brest - France.

<sup>3</sup> Laboratoire de génétique moléculaire et d'histocompatibilité, CHRU Morvan, Brest - France.

<sup>4</sup> INSERM U1078 - Brest - France.

**Corresponding author:** Baptiste Jude

**Address correspondence to:** Laboratoire de Physiologie – EA4324 ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, 22 Avenue Camille Desmoulins 29238 Brest, Cedex 3 France

Telephone: +33(0)2 98 01 64 62

Email: bjude@outlook.fr

## **Abstract:**

### Background

Many cancers induce cachexia but chemotherapy itself can also induce cachexia associated to muscle atrophy, inflammation and could be a limiting factor of cancer treatment. The aim of this study was to firstly investigate the effects of the docetaxel (Tax), on muscle mass and inflammation. Secondly, an inhibitor of calcium ryanodine channels, the dantrolene (Dant), was tested in order to study its potential benefit on the muscular toxicity of docetaxel.

## Methods

Three groups were realized: Control, Tax (docetaxel at 10mg/kg), and DanTax (dantrolene at 10mg/kg the first day or every day during 7 days). In a first series, animals were sacrificed 24h after treatments for determination of plasma cytokines and for the activated muscle pathways. In a second series, animals were sacrificed 7 days after treatments for muscle contraction recording and atrophy analyses. All values were compared to Control group.

## Results

24h after treatments, docetaxel induced muscle atrophy up to 12% for soleus, 13% for peroneus and 19% for diaphragm whereas in DanTax group it was mitigated with respectively only 7%, 4.2% and 4.5%. The expression of Calpain 1 and 2 and MAFbx were decreased in DanTax group vs Tax group. For cytokine profile, docetaxel led to an increase in INF- $\gamma$  (+280%), IL-1 $\beta$  (+780%), IL-6 (+232%) and TNF- $\alpha$  (+400%), but in DanTax group all concentrations came back to control values. Seven days after treatments, there was no significant muscle atrophy in Tax Group (-4.5% for soleus and -17.5% for diaphragm) but in DanTax group the muscle mass was increased by +9% for soleus and +7.6% for diaphragm. For peroneus, atrophy was the same in both groups (-4%). Concerning the heart parameters, docetaxel had no toxic effect and for the DanTax group there was an increase of heart contractile force. Maximal contraction force of peroneus decreased in Tax group to 179.2g compared to Control group (215.3g), and in DanTax group the force was restored (213.8g). This was associated to the decrease of peroneus fatigue in DanTax group.

## Conclusions

The results indicated that docetaxel induces muscle atrophy associated to the release of pro-inflammatory cytokines, and that dantrolene can contribute to protect muscle from the deleterious effects induced by docetaxel.

## **Keywords:**

Docetaxel; Cachexia; Inflammation; Dantrolene; Muscle Contraction.

## Introduction

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome characterized by muscle loss (with or without adipose tissue loss), inflammation and anorexia [1]. The incidence of the cachexia is about 63% for all cancers but is higher in digestive cancers especially in gastric and pancreas cancers with an incidence of 83% [2]. Serious complications can occurred, such as the increase in the side effects of treatments and then less complete cycles of chemotherapy, the decrease in therapy response and at least lower survival rate [3]. The mechanism by which cancer provokes the loss of muscle is multifactorial and is caused by both cancer-derived factors and treatments [4]. The competition for nutriment between host and tumor promotes metabolic disturbances, associated to a decrease in food intake due to the anorexia [5]. Mediators such as hormones and cytokines derived from both host and tumor can also modify the muscle mass. Among these mediators, pro-inflammatory cytokines seem to play a key role in the management of cachexia. In example, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), which is considered as the major pro-inflammatory cytokine is produced in tumor bearing animal model of cancer cachexia [6] or following chemotherapy injection [7]. Doxorubicin appears to be the major compound used to investigate chemotherapy toxicity in animal models and especially on muscle weakness. This kind of chemotherapy is able to induce a decrease in contractile force in the hind limb muscles (*soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL)) [8,9], and in the diaphragm which is the main respiratory muscle [10]. Interestingly, Gilliam *et al.* published that doxorubicin disrupted muscle function by a TNF receptor 1 (TNFR1) dependent pathway, suggesting the strong involvement of cytokines in muscle dysfunction induced by chemotherapy [9]. Another chemotherapy, docetaxel, derived of taxanes, is commonly used to treat cancer. This drug acts by microtubule disruption, leading to cell division blockade and to apoptosis of cancer cells. Nevertheless, besides its anti-cancer activity, docetaxel can cause a wide variety of side effects such as asthenia, neutropenia and neuropathy [11]. The impact of docetaxel on muscle function remains unknown.

Sepsis is characterized by a systemic inflammation associated to bacterial infection and leads to muscle weakness. Moreover, sepsis also leads to an increase in intra cellular calcium level ( $[Ca]_i$ ) in skeletal muscle which can trigger the activation of pathways involved in inflammation and proteolysis [12,13]. Injection of dantrolene, a specific inhibitor of ryanodine receptors (RyR) responsible of the calcium release in muscle fibers, is able to

prevent muscle catabolism enhancement and cytokines release during sepsis by inhibiting the increase in  $[Ca]_i$  [12].

In this study we firstly verify that a single injection of docetaxel at 10mg/kg induces muscle contraction dysfunction, with activation of proteolysis pathways and an increase in cytokines release. The second part of this study focuses on the action of dantrolene in order to investigate if this inhibitor could prevent cytokines release following chemotherapy treatment and could protect muscle against the docetaxel toxicity.

## **Materials and Methods**

### Animals

Female wistar rats averaging 310g for the protocol 1 (n=26), and 260g for the protocol 2 (n=36) were used for the experimentation. All the animals were purchased from Janvier (Le Genest SaintIsle, France) and housed in the same place at 23°C, with a 12-hr daylight cycle and fed *ad libitum* with standard rat pellets. The experiments were realized according to the recommendations of the European Community directive No. 2010/63/EU, which are equivalent to NIH recommendations. Experimental protocol, animal care, anaesthesia, analgesia and sacrifice method were approved by our ethical regional committee (CEFEA: "Comité d'Ethique Finistérien en Expérimentation Animale" - departmental agreement No. A29-019-03) and validated by French ministry in charge of animal experimentation and welfare (protocol No. 4692-20 16032217165238).

Docetaxel (Taxotère®) was purveyed by the Pharmacy Centrale of the Brest Hospital. 10mg/kg of docetaxel were injected intravenously (same type of administration than in patients), according to the relationship conversion between human and rat [14], with an equivalent of 75mg/m<sup>2</sup> in human. Dantrolene (Abcam) was injected at 10mk/kg in intraperitoneal according to values found in the literature [15].

### Protocol 1: Acute study

The aim of this protocol was to investigate the impact of docetaxel (IV injection in the caudal vein at 10mg/kg of body weight, under isoflurane anaesthesia), and the hypothesized protective effect of dantrolene (IP injections at 10mg/kg 2 hours before and 8 hours after IV injection). Four groups of animals were constituted:

-Control group (n=6): IV injection of NaCl 0.9% and IP injection of NaCl 0.9% 2 hours before and 8 hours after IV injection.

-Tax group (n=6): IV injection of docetaxel and IP injection of NaCl 0.9% 2 hours before and 8 hours after IV injection.

-Dant group (n=6): IV injection of NaCl 0.9% and IP injection of dantrolene 2 hours before and 8 hours after IV injection.

-DanTax group (n=8): IV injection of docetaxel and IP injection of dantrolene 2 hours before and 8 hours after IV injection.

### Protocol 2: Chronic study

The aim of the second protocol was to investigate, over a 7 days period, the impact of docetaxel (IV injection in the caudal vein at 10mg/kg of body weight, under isoflurane anaesthesia), dantrolene injection or an equal volume of NaCl 0.9% (IP injection 2 hours before and 8 hours after IV injection, then one injection every day until Day 6). Moreover a chronic and acute dosage of dantrolene was investigated in this protocol.

-Control group (n=6): IV injection of NaCl 0.9%, IP injection of NaCl 0.9% 2 hours before and 8 hours after IV injection and then once daily between D1 and D6.

-Tax group (n=8): IV injection of docetaxel, IP injection of NaCl 0.9% 2 hours before and 8 hours after IV injection and then once daily between D1 and D6.

-Dant group (n=6): IV injection of NaCl 0.9%, IP injection of dantrolene 2 hours before and 8 hours after IV injection and then once daily between D1 and D6.

DanTax 7D group (n=8): IV injection of docetaxel, IP injection of dantrolene 2 hours before and 8 hours after IV injection and then once daily between D1 and D6.

-DanTax 1D group (n=8): IV injection of docetaxel, IP injection of dantrolene 2 hours before and 8 hours after IV injection, and then with once daily IP injection of NaCl 0.9% between D1 and D6.

### Peroneus contraction

The *peroneus* and its tendon were freed from the surrounding tissue without impairing the blood supply. The nerve of peroneus was exposed and placed on bipolar platinum

stimulating electrodes. The hindlimb was abducted to the horizontal plane, and the body of the animal was maintained at 37°C by a monitored heating element. To prevent movements during contractions, the knee and ankle joints were held onto the supporting device. The distal tendon of peroneus was cut and attached to a force transducer (Kulite strain gauge, model BG 1000). The force transducer was mounted on a micrometer screw so that the muscle length could be accurately adjusted. For the force measurement, peroneus length was adjusted to L<sub>0</sub>, at which maximal active force is elicited. A single twitch was elicited by an electrical stimulus of 0.05ms duration at supramaximal intensity. Force/frequency relationship was determined by incremental stimulation frequencies (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80 and 100, Hz) with a burst duration was 0.7 s. The fatigability of *peroneus* was evaluated by using a Burke's modified protocol. This entailed a 40-Hz burst lasting 330 ms every 1 s during 2 min. The fatigue index (%) was obtained from the following relation: peak force of the 120th tetanus/peak force of the first tetanus.

#### Isolated rat heart preparation

After *peroneus* contraction recordings, the rat was killed by cervical dislocation and exsanguination. Rapidly, the heart and lungs were removed after sternotomy. Lungs were separated from the heart, and the aorta was cannulated according to the Langendorff technique. Heart was perfused at 37°C with modified Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 10 mM; glucose 11 mM all purchased from Sigma-Aldrich), adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub>. The Tyrode was supplemented with Heparin (1000 UI) during the first minutes of the perfusion in order to rinse the coronary system and to avoid thrombus formation. The heart was hooked by the apex to a strain gauge (WPI) connected to a computer via a Biopac MP35 interface (CEROM, France). Hearts were allowed to beat spontaneously throughout the experiment. Biopac Student lab software (BSL Pro, CEROM, France) was used to record and analyze heart contractions for 30 sec periods, every 5 min, and during 25 min. All the hearts were perfused at constant pressure (80 cm of water). Coronary flow was not imposed but was monitored by a ball flowmeter. Heart rate (bpm) and contraction amplitude (g) were recorded and analyzed with Biopac Student lab software and speeds of contraction (+dF/dt<sub>max</sub>) (g/s) and relaxation (-dF/dt<sub>min</sub>) (g/s) were calculated from the first derivative of contraction recordings. At the end of experimentation, the heart was frozen in liquid nitrogen until further analyses with the others muscles (*peroneus*, *soleus*, EDL, diaphragm), plasma and visceral adipose tissue.

### Western Blot analyses

One whole peroneus was homogenized in RIPA buffer (HEPES (pH 7.9) 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, KCl 10mM, DTT 0.5mM (purchased from Sigma-Aldrich) and Igepal (0.5%) from Euromedex). The protein content was measured with the Bradford method. Briefly, 5 µL of sample diluted (1:10) were added to 250µL of Bradford reagent (Sigma-Aldrich) in 96 wells plate, and read at 595nm. Proteins were diluted in Laemmli Buffer 4x (Biorad) with 10% 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). 50µg of proteins of each sample were run on 9% SDS-polyacrylamide gels then proteins were transferred onto PVDF membrane (0.45µm, Millipore). The PVDF membrane was then incubated in a blocking buffer (20mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl; TBS) supplemented with 0.05% v/v Tween 20 (TTBS) containing 5% w/v skimmed milk powder overnight à 4°C followed by 2x20 min washes in TBST. Blots were then incubated with both anti-Calpain 1 (1:1000), anti-Calpain 2 (1:1000) and anti-MAFbx (1:1000) (Abcam) in TTBS containing 1% w/v skimmed milk powder over night at 4°C. The blots were washed 2x20min in TTBS and incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (1:2000 dilution) (Abcam) for 60 min. Finally, blots were washed 2x20 min in TTBS rinsed in TBS and exposed to ECL-reagents composed of 10ml buffer Tris-HCL 100mM (Sigma-Aldrich) at pH=8.5, 3µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (Sigma-Aldrich) 50µL of solubilized luminol (Sigma-Aldrich) in DMSO (Sigma-Aldrich) (44.3mg/ml DMSO) and 25µL of p-coumaric acid (Sigma-Aldrich) in DMSO (14.8mg/ml DMSO). Membranes were exposed for 1 min and analyzed by using a Vilber-Lourmat Fusion SL image acquisition system, then Image Studio Lite (LI-COR Biosciences) which allows precise quantification of the signal.

### Cytokine analysis

Plasma cytokine were assayed by using the “Rat Inflammation Antibody Array (10 Targets) – Quantitative” (ab197484). 80µl of plasma were used according to the purveyed Abcam protocol. The signals were recorded by using a laser scanner Agilent G2539A, and the slides were analysed with the Agilent analysis software.

### Data analysis and statistics

Excel® (Microsoft, Redmond, WA) was used to analyse the experimental data. All values are expressed as mean value ± SEM. Statistical differences were determined after after

checking the normality of distribution (Lilliefors test) with ANOVA or Kruskal Wallis, and then the appropriated post-hoc test. A  $p$  value  $<0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

The aim of the first part of the study was to investigate the effects of an acute injection of docetaxel. As shown in Table 1, treatments induced no difference on the total body weight at 24h. Nevertheless, the docetaxel was responsible of the loss mass for the *soleus* and the *peroneus*, with respectively -12% and -13% compared to the control group. In the DanTax group there was no significant difference (*soleus*: -7.1% with  $p<0.10$ ; *peroneus*: -4.2% with  $p<0.29$ ). EDL mass remained unchanged whatever the treatments. For the diaphragm, the weight in Tax group tended to decrease by -20% compared to the control group (but with large individual variations). This difference was reversed in DanTax group compared to control group (-4.5%). The diaphragm mass in DanTax group was significantly higher than in Tax group. In the Dant group there was no difference for all the parameters. These results support the hypothesis that IV injection of docetaxel induced muscle atrophy after 24 hours, and that dantrolene injection could prevent this effect.

Cytokines levels were evaluated in plasma after 24h of treatment (Table 2). In most cases, docetaxel was responsible of a significant increase in the plasma concentration for 9 cytokines out of 10 evaluated, with an increase of +279% for IFN- $\gamma$ , +779% for IL-1 $\beta$ , +232% for IL-6 and +405% for TNF- $\alpha$  compared to control group. Concerning DanTax group, all cytokines concentrations returned to values not different from those of the control group. The injection of dantrolene alone was responsible of an increase in cytokines production, like in Tax group, but this increase was significant only for IL-4 and MCP1. To summarize, Docetaxel injection led to an activation of cytokine release which was abolished by dantrolene.

In order to identify mechanisms involved in this muscle mass loss, the activations of the calpains and of the proteasome pathways were investigated by western blot in the *peroneus* (Fig. 1). Concerning calpain isoforms, docetaxel treatment did not induce any modification of the expression for both calpain1 and 2. Dantrolene alone induced the decrease in calpain 1 expression compared to control group, and a decrease in calpain 2 compared to the Tax group. In the DanTax group there was a significant decrease (about -40%) of calpain1 compared to both control and Tax group, and a decrease in calpain 2 (-20%) compared to Tax group. For

the E3 ligase, docetaxel seemed to increase MAFbx (+18%;  $p<0.1$ ), and there was a significant decrease with DanTax compared to Tax group (-28%).

The aim of the second part of the procedure was to study if these effects observed after only 24h had consequences after 7 days. Two groups with docetaxel and dantrolene administration were realized. The first group had two injections of dantrolene the first day and then, a daily injection of dantrolene (DanTax 7D group). The second group had dantrolene injection only twice the first day (DanTax 1D group). Docetaxel injection was responsible of a decrease in food intake by a half in Tax, DanTax 7D and DanTax 1D groups compared to control group (Table 3). Concerning muscle weight, heart mass was reduced respectively by 5% in Tax group and 5.5% in DanTax 1D group compared to control. For the *soleus*, the *peroneus* and the EDL, Tax group showed no difference compared to control group. DanTax 7D treatment had a deleterious effect with an average decrease of -11% of the mass of the three muscles compared to control group but in DanTax 1D group there was no difference. The mass of *soleus* was higher in DanTax 1D compared to the Tax group. For diaphragm, docetaxel seemed to reduce muscle mass by -17.5% compared to control group. In the opposite, for both DanTax 7D and 1D the diaphragm mass seemed slightly higher compared to control group and was significantly higher compared to Tax group (respectively +28.5% and +25%). In addition, visceral adipose tissue (VAT) was decreased in both Tax and DanTax 7D groups (respectively -36% and -35%) whereas in DanTax 1D the mass was less decreased (-20%;  $p<0.8$ ) compared to control group. Dantrolene injection alone was responsible of a little increase of VAT (+19%;  $p<0.1$ )

In parallel with muscle mass evaluation, we investigated muscle contraction after chronic treatments. Concerning heart contraction, docetaxel did not induce any modification for all the five studied parameters (Fig. 2). For DanTax 7D, contractile force and both contraction and relaxation speeds were increased compared to control and Tax group. Concerning DanTax 1D, the contractile force, the speed of relaxation and the coronary flow were increased compared to control group.

A skeletal muscle, the *peroneus longus*, was studied by recording *in vivo* contraction. A modest decline in absolute tetanic force was observed in Tax group (control  $218.6 \pm 18$ g vs. Tax  $181.5 \pm 14$ g,  $p<0.07$  at 80Hz) (Fig. 3). Nonetheless, absolute tetanic force for DanTax 7D was significantly higher compared to Tax group ( $225.1 \pm 18$ g at 80Hz;  $225.7 \pm 18$ g at 100Hz), and in the same manner for DanTax 1D compared to Tax group ( $219.7 \pm 17$ g at 80Hz; 214

$\pm 17\text{g}$  at 100Hz). The dantrolene alone had no effect on muscle contractile force. The muscle fatigability was measured using the Burke's index. Docetaxel injection alone did not modify peroneus fatigability, but Burke's index was higher in Dant group ( $0.75 \pm 0.03$  vs.  $0.54 \pm 0.06$  in control group) and in DanTax 1D group ( $0.74 \pm 0.06$  vs.  $0.54 \pm 0.06$  in control group), suggesting a lower fatigability (Fig. 4).

## Discussion

Muscle wasting is a key compound of cancer cachexia, and is responsible of many complications of treatment and at last of the decrease in the survival rate [3]. Our results supported the hypothesis that a single injection of docetaxel, with a dose equivalent to the dose used in human patients, caused muscle wasting and weakness, associated to cytokines release. Moreover, we evidenced that the injection of dantrolene was able to protect muscle from both wasting and weakness, and suppressed the cytokines release.

Docetaxel, the analogue of paclitaxel, is a common chemotherapy widely used especially for treatment of the solid tumors including gastric cancer, prostate cancer and non-small lung cancer. Docetaxel injection in patient has multiple acute and long-term side effects such as febrile neutropenia, fatigue and peripheral neuropathy [16]. However, the effects on muscle function are less studied. A recent study investigated the injection of docetaxel on muscle force and mass in a murine model [17]. The authors concluded that the chemotherapy, in contrary to our study, does not impair muscle force for the EDL and *soleus* at 24h, 72h and 3weeks post injection, which is, according to the authors, controversially with the literature. In our present study, we evidenced that a single injection of docetaxel was able to induce muscle atrophy after 24h of injection, and potentially long term muscle weakness ( $p < 0.07$ ). These results are in agreement with most of the literature. Other chemotherapies were used to investigate their contribution to cancer cachexia: doxorubicin induces muscle weakness of the diaphragm and of the EDL 72h post injection [9,10]; cisplatin induces body weight loss and muscle wasting after 4 days of injection [18]. In the same manner, combination of chemotherapies (cyclophosphamide, doxorubicin and 5-fluorouracil) also induces muscle wasting [19]. Importantly, many of these publications used different routes of injection and high doses of chemotherapy. Docetaxel is commonly injected IV one time each 3 weeks in human that is why the publications using 4 injections in 5 days may be questionable. Moreover, Gilliam et al. (2011) published that the IV injection of doxorubicine led to a diaphragm weakness which was exacerbated in case of IP injection, correlated with

diaphragm fibres injury, and supporting the fact that IP injection could induce peritoneal inflammation involved in diaphragm weakness [10].

In our study, we founded that docetaxel was not responsible of an increase in calpain 1 and 2 and MAFbx suggesting that the muscle wasting was not due to the activation of proteolytic pathways. Previous study has found that doxorubicine was able to induce muscle atrophy with no effect on calpain 1 expression but the muscle protein synthesis rate was decreased by about 30% [20]. In another study, cisplatin injection induced muscle weight loss, in the same manner than tumor bearing with C-26 cells, but MuRF1 expression in muscle was increased only by tumor and not by cisplatin treatment [21]. This supports the fact that docetaxel could induce muscle atrophy by decreasing protein synthesis, and that dantrolene could decrease proteolysis leading to a beneficial effect on muscle mass such as in the DanTax group. Moreover, food intake was decreased by about 50% in the Tax and DanTax 1D groups whereas it was decreased by 20% in the Dant group and that could contribute to the loss of total body weight. In a model of cancer cachexia induced by tumor bearing, the increased food intake induced by megesterol acetate was associated with higher muscle weight compared to tumor bearing rats, supporting the strong involvement of food intake on muscle mass [22].

Heart function was studied because taxanes are known to be involved in cardiotoxicity, especially the analogue of the Paclitaxel [23]. Nevertheless, in our experiments we did not shown any toxicity due to one injection of docetaxel. Moreover, dantrolene injection had no cardio toxic effect but in the two DanTax groups there was a synergic action of docetaxel and dantrolene on heart contractile force and speeds of contraction and relaxation. VAT was decreased after docetaxel injection in both Tax and DanTax 7D groups, with -35% compared to control group, supporting the evidence that this chemotherapy induces adipose tissue wasting as previously shown [24]. The loss of both muscle and adipose tissue is the key compound of cachexia. In this study we have evidenced that docetaxel induced muscle and adipose tissue wasting and that dantrolene prevented these effects.

Increase in intracellular calcium level has been shown in muscle fibres following sepsis induced by endotoxemia [12]. This increase in calcium concentration is involved in cell signalling pathway triggering the release of pro-inflammatory molecules and proteolysis activation. Dantrolene, an inhibitor of the ryanodine receptors which are involved in the calcium release by sarcoplasmic reticulum, has been previously used in animal models of

sepsis showing that it was able to protect muscle from the increase in calcium concentration, the release of systemic TNF- $\alpha$  and corticosterone, the muscle proteolysis and weakness [12,13,15]. In the present study, we have hypothesized that dantrolene could have the similar effects against the effects of docetaxel. Doxorubicin is able to directly induce dysregulation of calcium homeostasis [25]. Nevertheless, chemotherapies such as cisplatin, doxorubicin and paclitaxel, are able to induce cytokines production (IL-6 [26], TNF- $\alpha$  [7] and IL-1 $\beta$  [27]), which are known to induce calcium homeostasis dysregulation [28,29]. Our study shows the capability of Dantrolene to prevent muscle wasting and muscle weakness induced by docetaxel injection.

Two chronic DanTax groups were used in our study in order to know if dantrolene should be injected every day in a week (DanTax 7D), or if only injection of dantrolene the first day would be sufficient (DanTax 1D). Surprisingly, we showed that repeated injection of dantrolene had deleterious effects on total body weight, food intake, and hindlimb muscles mass. In the opposite, in DanTax 1D group, final body weight was higher than DanTax 7D group, muscles mass were greater or equal compared to the Tax group and adipose tissue wasting was decreased compared to Tax group. We could conclude that the administration of dantrolene only the first day would have beneficial effects for patients treated with docetaxel. Moreover, this administration would be easier to apply to patients than daily injections for a week.

Cancer cachexia can occur following the release of mediators by the tumor and the host cells. Nevertheless, treatments are able to induce and participate to the cancer cachexia. Gilliam et al. (2009) published that the inhibition of TNFR1 abolished the decrease in force contraction induced by cisplatin, supporting the strong implication of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , in the muscle dysfunction [9]. In our study, we showed that a single IV injection of docetaxel was sufficient to increase plasmatic cytokines. Among these cytokines, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 are three of the most studied cytokines involved in muscle dysfunction. Moreover we demonstrated that dantrolene injection protected muscle from docetaxel-induced wasting and reversed both muscle weakness and cytokine release. The mechanism by which muscle weakness was prevented remains unclear. Dantrolene in DanTax 1D group decreased proteolytic pathways, which resulted in the increase in *soleus* and diaphragm mass compared to Tax group. Dantrolene could act directly on muscle by inhibiting calcium release, indirectly by the inhibition of cytokine release, or both. In the context of cancer cachexia, the inhibition of the systemic inflammation following chemotherapy could be positive because the pro-

inflammatory cytokines are involved in many side effects. Moreover, inflammation is potentially involved in the tumor growth, metastasis, and chemoresistance [30].

## Conclusion

In conclusion, we have shown in this study that docetaxel induced muscle atrophy 24h after its IV administration, associated to cytokine release, and that the injection of dantrolene prevented muscle wasting and abolished cytokine release induced by the chemotherapy. At 7 days post injection, dantrolene had long-lasting beneficial effects, if injected only the first day, on both muscle mass and muscle weakness induced by docetaxel. Dantrolene use seems to be a good possibility to protect the patients against some side effects, such as cachexia and muscle weakness, induced by docetaxel.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest

**Acknowledgement:** The authors certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing of the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle (von Haehling S, Morley JE, Coats AJS, Anker SD. Ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2015;4:315-6.).

This work was supported by grants from mission 8 of the Gastro-Esophageal Cancer Network of Cancéropole Grand Ouest. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

## References

- [1] K. Fearon, F. Strasser, S.D. Anker, I. Bosaeus, E. Bruera, R.L. Fainsinger, A. Jatoi, C. Loprinzi, N. MacDonald, G. Mantovani, M. Davis, M. Muscaritoli, F. Ottery, L. Radbruch, P. Ravasco, D. Walsh, A. Wilcock, S. Kaasa, V.E. Baracos, Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus, *Lancet Oncol.* 12 (2011) 489–495. doi:10.1016/S1470-2045(10)70218-7.
- [2] A. Laviano, M.M. Meguid, A. Inui, M. Muscaritoli, F. Rossi-Fanelli, Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2 (2005) 158–165. doi:10.1038/ncponc0112.

- [3] H. Suzuki, A. Asakawa, H. Amitani, N. Nakamura, A. Inui, Cancer cachexia--pathophysiology and management, *J. Gastroenterol.* 48 (2013) 574–594. doi:10.1007/s00535-013-0787-0.
- [4] R. Barreto, G. Mandili, F.A. Witzmann, F. Novelli, T.A. Zimmers, A. Bonetto, Cancer and Chemotherapy Contribute to Muscle Loss by Activating Common Signaling Pathways, *Front. Physiol.* 7 (2016) 472. doi:10.3389/fphys.2016.00472.
- [5] J.M. Argilés, B. Alvarez, F.J. López-Soriano, The metabolic basis of cancer cachexia, *Med. Res. Rev.* 17 (1997) 477–498.
- [6] X. Zhou, J.L. Wang, J. Lu, Y. Song, K.S. Kwak, Q. Jiao, R. Rosenfeld, Q. Chen, T. Boone, W.S. Simonet, D.L. Lacey, A.L. Goldberg, H.Q. Han, Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival, *Cell.* 142 (2010) 531–543. doi:10.1016/j.cell.2010.07.011.
- [7] J. Tangpong, M.P. Cole, R. Sultana, G. Joshi, S. Estus, M. Vore, W. St Clair, S. Ratanachaiyavong, D.K. St Clair, D.A. Butterfield, Adriamycin-induced, TNF-alpha-mediated central nervous system toxicity, *Neurobiol. Dis.* 23 (2006) 127–139. doi:10.1016/j.nbd.2006.02.013.
- [8] M. Ertunc, Y. Sara, P. Korkusuz, R. Onur, Differential contractile impairment of fast- and slow-twitch skeletal muscles in a rat model of doxorubicin-induced congestive heart failure, *Pharmacology.* 84 (2009) 240–248. doi:10.1159/000241723.
- [9] L.A.A. Gilliam, L.F. Ferreira, J.D. Bruton, J.S. Moylan, H. Westerblad, D.K. St Clair, M.B. Reid, Doxorubicin acts through tumor necrosis factor receptor subtype 1 to cause dysfunction of murine skeletal muscle, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 107 (2009) 1935–1942. doi:10.1152/japplphysiol.00776.2009.
- [10] L.A.A. Gilliam, J.S. Moylan, L.A. Callahan, M.P. Sumandea, M.B. Reid, Doxorubicin causes diaphragm weakness in murine models of cancer chemotherapy, *Muscle Nerve.* 43 (2011) 94–102. doi:10.1002/mus.21809.
- [11] J. Baker, J. Ajani, F. Scotté, D. Winther, M. Martin, M.S. Aapro, G. von Minckwitz, Docetaxel-related side effects and their management, *Eur. J. Oncol. Nurs. Off. J. Eur. Oncol. Nurs. Soc.* 13 (2009) 49–59. doi:10.1016/j.ejon.2008.10.003.
- [12] D.R. Fischer, X. Sun, A.B. Williams, G. Gang, T.A. Pritts, J.H. James, M. Molloy, J.E. Fischer, R.J. Paul, P.O. Hasselgren, Dantrolene reduces serum TNFalpha and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression, and protein breakdown in septic rats, *Shock Augusta Ga.* 15 (2001) 200–207.
- [13] R.S. Hotchkiss, I.E. Karl, Dantrolene ameliorates the metabolic hallmarks of sepsis in rats and improves survival in a mouse model of endotoxemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 3039–3043.
- [14] A.B. Nair, S. Jacob, A simple practice guide for dose conversion between animals and human, *J. Basic Clin. Pharm.* 7 (2016) 27–31. doi:10.4103/0976-0105.177703.
- [15] Y. Qiu, D. Chen, M. Xu, S. Li, Beneficial effects of dantrolene on sepsis-induced diaphragmatic dysfunction are associated with downregulation of high-mobility group box 1 and calpain-caspase-3 proteolytic pathway, *J. Surg. Res.* 200 (2016) 637–647. doi:10.1016/j.jss.2015.09.026.
- [16] M.Y. Ho, J.R. Mackey, Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer, *Cancer Manag. Res.* 6 (2014) 253–259. doi:10.2147/CMAR.S40601.
- [17] T. Chaillou, A. McPeck, J.T. Lanner, Docetaxel does not impair skeletal muscle force production in a murine model of cancer chemotherapy, *Physiol. Rep.* 5 (2017). doi:10.14814/phy2.13261.
- [18] H. Sakai, A. Sagara, K. Arakawa, R. Sugiyama, A. Hirosaki, K. Takase, A. Jo, K. Sato, Y. Chiba, M. Yamazaki, M. Matoba, M. Narita, Mechanisms of cisplatin-induced

- muscle atrophy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278 (2014) 190–199. doi:10.1016/j.taap.2014.05.001.
- [19] T.P. Braun, M. Szumowski, P.R. Levasseur, A.J. Grossberg, X. Zhu, A. Agarwal, D.L. Marks, Muscle atrophy in response to cytotoxic chemotherapy is dependent on intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle, *PloS One*. 9 (2014) e106489. doi:10.1371/journal.pone.0106489.
- [20] T.A. Nissinen, J. Degerman, M. Räsänen, A.R. Poikonen, S. Koskinen, E. Mervaala, A. Pasternack, O. Ritvos, R. Kivelä, J.J. Hulmi, Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32695. doi:10.1038/srep32695.
- [21] J.S. Damrauer, M. Stadler, S. Acharyya, A.S. Baldwin, M.E. Couch, D.C. Guttridge, Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF- $\kappa$ B and cancer cachexia, *Basic Appl. Myol.* 18 (2008) 139–148.
- [22] S. Busquets, R. Serpe, S. Sirisi, M. Toledo, J. Coutinho, R. Martínez, M. Orpí, F.J. López-Soriano, J.M. Argilés, Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia, *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 29 (2010) 733–737. doi:10.1016/j.clnu.2010.06.003.
- [23] M. Lamberti, G. Giovane, E.M. Garzillo, F. Avino, A. Feola, S. Porto, V. Tombolini, M. Di Domenico, Animal models in studies of cardiotoxicity side effects from antineoplastic drugs in patients and occupational exposed workers, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014) 240642. doi:10.1155/2014/240642.
- [24] H. Wang, T.-L. Li, S. Hsia, I.-L. Su, Y.-L. Chan, C.-J. Wu, Skeletal muscle atrophy is attenuated in tumor-bearing mice under chemotherapy by treatment with fish oil and selenium, *Oncotarget*. 6 (2015) 7758–7773. doi:10.18632/oncotarget.3483.
- [25] K. van Norren, A. van Helvoort, J.M. Argilés, S. van Tuijl, K. Arts, M. Gorselink, A. Laviano, D. Kegler, H.P. Haagsman, E.M. van der Beek, Direct effects of doxorubicin on skeletal muscle contribute to fatigue, *Br. J. Cancer*. 100 (2009) 311–314. doi:10.1038/sj.bjc.6604858.
- [26] L.J. Wood, L.M. Nail, N.A. Perrin, C.R. Elsea, A. Fischer, B.J. Druker, The cancer chemotherapy drug etoposide (VP-16) induces proinflammatory cytokine production and sickness behavior-like symptoms in a mouse model of cancer chemotherapy-related symptoms, *Biol. Res. Nurs.* 8 (2006) 157–169. doi:10.1177/1099800406290932.
- [27] C.M. White, B.K. Martin, L.F. Lee, J.S. Haskill, J.P. Ting, Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells, *Cancer Immunol. Immunother. CII.* 46 (1998) 104–112.
- [28] M.B. Reid, J. Lännergren, H. Westerblad, Respiratory and limb muscle weakness induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ : involvement of muscle myofilaments, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 479–484. doi:10.1164/rccm.2202005.
- [29] J. Fan, B. Zhang, H.-F. Shu, X.-Y. Zhang, X. Wang, F. Kuang, L. Liu, Z.-W. Peng, R. Wu, Z. Zhou, B.-R. Wang, Interleukin-6 increases intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and induces catecholamine secretion in rat carotid body glomus cells, *J. Neurosci. Res.* 87 (2009) 2757–2762. doi:10.1002/jnr.22107.
- [30] D. Vyas, G. Laput, A.K. Vyas, Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis, *OncoTargets Ther.* 7 (2014) 1015–1023. doi:10.2147/OTT.S60114.

## Figures caption:

|                      | Control       | Tax          | Dant         | DanTax                    |
|----------------------|---------------|--------------|--------------|---------------------------|
| <b>Body weight</b>   |               |              |              |                           |
| Initial              | 319.7 ± 7.6   | 306.3 ± 6.6  | 320.0 ± 5.6  | 311.4 ± 9.5               |
| Final                | 310.8 ± 6.2   | 298.8 ± 6.8  | 305.2 ± 5.2  | 293.1 ± 9.4               |
| <b>Muscle Weight</b> |               |              |              |                           |
| Soleus               | 165.6 ± 3.1   | 146.3 ± 3.2* | 155.7 ± 6.3  | 153.9 ± 7.3               |
| Peroneus             | 145.5 ± 8.1   | 126.5 ± 5.4* | 138.8 ± 7.5  | 139.4 ± 8.8               |
| EDL                  | 132.9 ± 4.2   | 129.6 ± 5.5  | 132.8 ± 2.8  | 124.6 ± 3.7               |
| Diaphragm            | 593.3 ± 100.7 | 476.2 ± 34.9 | 486.1 ± 61.2 | 566.8 ± 26.7 <sup>¥</sup> |

Table 1: Effects of docetaxel and dantrolene treatments after 1 day on total body weight and muscle weight. Body weight is expressed in g. Muscle weight is expressed in mg. EDL: *extensor digitorum longus*. n=6 for Control, Tax and Dant groups; n=8 for DanTax group. Data are expressed as mean ± SEM. \* significant difference from Control group (p<0.05), <sup>¥</sup> significant difference from Tax group (p<0.05).

|       | Control       | Tax           | Dant          | DanTax                     |
|-------|---------------|---------------|---------------|----------------------------|
| IFN-γ | 3.9 ± 2.9     | 14.8 ± 3.8*   | 14.2 ± 9.4    | 3.9 ± 4.3 <sup>¥</sup>     |
| IL-1β | 12.5 ± 21.1   | 109.9 ± 38.5* | 175.2 ± 97.6  | 4.7 ± 38.1 <sup>¥</sup>    |
| IL-4  | 0.1 ± 0.5     | 2.2 ± 0.7*    | 3 ± 1.3*      | 0.2 ± 0.8 <sup>¥</sup>     |
| IL-10 | 553.6 ± 112.9 | 714.6 ± 135.6 | 680.5 ± 88.7  | 543.3 ± 126.7              |
| MCP1  | 1.8 ± 2.7     | 15.1 ± 4.8*   | 16.3 ± 6.2*   | 3.9 ± 3.8 <sup>¥</sup>     |
| IL-1α | 103.3 ± 24    | 223.4 ± 38.9* | 232.9 ± 86.7  | 88.7 ± 48.4 <sup>¥</sup>   |
| IL-2  | 81 ± 15.1     | 255.5 ± 62.1* | 176.1 ± 85.8  | 87 ± 52.6 <sup>¥</sup>     |
| IL-6  | 59.5 ± 31.1   | 197.9 ± 52*   | 179.4 ± 74.4  | 50.7 ± 53.1 <sup>¥</sup>   |
| IL-13 | 69 ± 31.2     | 202 ± 41.7*   | 207.4 ± 75.2  | 69.4 ± 51.3 <sup>¥</sup>   |
| TNF-α | 155.4 ± 146.6 | 784 ± 198.1*  | 704.5 ± 318.9 | 179.7 ± 230.9 <sup>¥</sup> |

Table 2: Effects of docetaxel and dantrolene on plasma cytokines. Data are expressed in ng/ml of plasma. n=5 for Control and Dant groups, n=6 for Tax and DanTax groups. Data are expressed as mean ± SEM. \* significant difference from Control group (p<0.05), <sup>¥</sup> significant difference from Tax group (p<0.05).

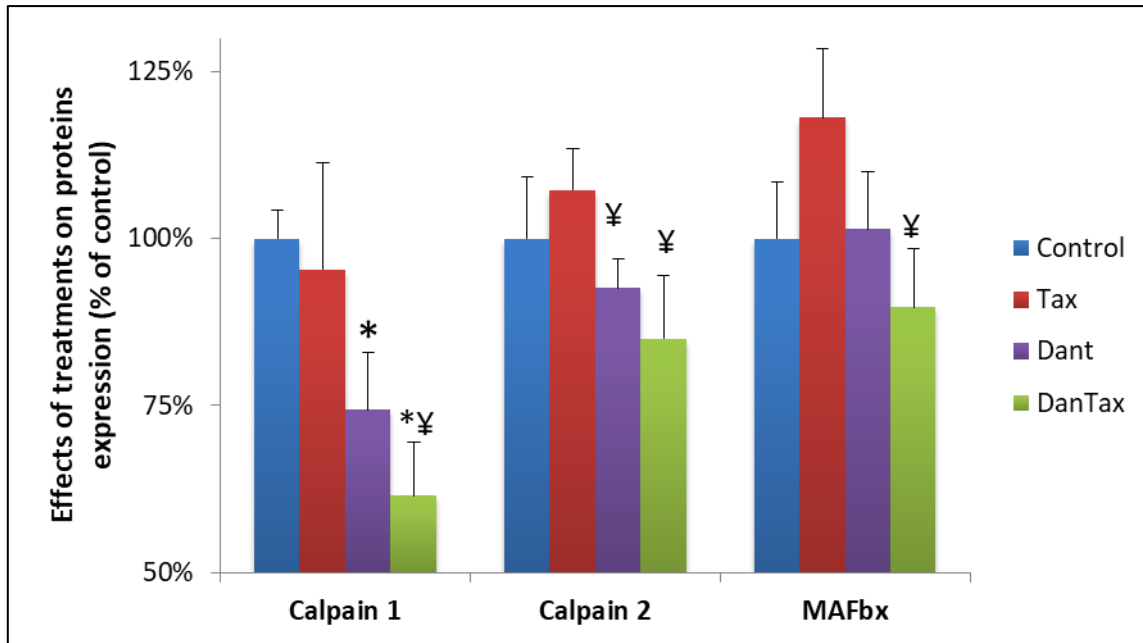


Figure 1: Involvement of docetaxel and dantrolene treatments after 1 day on Calpain 1 and 2 and MAFbx expression in *peroneus longus*. Densitometric quantification of Calpain 1 and 2 and MAFbx expression level is expressed as percentage of Control group values. n=6 for each condition. Data are expressed as mean± SEM. \* significant difference from Control group ( $p<0.05$ ), † significant difference from Control group ( $p<0.05$ ), ‡ significant difference from Tax group ( $p<0.05$ ).

|                      | Control       | Tax           | Dant                       | DanTax 7D                 | DanTax 1D                 |
|----------------------|---------------|---------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <b>Body weight</b>   |               |               |                            |                           |                           |
| Initial              | 259.8 ± 8.1   | 260.6 ± 2.3   | 265.3 ± 3.3                | 262.8 ± 2.2               | 262.5 ± 3.0               |
| Final                | 257.2 ± 4.5   | 239.5 ± 4.3*  | 252.0 ± 4.2 <sup>¥</sup>   | 234.0 ± 2.8*              | 241.5 ± 3.0* <sup>§</sup> |
| <b>Food intake</b>   | 34.3 ± 1.6    | 19.4 ± 2.5*   | 28.2 ± 1.8* <sup>¥</sup>   | 14.4 ± 1.5*               | 18.4 ± 0.7* <sup>§</sup>  |
| <b>Tissue Weight</b> |               |               |                            |                           |                           |
| Heart                | 1012.2 ± 19.7 | 963.4 ± 14.1* | 881.3 ± 48.2* <sup>¥</sup> | 987.1 ± 19.5              | 955.5 ± 10.4*             |
| Soleus               | 128.1 ± 1.7   | 120.9 ± 4.7   | 117.4 ± 2.9*               | 115.1 ± 4.2*              | 132.8 ± 3.2 <sup>¥</sup>  |
| Peroneus             | 137.8 ± 6.5   | 132.5 ± 5.6   | 119.3 ± 4.0* <sup>¥</sup>  | 121.1 ± 2.9* <sup>¥</sup> | 132.1 ± 6.7               |
| EDL                  | 122.1 ± 2.2   | 116.3 ± 2.9   | 107.5 ± 5.4*               | 109.0 ± 3.8*              | 121.2 ± 3.6               |
| Diaphragm            | 498.4 ± 36.7  | 410.9 ± 48.5  | 502.3 ± 55.4               | 552.8 ± 33.8 <sup>¥</sup> | 536.5 ± 23.9*             |
| VAT                  | 8.8 ± 1.1     | 5.7 ± 0.6*    | 10.5 ± 0.6 <sup>¥</sup>    | 5.7 ± 0.3*                | 6.8 ± 0.5                 |

Table 3: Effects of docetaxel and dantrolene treatments after 7 days on total body weight, food intake and tissue weight. Body weight is expressed in g. Average daily food intake for two rats (belonging to the same group and housed in the same cage), is expressed in g/day. EDL: *extensor digitorum longus*; VAT: Visceral adipose tissue. n=6 for Control and Dant groups. n=4 for Tax, DanTax 7D and DanTax 1D groups. Data are expressed as mean± SEM. \* Significant difference from Control group (p<0.05), <sup>¥</sup> significant difference from Tax group (p<0.05), <sup>§</sup> significant difference from DanTax 7D (p<0.05).

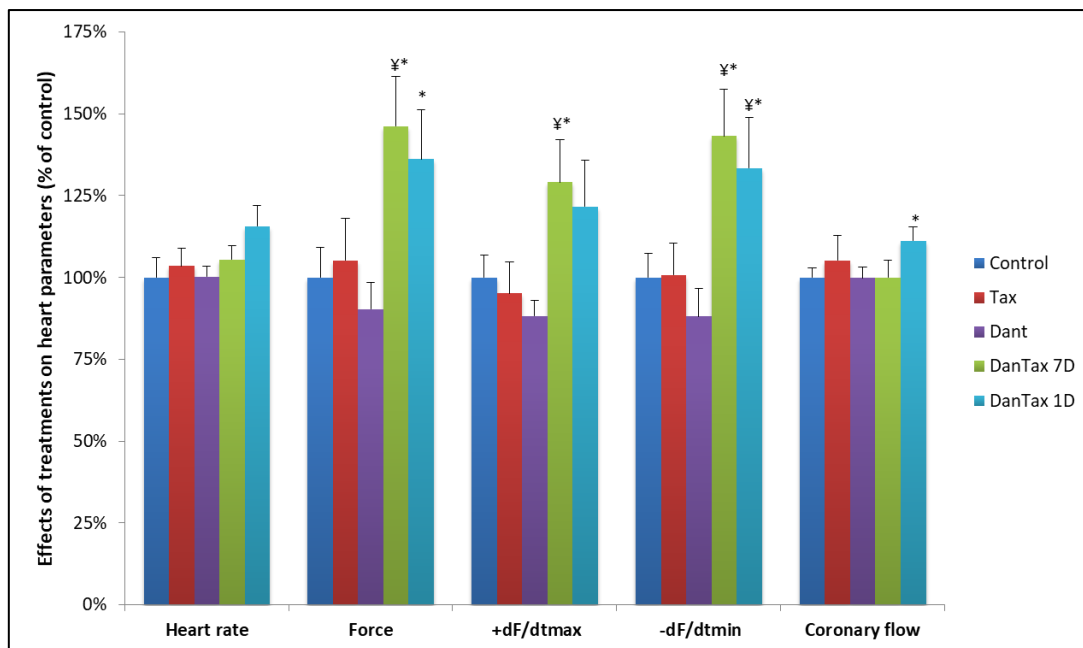


Figure 2: Heart parameters after chronic treatments of docetaxel and dantrolene. Heart rate (bpm), contractile force (g), maximum speed of contraction (+dF/dt<sub>max</sub>) (g/s) and relaxation (-dF/dt<sub>min</sub>) (g/s), and coronary flow (ml/min) are represented. Data are expressed as percentage of Control group values. n=5 for Dant group, n=6 for Control group, n=7 for DanTax 1D group, n=8 for Tax and DanTax 7D groups. Data are expressed as mean± SEM. \* significant difference from Control group (p<0.05), <sup>¥</sup> significant difference from Tax group (p<0.05).

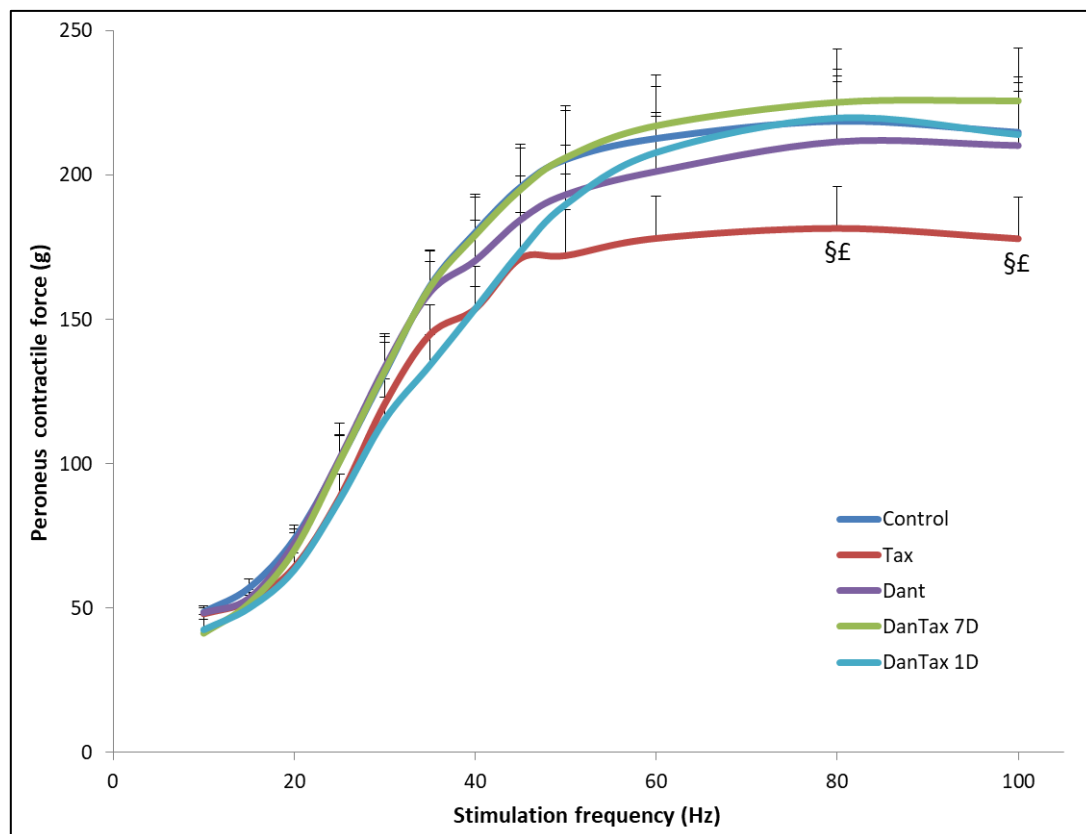


Figure 3: Effects of docetaxel and dantrolene treatments after 7 days on *peroneus longus* contraction. Force contraction is expressed in g for the different stimulus frequencies. n=4 for Dant group, n=5 for Control group, n=6 for DanTax 7D, n=8 for Tax and DanTax 1D groups. Data are expressed as mean $\pm$  SEM. <sup>£</sup> significant difference from DanTax 1D group (p<0.05), <sup>§</sup> significant difference from DanTax 7D group (p<0.05).

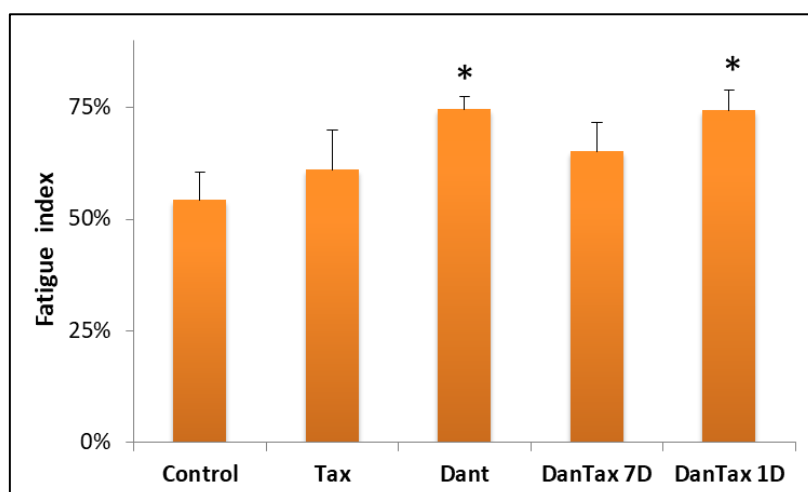


Figure 4: Effects of docetaxel and dantrolene treatments after 7 days on *peroneus longus* fatigue index. Data are expressed as mean $\pm$  SEM. n=4 for Dant group, n=5 for Control group, n=6 for DanTax 7D, n=8 for Tax and DanTax 1D groups. \* significant difference from Control group (p<0.05).

## Discussion des résultats

Les résultats montrent pour l'étude en aigu que le docétaxel (groupe Tax) est responsable d'une perte de masse musculaire de 12% pour le soléaire et 13% pour le péronier. Cette perte est reversée par l'ajout de dantrolène. Le même type de résultat est observé pour le diaphragme. Le docétaxel a déjà été étudié chez la souris où il induisait une perte de masse musculaire [182]. Néanmoins, dans cette étude les auteurs utilisaient une dose de chimiothérapie bien supérieure à la dose équivalente utilisée chez l'homme, ce qui relativise quelque peu les résultats. Ici nous avons volontairement choisi une dose équivalente à celle utilisée chez l'homme. De même, dans cette étude le docétaxel était injecté en intra péritonéal, ce qui peut majorer les effets observés. En effet, il a été montré qu'avec une autre chimiothérapie, la doxorubicine, il y avait une augmentation des dommages diaphragmatiques avec une injection en IP comparée à une injection en IV [180]. Nous avons étudié les voies protéolytiques dans le péronier pour identifier les mécanismes impliqués dans la perte de masse musculaire. Même si le docétaxel seul n'augmente pas les taux de calpaïnes 1 et 2 et de MAFbx, en revanche le dantrolène ajouté au docétaxel entraîne une diminution de l'expression de ces trois protéines. Néanmoins, pour vérifier si le docétaxel modifie l'activité de ces systèmes protéolytiques il faudrait analyser l'activité enzymatique des calpaïnes et du protéasome. Une autre hypothèse serait que le docétaxel affecterait surtout les voies de la protéosynthèse. En effet, la doxorubicine, par exemple, est capable de diminuer la protéosynthèse de 30% sans augmenter l'expression des calpaïnes [174]. Dans le groupe DanTax il y a une diminution de l'expression des calpaïnes 1 et 2 et de MAFbx, ce qui pourrait légèrement restaurer l'équilibre anabolisme/catabolisme et ainsi expliquer l'effet bénéfique du dantrolène observé sur la masse musculaire observé. Concernant les cytokines, la chimiothérapie induit une augmentation de 9 des 10 cytokines étudiées, dont +279% pour l'IFN- $\gamma$ , +779% pour l'IL-1 $\beta$ , +232% pour l'IL-6 et +405% pour le TNF- $\alpha$ . Cette augmentation de taux de cytokines par le docétaxel est également montrée dans l'étude de Wang *et al.*, pour l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ , mais à des doses de chimiothérapie 4 fois supérieures [182]. Le dantrolène permet un retour à la normale du taux de toutes ces cytokines. Ces cytokines peuvent avoir un rôle majeur dans l'atteinte musculaire. En effet, Gilliam *et al.*, ont montré que la doxorubicine par exemple induisait une diminution de la force de contraction diaphragmatique et que cette réponse était supprimée chez un modèle de KO pour le récepteur 1 du TNF- $\alpha$  [168]. Le dantrolène est donc capable de prévenir la libération de cytokines induite par le docétaxel même si son mécanisme d'action reste encore non élucidé.

La seconde partie de notre étude a été d'étudier ces différents traitements sur une période chronique de 7 jours. Deux posologies de dantrolène ont été utilisées pour les groupes DanTax, injection seulement le 1<sup>er</sup> jour (DanTax1J), ou injection de dantrolène tous les jours (DanTax 7J). La prise alimentaire est diminuée de moitié dans les 3 groupes comprenant du docétaxel comparée au groupe Contrôle. Concernant le poids des muscles, il y a une diminution d'environ 5% du poids du cœur pour les groupes Tax et DanTax 1J, en revanche il n'y a pas d'effet significatif pour le groupe (DanTax 7J). Pour les muscles de la patte, il n'y a pas de réel effet dans le groupe Tax. Cependant, le dantrolène a montré une certaine toxicité musculaire car, dans les groupes DanTax 7J ou DanTax 1J les poids des muscles de la patte sont nettement diminués. L'hypothèse concernant le groupe avec seulement injection de dantrolène le 1<sup>er</sup> jour (groupe DanTax 1J) était de privilégier les effets bénéfiques observés sur l'étude en aigu, tout en supprimant les effets négatifs liés aux injections quotidiennes. On observe un effet bénéfique du dantrolène (pour les groupes DanTax 7J et 1J) sur la masse du diaphragme comparé au docétaxel seul. Il est possible d'expliquer l'absence de différence entre les groupes Contrôle et Tax, par le fait que pour cette étude nous avons utilisé des jeunes adultes en croissance (rats d'environ 4mois - 260g). Au bout d'une semaine d'injection ils ont probablement régénéré leur masse musculaire. Les patients qui reçoivent ce type de traitement sont majoritairement des adultes ou des personnes âgées, or chez le sujet âgé l'anabolisme est diminué [218]. Cela nous laisse supposer qu'en utilisant un modèle de rat âgé, dont l'anabolisme est moins efficace, les effets du docétaxel seraient significatifs à 7 jours. Il y a une diminution d'environ 35% de la masse du tissu adipeux viscéral dans les groupes Tax et DanTax 7J alors qu'elle n'est que de 20% dans le groupe DanTax 1J, comparé au contrôle. Cela est cohérent avec l'effet délétère des injections répétées de dantrolène.

Nous avons étudié la contraction de 2 muscles : le cœur et le péronier. Pour le cœur, le docétaxel n'a pas d'effet après 7 jours d'injection, en revanche le dantrolène induit une augmentation de la force de contraction dans les groupes traités au docétaxel (DanTax1J et DanTax7J). Pour le péronier, il y a une diminution de la force tétonique maximale avec le docétaxel d'environ 20%, alors que dans les groupes DanTax 7J et 1J la force revient à des valeurs contrôles. Pour ce qui est de la fatigue, le docétaxel n'a pas d'effet, et la fatigue est diminuée dans le groupe DanTax 1J. Si le docétaxel seul n'induit pas de perte de masse musculaire, il provoque une faiblesse musculaire qui est réversée par le dantrolène. Il y a donc là aussi un effet bénéfique du dantrolène. Même dans le groupe DanTax 7J, où la perte de masse du péronier atteint 12% comparé aux contrôles, la force de contraction maximale est

supérieure au groupe Tax seul. L'effet bénéfique est donc moindre que dans le groupe DanTax 1J. Cela peut soulever la question de savoir ce qui est le plus important : la masse musculaire ou la force de contraction ? En effet, beaucoup d'études utilisent seulement la masse comme mesure d'atrophie et de fonction musculaire, or ici, nous montrons que même avec 12% d'atrophie on a une force de contraction améliorée.



**IV. Article 4 : L'inhibition de la voie des TGF- $\beta$  protège le diaphragme à la fois de l'atrophie et de la faiblesse musculaire lors du sepsis**

Cet article est actuellement en cours de rédaction.

## Introduction

Parmi les cibles thérapeutiques découvertes et les plus prometteuses pour lutter contre la cachexie cancéreuse, la myostatine constitue une cible intéressante, que ce soit en inhibant sa forme circulante, ou son récepteur ou encore en utilisant des antagonistes. L'inhibition de la myostatine a également un intérêt thérapeutique dans d'autres pathologies associées à une perte de masse musculaire comme la sarcopénie, l'atteinte cardiaque ou rénale chronique. Néanmoins aucune étude ne mentionne les effets de l'inhibition de cette voie lors de la perte de masse musculaire induite par le sepsis. Pour notre étude, le LY364947 a été choisi comme candidat pour inhiber la voie de signalisation de la myostatine. Parmi les critères requis pour sa sélection, celui-ci est commercialisé actuellement sous une forme administrable à l'animal et il existe des références concernant la posologie. Le LY364947 est capable d'inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur TGF- $\beta$ R1 et par conséquent de bloquer l'activation de SMAD2 et SMAD3 après stimulation avec de la myostatine, mais également après stimulation avec du TGF- $\beta$ 1 et de l'activine A [219].. Le choix d'un inhibiteur des TGF- $\beta$  en général et pas spécifique de la myostatine vient du fait que l'objectif était de tester une molécule applicable sur des modèles de cachexie cancéreuse au laboratoire. En effet, en plus des effets sur la masse musculaire les TGF- $\beta$  sont également impliqués dans le pouvoir métastatique de certains cancers, ce qui en fait une double cible d'intérêt.

Concernant la posologie d'administration du LY364947 nous avons choisi 1mg/kg, une fois par jour en IP, conformément à la bibliographie. Nous avons constitué un premier groupe de rats recevant l'inhibiteur 2h avant le déclenchement du sepsis par CLP (LY D0), et un second groupe de rat septiques recevant l'inhibiteur 24h après le déclenchement du sepsis (LY D1). Contrairement à la chimiothérapie, qui est administrée au moment voulu, le sepsis est déjà présent dans le cas des patients en service de soins intensifs. Dans le premier cas le traitement peut donc être administré en préventif alors que dans le second il sera curatif uniquement. C'est pour cela que nous avons voulu vérifier si l'inhibition en curatif de la voie des TGF- $\beta$  pouvait produire des effets bénéfiques dans le sepsis, ce qui serait la thérapeutique applicable la plus proche de celle qui pourrait être utilisée chez l'homme. Après 7 jours de sepsis la mesure de la contraction du péronier, du cœur et du diaphragme, ainsi que la pesée des muscles et du tissu adipeux viscéral ont été réalisées.

# **TGF- $\beta$ pathway inhibition protects diaphragm from wasting and weakness induced by sepsis**

**Authors:** Jude B<sup>1</sup>, Tissier F<sup>1,2</sup>, Droguet M<sup>1</sup>, Castel T<sup>1</sup>, Léon K<sup>1</sup>, Giroux-Metges MA<sup>1,2</sup>, Pennec JP<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie - EA 4324 ORPHY, IBSAM, Université de Bretagne Occidentale, Brest - France.

<sup>2</sup> Explorations Fonctionnelles Respiratoires, CHRU de Brest, Brest – France

**Short Title:** Diaphragm protection by TGF- $\beta$  pathway inhibition

**Corresponding author:** Baptiste Jude

Laboratoire de Physiologie – EA4324 ORPHY, Université de Bretagne Occidentale, 22 Avenue Camille Desmoulins 29238 Brest, Cedex 3 France

Telephone: +33(0)2 98 01 64 62

[bjude@outlook.fr](mailto:bjude@outlook.fr)

## **Abstract:**

Sepsis is considered as a major risk of critical illness neuro myopathy (CIP) which is one of the most frequent pathology acquired by patients in intensive care units. Muscle weakness is one of the most common symptoms observed in this case. This weakness can concern diaphragm and then causes problems about weaning from mechanical ventilation. In addition skeletal muscles can be affected thus leading to long-term sequels and a poor quality of life for patients. Muscle dysfunction is related to an unbalance between protein synthesis and breakdown. Pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-6, play an important role in the activation of proteolysis pathways. Since few years, myostatin, a member of TGF- $\beta$  family, is reported to strongly trigger activation of protein breakdown. The aim of this study was to investigate the potential beneficial effect of a TGF- $\beta$  receptor inhibitor, the LY364947, on the muscle function during a chronic sepsis.

Chronic sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP), and carried out during 7 days. Four groups were realized: Control group, Septic group, septic group with inhibitor from day 0 (LY D0), and septic group with inhibitor from day 1 (LY D1). Rats were sacrificed 7days after sepsis induction. Contractions of *peroneus*, diaphragm and heart were recorded, tissues weighted and protein expression was carried out on diaphragm.

Chronic sepsis was responsible of a general decrease of body weight, food intake, muscles mass and visceral adipose tissue. The inhibitor was able to abolish muscle wasting for the diaphragm but only in the LY D1 group. Concerning heart function, sepsis decreased heart rate, when both LY D0 and LY D1 groups showed a modest increase of force and speed of contraction and relaxation compared to Control group. LY364947 had a beneficial effect on *peroneus* contraction, but not on the fatigue index or on the shift to a slower phenotype induced by sepsis. In the same manner, LY364947 had beneficial effect on diaphragm contraction but not on the slower phenotype. Fatigue index was unchanged in all groups. SMAD3 was over-expressed and phosphorylated in diaphragm by sepsis, but this was reversed by LY364947. Calpain 1 and 2 and MAFbx were over-expressed also, and the inhibitor decreased the expression of calpain 1 and MAFbx.

This work demonstrates that the inhibition of TGF- $\beta$  pathway by LY364947 can protect diaphragm from weakness and proteolysis during a chronic sepsis. This could be of a major importance in the care of septic patients.

### **Keywords**

Sepsis, TGF- $\beta$ , Diaphragm, SMAD3, Contractile Force.

## **Introduction**

Critical illness polyneuromyopathy (CIP) is one of the most frequently observed pathology in patients, which can be acquired in intensive care unit (ICU) (1). The decrease of muscle mass and of muscle excitability and force, leading to muscle weakness, is one of the most deleterious symptom. The CIP induced weakness can concern peripheral skeletal muscle but also the main respiratory muscle, the diaphragm with problems in weaning from mechanical ventilation and increased length of the stays in ICU. An important factor is the muscle disuse corresponding to bed rest and also the prolonged mechanical ventilation

especially for the diaphragm (2). On the other hand, sepsis is also considered as a major risk of CIP (3), with an incidence of weakness in ICU patient until 50-100% and influence the patients prognostic with increased morbidity and long-time sequels inducing a decrease in the quality of life and increased costs (1). Muscle wasting is a prominent feature of sepsis resulting in an increase of muscle catabolism and the decrease on anabolism (4,5). Mediators released during sepsis, such as cytokines, are able to regulate muscle metabolism. For example, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 are produced during the early phase of sepsis corresponding to the first hours following the onset of sepsis and can trigger muscle catabolism (1).

Other mediators are able to induce muscle atrophy. Myostatin, a member of the TGF- $\beta$  superfamily, is a negative regulator of skeletal muscle mass (6), and is involved in the muscle catabolism during cancer cachexia and heart failure (7). Few publications investigating the effects of sepsis induced by zymosan or cecal ligation and puncture (CLP) report that myostatin expression was modified during sepsis but the mechanism is still unclear (8–10).

In the present study, we hypothesized that myostatin or other mediators of the TGF- $\beta$  superfamily are released during sepsis, and are involved in muscle wasting and muscle weakness. In order to determine if the myostatin could be involved in the muscle wasting induced by sepsis, we used a specific myostatin receptor inhibitor, the LY364947. The sepsis was induced by a chronic CLP during 7days. At the end of the experiment the contractile force (CF) of the muscles (*peroneus*, diaphragm and heart) was recorded *ex vivo* and the muscle mass was also measured.

## Materials and Methods

### Animals

Female wistar rats averaging 200g were used for the experimentation. All the animals were purchased from Charles River (Charles River laboratories, France) and housed in the same location at 23°C, with a 12-hr daylight cycle and fed *ad libitum* with standard rat pellets. The experiments were realized according to the recommendations of the European Community directive No. 2010/63/EU, which are equivalent to NIH recommendations. Experimental protocol, animal care, anesthesia, analgesia and sacrifice methods were approved by our ethical regional committee (CEFEA: "Comité d'Ethique Finistérien en

*Expérimentation Animale*” - departmental agreement No. A29-019-03) and validated by the French ministry in charge of animal experimentation and welfare (protocol No. 02076.01).

### Sepsis induction

The sepsis was induced by CLP according to method previously described (11). Briefly, rats were anesthetized with intraperitoneal (IP) injection of Xylazine (12mg/kg) and Ketamine (80mg/kg). After laparotomy, the cecum was exposed carefully then was sub-occlusively ligatured at its base below the colo-caecal valve. Ten punctures were performed in the caecum with a 21G needle, avoiding blood vessels. Gentle pressure was applied to the caecum in order to exude a small amount of feces. After that, the cecum was replaced into the abdominal cavity. The muscular layer and the skin were sutured separately with absorbable suture. Analgesia was carried out after the surgery by daily buprenorphine subcutaneous injection (0.1mg/kg) during the 7 days of procedure.

### Protocol

The aim of this protocol was to determine the impact of sepsis on muscle wasting and muscle weakness and to check if the inhibition of the TGF- $\beta$  could have beneficial effects. The inhibitor used is the LY364947 (Adooq) which is an ATP-competitive inhibitor of TGF- $\beta$  receptor 1 (TGF- $\beta$ R1), and especially the Activin Like Kinase (ALK) 4 and 5. Some TGF- $\beta$ , such as myostatin and activin A, bind the activin type 2 receptor B (ActRIIB) leading to the phosphorylation and activation of TGF- $\beta$ R1 and then the activation of TGF- $\beta$  pathways (12).

The LY364947 was diluted in NaCl 0.9% with 5% of DMSO to a final concentration of 250mg/ml. Animals received daily IP injection of LY364947 at 1mg/kg, or an equal volume of NaCl 0.9 with 5% of DMSO. The injection on day 0 was made 2h before anaesthesia and surgery.

In this study, 4 groups were constituted:

Control: rats were operated but not septic (no CLP), with daily injection of NaCl + DMSO.

Septic: rats were operated and septic, with daily injection of NaCl + DMSO.

LY D0: rats were operated and septic, with daily injection of LY364947.

LY D1: rats were operated and septic, with injection of NaCl + DMSO the first day and then, daily injection of LY364947.

The animal weight and the food intake were measured daily.

#### Peroneus contraction

The *peroneus* and its distal tendon were freed from the surrounding tissue without impairing the blood supply. The nerve of *peroneus* was exposed and placed on bipolar platinum stimulating electrodes. The hindlimb was abducted to the horizontal plane, and the body of the animal was maintained at 37°C by a monitored heating element. To prevent movements during contractions, the knee and ankle joints were secured onto the supporting device. The distal tendon of *peroneus* was cut and attached to a force transducer (Kulite strain gauge, model BG 1000). The force transducer was mounted on a micrometer screw so that the muscle length could be accurately adjusted. For the force measurement, *peroneus* length was adjusted to L<sub>0</sub>, at which maximal active force is elicited. A single twitch was elicited by an electrical stimulus of 0.05ms duration at supramaximal intensity. Force/frequency relationship was determined by incremental stimulation frequencies (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 80 and 100, Hz) with a burst duration lasting 0.7s. The fatigability of *peroneus* was evaluated by using a Burke's modified protocol. This consisted of a 40-Hz burst lasting 330ms repeated every 1s. The fatigue index (%) was obtained from the following relation: peak force of the 120th tetanus/peak force of the first tetanus. After the recordings, the muscle was weighted and the specific force was calculated in g/mg of fresh muscle.

#### Isolated Rat Heart Preparations and Recordings

After *peroneus* contraction, the rat was killed by cervical dislocation and exsanguination. Rapidly, the heart and lungs were removed after sternotomy. Lungs were separated from the heart, and the aorta was cannulated according to the Langendorff technique. Heart was perfused at 37°C with modified Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 5.4mM; CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1.8 mM; HEPES 10 mM; glucose 11 mM all purchased from Sigma-Aldrich), adjusted at pH=7.4 with NaOH and oxygenated with 100% O<sub>2</sub>. The Tyrode was supplemented with Heparin (1000 UI) during the first minutes of the perfusion in order to rinse the coronary system and to avoid thrombus formation. The heart was hooked by the apex to a strain gauge connected to a computer via a Biopac MP35 interface (CEROM, France). Hearts were allowed to beat spontaneously throughout the experiment. Biopac

Student lab software (BSL Pro, CEROM, France) was used to record and analyze heart contractions for 30 sec periods, every 5 min, and during 25 min. All the hearts were perfused at constant pressure (80 cm of water). Coronary flow was not imposed but was monitored by a ball flowmeter. Heart rate (bpm) and contraction amplitude (g) were recorded and analyzed with Biopac Student lab software and the speeds of contraction ( $+dF/dt_{\max}$ ) (g/s) and relaxation ( $-dF/dt_{\min}$ ) (g/s) were calculated based upon the first derivative of contraction recording. Coronary flow (ml/min) was also recorded each 5min. At the end of experimentation, all the hearts were rapidly frozen in liquid nitrogen until further analyses with others muscles (*peroneus*, *soleus*, EDL, diaphragm) and visceral adipose tissue (VAT).

### Diaphragm contraction

Two bundles of diaphragm were isolated from each animal. The bundle was placed in modified Tyrode at 37°C and oxygenated with 100% O<sub>2</sub> (same Tyrode as described in isolated heart protocol), then it was attached by its central tendon to a force transducer (Kulite strain gauge, model BG 1000). The force transducer was mounted on a micrometer screw so that the muscle length could be accurately adjusted. For the force measurement, diaphragm length was adjusted to L<sub>0</sub>, at which maximal active force is elicited. A single twitch was elicited by an electrical stimulus of 0.05ms duration at supramaximal intensity. Force/frequency relationship was determined on the first bundle, by incremental stimulation frequencies (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 and 100, Hz) with a burst duration was 0.7s, with a recovery time 20s between each stimulation. The fatigability of diaphragm was evaluated with the second bundle, by using a Burke's modified protocol. This consisted of 40-Hz bursts lasting 330ms repeated every 2s. The fatigue index (%) was obtained from the following relation: peak force of the 50th tetanus/peak force of the first tetanus. After recording contractions, the bundle was separated from the remaining ribs. Cross-sectional area (CSA) of the bundle was measured and specific force was expressed as g/cm<sup>2</sup>.

### Western Blot analyses

200mg of non-contracted diaphragm was homogenized in ripa buffer (HEPES (pH 7.9) 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, KCl 10mM, DTT 0.5mM (purchased from Sigma-Aldrich) and Igepal (0.5%) from Euromedex). The protein content was measured with the Bradford method. Briefly, 5 µL of sample diluted (1:10) were added to 250µL of Bradford reagent (Sigma-Aldrich) in 96 wells plate, and read at 595nm. Proteins were diluted in Laemmli Buffer 4x

(Biorad) with 10% 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich). 50µg of proteins of each sample were run on 9% SDS-polyacrylamide gels then proteins were transferred onto PVDF membrane (0.45µm, Millipore). The PVDF membrane was then incubated in a blocking buffer (20mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl; TBS) supplemented with 0.05% v/v Tween 20 (TTBS) containing 5% w/v skimmed milk powder overnight à 4°C followed by 2x20 min washes in TBST. Blots were then incubated with both anti-Calpain 1 (1:1000), anti-Calpain 2 (1:1000), anti-MAFbx (1:1000), anti-SMAD3 (1:5000), anti-pSMAD3 (1:2000) and anti-GAPDH (1:200) (Abcam) in TTBS containing 1% w/v skimmed milk powder over night at 4°C. The blots were washed 2x20min in TTBS and incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) (1:2000 dilution) (Abcam) for 60 min. Finally, blots were washed 2x20 min in TTBS rinsed in TBS and exposed to ECL-reagents composed of 10ml buffer Tris-HCL 100mM (Sigma-Aldrich) at pH=8.5, 3µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50% (Sigma-Aldrich) 50µL of solubilized luminol (Sigma-Aldrich) in DMSO (Sigma-Aldrich) (44.3mg/ml DMSO) and 25µL of p-coumaric acid (Sigma-Aldrich) in DMSO (14.8mg/ml DMSO). Membranes were exposed for 1 min and analyzed by using a Vilber-Lourmat Fusion SL image acquisition system, then Image Studio Lite (LI-COR Biosciences) which allows precise quantification of the signal.

#### Data and statistical analyses

All experimental data were analysed using Excel® (Microsoft, Redmond, WA) including the fitting onto Boltzmann curves. Data are expressed by mean value ± SEM (Standard Error of the Mean). Statistical differences were determined as appropriated after checking the normality of distribution (Lilliefors test) with ANOVA or Kruskal Wallis, and then the appropriated post-hoc test. A p value<0.05 was considered as statistically significant.

## **Results**

The first part of the results focused on the monitoring of animals and organs weight. Chronic sepsis induced a loss of total body weight after 7 days (180.6 ± 4.1g for Septic group vs 200.4 ± 2.3 for Control group) (Table1). In the same manner, the injection of LY364947 at day 0 had no effect on the final total body weight (186.8 ± 3.2g) whereas if the injection was made on day 1, total body weight loss after chronic sepsis was reduced (189.9 ± 6.1g, p<0.07). Concerning the food intake, sepsis was responsible of a decrease averaging -80% of the food intake over the week. For muscle weight, chronic sepsis in Septic group led to a

significant atrophy by about -20% for the heart, -20% for the diaphragm, -18% for the *soleus*, -25% for the *peroneus*, -30% for the EDL and -22% for the *gastrocnemius* compared to the Control group. Muscle weights were similar in LY D0 group compared to Septic group. For LY D1 group, the muscle mass of the heart, *soleus*, *peroneus*, EDL and *gastrocnemius* was decreased as for Septic and LYD0 groups. Nevertheless, very interestingly, the diaphragm mass was unchanged compared to Control group ( $218.1 \pm 20.7\text{g}$  in LY D0 group vs  $221.1 \pm 12.4\text{g}$  in Control group) and was increased compared to the Septic group ( $176.7 \pm 15\text{g}$ ,  $p < 0.07$ ). In addition, compared to the Control group, the VAT was decreased for the Septic group by -58%, and by -82% and -83% for respectively LY D0 and LY D1 groups. Moreover, the VAT mass was significantly decreased for the two groups with the inhibitor compared to the Septic group. To summarise, sepsis was responsible of a decrease of body weight, food intake and a general muscle wasting. LY364947 was able to prevent only diaphragm wasting and the body weight loss despite of an increased VAT loss.

The second part of the experimentation was focused on muscle contraction. Firstly, heart function was investigated in order to know if the sepsis and/or the inhibitor had cardio toxic effects. Chronic sepsis of 7 days induced a decrease in 11% of the heart rate but had no effect on the contractile force (CF), the speeds of contraction and relaxation and the coronary flow compared to the Control group (Fig 1). For the LY D0 group, all parameters were unchanged compared to the Control group, even if the force contraction seemed to be increased in 27% ( $p < 0.06$ ). Concerning LY D1 group, heart rate and coronary flow were unchanged compared to the Control group, and in the same manner the force of contraction seemed to be increased in 36% ( $p < 0.06$ ) but also for speeds of contraction (+31%,  $p < 0.1$ ) and relaxation (+28%,  $p < 0.1$ ). In conclusion, chronic sepsis had only a moderate negative chronotropic effect on the rat heart, and the inhibitor LY364947 tended to increase force and speeds of contraction but not significantly due to large individual variations.

Secondly, we recorded the CF of a hind limb muscle, the *peroneus*. In the protocol of isometric contraction measurement, the force/frequency contraction was recorded in order to obtain absolute tetanic CF, the specific tetanic CF (force related to muscle weight) and the relative tetanic CF (% of the maximal force) of the muscle. A modest decrease of the isometric contraction of *peroneus* was observed after chronic sepsis ( $311.5 \pm 30.9\text{g}$  for Septic group vs  $371.2 \pm 41.2\text{g}$  for Control group,  $p < 0.14$ ) (Fig 2A). For the LY D0 group, there was an increase of CF for the mean range stimulation frequencies of 25 and 30Hz compared to the Control group, and an increase for 20Hz compared to Septic group, and for the LY D1 group

it was respectively an increase for the mean range stimulation frequencies of 25 and 30Hz and for 20-35Hz. For the specific force, sepsis induced an increase of the force for the stimulation frequencies of 25 and 30Hz (Fig 2B). In the groups with the inhibitor, the force was increased for 20-50Hz in LY D0 group and 20-100Hz in LY D1 group compared to the Control group, and 15-40Hz for LY D0 group and 15-35Hz for LY D1 group compared to the Septic group. The fatigue index of the muscle was obtained following the Burke's protocol measurement modified for the diaphragm (see methods section). Sepsis was responsible of a decrease of the index, indicating an increase of the muscle fatigability ( $70 \pm 4\%$  for Septic group vs  $81 \pm 4\%$  for Control group) (Fig 3). LY364947 did not prevent peroneus fatigability ( $64 \pm 3\%$  for LY D0 group and  $69 \pm 3\%$  for LY D1 group). In the same manner sepsis in the three groups (Septic, LY D0 and LY D1 groups) induced a leftward shift (Fig 4A), with a significant decrease of the frequency stimulation corresponding to the half maximal contraction force for in the groups Septic (28Hz), LY D0 (26.5Hz) and LY D1 (27Hz) compared to the control group (32Hz) (Fig 4B). In summary, the relative force contraction of the *peroneus* was increased with the inhibitor, but fatigue and the leftward shift was the same in Sepsis with and without the inhibitor.

The second recorded muscle was the diaphragm, the principal respiratory muscle, which can be altered by sepsis. For this muscle, the specific tetanic force contraction was calculated as the absolute force related to the CSA. Concerning the absolute force, sepsis induced a decrease by 34% of the maximal force contraction ( $74.6 \pm 16.2\text{g}$  in Septic group vs  $115.3 \pm 8.7\text{g}$  in Control group) (Fig 5A). The injection of the inhibitor in LY D0 group had no effect because the CF profile was similar to the Septic group, with a maximal CF of  $78.8 \pm 12.4\text{g}$ . However, interestingly, the absolute CF measured in LY D1 group was similar to the force measured in control group and was significantly higher than in Septic group ( $109.7 \pm 7.7\text{g}$ ) indicating a protective effect of LYD1 on the diaphragm during sepsis. Specific contraction forces profiles seemed comparable to the absolute force. Sepsis induced a decrease of 27% of the maximal CF ( $1082 \pm 195\text{g/cm}^2$  in Septic group vs  $1479 \pm 143\text{g}$  in Control group,  $p < 0.07$ ) (Fig 5B). Profile of contraction for LY D0 group was between Control and Septic groups with a little decline compared to the Control group ( $1150 \pm 153\text{g/cm}^2$ ,  $p < 0.08$ ). For the LY D1 groups, CF was similar to the Control group, and the maximal CF was increased by 27% compared to the Septic group ( $1479 \pm 117\text{g/cm}^2$  in LY D1 group,  $p < 0.06$ ) thus confirming the effect of LY D1 observed on the absolute CF. In the opposite of what was found in the *peroneus*, the fatigue was unchanged for all groups in the diaphragm (Fig 6). The relative

force frequency curve was also shifted leftward for the Septic and the LY D0 group compared to the Control group, but in the LY D1 group the curve was less shifted (Fig 7A). These results were confirmed by the frequency stimulation necessary to reach the half maximal contraction force which was decreased for the Septic (15Hz), the LY D0 (12.6Hz) and LY D1 (18.8Hz) groups compared to the Control group (26.1Hz) (Fig 7B). The frequency for LY D1 groups was a little less decreased compared to the Control group ( $p < 0.09$ ). To conclude, sepsis was responsible of a decrease of the diaphragm CF. This effect was prevented by the LY364947 in the LY D1 group. The fatigue index was the same in all the four groups, and sepsis induced a leftward shift in all the three groups compared to the Control group.

Finally, we checked the activation of SMAD3 pathway, calpains and proteasome pathway by western blot in diaphragm because of the positive effects of the LY 364947 on both muscle mass and contraction. Chronic sepsis was responsible of an increase of the SMAD3 expression by 98% compared to the Control group (Fig 8A), whereas in both LY D0 and LY D1 groups SMAD3 was half less increased with respectively +49% and +45%. The phosphorylation of SMAD3 was increased by 58% in Septic group, but the inhibitor abolished the phosphorylation in both groups LY D0 and LY D1. Concerning calpain 1, sepsis led to an increase by 61% compared to the Control group, and LY364947 inhibited calpain over-expression in both LY D0 and LY D1 groups and was responsible of a significant decrease of the calpain expression compared to the Septic group (Fig 8B). For calpain 2, the expression was increased for all the three groups (+25% for Septic group, +45% for LY D0 group and +35% for LY D1 group) compared to the Control group. To the end, MAFbx expression was increased by 21% in the Septic group, when in LY D0 and LY D1 groups MAFbx expression values were not different from control. In conclusion, sepsis induced an increase of expression and phosphorylation of SMAD3 prevented by the inhibitor, in the same manner than calpain 1 and MAFbx expression

## Discussion

This study assessed the effect of TGF- $\beta$ R1 inhibition during a chronic sepsis induced by CLP on muscle mass and muscle contraction and on proteolysis pathways. TGF- $\beta$ , like myostatin, are involved in the activation of muscle proteolysis in a large number of pathologies, but their inhibition during sepsis are not yet studied. Chronic 7 days sepsis induced by CLP was responsible of a decrease of the total body weight and food intake, associated to a dramatic muscle and VAT wasting. Chronic sepsis is responsible of a muscle

mass loss as previously describe with CLP of 5 days (13). Moreover, Minnaard et al, have shown that sepsis induced by injection of zymosan was associated to the decrease of food intake, but they also found that muscle wasting was less important in per-fed groups suggesting the involvement of mediators on the loss of muscle mass (14). Concerning adipose tissue, sepsis induced a decrease in 58% in Septic group in our study, as previously found in the literature (9). Nevertheless, in both LY D0 and LY D1 groups the VAT was averaged decreased by 82% compared to the Control group. Myostatine pathway inhibition by inhibition of ActRIIB with an antibody or the gene inactivation of the myostatin, protects muscle from atrophy in models of cancer cachexia but has no effect on adipose tissue wasting (15,16). The inhibition of the myostatine is able to increase muscle mass but at the opposite induce a decrease of adipose tissue mass (17), which is in agreement with our results.

In our study, we showed that after chronic sepsis the heart function was unchanged, except a moderate decrease of 11% for the heart rate. This results is in agreement with previous studies because, if heart dysfunction is frequent during the early phase of sepsis, after 5 to 7 days there is a recovery of the heart function (18,19). Moreover, the TGF- $\beta$ R1 had no deleterious effects on heart function. Despite of muscle wasting, for the *peroneus* CF, a 7 days chronic sepsis was responsible of only a modest decrease of the absolute maximal CF compared to the Control group. Maximal specific force contraction indicated no difference, which suggests the strong involvement of the muscle loss in the decrease of force contraction. Nevertheless, a positive point is that LY364947 induced an increase of specific CF in the *peroneus* whereas the muscle mass remained similar to the Septic group. In addition, sepsis induced an increase of peroneus fatigability, a leftward shift of the relative force curve corresponding to the fact that tetanus is reached for lower stimulation frequencies. This is confirmed by the decrease of stimulation frequency corresponding to 50% of maximal CF. These parameters were not modified by the inhibitor. Publications reported that sepsis induced a decrease of hind limb skeletal muscle force but many of this publications were based upon acute sepsis by CLP, lasting only 16 hours (20), or LPS during 24 hours (21). This suggests that cytokines such as TNF- $\alpha$  which are released in the first hours of sepsis induction (22) are involved in the observed hypo excitability (23) and muscle weakness (24). Diaphragm CF was decreased in Septic group by 34%. In the same manner, injection of LY364947 just before sepsis induction had no effect, whereas if it was injected 1 day after sepsis induction, the absolute force came back to control values. Concerning the specific force, results were rather similar but not significant. The diaphragm fatigue was unchanged in

all the four groups. In the same manner than *peroneus*, the relative force curve was shifted leftward for Septic and LY D0 groups, but this shift was less marked for LY D1 group. Sepsis induced by LPS or mechanical ventilation are able to decrease CF of the diaphragm associated to cytokines production and activation of proteolytic pathways (25). Calpain inhibition prevent diaphragm weakness induced by CLP (26) and LPS (27) and mechanical ventilation (28). In ICU, diaphragm dysfunction is a dramatic risk factor of death (29) then all the possibilities of preventing impairment of diaphragm function are to be considered.

In our study, we used the LY364947 as inhibitor of the myostatin, which is an ATP-competitive inhibitor of the TGF- $\beta$ R1, and can abolish the activation of the downstream intracellular signalization pathways such as SMAD2/3 phosphorylation. Nevertheless, this inhibitor blocks also the activation of SMAD2/3 by TGF- $\beta$ 1 and Activin A, two other members of the TGF- $\beta$  superfamily (30). TGF- $\beta$ 1 concentration is increased in plasma from septic patients compared to non-septic patients (31). Similar observation is made about the concentration of Activin A in serum. In addition, the increase of Activin A can be related to the sepsis intensity (32). Activin A is able to increase phosphorylation of SMAD3 and decrease phosphorylation of PI3K leading to muscle atrophy (33). Moreover, the inhibition of ActRIIB protects muscle from atrophy induced by glucocorticoid stimulation with dexamethasone. The present study shows that sepsis was able to increase the expression of SMAD3 (+98%) and increased its phosphorylation (+58%) compared to the Control group, and that LY364947 injection prevented the increase of SMAD3 expression (+45%) and abolished SMAD3 phosphorylation in the diaphragm. These results are in agreement with the increase of calpain 1 expression and MAFbx expression in the diaphragm in Septic group but not in LY D0 and LY D1 groups. Supinski et al, have published that, with sepsis induced by CLP, the diaphragm CF was decreased (21.4 N/cm<sup>2</sup> for Controls and 6.9N/cm<sup>2</sup> for Septic) associated to a strong increase of calpain activity (about +400%) (26). Moreover, the inhibition of calpain by calpastatine overexpression was able to prevent diaphragm weakness and to abolish calpain activity, suggesting the strong link between calpain and force contraction. In our study, sepsis induced muscle weakness and increased calpain 1 expression, and this can be prevented in LY D1 group.

The timing of the activation of the myostatin pathway during sepsis is unclear. Smith et al, published that following a 16 hours CLP, the mRNA myostatin expression is decreased in

the EDL such as protein expression. A decrease of its plasma level, and an increase of the SMAD3 expression and phosphorylation are also noticed (8). In another publication, Morel et al, published that myostatin mRNA is increased only 1 day after CLP in *gastrocnemius* but that SMAD2/3 phosphorylation was unchanged (9). In the present study, we have shown that the inhibition of myostatin pathway prevented activation of SMAD3 7days after CLP. Moreover, the down regulation of SMAD3, associated to the down activation of calpain 1 and MAFbx, led to the inhibition of both diaphragm wasting and weakness only if the inhibitor was injected 1 day after sepsis induction. This is interesting because it is not necessary to use the inhibitor in a preventive way as the most important effect is observed if the injection occurs one day after the onset of the sepsis. Curiously, the administration of follistatin, an endogenous competitive inhibitor of the myostatin and activin A, is able to decrease the release of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  by a half following LPS injection, and is associated to a higher survival, suggesting a beneficial effect of the early inhibition of the myostatine pathway during sepsis (22).

## **Conclusion**

In conclusion, the present study shows that sepsis was responsible of a body weight loss, a decrease of food intake and a general muscle wasting between 18-30% for the skeletal muscles. Moreover, sepsis induced a modest decline of peroneus contractile force and overall an important diaphragm weakness, with average -34% of maximal contractile force compared to control. This was associated to an increase of SMAD3 activation pathway, and an increase of calpain 1 and 2 and of the E3 ligase MAFbx in the diaphragm. The inhibition of the TGF- $\beta$  pathway was able to protect especially the diaphragm from both muscle wasting and muscle weakness with a complete recovery of these parameters, and it was able to prevent the activation of SMAD3 pathway, and calpain 1 and MAFbx. Moreover, the inhibitor of TGF- $\beta$  had protective properties only if it is injected 24h after sepsis induction.

### **Conflict of interest:**

The authors declare that no conflict of interest exists.

## References

1. Friedrich O, Reid MB, Van den Berghe G, Vanhorebeek I, Hermans G, Rich MM, et al. The Sick and the Weak: Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill. *Physiol Rev.* juill 2015;95(3):1025-109.
2. Griffiths RD, Hall JB. Intensive care unit-acquired weakness. *Crit Care Med.* mars 2010;38(3):779-87.
3. Gueret G, Guillouet M, Vermeersch V, Guillard E, Talarmin H, Nguyen B-V, et al. [ICU acquired neuromyopathy]. *Ann Fr Anesthésie Réanimation.* sept 2013;32(9):580-91.
4. Lang CH, Frost RA, Vary TC. Regulation of muscle protein synthesis during sepsis and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* août 2007;293(2):E453-459.
5. Latronico N, Bolton CF. Critical illness polyneuropathy and myopathy: a major cause of muscle weakness and paralysis. *Lancet Neurol.* oct 2011;10(10):931-41.
6. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature.* 1 mai 1997;387(6628):83-90.
7. Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, Springer J. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* sept 2011;2(3):143-51.
8. Smith IJ, Aversa Z, Alamdari N, Petkova V, Hasselgren P-O. Sepsis downregulates myostatin mRNA levels without altering myostatin protein levels in skeletal muscle. *J Cell Biochem.* 1 nov 2010;111(4):1059-73.
9. Morel J, Palao J-C, Castells J, Desgeorges M, Busso T, Molliex S, et al. Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in locomotor and respiratory muscles during experimental sepsis in mice. *Sci Rep.* 7 sept 2017;7(1):10866.
10. Hill NE, Saeed S, Phadke R, Ellis MJ, Chambers D, Wilson DR, et al. Detailed characterization of a long-term rodent model of critical illness and recovery. *Crit Care Med.* mars 2015;43(3):e84-96.
11. Rossignol B, Gueret G, Pennec J-P, Morel J, Rannou F, Giroux-Metges M-A, et al. Effects of chronic sepsis on contractile properties of fast twitch muscle in an experimental model of critical illness neuromyopathy in the rat. *Crit Care Med.* juin 2008;36(6):1855-63.
12. Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ, Attisano L. Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor  $\beta$ -Like Signaling Pathway To Block Adipogenesis. *Mol Cell Biol.* oct 2003;23(20):7230-42.
13. Crowell KT, Kelleher SL, Soybel DI, Lang CH. Marginal dietary zinc deprivation augments sepsis-induced alterations in skeletal muscle TNF- $\alpha$  but not protein synthesis. *Physiol Rep* [Internet]. 3 nov 2016 [cité 11 oct 2017];4(21). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112495/>
14. Minnaard R, Drost MR, Wagenmakers AJM, van Kranenburg GP, Kuipers H, Hesselink MKC. Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats. *Muscle Nerve.* mars 2005;31(3):339-48.
15. Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell.* 20 août 2010;142(4):531-43.

16. Gallot YS, Durieux A-C, Castells J, Desgeorges MM, Vernus B, Plantureux L, et al. Myostatin gene inactivation prevents skeletal muscle wasting in cancer. *Cancer Res.* 15 déc 2014;74(24):7344-56.
17. Deng B, Zhang F, Wen J, Ye S, Wang L, Yang Y, et al. The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. *Nutr Metab.* 2017;14:29.
18. Martin C, Vincent J-L. Sepsis grave et choc septique: Deuxième édition. Springer Science & Business Media; 2013. 320 p.
19. Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. *Crit Care Med.* juin 2007;35(6):1599-608.
20. Alamdari N, Toraldo G, Aversa Z, Smith I, Castellero E, Renaud G, et al. Loss of muscle strength during sepsis is in part regulated by glucocorticoids and is associated with reduced muscle fiber stiffness. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 15 nov 2012;303(10):R1090-1099.
21. Supinski GS, Callahan LA. Caspase activation contributes to endotoxin-induced diaphragm weakness. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* juin 2006;100(6):1770-7.
22. Jones KL, Mansell A, Patella S, Scott BJ, Hedger MP, de Kretser DM, et al. Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 oct 2007;104(41):16239-44.
23. Guilloët M, Rannou F, Giroux-Metges M-A, Droguet M, Pennec J-P. Tumor Necrosis Factor alpha induced hypoexcitability in rat muscle evidenced in a model of ion currents and action potential. *Cytokine.* oct 2013;64(1):165-71.
24. Adams V, Mangner N, Gasch A, Krohne C, Gielen S, Hirner S, et al. Induction of MuRF1 is essential for TNF-alpha-induced loss of muscle function in mice. *J Mol Biol.* 5 déc 2008;384(1):48-59.
25. Maes K, Stamiris A, Thomas D, Cielen N, Smuder A, Powers SK, et al. Effects of controlled mechanical ventilation on sepsis-induced diaphragm dysfunction in rats. *Crit Care Med.* déc 2014;42(12):e772-782.
26. Supinski GS, Wang L, Song X-H, Moylan JS, Callahan LA. Muscle-specific calpastatin overexpression prevents diaphragm weakness in cecal ligation puncture-induced sepsis. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985.* 15 oct 2014;117(8):921-9.
27. Supinski GS, Callahan LA. Calpain activation contributes to endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* janv 2010;42(1):80-7.
28. Nelson WB, Smuder AJ, Hudson MB, Talbert EE, Powers SK. Cross-talk between the calpain and caspase-3 proteolytic systems in the diaphragm during prolonged mechanical ventilation. *Crit Care Med.* juin 2012;40(6):1857-63.
29. Demoule A, Jung B, Prodanovic H, Molinari N, Chanques G, Coirault C, et al. Diaphragm dysfunction on admission to the intensive care unit. Prevalence, risk factors, and prognostic impact-a prospective study. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2013;188(2):213-9.
30. Ohsawa Y, Okada T, Nishimatsu S-I, Ishizaki M, Suga T, Fujino M, et al. An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* août 2012;92(8):1100-14.

31. Marie C, Cavaillon JM, Losser MR. Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.* 15 sept 1996;125(6):520-1.
32. Lee J-K, Choi SM, Lee J, Park YS, Lee CH, Yim J-J, et al. Serum activin-A as a predictive and prognostic marker in critically ill patients with sepsis. *Respirol Carlton Vic.* 2016;21(5):891-7.
33. Lach-Trifilieff E, Minetti GC, Sheppard K, Ibebunjo C, Feige JN, Hartmann S, et al. An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy. *Mol Cell Biol.* févr 2014;34(4):606-18.

## Figure Captions

|                      | Control        | Septic          | LY D0          | LY D1          |
|----------------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
| <b>Body weight</b>   |                |                 |                |                |
| Initial              | 202,6 ± 2,7    | 202,9 ± 2,9     | 205,5 ± 1,9    | 204,4 ± 2,2    |
| Final                | 200,4 ± 2,3    | 180,6 ± 4,1*    | 186,8 ± 3,2*   | 189,9 ± 6,1    |
| <b>Food intake</b>   | 107,6 ± 3,8    | 20,9 ± 2,0*     | 24,5 ± 1,3*    | 24,4 ± 3,2*    |
| <b>Tissue Weight</b> |                |                 |                |                |
| Heart                | 816,4 ± 20,7   | 657,3 ± 19,1*   | 628,0 ± 16,8*  | 695,6 ± 31,4*  |
| Diaphragm            | 221,1 ± 12,4   | 176,7 ± 15,0*   | 181,7 ± 12,8*  | 218,1 ± 20,7   |
| Soleus               | 88,4 ± 1,7     | 72,5 ± 1,7*     | 74,1 ± 1,7*    | 71,6 ± 1,9*    |
| Peroneus             | 108,6 ± 3,7    | 83,1 ± 4,1*     | 76,0 ± 3,0*    | 84,6 ± 3,4*    |
| EDL                  | 93,4 ± 2,6     | 68,2 ± 3,6*     | 64,5 ± 2,3*    | 65,2 ± 2,1*    |
| Gastrocnemius        | 976,7 ± 33,0   | 682,4 ± 42,8*   | 694,1 ± 18,4*  | 655,6 ± 21,8*  |
| VAT                  | 4245,3 ± 550,3 | 1776,0 ± 488,7* | 784,9 ± 193,5* | 738,7 ± 184,8* |

Table 1: Effects of sepsis and LY364947 on total body weight, food intake and tissues weight. Body weight and food intake are expressed in g, and tissue weight in mg. EDL, *extensor digitorum longus* ; VAT, visceral adipose tissue. n=7 for Control group, Septic and LY D1 groups, n=8 for LY DO group. Data are expressed as mean ± SEM. \* significant difference from Control group (p<0.05)

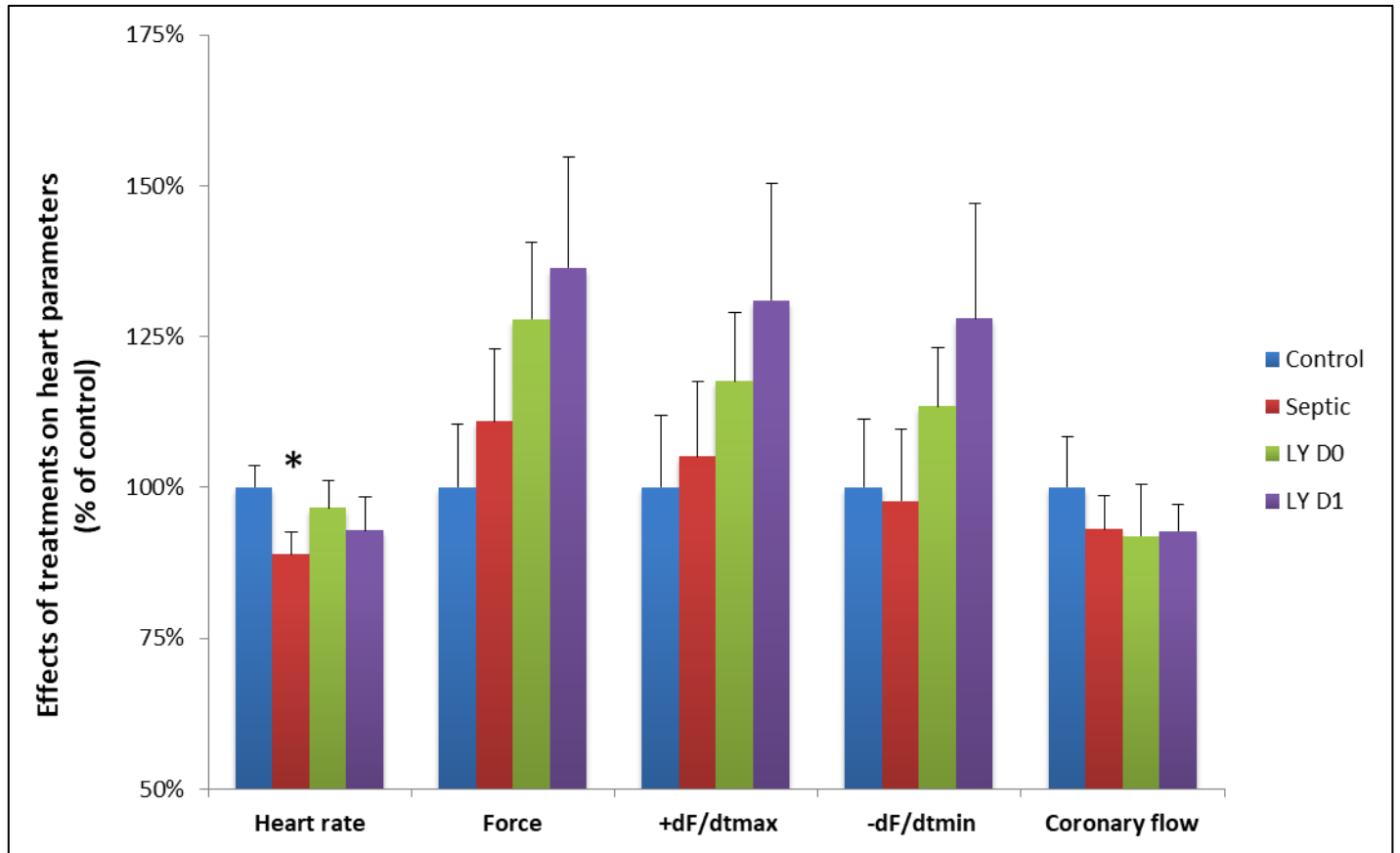


Figure 1: Effects of sepsis and TGF- $\beta$  inhibitor on heart parameters. Heart rate (bpm), contractile force (g), maximum speed of contraction (+dF/dt<sub>max</sub>) (g/s) and relaxation (-dF/dt<sub>min</sub>) (g/s), and coronary flow (ml/min) are represented. Data are expressed as percentage of Control group values. n=7 for Control, Septic and LY D1 groups, n=8 for LY D0 group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* significant difference from Control group (p<0.05).

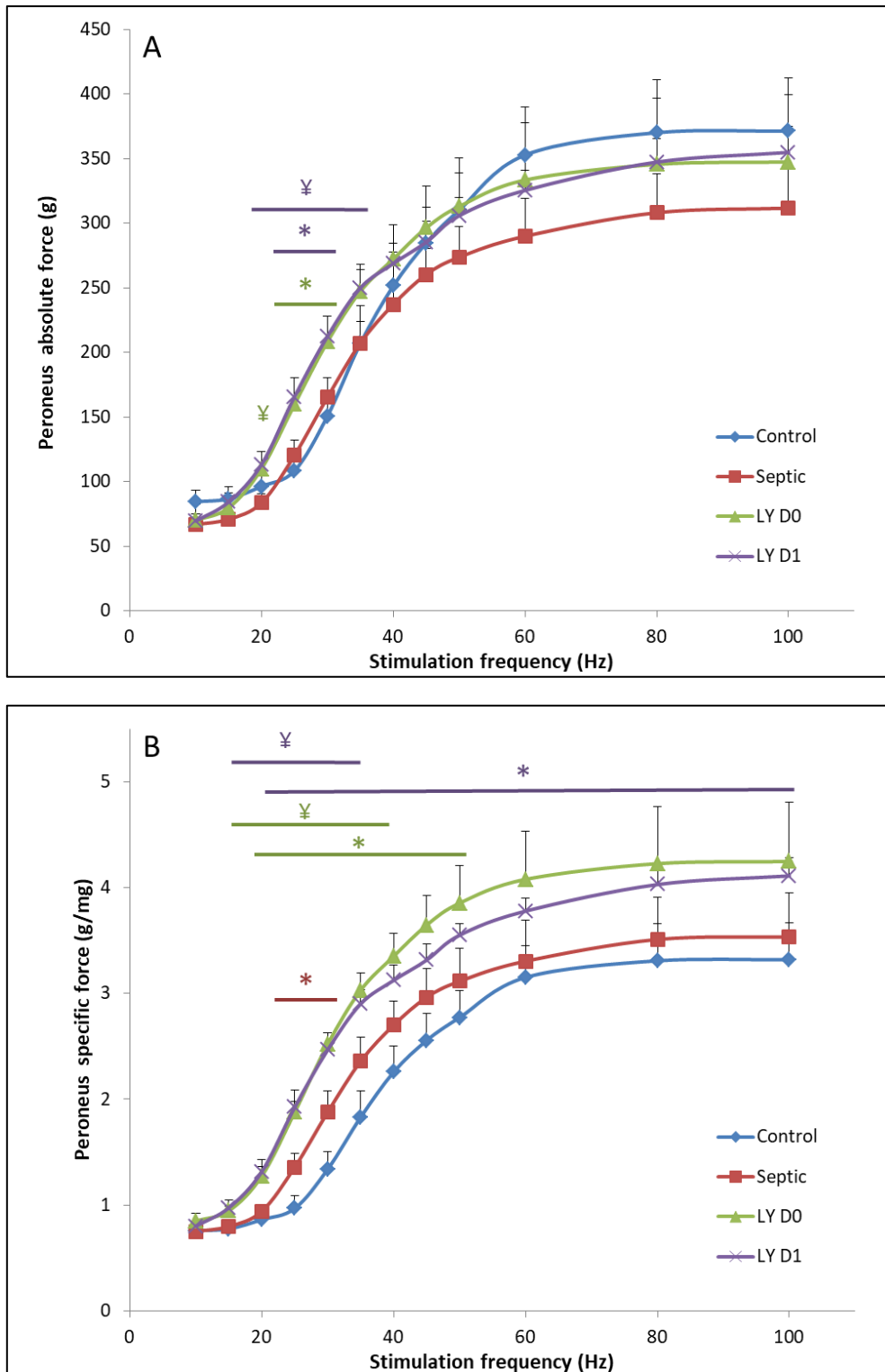


Figure 2: Force-frequency relationship of the *peroneus*. A, absolute force is expressed in g. B, specific force is expressed as the ratio of absolute force by muscle weight (g/mg). n=5 for LY D0 group, n=6 for Control and Septic groups, n=7 for LY D1 group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* significant difference from Control group ( $p < 0.05$ ), ‡ significant difference from Septic group ( $p < 0.05$ ).

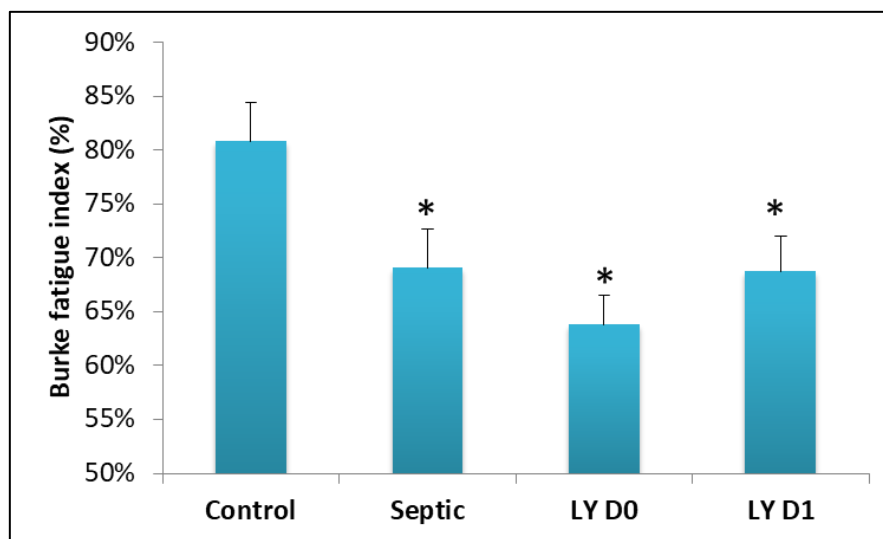


Figure 3: *Peroneus* fatigability during sepsis and treatments. Data are expressed as burke index. n=5 for LY D0 group, n=6 for Control and Septic groups, n=7 for LY D1 group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* significant difference from Control group ( $p < 0.05$ ).

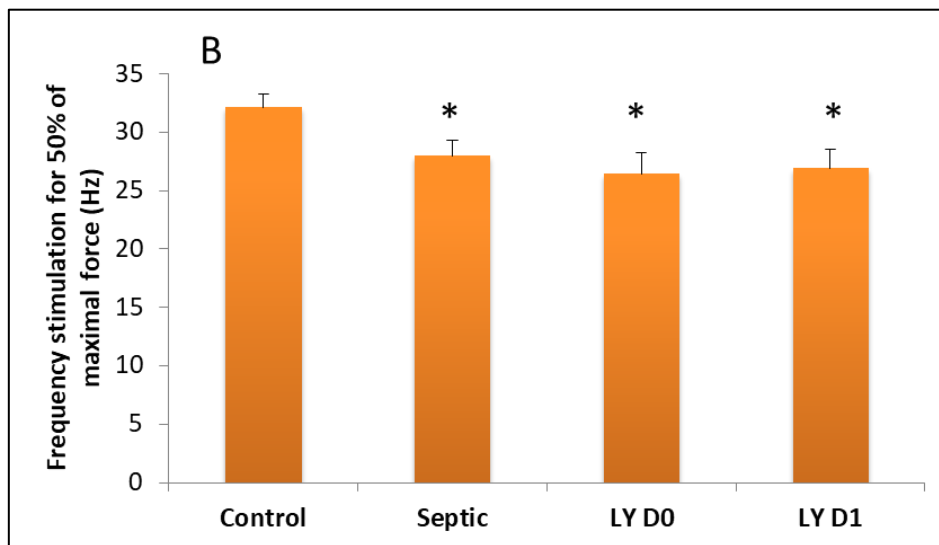
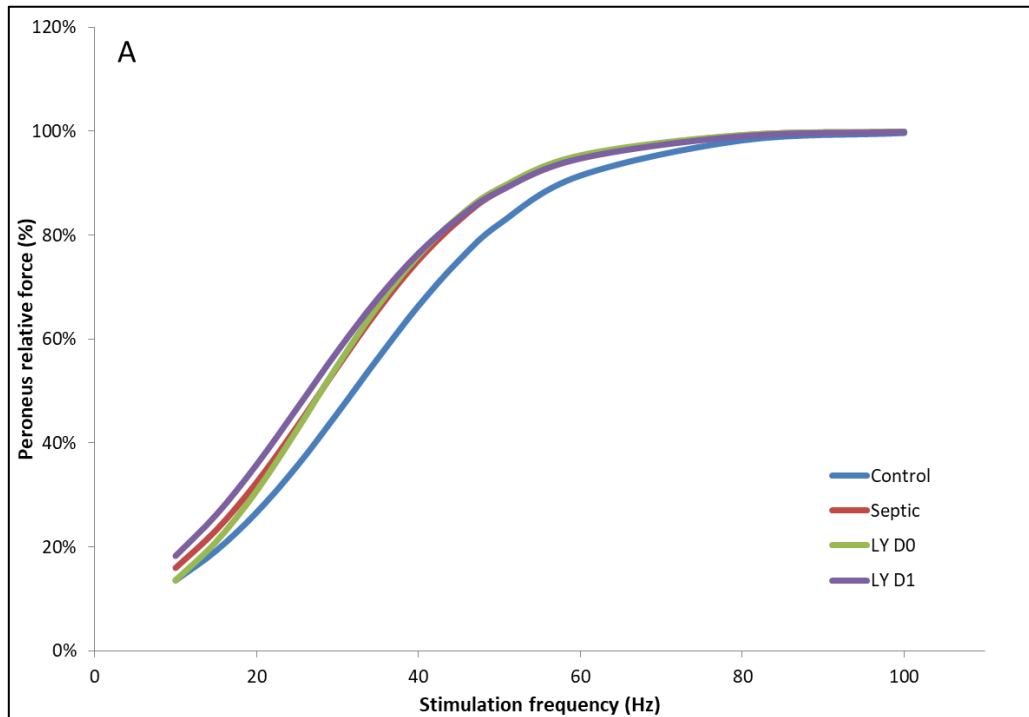


Figure 4: Effects of sepsis and treatment on *peroneus* relative force contraction. A, relative force expressed as percentage of the maximal force. B, frequency stimulation for 50% of the maximal force contraction. n=5 for LY D0 group, n=6 for Control and Septic groups, n=7 for LY D1 group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* significant difference from Control group ( $p < 0.05$ ).

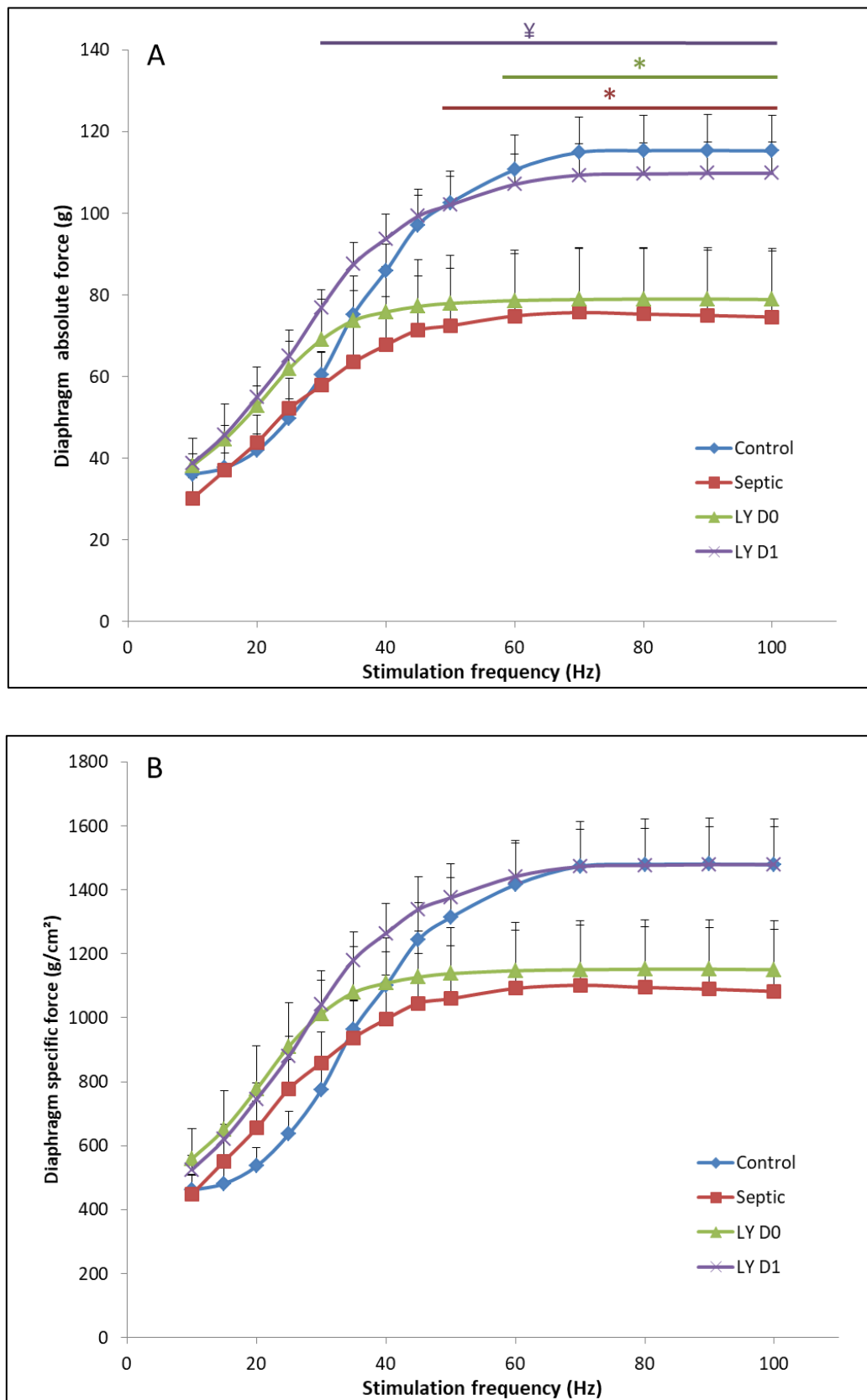


Figure 5: Force-frequency relationship of the diaphragm. A, absolute force is expressed in g. B, specific force is expressed as the ratio of absolute force by cross section area (g/cm<sup>2</sup>). n=5 for LY D0 group, n=6 for Control group, n=7 for Septic and LY D1 groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* significant difference from Control group ( $p < 0.05$ ), <sup>‡</sup> significant difference from Septic group ( $p < 0.05$ ).

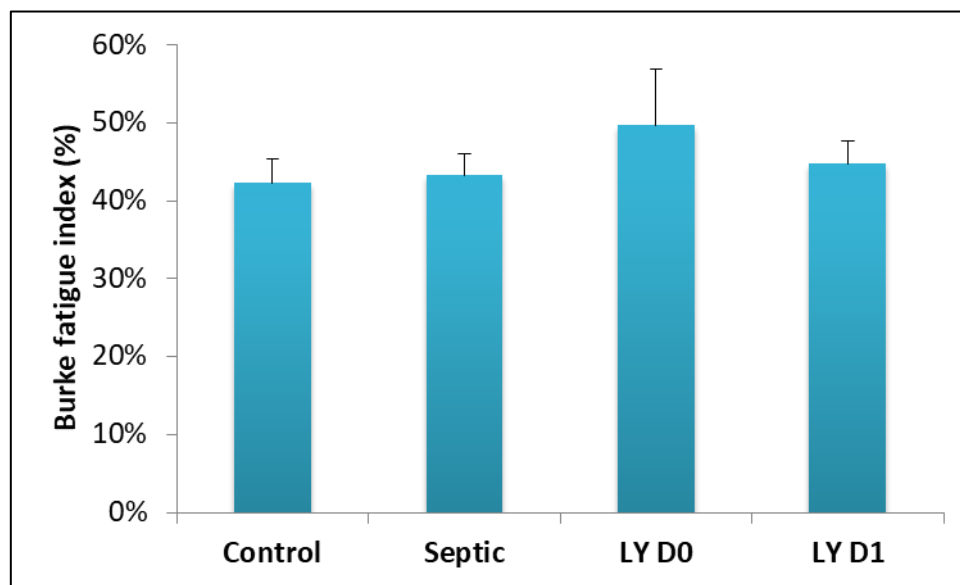


Figure 6: Diaphragm fatigability during sepsis and treatments. Data are expressed as burke index. n=5 for LY D0 group, n=6 for Control group, n=7 for Septic and LY D1 groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM.

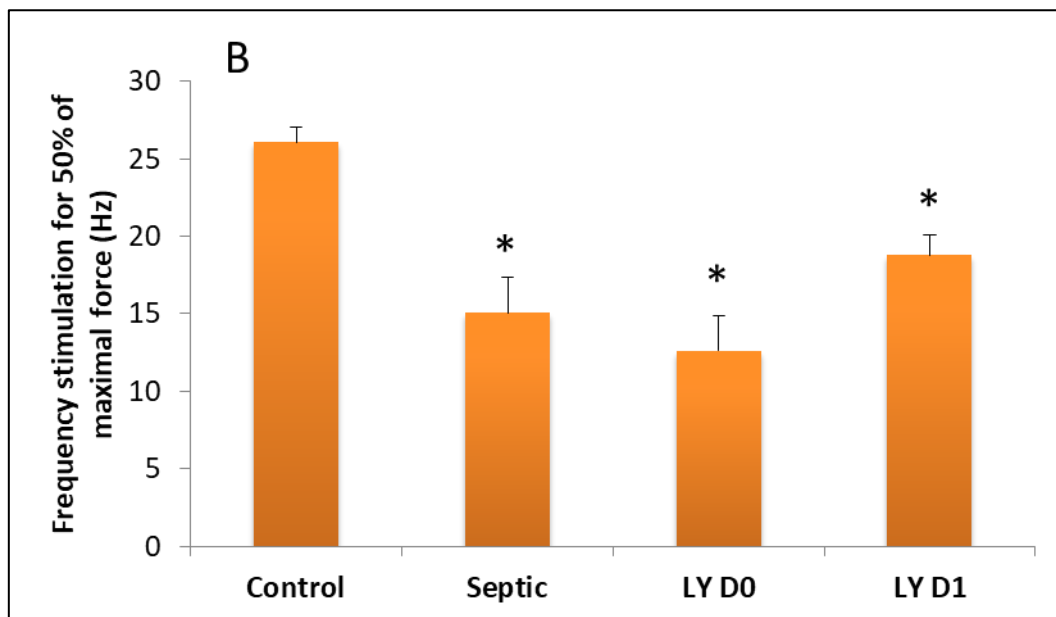
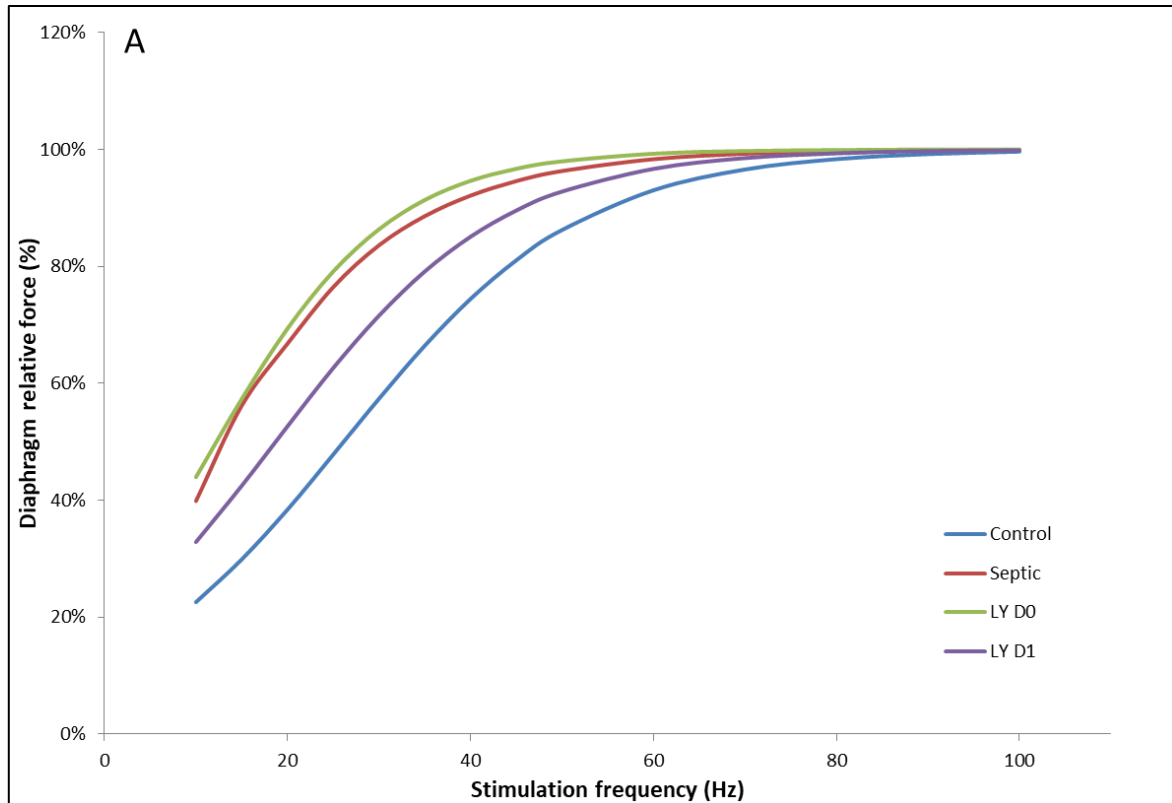


Figure 7: Effects of sepsis and treatment on diaphragm relative force contraction. A, relative force expressed as percentage of the maximal force. B, frequency stimulation for 50% of the maximal force contraction.  $n=5$  for LY D0 group,  $n=6$  for Control group,  $n=7$  for Septic and LY D1 groups. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* significant difference from Control group ( $p < 0.05$ ).

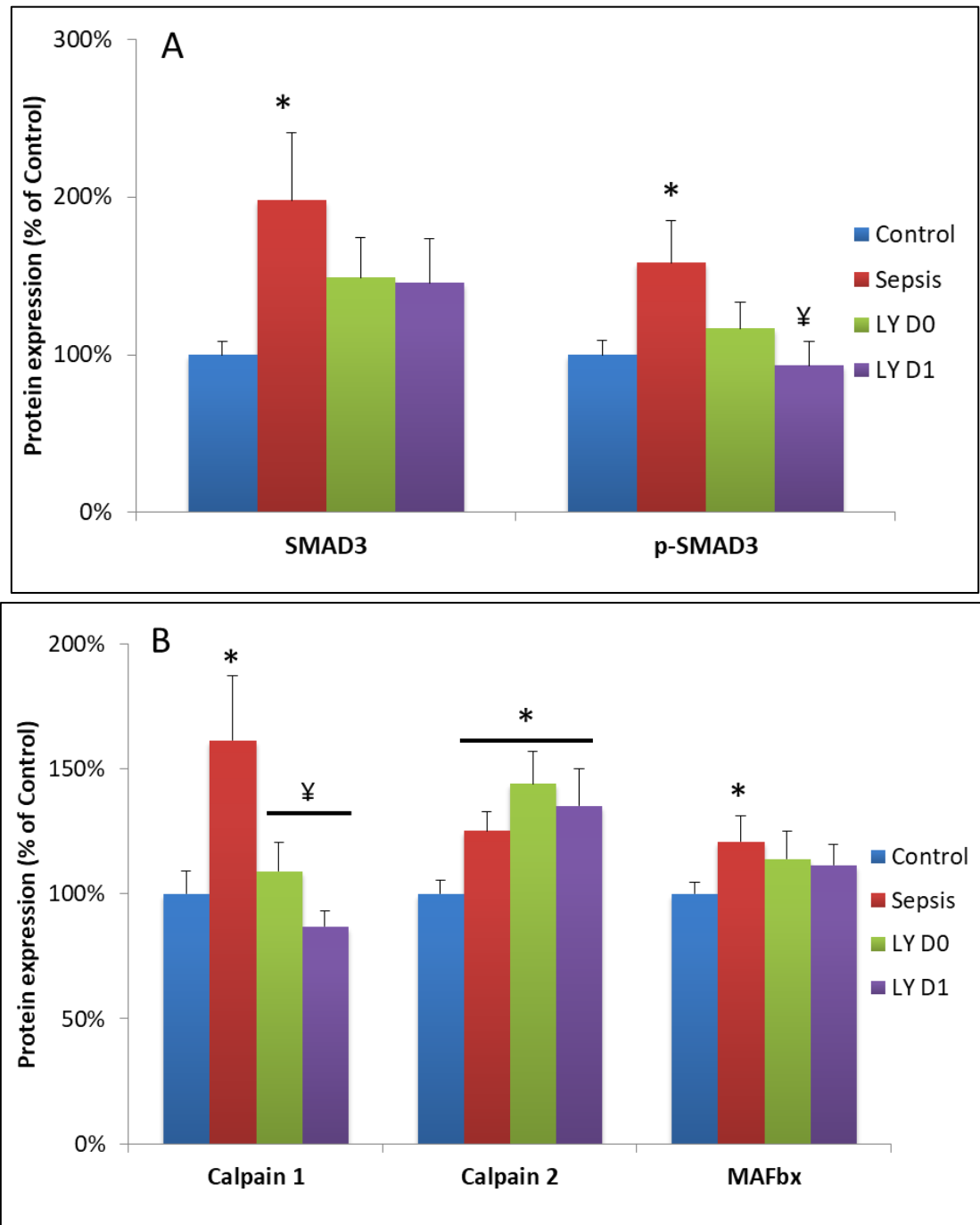


Figure 8: Involvement of sepsis and TGF- $\beta$  on protein expression in the diaphragm. A, regulation of the SMAD3 expression and phosphorylation. B, expression of calpain 1 and 2 and the E3 ligase MAFbx. Densitometric of protein expression level is expressed as percentage of Control group values. n=7 for Control, Septic and LY D1 groups, n=8 for LY DO group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* significant difference from Control group ( $p < 0.05$ ), ¥ significant difference from Septic group ( $p < 0.05$ ).

## Discussion des résultats

Les résultats de cette étude indiquent que le sepsis induit par CLP induit une perte de poids de 10% à 7 jours, alors que pour le groupe LY D1 elle n'est que de 5%. Néanmoins on peut se poser la question de l'intérêt de ce paramètre lors du sepsis chronique car, les animaux présentent une dysfonction digestive en relation avec l'occlusion partielle, en plus du sepsis proprement dit. Cela est confirmé par la prise alimentaire : durant les 7 jours, les animaux avec sepsis ont une réduction d'environ 80% de la prise alimentaire, ce qui témoigne là aussi de l'occlusion intestinale. Dans une autre étude utilisant du zymosan® comme modèle de sepsis, ou plus exactement de syndrome inflammatoire, les auteurs montrent une diminution transitoire de la prise alimentaire, et l'importance de cette dernière dans la diminution du poids total [74]. Pour ce qui est de la masse musculaire, le sepsis induit une diminution de poids de l'ordre de 20 à 30% et cela pour l'ensemble des muscles prélevés. La tendance est analogue avec l'inhibiteur, sauf pour le diaphragme dans le groupe LY D1. En effet, lorsqu'il est administré à partir du jour 1, l'inhibiteur permet de restaurer totalement la masse du diaphragme. Enfin, pour le tissu adipeux viscéral, le sepsis induit une lipolyse importante, et celle-ci semble plus importante encore dans les 2 groupes avec l'inhibiteur. Il a été montré que l'inhibition de la voie de la myostatine avait un effet bénéfique en augmentant la masse musculaire, mais néanmoins un effet opposé sur le tissu adipeux, ce qui semble en accord avec nos résultats ici [220]. Néanmoins il faudrait tester l'effet de l'inhibiteur sur un groupe non septique pour confirmer cette hypothèse. De plus, lors du prélèvement, le système mésentérique est prélevé en même temps que le tissu adipeux. Dans les groupes LY D0 et D1 nous avons observé vraiment très peu de tissu adipeux et par conséquent nous n'avons pu rien prélever sur certains animaux, ce qui explique en partie les résultats obtenus.

Pour le cœur, nous observons une diminution de la fréquence cardiaque dans le groupe septique, et une tendance à l'augmentation de la force de contraction, ainsi que des vitesses de contraction et relaxation pour les groupes LY D0 et D1. Le fait que peu d'effets soient observés après le sepsis chronique vient du fait qu'il y a une récupération cardiaque au-delà de 5-7 jours [94,95]. Concernant l'inhibiteur nous n'observons pas ici d'effet délétère sur la fonction cardiaque. Néanmoins, il est intéressant de noter que le fait qu'il n'y a pas d'effet à 7J ne veut pas dire pour autant que durant le sepsis il n'y ait pas d'atteinte cardiaque. En effet, durant la phase aiguë, la fonction cardiaque peut être atteinte, et entraîner des défaillances d'organes ce qui participe à l'aggravation du stade du sepsis (cas du choc septique). Il

pourrait être intéressant d'évaluer les effets de cet inhibiteur lors d'un sepsis aigu sur la fonction cardiaque par exemple. De plus, comme nous l'avons montré pour la publication avec l'IL-13, même s'il n'y a pas de modification de la force de contraction, la réponse à certains stimuli tels que les catécholamines est altérée [210]. Ici, nous ne savons pas si la voie  $\beta 1$  adrénergique - PKA par exemple, est modifiée avec l'inhibiteur ou non. Pour le péronier, le sepsis induit une petite diminution de la force de contraction tétanique maximale qui n'est plus présente si l'on considère la force relative. Cela met en avant le fait que la masse du muscle est fortement corrélée à la force générée par le muscle. L'inhibiteur a des effets bénéfiques en augmentant la force tétanique spécifique, ce qui indique qu'en dépit du fait que l'atrophie soit similaire au groupe septique, la force générée par le muscle est malgré tout supérieure. Néanmoins, dans les 3 groupes septiques on peut observer une diminution de l'index de fatigue, traduisant une augmentation de la fatigabilité. Il y a également un décalage vers la gauche des courbes force-fréquence, ce qui indique un phénotype de contraction plus lent du muscle. Cela correspondrait donc à une atteinte prépondérante des fibres rapides.

Enfin, pour le diaphragme, on observe une diminution de la force de contraction pour les groupes Septique et LY D0, alors que pour le groupe LY D1 le profil est similaire au contrôle. Ces résultats sont cohérents avec la masse du diaphragme mesurée dans les différentes conditions. De plus, on obtient également un changement vers un phénotype de contraction plus lent, qui est moindre pour le groupe LY D1. Pour expliquer l'effet observé sur le diaphragme, nous avons étudié les voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'atrophie. Lors du sepsis, la voie SMAD3 est activée et l'inhibiteur permet de réverser cette activation, comme nous en avons fait l'hypothèse initialement. De plus, le sepsis augmente l'expression des calpaïnes 1 et 2 et de MAFbx, alors que pour les groupes avec l'inhibiteur, les taux de calpaïne 1 et MAFbx sont diminués. Nous pouvons corrélérer la diminution de la voie SMAD3, de la calpaïne1 et de MAFbx avec l'effet bénéfique sur la masse et la contraction du diaphragme observé dans le groupe LY D1. Néanmoins, concernant le groupe LY D0, l'expression de ces protéines est similaire à celle du groupe LY D1, alors que la masse et la force de contraction sont semblables à celles du groupe Septique. Nous n'avons pas d'explication permettant d'élucider cette différence. Dans une étude de Jones *et al.*, les auteurs montrent que l'administration de follistatine, un inhibiteur endogène de la myostatine et de l'activine A, est capable de diminuer la sécrétion de TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  [221]. Or dans notre étude, le groupe recevant l'inhibiteur avant la production de cytokine ne montre aucun effet bénéfique, alors que si l'inhibiteur est injecté 24h après le déclenchement du

sepsis il y a un effet bénéfique sur le diaphragme. Il serait intéressant là aussi d'étudier ces mêmes groupes dans le cas d'un sepsis plus aigu. Comme expliqué au début, un des problèmes de ce modèle de sepsis chronique est que sur 7 jours il y a une réponse inflammatoire qui va en diminuant, et l'animal présente une occlusion intestinale plus ou moins sévère. Il serait donc intéressant de voir sur 3 à 4 jours, les effets observés sur la masse et la force musculaires. Dans ce cas ces effets seraient plus dépendants de la réaction inflammatoire que de la diminution drastique de l'apport alimentaire sur 7 jours.

Le résultat de cette étude est cependant positif car cela indique que l'inhibition de la voie des TGF- $\beta$  peut être un bon candidat dans la prise en charge de la dysfonction diaphragmatique lors du sepsis, et cela avec une intervention pharmacologique curative. Or, c'est bien l'altération de la fonction diaphragmatique qui est le problème crucial parmi les effets court terme du sepsis [222].

## Conclusion générale et perspectives

A travers ces différentes études, nous nous sommes intéressés aux rôles de médiateurs, qu'ils soient endogènes, comme les cytokines, ou exogènes comme, le docétaxel ou les inhibiteurs comme le dantrolène ou le LY, et à leurs effets sur la cachexie. L'ensemble de ces travaux montre les effets de ces médiateurs sur le muscle strié cardiaque et squelettique, avec la volonté de faire le lien entre les analyses fonctionnelles et mécanistiques, qui sont la base même de la physiologie. Comme expliqué précédemment, la cachexie est un facteur aggravant du pronostic vital des patients et sa prise en charge est difficile du fait de la compréhension des mécanismes mis en jeu qui pas encore élucidé, et également du manque de traitements disponibles. Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à la cachexie présente lors du sepsis, et à la cachexie cancéreuse. Nous avons focalisé nos recherches sur les effets de deux cytokines : le TNF- $\alpha$  et l'IL-13 sur la fonction cardiaque, sur le potentiel effet protecteur du dantrolène vis à vis de l'atrophie musculaire induite par le docétaxel, et enfin sur le potentiel rôle bénéfique de l'inhibition de la voie des TGF- $\beta$  sur la fonction musculaire, lors d'un sepsis chronique.

Pour la première étude sur le TNF- $\alpha$ , nous avons montré que cette cytokine induisait une diminution de la force de contraction du cœur sans altérer l'excitabilité membranaire. De plus nous montrons que le mécanisme est PKC dépendant. Comme relaté précédemment, nous ne savons pas exactement quel est le lien de cause à effet entre le TNF- $\alpha$ , les PKC et les NADPH oxydases, ce qui pourrait être intéressant à déterminer. L'utilisation d'un inhibiteur de NADPH oxydase, tel que l'apocynine, pourrait être utilisé sur des cœurs perfusés, de la même manière que la chelerythrine pour l'inhibition des PKC, afin d'observer les effets sur la fonction cardiaque. Néanmoins, nous avons testé l'apocynine sur quelques cœurs et ce composé semble mal toléré et présenter une certaine toxicité. D'autres travaux ont déjà été réalisés avec cet inhibiteur sur des lignées cellulaires de cœur de rat. Contrairement à ce qui avait été observé sur le muscle squelettique, le TNF- $\alpha$  n'altère pas l'excitabilité membranaire des cardiomyocytes. Il ne serait donc pas directement responsable d'une diminution de l'excitabilité cardiaque lors de sepsis aigu. Il est possible d'envisager une synergie entre différents médiateurs, comme les interleukines. Par ailleurs, *in vivo*, la vasoplégie et l'hypotension consécutive sont certainement des facteurs importants de la défaillance cardiaque. L'excitabilité membranaire évaluée par la mesure du courant de sodium est la

même après 30 minutes de perfusion de TNF- $\alpha$ . L'effet inotrope négatif observé sur le cœur ne dépendrait donc pas d'une altération du courant sodique, contrairement à ce qui a été observé sur le péronier. Il semble donc que cet effet soit donc plutôt lié à une action du TNF- $\alpha$  sur les autres acteurs impliqués dans le couplage excitation/contraction (courants calciques, pompes à calcium). Peut-être que d'autres médiateurs présents lors du sepsis aigu peuvent aussi avoir un effet sur l'excitabilité des cardiomyocytes. Par ailleurs, la concentration de 20ng/ml de TNF- $\alpha$  a été choisie en accord avec les données biologiques et la littérature, mais il aurait sans doute été souhaitable d'étudier les effets de cette cytokine à différentes doses. En effet, cette cytokine est libérée dans la circulation de manière massive et dans un intervalle de temps très court (quelques heures) et sa concentration au niveau de zones particulières pourrait être sensiblement plus importante. Par la même occasion, nous avons montré que le sepsis chronique induit par CLP n'a pas d'effet sur la fonction cardiaque, ni sur l'excitabilité membranaire cardiaque (cf. étude IL-13), en revanche, il pourrait être intéressant d'étudier ces paramètres lors d'un sepsis aigu. Contrairement à une majorité d'études concernant l'effet de médiateurs comme les cytokines, sur l'excitabilité cardiaque et qui utilisent des lignées cellulaires, voire des cellules transfectées, nous avons voulu utiliser le cœur isolé entier, et les cardiomyocytes isolés de cœur de rats adultes, ce type de modèles nous ayant semblé le plus pertinent physiologiquement.

Concernant l'étude de l'IL-13 sur le cœur, la mécanistique d'action de cette cytokine sur le cœur a été en partie mise en lumière, et les raisons pour lesquelles il y a une absence d'effets sur le cœur septique sont cohérentes avec la diminution de l'efficacité de la voie  $\beta$ 1-adrénergique - adénylate cyclase - PKA observée lors du sepsis. Le lien entre l'IL-13 et l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques n'est cependant pas élucidé, et la spécificité ou la non spécificité du récepteur non plus. Notre hypothèse est que, durant le sepsis, il y ait une dysfonction sur la voie de signalisation  $\beta$ -adrénergique-Adénylate cyclase-PKA, ce qui est en accord avec la littérature. Néanmoins, il n'y a aucune étude à ce jour, sur la régulation des récepteurs à l'IL-13 ou sur les modes d'actions qu'elle utilise pour activer la voie  $\beta$ -adrénergique. Une des critiques de cette étude peut être le choix d'une dose unique d'IL-13 de 10ng/ml. Ce travail pourrait être renforcé par le tracé de la courbe dose-réponse de la cytokine sur le cœur, et également de l'étude de la cinétique sur un temps plus important. Dans nos conditions expérimentales nous avons étudié l'IL-13 sur la fonction cardiaque pendant 15 minutes, mais à cette durée de perfusion nous n'observons pas encore atteint le plateau des effets observés. En revanche une durée trop longue d'observation peut amener une

détérioration spontanée des performances cardiaques. Un compromis serait à trouver. Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'étudier les effets de cette cytokine également sur le muscle strié squelettique, tel que le diaphragme, ou le péronier, par exemple. En effet, une seule étude sur le diaphragme s'est intéressée à l'utilisation en préventif de l'IL-13 dans un modèle de sepsis réalisé par une injection de LPS, avec une préservation de la force de contraction du diaphragme sur 2h. Néanmoins, il est important de noter que l'injection de l'IL-13 était réalisée en préventif en ce cas, ce qui n'est pas possible en clinique. Il pourrait être intéressant d'étudier également les effets de l'IL-4, étant donné que l'un des récepteurs à l'IL-13 est couplé à celui de l'IL-4. Enfin, l'IL-13 a également montré des effets anti-inflammatoires, et par conséquent étudier le profil de libération des cytokines lors du sepsis sur l'animal, avec ou sans IL-13 via l'injection d'un anticorps anti IL-13 par exemple, pourrait être intéressant.

Concernant l'étude docétaxel (Taxotère®) et dantrolène, l'utilisation d'une chimiothérapie pour l'étude de la cachexie cancéreuse ouvre de vastes possibilités, du fait du grand nombre de traitements anti-cancéreux actuellement disponibles ou en développement. Concernant notre étude, il serait intéressant de tester les mêmes traitements, mais sur animal après inoculation de cellules cancéreuses. De plus, il pourrait être intéressant de tester d'autres molécules à la place du dantrolène, tel que le formoterol ou des inhibiteurs de la voie des TGF- $\beta$ . Ce travail a permis de nouer une collaboration avec le Cancéropôle Grand-ouest qui a fourni la chimiothérapie, et financé une partie de ce projet. De plus, cela a permis de nous mettre en contact avec des industriels et des cancérologues qui sont au cœur du choix des traitements. En effet, il serait intéressant et prometteur d'utiliser dans ce type d'études d'autres thérapies, telles que des immunothérapies ou des thérapies ciblées. Ces thérapies ont pour but d'inhiber le métabolisme des cellules cancéreuses, mais peuvent également avoir des effets secondaires sur des tissus sains, dont le muscle. Cette idée est l'origine d'un projet avec un partenaire industriel, Astrazeneca, concernant l'étude de la combinaison de l'AZD2014 (un inhibiteur de mTORC1/2) et du Fulvestrant (inhibiteur du récepteur aux œstrogènes) sur la masse musculaire du rat après inoculation de cellules cancéreuses ovariennes (Walker 236), et ajout une molécule pouvant inhiber la protéolyse musculaire, comme le LY364947 (inhibiteur du récepteur de la voie des TGF- $\beta$ R1).

La dernière étude concernant l'inhibiteur de TGF- $\beta$  a montré des résultats concluants concernant le diaphragme. Néanmoins, dans cette étude un certain nombre de résultats sont non significatifs, mais montrent de fortes tendances, ce qui laisse supposer que la poursuite de

ces travaux, en augmentant les effectifs des groupes pourrait permettre d'obtenir une meilleure significativité et ainsi d'affiner les conclusions. Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'utiliser un autre modèle de sepsis, comme l'injection de LPS, afin de préciser si l'absence de réponse observée sur les autres muscles vient de la diminution drastique de la prise alimentaire, ou est liée à la voie de signalisation des TGF- $\beta$ . Dans cette optique, il serait également important d'utiliser des groupes avec un apport équivalent de nourriture (*pair-fed*) afin de préciser l'effet de la diminution de la prise alimentaire. De plus, l'inhibiteur n'a pas été testé sur des animaux sains dans notre étude or, cela pourrait confirmer certaines hypothèses, comme l'augmentation de la masse et de la force de contraction musculaire. Enfin, il pourrait être intéressant également de voir quel est l'effet de cet inhibiteur sur un sepsis aigu de quelques jours. En effet, l'inhibition de la voie des TGF- $\beta$  avec des cibles telle que la myostatine est surtout étudiée dans des études chroniques et sur la masse musculaire. Néanmoins, il y a, à ce jour, très peu de données concernant l'action de cette voie de signalisation sur la réponse inflammatoire. L'activine A, par exemple, serait capable de diminuer la production d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$ , mais augmenterait celle de l'IL-6.

L'ensemble des travaux réalisés lors de cette thèse m'a permis de m'intégrer dans un nouveau laboratoire, d'acquérir une expérience supplémentaire et des techniques nouvelles. Durant ces trois ans j'ai eu la chance de découvrir une thématique de recherche nouvelle pour moi, par rapport à mon Master en Nutrition Humaine, faisant le lien entre l'inflammation et le muscle strié. J'ai eu la chance d'accroître mes connaissances en physiologie et électrophysiologie, d'être initié à la technique du patch clamp, d'avoir enregistré des contractions de muscles *in vivo* et *ex vivo*, dissocié des fibres musculaires... J'ai également perfectionné mon utilisation du western blot qui, même si c'est une technique ancienne et perfectible, est selon moi un outil très pratique pour étudier les protéines et les voies de signalisation, ce qui est l'un de mes grands intérêts dans le domaine. De plus j'ai eu l'opportunité de rédiger entièrement deux projets, de leur conception à leur publication. J'ai eu la chance de faire cela grâce à l'encadrement que j'ai reçu durant ces trois ans, et à la liberté qu'ils m'ont accordée. A cela vient s'ajouter le développement de mon autonomie concernant l'ensemble des achats et relations avec les industriels. J'ai également eu la chance d'être épaulé dans le développement de la partie cachexie induite par le docétaxel, d'être présenté à des partenaires industriels (Astrazeneca, Lilly, Roche, Novartis, Bayer...) et d'avoir tenté d'obtenir des financements. J'ai également eu l'opportunité de défendre mes

différents travaux à trois congrès (FEPS en 2016, MUSCLE en 2016, SCWD en 2017), de gagner le 1<sup>er</sup> prix pour la communication orale en 2017 à l'occasion de la journée de l'Institut Bretois Santé Agro-Matière, et de découvrir le laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire de Josep Argiles, sous la bienveillance de Silvia Busquets. Il me reste maintenant à valoriser tous ces acquis.



## Références

- [1] E.R. Chin, The role of calcium and calcium/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity and mitochondrial biogenesis, *Proc. Nutr. Soc.* 63 (2004) 279–286. doi:10.1079/PNS2004335.
- [2] T. Chaillou, A. McPeck, J.T. Lanner, Docetaxel does not impair skeletal muscle force production in a murine model of cancer chemotherapy, *Physiol. Rep.* 5 (2017). doi:10.14814/phy2.13261.
- [3] M. McKinley, V.D. O’Loughlin, T.S. Bidle, *Anatomie et physiologie : Une approche intégrée*, Maloine, Paris, 2014.
- [4] J.-Y. Le Heuzey, Nœud sinusal et canaux ioniques : physiologie et régulation, *Thérapie.* 59 (2004) 491–494. doi:10.2515/therapie:2004085.
- [5] B. Hille, The receptor for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis, *Biophys. J.* 15 (1975) 615–619. doi:10.1016/S0006-3495(75)85842-5.
- [6] W.A. Catterall, Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology, *J. Physiol.* 590 (2012) 2577–2589. doi:10.1113/jphysiol.2011.224204.
- [7] C. Chen, R.E. Westenbroek, X. Xu, C.A. Edwards, D.R. Sorenson, Y. Chen, D.P. McEwen, H.A. O’Malley, V. Bharucha, L.S. Meadows, G.A. Knudsen, A. Vilaythong, J.L. Noebels, T.L. Saunders, T. Scheuer, P. Shrager, W.A. Catterall, L.L. Isom, Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24 (2004) 4030–4042. doi:10.1523/JNEUROSCI.4139-03.2004.
- [8] L. Candenas, M. Seda, P. Noheda, H. Buschmann, C.G. Cintado, J.D. Martin, F.M. Pinto, Molecular diversity of voltage-gated sodium channel alpha and beta subunit mRNAs in human tissues, *Eur. J. Pharmacol.* 541 (2006) 9–16. doi:10.1016/j.ejphar.2006.04.025.
- [9] R.H. Adrian, M.W. Marshall, Action potentials reconstructed in normal and myotonic muscle fibres., *J. Physiol.* 258 (1976) 125–143.
- [10] T. Scheuer, Regulation of sodium channel activity by phosphorylation, *Semin. Cell Dev. Biol.* 22 (2011) 160–165. doi:10.1016/j.semcdb.2010.10.002.
- [11] C. Bourdin, *Etude des sous-unités auxiliaires du canal sodium dépendant du potentiel d’insecte : Approches moléculaires, électrophysiologiques et pharmacologiques*, phdthesis, Université d’Angers, 2013. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00950043/document> (accessed August 4, 2017).
- [12] S.C. Bodine, T.N. Stitt, M. Gonzalez, W.O. Kline, G.L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J.C. Lawrence, D.J. Glass, G.D. Yancopoulos, Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo, *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 1014–1019. doi:10.1038/ncb1101-1014.
- [13] S.R. von Manteuffel, A.C. Gingras, X.F. Ming, N. Sonenberg, G. Thomas, 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 4076–4080.
- [14] K. Hara, K. Yonezawa, M.T. Kozlowski, T. Sugimoto, K. Andrabi, Q.P. Weng, M. Kasuga, I. Nishimoto, J. Avruch, Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 26457–26463.
- [15] B. Magnuson, B. Ekim, D.C. Fingar, Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks, *Biochem. J.* 441 (2012) 1–21. doi:10.1042/BJ20110892.

- [16] M. Marabita, M. Baraldo, F. Solagna, J.J.M. Ceelen, R. Sartori, H. Nolte, I. Nemazanyy, S. Pyronnet, M. Kruger, M. Pende, B. Blaauw, S6K1 Is Required for Increasing Skeletal Muscle Force during Hypertrophy, *Cell Rep.* 17 (2016) 501–513. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.020.
- [17] B.T. Navé, M. Ouwers, D.J. Withers, D.R. Alessi, P.R. Shepherd, Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation, *Biochem. J.* 344 Pt 2 (1999) 427–431.
- [18] F. Tremblay, A. Gagnon, A. Veilleux, A. Sorisky, A. Marette, Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes, *Endocrinology.* 146 (2005) 1328–1337. doi:10.1210/en.2004-0777.
- [19] K. Inoki, Y. Li, T. Xu, K.-L. Guan, Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling, *Genes Dev.* 17 (2003) 1829–1834. doi:10.1101/gad.1110003.
- [20] G.I. Welsh, C.M. Miller, A.J. Loughlin, N.T. Price, C.G. Proud, Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin, *FEBS Lett.* 421 (1998) 125–130.
- [21] T.N. Stitt, D. Drujan, B.A. Clarke, F. Panaro, Y. Timofeyeva, W.O. Kline, M. Gonzalez, G.D. Yancopoulos, D.J. Glass, The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors, *Mol. Cell.* 14 (2004) 395–403.
- [22] J. Zhao, J.J. Brault, A. Schild, P. Cao, M. Sandri, S. Schiaffino, S.H. Lecker, A.L. Goldberg, FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells, *Cell Metab.* 6 (2007) 472–483. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.004.
- [23] B. Zheng, S. Ohkawa, H. Li, T.K. Roberts-Wilson, S.R. Price, FOXO3a mediates signaling crosstalk that coordinates ubiquitin and atrogin-1/MAFbx expression during glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24 (2010) 2660–2669. doi:10.1096/fj.09-151480.
- [24] S. Schiaffino, C. Mammucari, Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models, *Skelet. Muscle.* 1 (2011) 4. doi:10.1186/2044-5040-1-4.
- [25] D. Bechet, A. Tassa, D. Taillandier, L. Combaret, D. Attaix, Lysosomal proteolysis in skeletal muscle, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 2098–2114. doi:10.1016/j.biocel.2005.02.029.
- [26] P.O. Hasselgren, J.E. Fischer, Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation, *Ann. Surg.* 233 (2001) 9–17.
- [27] D. Attaix, S. Ventadour, A. Codran, D. Béchet, D. Taillandier, L. Combaret, The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting, *Essays Biochem.* 41 (2005) 173–186. doi:10.1042/EB0410173.
- [28] S.K. Powers, A.N. Kavazis, K.C. DeRuisseau, Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288 (2005) R337–344. doi:10.1152/ajpregu.00469.2004.
- [29] J. Khal, A.V. Hine, K.C.H. Fearon, C.H.C. Dejong, M.J. Tisdale, Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 2196–2206. doi:10.1016/j.biocel.2004.10.017.

- [30] D. Attaix, E. Aurousseau, L. Combaret, A. Kee, D. Larbaud, C. Ralli re, B. Souweine, D. Taillandier, T. Tilignac, Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle, *Reprod. Nutr. Dev.* 38 (1998) 153–165.
- [31] E. Latres, A.R. Amini, A.A. Amini, J. Griffiths, F.J. Martin, Y. Wei, H.C. Lin, G.D. Yancopoulos, D.J. Glass, Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2737–2744. doi:10.1074/jbc.M407517200.
- [32] B.A. Clarke, D. Drujan, M.S. Willis, L.O. Murphy, R.A. Corpina, E. Burova, S.V. Rakhilin, T.N. Stitt, C. Patterson, E. Latres, D.J. Glass, The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle, *Cell Metab.* 6 (2007) 376–385. doi:10.1016/j.cmet.2007.09.009.
- [33] D. Attaix, V.E. Baracos, MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of muscle proteolysis, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 13 (2010) 223–224. doi:10.1097/MCO.0b013e328338b9a6.
- [34] K. Fearon, J. Arends, V. Baracos, Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10 (2013) 90–99. doi:10.1038/nrclinonc.2012.209.
- [35] M.J. Tisdale, Mechanisms of cancer cachexia, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 381–410. doi:10.1152/physrev.00016.2008.
- [36] B. Beutler, J. Mahoney, N. Le Trang, P. Pekala, A. Cerami, Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells, *J. Exp. Med.* 161 (1985) 984–995.
- [37] G. Schlag, H. Redl, S. Hallstr m, The cell in shock: the origin of multiple organ failure, *Resuscitation.* 21 (1991) 137–180.
- [38] T. Peng, X. Lu, M. Lei, G.W. Moe, Q. Feng, Inhibition of p38 MAPK decreases myocardial TNF-  expression and improves myocardial function and survival in endotoxemia, *Cardiovasc. Res.* 59 (2003) 893–900.
- [39] M.S. Hayden, S. Ghosh, NF- B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions, *Genes Dev.* 26 (2012) 203–234. doi:10.1101/gad.183434.111.
- [40] J. Zhou, B. Liu, C. Liang, Y. Li, Y.-H. Song, Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting, *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 27 (2016) 335–347. doi:10.1016/j.tem.2016.03.002.
- [41] P.K. Paul, A. Kumar, TRAF6 coordinates the activation of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in atrophying skeletal muscle, *Autophagy.* 7 (2011) 555–556.
- [42] P.K. Paul, S.K. Gupta, S. Bhatnagar, S.K. Panguluri, B.G. Darnay, Y. Choi, A. Kumar, Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice, *J. Cell Biol.* 191 (2010) 1395–1411. doi:10.1083/jcb.201006098.
- [43] Q. Zhao, S.T. Yang, J.J. Wang, J. Zhou, S.S. Xing, C.C. Shen, X.X. Wang, Y.X. Yue, J. Song, M. Chen, Y.Y. Wei, Q.P. Zhou, T. Dai, Y.H. Song, TNF   inhibits myogenic differentiation of C2C12 cells through NF- B activation and impairment of IGF-1 signaling pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 458 (2015) 790–795. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.026.
- [44] K. Pradeau, S. Collot-Teixeira, F. Denis, S. Alain, S. Ranger-Rogez, Inter-relations entre virus herp s humains et *tumor necrosis factor  *, *Virologie.* 8 (2004) 39–51.
- [45] E. Jones, I.M. Adcock, B.Y. Ahmed, N.A. Punchard, Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKCepsilon and JAK2 in RAW macrophages, *J. Inflamm. Lond. Engl.* 4 (2007) 23. doi:10.1186/1476-9255-4-23.
- [46] C. Garlanda, C.A. Dinarello, A. Mantovani, The Interleukin-1 Family: Back to the Future, *Immunity.* 39 (2013) 1003–1018. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.010.

- [47] C.A. Dinarello, Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases, *Blood*. 117 (2011) 3720–3732. doi:10.1182/blood-2010-07-273417.
- [48] J.M. Peake, P. Della Gatta, K. Suzuki, D.C. Nieman, Cytokine expression and secretion by skeletal muscle cells: regulatory mechanisms and exercise effects, *Exerc. Immunol. Rev.* 21 (2015) 8–25.
- [49] R.N. Cooney, G.O. Maish, T. Gilpin, M.L. Shumate, C.H. Lang, T.C. Vary, Mechanism of IL-1 induced inhibition of protein synthesis in skeletal muscle, *Shock Augusta Ga.* 11 (1999) 235–241.
- [50] O. Friedrich, M.B. Reid, G. Van den Berghe, I. Vanhorebeek, G. Hermans, M.M. Rich, L. Larsson, The Sick and the Weak: Neuropathies/Myopathies in the Critically Ill, *Physiol. Rev.* 95 (2015) 1025–1109. doi:10.1152/physrev.00028.2014.
- [51] J.E. Belizário, C.C. Fontes-Oliveira, J.P. Borges, J.A. Kashiabara, E. Vannier, Skeletal muscle wasting and renewal: a pivotal role of myokine IL-6, *SpringerPlus*. 5 (2016) 619. doi:10.1186/s40064-016-2197-2.
- [52] C. García-Martínez, F.J. López-Soriano, J.M. Argilés, Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle, *Cancer Lett.* 76 (1994) 1–4.
- [53] M.N. Goodman, Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N.* 205 (1994) 182–185.
- [54] T. Tsujinaka, C. Ebisui, J. Fujita, M. Kishibuchi, T. Morimoto, A. Ogawa, A. Katsume, Y. Ohsugi, E. Kominami, M. Monden, Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207 (1995) 168–174. doi:10.1006/bbrc.1995.1168.
- [55] T. Tsujinaka, J. Fujita, C. Ebisui, M. Yano, E. Kominami, K. Suzuki, K. Tanaka, A. Katsume, Y. Ohsugi, H. Shiozaki, M. Monden, Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice, *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 244–249. doi:10.1172/JCI118398.
- [56] K.A. Baltgalvis, F.G. Berger, M.M.O. Pena, J.M. Davis, S.J. Muga, J.A. Carson, Interleukin-6 and cachexia in *ApcMin/+* mice, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294 (2008) R393–401. doi:10.1152/ajpregu.00716.2007.
- [57] P. Muñoz-Cánoves, C. Scheele, B.K. Pedersen, A.L. Serrano, Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?, *FEBS J.* 280 (2013) 4131–4148. doi:10.1111/febs.12338.
- [58] J.P. White, M.J. Pappa, S. Gao, S. Sato, S.L. Welle, J.A. Carson, Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: a role for AMPK, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304 (2013) E1042–1052. doi:10.1152/ajpendo.00410.2012.
- [59] A.C. McPherron, A.M. Lawler, S.J. Lee, Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member, *Nature*. 387 (1997) 83–90. doi:10.1038/387083a0.
- [60] A. Rebbapragada, H. Benchabane, J.L. Wrana, A.J. Celeste, L. Attisano, Myostatin Signals through a Transforming Growth Factor  $\beta$ -Like Signaling Pathway To Block Adipogenesis, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 7230–7242. doi:10.1128/MCB.23.20.7230-7242.2003.
- [61] A. Nakao, T. Imamura, S. Souchelnyskyi, M. Kawabata, A. Ishisaki, E. Oeda, K. Tamaki, J. Hanai, C.H. Heldin, K. Miyazono, P. ten Dijke, TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4, *EMBO J.* 16 (1997) 5353–5362. doi:10.1093/emboj/16.17.5353.
- [62] X. Zhu, S. Topouzis, L.-F. Liang, R.L. Stotish, Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism, *Cytokine*. 26 (2004) 262–272. doi:10.1016/j.cyto.2004.03.007.

- [63] C.E. Winbanks, K.T. Murphy, B.C. Bernardo, H. Qian, Y. Liu, P.V. Sepulveda, C. Beyer, A. Hagg, R.E. Thomson, J.L. Chen, K.L. Walton, K.L. Loveland, J.R. McMullen, B.D. Rodgers, C.A. Harrison, G.S. Lynch, P. Gregorevic, Smad7 gene delivery prevents muscle wasting associated with cancer cachexia in mice, *Sci. Transl. Med.* 8 (2016) 348ra98. doi:10.1126/scitranslmed.aac4976.
- [64] B. Langley, M. Thomas, A. Bishop, M. Sharma, S. Gilmour, R. Kambadur, Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 49831–49840. doi:10.1074/jbc.M204291200.
- [65] Y. Elkina, S. von Haehling, S.D. Anker, J. Springer, The role of myostatin in muscle wasting: an overview, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2 (2011) 143–151. doi:10.1007/s13539-011-0035-5.
- [66] W. Osler, *The principles and practice of medicine: designed for the use of practitioners and students of medicine*, New York: D. Appleton and Company, 1892. <http://archive.org/details/principlesandpr00oslegoog> (accessed June 2, 2017).
- [67] C.F. Bolton, J.J. Gilbert, A.F. Hahn, W.J. Sibbald, Polyneuropathy in critically ill patients, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 47 (1984) 1223–1231.
- [68] G. Gueret, M. Guillouet, V. Vermeersch, E. Guillard, H. Talarmin, B.-V. Nguyen, F. Rannou, M.-A. Giroux-Metges, J.-P. Pennec, Y. Ozier, [ICU acquired neuromyopathy], *Ann. Fr. Anesthésie Réanimation.* 32 (2013) 580–591. doi:10.1016/j.annfar.2013.05.011.
- [69] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.-D. Chiche, C.M. Coopersmith, R.S. Hotchkiss, M.M. Levy, J.C. Marshall, G.S. Martin, S.M. Opal, G.D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.-L. Vincent, D.C. Angus, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA.* 315 (2016) 801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287.
- [70] R.C. Bone, R.A. Balk, F.B. Cerra, R.P. Dellinger, A.M. Fein, W.A. Knaus, R.M. Schein, W.J. Sibbald, Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine, *Chest.* 101 (1992) 1644–1655.
- [71] F.J. Romero-Bermejo, M. Ruiz-Bailen, J. Gil-Cebrian, M.J. Huertos-Ranchal, Sepsis-induced Cardiomyopathy, *Curr. Cardiol. Rev.* 7 (2011) 163–183. doi:10.2174/157340311798220494.
- [72] D.G. Remick, D.E. Newcomb, G.L. Bolgos, D.R. Call, Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture, *Shock* Augusta Ga. 13 (2000) 110–116.
- [73] L.A. Callahan, G.S. Supinski, Sepsis-induced myopathy, *Crit. Care Med.* 37 (2009) S354–367. doi:10.1097/CCM.0b013e3181b6e439.
- [74] R. Minnaard, M.R. Drost, A.J.M. Wagenmakers, G.P. van Kranenburg, H. Kuipers, M.K.C. Hesselink, Skeletal Muscle wasting and contractile performance in septic rats, *Muscle Nerve.* 31 (2005) 339–348. doi:10.1002/mus.20268.
- [75] C.H. Lang, R.A. Frost, Glucocorticoids and TNFalpha interact cooperatively to mediate sepsis-induced leucine resistance in skeletal muscle, *Mol. Med. Camb. Mass.* 12 (2006) 291–299. doi:10.2119/2006-00071.Lang.
- [76] D.R. Fischer, X. Sun, A.B. Williams, G. Gang, T.A. Pritts, J.H. James, M. Molloy, J.E. Fischer, R.J. Paul, P.O. Hasselgren, Dantrolene reduces serum TNFalpha and corticosterone levels and muscle calcium, calpain gene expression, and protein breakdown in septic rats, *Shock* Augusta Ga. 15 (2001) 200–207.
- [77] F. Stana, M. Vujovic, D. Mayaki, J.-P. Leduc-Gaudet, P. Leblanc, L. Huck, S.N.A. Hussain, Differential Regulation of the Autophagy and Proteasome Pathways in Skeletal

- Muscles in Sepsis, *Crit. Care Med.* 45 (2017) e971–e979. doi:10.1097/CCM.0000000000002520.
- [78] T.C. Vary, G. Deiter, S.R. Kimball, Phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF2Bepsilon in skeletal muscle during sepsis, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283 (2002) E1032–1039. doi:10.1152/ajpendo.00171.2002.
- [79] M. Klaude, K. Fredriksson, I. Tjäder, F. Hammarqvist, B. Ahlman, O. Rooyackers, J. Wernerman, Proteasome proteolytic activity in skeletal muscle is increased in patients with sepsis, *Clin. Sci. Lond. Engl.* 112 (2007) 499–506. doi:10.1042/CS20060265.
- [80] S.C. Hobler, A. Williams, D. Fischer, J.J. Wang, X. Sun, J.E. Fischer, J.J. Monaco, P.O. Hasselgren, Activity and expression of the 20S proteasome are increased in skeletal muscle during sepsis, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) R434–440.
- [81] C.J. Wray, X. Sun, G.I. Gang, P.-O. Hasselgren, Dantrolene downregulates the gene expression and activity of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in septic skeletal muscle, *J. Surg. Res.* 104 (2002) 82–87. doi:10.1006/jsre.2002.6416.
- [82] Y. Qiu, D. Chen, M. Xu, S. Li, Beneficial effects of dantrolene on sepsis-induced diaphragmatic dysfunction are associated with downregulation of high-mobility group box 1 and calpain-caspase-3 proteolytic pathway, *J. Surg. Res.* 200 (2016) 637–647. doi:10.1016/j.jss.2015.09.026.
- [83] G.S. Supinski, L. Wang, X.-H. Song, J.S. Moylan, L.A. Callahan, Muscle-specific calpastatin overexpression prevents diaphragm weakness in cecal ligation puncture-induced sepsis, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 117 (2014) 921–929. doi:10.1152/japplphysiol.00975.2013.
- [84] M. Mofarrah, I. Sigala, Y. Guo, R. Godin, E.C. Davis, B. Petrof, M. Sandri, Y. Burrelle, S.N.A. Hussain, Autophagy and Skeletal Muscles in Sepsis, *PLoS ONE*. 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0047265.
- [85] N. Alamdari, G. Toraldo, Z. Aversa, I. Smith, E. Castillero, G. Renaud, R. Qaisar, L. Larsson, R. Jasuja, P.-O. Hasselgren, Loss of muscle strength during sepsis is in part regulated by glucocorticoids and is associated with reduced muscle fiber stiffness, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303 (2012) R1090–1099. doi:10.1152/ajpregu.00636.2011.
- [86] S.F. Gilliver, H. Degens, J. Rittweger, A.J. Sargeant, D.A. Jones, Variation in the determinants of power of chemically skinned human muscle fibres, *Exp. Physiol.* 94 (2009) 1070–1078. doi:10.1113/expphysiol.2009.048314.
- [87] N.J. Witt, D.W. Zochodne, C.F. Bolton, F. Grand'Maison, G. Wells, G.B. Young, W.J. Sibbald, Peripheral nerve function in sepsis and multiple organ failure, *Chest*. 99 (1991) 176–184.
- [88] I. Cankayali, Y.H. Dogan, I. Solak, K. Demirag, O. Eris, S. Demirgoren, A.R. Moral, Neuromuscular deterioration in the early stage of sepsis in rats, *Crit. Care Lond. Engl.* 11 (2007) R1. doi:10.1186/cc5139.
- [89] B. Rossignol, G. Gueret, J.-P. Pennec, J. Morel, M.A. Giroux-Metges, H. Talarmin, C.C. Arvieux, Effects of chronic sepsis on the voltage-gated sodium channel in isolated rat muscle fibers, *Crit. Care Med.* 35 (2007) 351–357. doi:10.1097/01.CCM.0000254335.88023.0E.
- [90] E. Guillard, G. Gueret, M. Guillouet, V. Vermeersch, F. Rannou, M.-A. Giroux-Metges, J.-P. Pennec, Alteration of muscle membrane excitability in sepsis: possible involvement of ciliary nervous trophic factor (CNTF), *Cytokine*. 63 (2013) 52–57. doi:10.1016/j.cyto.2013.04.023.
- [91] M. Guillouet, G. Gueret, F. Rannou, M.-A. Giroux-Metges, M. Gioux, C.C. Arvieux, J.-P. Pennec, Tumor necrosis factor- $\alpha$  downregulates sodium current in skeletal muscle by

- protein kinase C activation: involvement in critical illness polyneuromyopathy, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301 (2011) C1057-1063. doi:10.1152/ajpcell.00097.2011.
- [92] R.D. Piper, M. Pitt-Hyde, F. Li, W.J. Sibbald, R.F. Potter, Microcirculatory changes in rat skeletal muscle in sepsis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 (1996) 931–937. doi:10.1164/ajrccm.154.4.8887588.
- [93] M. Sair, P.J. Etherington, C. Peter Winlove, T.W. Evans, Tissue oxygenation and perfusion in patients with systemic sepsis, *Crit. Care Med.* 29 (2001) 1343–1349.
- [94] C. Martin, J.-L. Vincent, *Sepsis grave et choc septique: Deuxième édition*, Springer Science & Business Media, 2013.
- [95] A. Rudiger, M. Singer, Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction, *Crit. Care Med.* 35 (2007) 1599–1608. doi:10.1097/01.CCM.0000266683.64081.02.
- [96] J.D. Hunter, M. Doddi, Sepsis and the heart, *Br. J. Anaesth.* 104 (2010) 3–11. doi:10.1093/bja/aep339.
- [97] R.E. Shepherd, C.H. Lang, K.H. McDonough, Myocardial adrenergic responsiveness after lethal and nonlethal doses of endotoxin, *Am. J. Physiol.* 252 (1987) H410-416.
- [98] M.K. Chung, T.S. Gulick, R.E. Rotondo, G.F. Schreiner, L.G. Lange, Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction, *Circ. Res.* 67 (1990) 753–763.
- [99] S.M. Hollenberg, T.S. Ahrens, D. Annane, M.E. Astiz, D.B. Chalfin, J.F. Dasta, S.O. Heard, C. Martin, L.M. Napolitano, G.M. Susla, R. Totaro, J.-L. Vincent, S. Zanotti-Cavazzoni, Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update, *Crit. Care Med.* 32 (2004) 1928–1948.
- [100] O. Martinet, X. Delabranche, M. Aghajanian, M. Hasselmann, SIRS, Sepsis, CARS, SDRA : comprendre différents aspects de l'inflammation en réanimation, *Nutr. Clin. Métabolisme.* 23 (2009) 185–191. doi:10.1016/j.nupar.2009.10.001.
- [101] R.C. Bone, C.J. Grodzin, R.A. Balk, Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process, *Chest.* 112 (1997) 235–243.
- [102] R.S. Hotchkiss, I.E. Karl, Dantrolene ameliorates the metabolic hallmarks of sepsis in rats and improves survival in a mouse model of endotoxemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 3039–3043.
- [103] H.Q. Han, X. Zhou, W.E. Mitch, A.L. Goldberg, Myostatin/activin pathway antagonism: molecular basis and therapeutic potential, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 2333–2347. doi:10.1016/j.biocel.2013.05.019.
- [104] C. Marie, J.M. Cavaillon, M.R. Losser, Elevated levels of circulating transforming growth factor-beta 1 in patients with the sepsis syndrome, *Ann. Intern. Med.* 125 (1996) 520–521.
- [105] J.-K. Lee, S.M. Choi, J. Lee, Y.S. Park, C.H. Lee, J.-J. Yim, C.-G. Yoo, Y.W. Kim, S.K. Han, S.-M. Lee, Serum activin-A as a predictive and prognostic marker in critically ill patients with sepsis, *Respirol. Carlton Vic.* 21 (2016) 891–897. doi:10.1111/resp.12751.
- [106] E. Lach-Trifilieff, G.C. Minetti, K. Sheppard, C. Ibebunjo, J.N. Feige, S. Hartmann, S. Brachat, H. Rivet, C. Koelbing, F. Morvan, S. Hatakeyama, D.J. Glass, An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy, *Mol. Cell. Biol.* 34 (2014) 606–618. doi:10.1128/MCB.01307-13.
- [107] I.J. Smith, Z. Aversa, N. Alamdari, V. Petkova, P.-O. Hasselgren, Sepsis downregulates myostatin mRNA levels without altering myostatin protein levels in skeletal muscle, *J. Cell. Biochem.* 111 (2010) 1059–1073. doi:10.1002/jcb.22796.
- [108] J. Morel, J.-C. Palao, J. Castells, M. Desgeorges, T. Busso, S. Molliex, V. Jahnke, P. Del Carmine, J. Gondin, D. Arnould, A. Cécile Durieux, D. Freyssenet, Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in locomotor and

- respiratory muscles during experimental sepsis in mice, *Sci. Rep.* 7 (2017) 10866. doi:10.1038/s41598-017-11440-5.
- [109] N.E. Hill, S. Saeed, R. Phadke, M.J. Ellis, D. Chambers, D.R. Wilson, J. Castells, J. Morel, D.G. Freysenhet, S.J. Brett, K.G. Murphy, M. Singer, Detailed characterization of a long-term rodent model of critical illness and recovery, *Crit. Care Med.* 43 (2015) e84-96. doi:10.1097/CCM.0000000000000854.
- [110] A. Rhodes, L.E. Evans, W. Alhazzani, M.M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, A. Kumar, J.E. Sevransky, C.L. Sprung, M.E. Nunnally, B. Rochwerf, G.D. Rubenfeld, D.C. Angus, D. Annane, R.J. Beale, G.J. Bellingham, G.R. Bernard, J.-D. Chiche, C. Coopersmith, D.P. De Backer, C.J. French, S. Fujishima, H. Gerlach, J.L. Hidalgo, S.M. Hollenberg, A.E. Jones, D.R. Karnad, R.M. Kleinpell, Y. Koh, T.C. Lisboa, F.R. Machado, J.J. Marini, J.C. Marshall, J.E. Mazuski, L.A. McIntyre, A.S. McLean, S. Mehta, R.P. Moreno, J. Myburgh, P. Navalesi, O. Nishida, T.M. Osborn, A. Perner, C.M. Plunkett, M. Ranieri, C.A. Schorr, M.A. Seckel, C.W. Seymour, L. Shieh, K.A. Shukri, S.Q. Simpson, M. Singer, B.T. Thompson, S.R. Townsend, T. Van der Poll, J.-L. Vincent, W.J. Wiersinga, J.L. Zimmerman, R.P. Dellinger, Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016, *Intensive Care Med.* 43 (2017) 304–377. doi:10.1007/s00134-017-4683-6.
- [111] J.-L. Vincent, Q. Sun, M.-J. Dubois, Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock, *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 34 (2002) 1084–1093. doi:10.1086/339549.
- [112] E.A. Panacek, J.C. Marshall, T.E. Albertson, D.H. Johnson, S. Johnson, R.D. MacArthur, M. Miller, W.T. Barchuk, S. Fischkoff, M. Kaul, L. Teoh, L. Van Meter, L. Daum, S. Lemeshow, G. Hicklin, C. Doig, Monoclonal Anti-TNF: a Randomized Controlled Sepsis Study Investigators, Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels, *Crit. Care Med.* 32 (2004) 2173–2182.
- [113] A.R. Heller, S. Rössler, R.J. Litz, S.N. Stehr, S.C. Heller, R. Koch, T. Koch, Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome, *Crit. Care Med.* 34 (2006) 972–979. doi:10.1097/01.CCM.0000206309.83570.45.
- [114] A. Fappi, T.S. Godoy, J.R. Maximino, V.R. Rizzato, J. de C. Neves, G. Chadi, E. Zanoteli, The Effects of Omega-3 Fatty Acid Supplementation on Dexamethasone-Induced Muscle Atrophy, *BioMed Res. Int.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/961438.
- [115] O.R. Joassard, A.-C. Durieux, D.G. Freysenhet,  $\beta$ 2-Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 2309–2321. doi:10.1016/j.biocel.2013.06.025.
- [116] E. de Montmollin, J. Aboab, A. Mansart, D. Annane, Bench-to-bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis, *Crit. Care Lond. Engl.* 13 (2009) 230. doi:10.1186/cc8026.
- [117] M. Toledo, S. Busquets, F. Penna, X. Zhou, E. Marmonti, A. Betancourt, D. Massa, F.J. López-Soriano, H.Q. Han, J.M. Argilés, Complete reversal of muscle wasting in experimental cancer cachexia: Additive effects of activin type II receptor inhibition and  $\beta$ -2 agonist, *Int. J. Cancer.* 138 (2016) 2021–2029. doi:10.1002/ijc.29930.
- [118] J.J. Choo, M.A. Horan, R.A. Little, N.J. Rothwell, Muscle wasting associated with endotoxemia in the rat: modification by the beta 2-adrenoceptor agonist clenbuterol, *Biosci. Rep.* 9 (1989) 615–621.
- [119] T. Ito, N. Fujimura, K. Omote, A. Namiki, A selective beta2-adrenergic agonist, terbutaline, improves sepsis-induced diaphragmatic dysfunction in the rat, *Life Sci.* 79 (2006) 905–912. doi:10.1016/j.lfs.2006.03.003.

- [120] G. Hermans, B. De Jonghe, F. Bruyninckx, G. Van den Berghe, Clinical review: Critical illness polyneuropathy and myopathy, *Crit. Care Lond. Engl.* 12 (2008) 238. doi:10.1186/cc7100.
- [121] W.J. Evans, J.E. Morley, J. Argilés, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W.E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F. Rossi Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, S.D. Anker, Cachexia: a new definition, *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 27 (2008) 793–799. doi:10.1016/j.clnu.2008.06.013.
- [122] K. Fearon, F. Strasser, S.D. Anker, I. Bosaeus, E. Bruera, R.L. Fainsinger, A. Jatoi, C. Loprinzi, N. MacDonald, G. Mantovani, M. Davis, M. Muscaritoli, F. Ottery, L. Radbruch, P. Ravasco, D. Walsh, A. Wilcock, S. Kaasa, V.E. Baracos, Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus, *Lancet Oncol.* 12 (2011) 489–495. doi:10.1016/S1470-2045(10)70218-7.
- [123] S. von Haehling, S.D. Anker, Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 1 (2010) 1–5. doi:10.1007/s13539-010-0002-6.
- [124] A. Laviano, M.M. Meguid, A. Inui, M. Muscaritoli, F. Rossi-Fanelli, Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself, *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2 (2005) 158–165. doi:10.1038/ncponc0112.
- [125] W.D. Dewys, C. Begg, P.T. Lavin, P.R. Band, J.M. Bennett, J.R. Bertino, M.H. Cohen, H.O. Douglass, P.F. Engstrom, E.Z. Ezdinli, J. Horton, G.J. Johnson, C.G. Moertel, M.M. Oken, C. Perlia, C. Rosenbaum, M.N. Silverstein, R.T. Skeel, R.W. Sponzo, D.C. Tormey, Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group, *Am. J. Med.* 69 (1980) 491–497.
- [126] H. Suzuki, A. Asakawa, H. Amitani, N. Nakamura, A. Inui, Cancer cachexia--pathophysiology and management, *J. Gastroenterol.* 48 (2013) 574–594. doi:10.1007/s00535-013-0787-0.
- [127] M. Fouladiun, U. Körner, L. Gunnebo, P. Sixt-Ammilon, I. Bosaeus, K. Lundholm, Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13 (2007) 6379–6385. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1147.
- [128] J.M. Argilés, F.J. López-Soriano, M. Toledo, A. Betancourt, R. Serpe, S. Busquets, The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2 (2011) 87–93. doi:10.1007/s13539-011-0027-5.
- [129] J.M. Argilés, A. Betancourt, J. Guàrdia-Olmos, M. Però-Cebollero, F.J. López-Soriano, C. Madeddu, R. Serpe, S. Busquets, Validation of the CACHexia SCORe (CASCO). Staging Cancer Patients: The Use of miniCASCO as a Simplified Tool, *Front. Physiol.* 8 (2017). doi:10.3389/fphys.2017.00092.
- [130] E.J.B. Ramos, S. Suzuki, D. Marks, A. Inui, A. Asakawa, M.M. Meguid, Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 7 (2004) 427–434.
- [131] A. Kumar, V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, J.E. Parrillo, Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 949–958.
- [132] S.S. Donaldson, R.A. Lenon, Alterations of nutritional status: impact of chemotherapy and radiation therapy, *Cancer.* 43 (1979) 2036–2052.
- [133] S. Reers, A.-C. Pfannerstill, D. Rades, R. Maushagen, M. Andratschke, R. Pries, B. Wollenberg, Cytokine changes in response to radio-/chemotherapeutic treatment in head and neck cancer, *Anticancer Res.* 33 (2013) 2481–2489.

- [134] K.L. Smith, M.J. Tisdale, Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia, *Br. J. Cancer*. 67 (1993) 680–685.
- [135] J.M. Argilés, S. Busquets, B. Stemmler, F.J. López-Soriano, Cancer cachexia: understanding the molecular basis, *Nat. Rev. Cancer*. 14 (2014) 754–762. doi:10.1038/nrc3829.
- [136] F. Dworzak, P. Ferrari, C. Gavazzi, C. Maiorana, F. Bozzetti, Effects of cachexia due to cancer on whole body and skeletal muscle protein turnover, *Cancer*. 82 (1998) 42–48.
- [137] H.L. Eley, S.T. Russell, M.J. Tisdale, Attenuation of muscle atrophy in a murine model of cachexia by inhibition of the dsRNA-dependent protein kinase, *Br. J. Cancer*. 96 (2007) 1216–1222. doi:10.1038/sj.bjc.6603704.
- [138] Y.S. Gallot, A.-C. Durieux, J. Castells, M.M. Desgeorges, B. Vernus, L. Plantureux, D. Rémond, V.E. Jahnke, E. Lefai, D. Dardevet, G. Nemoz, L. Schaeffer, A. Bonniou, D.G. Freyssenet, Myostatin gene inactivation prevents skeletal muscle wasting in cancer, *Cancer Res*. 74 (2014) 7344–7356. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0057.
- [139] K. Lundholm, A.-C. Bylund, J. Holm, T. Scherstén, Skeletal muscle metabolism in patients with malignant tumor, *Eur. J. Cancer* 1965. 12 (1976) 465–473. doi:10.1016/0014-2964(76)90036-0.
- [140] G. Ventrucci, M. a. R. Mello, M.C.C. Gomes-Marcondes, Proteasome activity is altered in skeletal muscle tissue of tumour-bearing rats a leucine-rich diet, *Endocr. Relat. Cancer*. 11 (2004) 887–895. doi:10.1677/erc.1.00828.
- [141] P. Costelli, M. Bossola, M. Muscaritoli, G. Grieco, G. Bonelli, R. Bellantone, G.B. Doglietto, F.M. Baccino, F. Rossi Fanelli, Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca(2+)-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats, *Cytokine*. 19 (2002) 1–5.
- [142] X. Zhou, J.L. Wang, J. Lu, Y. Song, K.S. Kwak, Q. Jiao, R. Rosenfeld, Q. Chen, T. Boone, W.S. Simonet, D.L. Lacey, A.L. Goldberg, H.Q. Han, Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival, *Cell*. 142 (2010) 531–543. doi:10.1016/j.cell.2010.07.011.
- [143] M. Toledo, F. Penna, F. Oliva, M. Luque, A. Betancourt, E. Marmonti, F.J. López-Soriano, J.M. Argilés, S. Busquets, A multifactorial anti-cachectic approach for cancer cachexia in a rat model undergoing chemotherapy, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. 7 (2016) 48–59. doi:10.1002/jcsm.12035.
- [144] L. Zhang, H. Tang, Y. Kou, R. Li, Y. Zheng, Q. Wang, X. Zhou, L. Jin, MG132-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway ameliorates cancer cachexia, *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 139 (2013) 1105–1115. doi:10.1007/s00432-013-1412-6.
- [145] F. Penna, A. Bonetto, Z. Aversa, V.G. Minero, F. Rossi Fanelli, P. Costelli, M. Muscaritoli, Effect of the specific proteasome inhibitor bortezomib on cancer-related muscle wasting, *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*. 7 (2016) 345–354. doi:10.1002/jcsm.12050.
- [146] D.J. Ham, K.T. Murphy, A. Chee, G.S. Lynch, R. Koopman, Glycine administration attenuates skeletal muscle wasting in a mouse model of cancer cachexia, *Clin. Nutr. Edinb. Scotl*. 33 (2014) 448–458. doi:10.1016/j.clnu.2013.06.013.
- [147] S. Busquets, C. García-Martínez, B. Alvarez, N. Carbó, F.J. López-Soriano, J.M. Argilés, Calpain-3 gene expression is decreased during experimental cancer cachexia, *Biochim. Biophys. Acta*. 1475 (2000) 5–9.
- [148] X.-Y. Lin, S.-Z. Chen, Calpain inhibitors ameliorate muscle wasting in a cachectic mouse model bearing CT26 colorectal adenocarcinoma, *Oncol. Rep*. 37 (2017) 1601–1610. doi:10.3892/or.2017.5396.
- [149] F. Pin, V.G. Minero, F. Penna, M. Muscaritoli, R. De Tullio, F.M. Baccino, P. Costelli, Interference with Ca(2+)-Dependent Proteolysis Does Not Alter the Course of

- Muscle Wasting in Experimental Cancer Cachexia, *Front. Physiol.* 8 (2017) 213. doi:10.3389/fphys.2017.00213.
- [150] L. Leloup, A. Wells, Calpains as potential anti-cancer targets, *Expert Opin. Ther. Targets.* 15 (2011) 309–323. doi:10.1517/14728222.2011.553611.
- [151] K. Pettersen, S. Andersen, S. Degen, V. Tadini, J. Grosjean, S. Hatakeyama, A.N. Tesfahun, S. Moestue, J. Kim, U. Nonstad, P.R. Romundstad, F. Skorpen, S. Sørhaug, T. Amundsen, B.H. Grønberg, F. Strasser, N. Stephens, D. Hoem, A. Molven, S. Kaasa, K. Fearon, C. Jacobi, G. Bjørkøy, Cancer cachexia associates with a systemic autophagy-inducing activity mimicked by cancer cell-derived IL-6 trans-signaling, *Sci. Rep.* 7 (2017) 2046. doi:10.1038/s41598-017-02088-2.
- [152] F. Penna, D. Costamagna, F. Pin, A. Camperi, A. Fanzani, E.M. Chiarpotto, G. Cavallini, G. Bonelli, F.M. Baccino, P. Costelli, Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia, *Am. J. Pathol.* 182 (2013) 1367–1378. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.023.
- [153] V.E. Baracos, C. DeVivo, D.H. Hoyle, A.L. Goldberg, Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) E996–1006.
- [154] J.M. Argilés, F.J. López-Soriano, D. Wiggins, D.H. Williamson, Comparative effects of tumour necrosis factor-alpha (cachectin), interleukin-1-beta and tumour growth on amino acid metabolism in the rat in vivo. Absorption and tissue uptake of alpha-amino[1-<sup>14</sup>C]isobutyrate, *Biochem. J.* 261 (1989) 357–362.
- [155] R.A. Murphy, M.S. Wilke, M. Perrine, M. Pawlowicz, M. Mourtzakis, J.R. Lieffers, M. Maneshgar, E. Bruera, M.T. Clandinin, V.E. Baracos, V.C. Mazurak, Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients, *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 29 (2010) 482–487. doi:10.1016/j.clnu.2009.11.006.
- [156] C. Bing, S. Russell, E. Becket, M. Pope, M.J. Tisdale, P. Trayhurn, J.R. Jenkins, Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice, *Br. J. Cancer.* 95 (2006) 1028–1037. doi:10.1038/sj.bjc.6603360.
- [157] M. Ebadi, V.C. Mazurak, Evidence and mechanisms of fat depletion in cancer, *Nutrients.* 6 (2014) 5280–5297. doi:10.3390/nu6115280.
- [158] J. López-Soriano, J.M. Argilés, F.J. López-Soriano, Sequential changes in lipoprotein lipase activity and lipaemia induced by the Yoshida AH-130 ascites hepatoma in rats, *Cancer Lett.* 116 (1997) 159–165.
- [159] S.K. Das, S. Eder, S. Schauer, C. Diwoky, H. Temmel, B. Guertl, G. Gorkiewicz, K.P. Tamilarasan, P. Kumari, M. Trauner, R. Zimmermann, P. Vesely, G. Haemmerle, R. Zechner, G. Hoeffler, Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia, *Science.* 333 (2011) 233–238. doi:10.1126/science.1198973.
- [160] O. Warburg, F. Wind, E. Negelein, THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY, *J. Gen. Physiol.* 8 (1927) 519–530.
- [161] T. Yoshikawa, Y. Noguchi, C. Doi, T. Makino, T. Okamoto, A. Matsumoto, Insulin resistance was connected with the alterations of substrate utilization in patients with cancer, *Cancer Lett.* 141 (1999) 93–98.
- [162] Y. Noguchi, T. Yoshikawa, D. Marat, C. Doi, T. Makino, K. Fukuzawa, A. Tsuburaya, S. Satoh, T. Ito, S. Mitsuse, Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor-alpha expression in skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253 (1998) 887–892. doi:10.1006/bbrc.1998.9794.
- [163] M.L. Batista, M. Olivan, P.S.M. Alcantara, R. Sandoval, S.B. Peres, R.X. Neves, R. Silverio, L.F. Maximiano, J.P. Otoch, M. Seelaender, Adipose tissue-derived factors as

- potential biomarkers in cachectic cancer patients, *Cytokine*. 61 (2013) 532–539. doi:10.1016/j.cyto.2012.10.023.
- [164] J.M. Argilés, S. Busquets, M. Toledo, F.J. López-Soriano, The role of cytokines in cancer cachexia, *Curr. Opin. Support. Palliat. Care*. 3 (2009) 263–268. doi:10.1097/SPC.0b013e3283311d09.
- [165] K. Zins, D. Abraham, M. Sioud, S. Aharinejad, Colon cancer cell-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates the tumor growth-promoting response in macrophages by up-regulating the colony-stimulating factor-1 pathway, *Cancer Res*. 67 (2007) 1038–1045. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2295.
- [166] B.A. Sherry, J. Gelin, Y. Fong, M. Marano, H. Wei, A. Cerami, S.F. Lowry, K.G. Lundholm, L.L. Moldawer, Anticachectin/tumor necrosis factor- $\alpha$  antibodies attenuate development of cachexia in tumor models, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 3 (1989) 1956–1962.
- [167] L. Combaret, C. Ralli  re, D. Taillandier, K. Tanaka, D. Attaix, Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats, *Mol. Biol. Rep.* 26 (1999) 95–101.
- [168] L.A.A. Gilliam, L.F. Ferreira, J.D. Bruton, J.S. Moylan, H. Westerblad, D.K. St Clair, M.B. Reid, Doxorubicin acts through tumor necrosis factor receptor subtype 1 to cause dysfunction of murine skeletal muscle, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 107 (2009) 1935–1942. doi:10.1152/jappphysiol.00776.2009.
- [169] T.P. Braun, M. Szumowski, P.R. Levasseur, A.J. Grossberg, X. Zhu, A. Agarwal, D.L. Marks, Muscle atrophy in response to cytotoxic chemotherapy is dependent on intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle, *PloS One*. 9 (2014) e106489. doi:10.1371/journal.pone.0106489.
- [170] R.C. Smith, M.S. Cramer, P.J. Mitchell, A. Capen, L. Huber, R. Wang, L. Myers, B.E. Jones, B.J. Eastwood, D. Ballard, J. Hanson, K.M. Credille, V.J. Wroblewski, B.K. Lin, J.G. Heuer, Myostatin Neutralization Results in Preservation of Muscle Mass and Strength in Preclinical Models of Tumor-Induced Muscle Wasting, *Mol. Cancer Ther.* 14 (2015) 1661–1670. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0681.
- [171] S. Hatakeyama, S. Summermatter, M. Jourdain, S. Melly, G.C. Minetti, E. Lach-Trifilieff, ActRII blockade protects mice from cancer cachexia and prolongs survival in the presence of anti-cancer treatments, *Skelet. Muscle*. 6 (2016) 26. doi:10.1186/s13395-016-0098-2.
- [172] S. Antoun, L. Birdsell, M.B. Sawyer, P. Venner, B. Escudier, V.E. Baracos, Association of skeletal muscle wasting with treatment with sorafenib in patients with advanced renal cell carcinoma: results from a placebo-controlled study, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1054–1060. doi:10.1200/JCO.2009.24.9730.
- [173] H. Sakai, A. Sagara, K. Arakawa, R. Sugiyama, A. Hirotsaki, K. Takase, A. Jo, K. Sato, Y. Chiba, M. Yamazaki, M. Matoba, M. Narita, Mechanisms of cisplatin-induced muscle atrophy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 278 (2014) 190–199. doi:10.1016/j.taap.2014.05.001.
- [174] T.A. Nissinen, J. Degerman, M. R  s  nen, A.R. Poikonen, S. Koskinen, E. Mervaala, A. Pasternack, O. Ritvos, R. Kivel  , J.J. Hulmi, Systemic blockade of ACVR2B ligands prevents chemotherapy-induced muscle wasting by restoring muscle protein synthesis without affecting oxidative capacity or atrogenes, *Sci. Rep.* 6 (2016) 32695. doi:10.1038/srep32695.
- [175] J.S. Damrauer, M. Stadler, S. Acharyya, A.S. Baldwin, M.E. Couch, D.C. Guttridge, Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF- $\kappa$ B and cancer cachexia, *Basic Appl. Myol.* 18 (2008) 139–148.

- [176] R. Barreto, G. Mandili, F.A. Witzmann, F. Novelli, T.A. Zimmers, A. Bonetto, Cancer and Chemotherapy Contribute to Muscle Loss by Activating Common Signaling Pathways, *Front. Physiol.* 7 (2016) 472. doi:10.3389/fphys.2016.00472.
- [177] D. Vyas, G. Laput, A.K. Vyas, Chemotherapy-enhanced inflammation may lead to the failure of therapy and metastasis, *OncoTargets Ther.* 7 (2014) 1015–1023. doi:10.2147/OTT.S60114.
- [178] L. Pusztai, T.R. Mendoza, J.M. Reuben, M.M. Martinez, J.S. Willey, J. Lara, A. Syed, H.A. Fritsche, E. Bruera, D. Booser, V. Valero, B. Arun, N. Ibrahim, E. Rivera, M. Royce, C.S. Cleeland, G.N. Hortobagyi, Changes in plasma levels of inflammatory cytokines in response to paclitaxel chemotherapy, *Cytokine.* 25 (2004) 94–102.
- [179] C.M.M. Prado, S. Antoun, M.B. Sawyer, V.E. Baracos, Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 14 (2011) 250–254. doi:10.1097/MCO.0b013e3283455d45.
- [180] L.A.A. Gilliam, J.S. Moylan, L.A. Callahan, M.P. Sumandea, M.B. Reid, Doxorubicin causes diaphragm weakness in murine models of cancer chemotherapy, *Muscle Nerve.* 43 (2011) 94–102. doi:10.1002/mus.21809.
- [181] L.A.A. Gilliam, D.K. St Clair, Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 2543–2563. doi:10.1089/ars.2011.3965.
- [182] H. Wang, T.-L. Li, S. Hsia, I.-L. Su, Y.-L. Chan, C.-J. Wu, Skeletal muscle atrophy is attenuated in tumor-bearing mice under chemotherapy by treatment with fish oil and selenium, *Oncotarget.* 6 (2015) 7758–7773. doi:10.18632/oncotarget.3483.
- [183] S. Busquets, R. Serpe, S. Sirisi, M. Toledo, J. Coutinho, R. Martínez, M. Orpí, F.J. López-Soriano, J.M. Argilés, Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia, *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* 29 (2010) 733–737. doi:10.1016/j.clnu.2010.06.003.
- [184] E. De Waele, S. Mattens, P.M. Honoré, H. Spapen, J. De Grève, J.J. Pen, Nutrition therapy in cachectic cancer patients. The Tight Caloric Control (TiCaCo) pilot trial, *Appetite.* 91 (2015) 298–301. doi:10.1016/j.appet.2015.04.049.
- [185] I. Bourdel-Marchasson, C. Blanc-Bisson, A. Doussau, C. Germain, J.-F. Blanc, J. Dauba, C. Lahmar, E. Terrebonne, C. Lecaille, J. Ceccaldi, L. Cany, S. Lavau-Denes, N. Houede, F. Chomy, J. Durrieu, P. Soubeyran, P. Senesse, G. Chene, M. Fonck, Nutritional advice in older patients at risk of malnutrition during treatment for chemotherapy: a two-year randomized controlled trial, *PloS One.* 9 (2014) e108687. doi:10.1371/journal.pone.0108687.
- [186] A. Ries, P. Trottenberg, F. Elsner, S. Stiel, D. Haugen, S. Kaasa, L. Radbruch, A systematic review on the role of fish oil for the treatment of cachexia in advanced cancer: an EPCRC cachexia guidelines project, *Palliat. Med.* 26 (2012) 294–304. doi:10.1177/0269216311418709.
- [187] J.P. Monk, G. Phillips, R. Waite, J. Kuhn, L.J. Schaaf, G.A. Otterson, D. Guttridge, C. Rhoades, M. Shah, T. Criswell, M.A. Caligiuri, M.A. Villalona-Calero, Assessment of tumor necrosis factor alpha blockade as an intervention to improve tolerability of dose-intensive chemotherapy in cancer patients, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 24 (2006) 1852–1859. doi:10.1200/JCO.2005.04.2838.
- [188] J.N. Gordon, T.M. Trebble, R.D. Ellis, H.D. Duncan, T. Johns, P.M. Goggin, Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial, *Gut.* 54 (2005) 540–545. doi:10.1136/gut.2004.047563.

- [189] R.C. Smith, B.K. Lin, Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders, *Curr. Opin. Support. Palliat. Care.* 7 (2013) 352–360. doi:10.1097/SPC.0000000000000013.
- [190] S. Colak, P. Ten Dijke, Targeting TGF- $\beta$  Signaling in Cancer, *Trends Cancer.* 3 (2017) 56–71. doi:10.1016/j.trecan.2016.11.008.
- [191] K.A. Wichterman, A.E. Baue, I.H. Chaudry, Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal, *J. Surg. Res.* 29 (1980) 189–201.
- [192] A.B. Nair, S. Jacob, A simple practice guide for dose conversion between animals and human, *J. Basic Clin. Pharm.* 7 (2016) 27–31. doi:10.4103/0976-0105.177703.
- [193] S. Karkampouna, M.-J. Goumans, P. Ten Dijke, S. Dooley, M. Kruithof-de Julio, Inhibition of TGF $\beta$  type I receptor activity facilitates liver regeneration upon acute CCl<sub>4</sub> intoxication in mice, *Arch. Toxicol.* 90 (2016) 347–357. doi:10.1007/s00204-014-1436-y.
- [194] N. Yoshioka, J. Kimura-Kuroda, T. Saito, K. Kawamura, S. Hisanaga, H. Kawano, Small molecule inhibitor of type I transforming growth factor- $\beta$  receptor kinase ameliorates the inhibitory milieu in injured brain and promotes regeneration of nigrostriatal dopaminergic axons, *J. Neurosci. Res.* 89 (2011) 381–393. doi:10.1002/jnr.22552.
- [195] M. Oka, C. Iwata, H.I. Suzuki, K. Kiyono, Y. Morishita, T. Watabe, A. Komuro, M.R. Kano, K. Miyazono, Inhibition of endogenous TGF-beta signaling enhances lymphangiogenesis, *Blood.* 111 (2008) 4571–4579. doi:10.1182/blood-2007-10-120337.
- [196] C. Li, X. Qu, W. Xu, N. Qu, L. Mei, Y. Liu, X. Wang, X. Yu, Z. Liu, D. Nie, Y. Liu, J. Yan, B. Yang, Y. Lu, W. Chu, Arsenic trioxide induces cardiac fibroblast apoptosis in vitro and in vivo by up-regulating TGF- $\beta$ 1 expression, *Toxicol. Lett.* 219 (2013) 223–230. doi:10.1016/j.toxlet.2013.03.024.
- [197] M. Guillouet, G. Gueret, F. Rannou, M.-A. Giroux-Metges, M. Gioux, C.C. Arvieux, J.-P. Pennec, TNF $\alpha$  increases resting potential in isolated fibres from rat peroneus longus by a PKC mediated mechanism: involvement in ICU acquired polyneuromyopathy, *Cytokine.* 56 (2011) 149–152. doi:10.1016/j.cyto.2011.05.023.
- [198] S. Roberge, J. Roussel, D.C. Andersson, A.C. Meli, B. Vidal, F. Blandel, J.T. Lanner, J.-Y. Le Guennec, A. Katz, H. Westerblad, A. Lacampagne, J. Fauconnier, TNF- $\alpha$ -mediated caspase-8 activation induces ROS production and TRPM2 activation in adult ventricular myocytes, *Cardiovasc. Res.* 103 (2014) 90–99. doi:10.1093/cvr/cvu112.
- [199] X. Chen, B.T. Andresen<sup>1</sup>, M. Hill, J. Zhang, F. Booth, C. Zhang, Role of Reactive Oxygen Species in Tumor Necrosis Factor-alpha Induced Endothelial Dysfunction, *Curr. Hypertens. Rev.* 4 (2008) 245–255.
- [200] T. van der Poll, S.J. van Deventer, Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis, *Infect. Dis. Clin. North Am.* 13 (1999) 413–426, ix.
- [201] N.J. Edmunds, H. Lal, B. Woodward, Effects of tumour necrosis factor-alpha on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: possible mechanisms for a decline in cardiac function, *Br. J. Pharmacol.* 126 (1999) 189–196. doi:10.1038/sj.bjp.0702294.
- [202] J.C. Braz, K. Gregory, A. Pathak, W. Zhao, B. Sahin, R. Klevitsky, T.F. Kimball, J.N. Lorenz, A.C. Nairn, S.B. Liggett, I. Bodi, S. Wang, A. Schwartz, E.G. Lakatta, A.A. DePaoli-Roach, J. Robbins, T.E. Hewett, J.A. Bibb, M.V. Westfall, E.G. Kranias, J.D. Molkentin, PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure, *Nat. Med.* 10 (2004) 248–254. doi:10.1038/nm1000.
- [203] H. Hallaq, D.W. Wang, J.D. Kunic, A.L. George, K.S. Wells, K.T. Murray, Activation of protein kinase C alters the intracellular distribution and mobility of cardiac Na<sup>+</sup> channels, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 302 (2012) H782–789. doi:10.1152/ajpheart.00817.2010.

- [204] G.Q. Xiao, Y. Qu, Z.Q. Sun, D. Mochly-Rosen, M. Boutjdir, Evidence for functional role of epsilonPKC isozyme in the regulation of cardiac Na(+) channels, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281 (2001) C1477-1486.
- [205] C.L. Watson, M.R. Gold, Modulation of Na<sup>+</sup> current inactivation by stimulation of protein kinase C in cardiac cells, *Circ. Res.* 81 (1997) 380–386.
- [206] A. Matsukawa, C.M. Hogaboam, N.W. Lukacs, P.M. Lincoln, H.L. Evanoff, R.M. Strieter, S.L. Kunkel, Expression and contribution of endogenous IL-13 in an experimental model of sepsis, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 164 (2000) 2738–2744.
- [207] N. Collighan, P.V. Giannoudis, O. Kourgeraki, S.L. Perry, P.J. Guillou, M.C. Bellamy, Interleukin 13 and inflammatory markers in human sepsis, *Br. J. Surg.* 91 (2004) 762–768. doi:10.1002/bjs.4521.
- [208] J.L. Ingram, M. Kraft, IL-13 in asthma and allergic disease: asthma phenotypes and targeted therapies, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (2012) 829-842; quiz 843-844. doi:10.1016/j.jaci.2012.06.034.
- [209] Y. Takahashi, D. Katayose, C. Shindoh, Interleukin-13 prevents diaphragm muscle deterioration in a septic animal model, *Tohoku J. Exp. Med.* 189 (1999) 191–202.
- [210] A. Madamanchi, Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure, *McGill J. Med. MJM Int. Forum Adv. Med. Sci. Stud.* 10 (2007) 99–104.
- [211] L. Li, J. Desantiago, G. Chu, E.G. Kranias, D.M. Bers, Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 (2000) H769-779.
- [212] G.K.K. Hershey, IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (2003) 677–690; quiz 691.
- [213] N. Yano, A. Tseng, T.C. Zhao, J. Robbins, J.F. Padbury, Y.-T. Tseng, Temporally controlled overexpression of cardiac-specific PI3Kalpha induces enhanced myocardial contractility--a new transgenic model, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295 (2008) H1690-1694. doi:10.1152/ajpheart.00531.2008.
- [214] H. Hallaq, Z. Yang, P.C. Viswanathan, K. Fukuda, W. Shen, D.W. Wang, K.S. Wells, J. Zhou, J. Yi, K.T. Murray, Quantitation of protein kinase A-mediated trafficking of cardiac sodium channels in living cells, *Cardiovasc. Res.* 72 (2006) 250–261. doi:10.1016/j.cardiores.2006.08.007.
- [215] R. Thangamalai, K. Kandasamy, S.V. Sukumarn, N. Reddy, V. Singh, S. Choudhury, S. Parida, T.U. Singh, R. Boobalan, S.K. Mishra, Atorvastatin prevents sepsis-induced downregulation of myocardial  $\beta$ 1-adrenoceptors and decreased cAMP response in mice, *Shock Augusta Ga.* 41 (2014) 406–412. doi:10.1097/SHK.0000000000000138.
- [216] S. Moniotte, C. Belge, B. Sekkali, P.B. Massion, B. Rozec, C. Dessy, J.-L. Balligand, Sepsis is associated with an upregulation of functional beta3 adrenoceptors in the myocardium, *Eur. J. Heart Fail.* 9 (2007) 1163–1171. doi:10.1016/j.ejheart.2007.10.006.
- [217] T. Suzuki, Y. Suzuki, J. Okuda, T. Kurazumi, T. Suhara, T. Ueda, H. Nagata, H. Morisaki, Sepsis-induced cardiac dysfunction and  $\beta$ -adrenergic blockade therapy for sepsis, *J. Intensive Care.* 5 (2017). doi:10.1186/s40560-017-0215-2.
- [218] L. Combaret, D. Dardevet, D. Béchet, D. Taillandier, L. Mosoni, D. Attaix, Skeletal muscle proteolysis in aging, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 12 (2009) 37–41. doi:10.1097/MCO.0b013e32831b9c31.
- [219] Y. Ohsawa, T. Okada, S.-I. Nishimatsu, M. Ishizaki, T. Suga, M. Fujino, T. Murakami, M. Uchino, K. Tsuchida, S. Noji, A. Hinohara, T. Shimizu, K. Shimizu, Y. Sunada, An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 92 (2012) 1100–1114. doi:10.1038/labinvest.2012.78.

- [220] B. Deng, F. Zhang, J. Wen, S. Ye, L. Wang, Y. Yang, P. Gong, S. Jiang, The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals, *Nutr. Metab.* 14 (2017) 29. doi:10.1186/s12986-017-0179-1.
- [221] K.L. Jones, A. Mansell, S. Patella, B.J. Scott, M.P. Hedger, D.M. de Kretser, D.J. Phillips, Activin A is a critical component of the inflammatory response, and its binding protein, follistatin, reduces mortality in endotoxemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 16239–16244. doi:10.1073/pnas.0705971104.
- [222] S.K. Powers, R.A. Shanely, J.S. Coombes, T.J. Koesterer, M. McKenzie, D. Van Gammeren, M. Cicale, S.L. Dodd, Mechanical ventilation results in progressive contractile dysfunction in the diaphragm, *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985. 92 (2002) 1851–1858. doi:10.1152/jappphysiol.00881.2001.



## **Résumé**

### **Rôle de médiateurs de l'inflammation dans l'altération de la fonction musculaire: étude des effets du sepsis et de la chimiothérapie sur un modèle murin**

L'atteinte musculaire peut être un facteur aggravant du pronostic dans certaines pathologies. Durant cette thèse nous nous sommes intéressés à des médiateurs de l'inflammation, tels que les cytokines, et leurs effets sur la fonction du muscle cardiaque et des muscles striés squelettiques. Dans la première étude, nous avons montré que le TNF- $\alpha$  entraîne une diminution de la force contractile cardiaque, via l'activation des PKC, mais que l'excitabilité membranaire n'est pas altérée. Dans la seconde étude nous montrons que l'IL-13 augmente la force de contraction du cœur, via l'activation de la voie  $\beta$ 2 adrénergique - PKA, et permet également d'augmenter l'excitabilité membranaire des cardiomyocytes en augmentant le nombre de canaux sodiques potentiel dépendants. Néanmoins après un sepsis chronique l'IL-13 perd ses effets sur le cœur. Dans la troisième étude, nous démontrons qu'une chimiothérapie, le docétaxel, est capable d'induire une atrophie musculaire associée à la libération de cytokines pro-inflammatoires et de diminuer la force de contraction du muscle strié squelettique. Néanmoins, l'ajout de dantrolène, un inhibiteur de canaux calciques, permet de prévenir ces effets délétères. Enfin dans la dernière étude, nous avons montré que l'inhibition de la voie des TGF- $\beta$  peut avoir un effet bénéfique sur la dysfonction diaphragmatique lors du sepsis, en restaurant à la fois la masse musculaire et la force de contraction.

**Mots clés :** Muscle, Sepsis, Cytokines, Chimiothérapie, TGF- $\beta$

## **Abstract**

### **Role of the mediators of inflammation in the alteration of the muscle function: an in vivo murine model study of the effects of sepsis and chemotherapy.**

Muscular dysfunction is associated with a worsen outcome for different pathologies. During this thesis, we have focused on mediators of the inflammation, such as cytokines, and their effects on heart and striated muscle function. In the first study, we have shown that the TNF- $\alpha$  decreased the heart contractile force by PKC pathway activation, but that the membrane excitability remained unchanged. In the second study, we showed that IL-13 increased the heart contraction, by the activation of  $\beta$ 2 adrenergic - PKA pathway, and increased the membrane excitability of cardiomyocytes associated to an increase of the number of channels at the membrane level. Nevertheless, IL-13 lost its effect on septic heart. In the third study, we showed that the chemotherapy, docetaxel, was able to induce muscle atrophy associated to the release of pro-inflammatory cytokines, and a decrease of the contractile force of the skeletal muscle. However, the addition of dantrolene, an inhibitor of calcium channels, can prevent these deleterious effects. For the last study, we showed that the inhibition of TGF- $\alpha$  pathway can have beneficial effects on diaphragm dysfunction during sepsis, by preserving both muscle mass and muscle contractile force.

**Keywords:** Muscle, Sepsis, Cytokines, Chemotherapy, TGF- $\beta$