

*ÉCOLE DOCTORALE SST*

Unité INSERM U1069 : Nutrition, Croissance et Cancer

## THÈSE présentée par : **Cloé, Mimsy JULIENNE**

soutenue le : 17 février 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Physiologie

### **Altérations du métabolisme énergétique mitochondrial lors de la cachexie cancéreuse**

**THÈSE dirigée par :**

**M COUET Charles**  
**M SERVAIS Stéphane**

Professeur, Université F-Rabelais, Tours  
Maître de Conférence-HDR, Université F-Rabelais, Tours

**RAPPORTEURS :**

**Mme MORIO-LIONDORE Béatrice**  
**M SCHNEIDER Stéphane**

Directeur de recherche, INRA, Clermont Ferrand  
Professeur, Université Sophia-Antipolis, Nice

---

**JURY :**

**M COUET Charles**  
**M DUMAS Jean-François**  
**M HANKARD Régis**  
**Mme MORIO-LIONDORE Béatrice**  
**M SCHNEIDER Stéphane**  
**M SERVAIS Stéphane**

Professeur, Université F-Rabelais, Tours  
ATER, Université F-Rabelais, Tours  
Professeur, Université de Poitiers  
Directeur de recherche, INRA, Clermont Ferrand  
Professeur, Université Sophia-Antipolis, Nice  
Maître de Conférence-HDR, Université F-Rabelais, Tours



# Remerciements

Je tiens à présenter mes sincères remerciements à :

*Mme Béatrice Morio-Liondore* et *M Stéphane Schneider* pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

*M Régis Hankard* pour avoir accepté d'être examinateur de mon travail.

*M Philippe Bougnoux* pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Votre savoir et votre passion pour la recherche resteront une source d'admiration et de motivation pour moi. Je remercie également *M Stéphan Chevalier*, notre nouveau grand patron, pour sa sympathie et pour avoir su préserver cette bonne ambiance qui règne dans le laboratoire.

*M Charles Couet* pour avoir dirigé ce travail de thèse. Vous avez su faire les choix judicieux pour me permettre d'avancer dans mes recherches et votre implication et vos conseils ont été d'une aide très précieuse.

*M Stéphane Servais*, mon co-encadrant officiel. Je te remercie beaucoup pour ton travail et ton aide précieuse notamment sur la rédaction de mon article et de ce manuscrit. Nous avons parfois souffert de problèmes de communication tous les deux mais ton œil critique m'a beaucoup appris aussi bien professionnellement que sur moi-même. Je te remercie également pour ton rôle de « VRP » de notre thématique et pour tout ton travail sur la construction des projets qui ont pu financer mon travail de thèse. Et je n'oublierais pas tous ces bons moments passés notamment lors des congrès, des restaurants « équipe » ou des tournois sportifs.

*M Jean-François Dumas*, mon co-encadrant officieux. Il me faudrait probablement une dizaine de pages pour énumérer toutes les raisons de te remercier. Je te remercie notamment pour ta participation indispensable à la réalisation de ces travaux de thèse et pour toutes ces journées de « manip » passées ensemble. Je te remercie aussi vivement pour tes remarques constructives, des conseils, et ton implication dans toutes les étapes de mon travail. Je te remercie énormément pour toutes ces discussions professionnelles et personnelles, ton soutien

et tes paroles rassurantes qui m'ont été très chers pendant toute la durée de ma thèse. Je n'oublierais pas tous ces bons moments et toutes les galères vécus ensemble et tu resteras un modèle pour moi.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont participé à mes travaux de thèse :

*Mme Sophie Tesseraud* et *Mme Cécile Bérry*, de l'unité aviaire UR83 de l'INRA de Nouzilly pour leur collaboration dans ce travail. Merci de m'avoir aussi bien accueilli dans votre équipe et merci pour votre aide précieuse dans l'élaboration et l'analyse de mes résultats.

Un merci tout particulier à *Mme Sabine Crochet* et à *M Thierry Bordeau* pour leur participation active à l'acquisition de ces résultats. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec vous. Merci d'avoir tout fait pour me mettre dans les meilleures dispositions pour réaliser mes expériences.

Merci ainsi à toutes les personnes de l'unité pour leur accueil chaleureux avec une pensée particulière pour Thomas et ces dépannages des jours fériés ainsi qu'à Lucie et Pauline pour les discussions des pauses détente.

*M Jérôme Montharu*, le responsable de l'animalerie et acteur de ma formation expérimentation animale pour sa sympathie et sa disponibilité ainsi que *Mme Valérie Schubnel* pour sa gestion de notre travail à l'animalerie, son œil attentif sur le bien-être de nos rats, sa gentillesse et nos discussions du week-end dans les couloirs de l'animalerie. Un merci aussi pour toutes les facilités et les coups de pouce que vous m'avez accordés.

Je remercie aussi toute l'équipe « Cachexie » de notre laboratoire et notamment :

*Mme Michèle Pinault*, notre madame lipide. Un grand merci pour sa maîtrise de la GC, sa gentillesse et son caractère jovial.

*Melle Marine Tardieu* pour sa participation au travail d'enrichissement du contenu en cardiolipines et en PE, sa bonne humeur, son personnage si sympathique et attachant, les discussions, et les bons moments passés ensemble (et vive le mojito).

*M François Maillot* et *M François Labarthe* pour les remarques et les discussions sur mon travail et leur sympathie.

David Jacobi, Cynthia, Espérance et une pensée pour nos stagiaires Lakehal, Christelle et particulièrement Julie Dartier pour sa participation à mon travail et son caractère fort et

sympathique et à Rudy Michau pour sa passion pour ses formules de physique et sa bonne humeur.

Un énorme merci également à l'ensemble du laboratoire U1069 (ex U921), Caroline, Karine, Christophe, Catherine, Sébastien, Isabelle, Marie, Aurélie, Julie, Marie-Lise, Violetta, Jacques, sans oublier Jean-Yves qui fut mon premier directeur de stage, ainsi qu'à tous mes confrères doctorants et aux stagiaires qui ont pu partager mon quotidien Ludo, Lucie B, Alban, Ramez, Bilel, Amandine, Nawale, Virginie, Stéphanie, Johan, Sophie V, Tran, Charlie, Maxime, Camille, Lucie (la nouvelle venue) et tout ce que j'oublie.

Un merci aussi à Laure, ma suiveuse. Je te souhaite bonne chance pour ta thèse qui commence et beaucoup de résultats positifs.

Un merci particulier à Pierre pour tout le temps passé à rassurer mes angoisses et à répondre à toutes mes questions.

Un grand merci aussi à Aurore. Bien que mon manteau garde un mauvais souvenir de son exclusion du bureau, j'ai beaucoup apprécié nos longues discussions et je te remercie de ton soutien.

Un merci tout particulier aussi à Lucie C. Parfois tranchante mais toujours franche, ton amitié m'a été d'un grand réconfort et je te souhaite de réussir et d'arrêter de te prendre la tête.

Une pensée spéciale pour Sophie K et Fabio, mes confrères de promo avec qui j'ai partagé de nombreux moments de galère, de tristesse mais aussi de délires et de fous rires qui resteront inoubliables.

Je tiens aussi à remercier *M Frédéric Esnard* et l'unité d'enseignement de Biochimie qui m'ont permis de réaliser mon monitorat. Un grand merci à toute l'équipe d'enseignement, Sandrine Dallet, Fabien Lecaille, Fabien Barbarin-Costes, Fabienne, Audrey Muñoz, Thierry Moreau et à mes consœurs monitrices Alice et Marion.

Un grand merci à tous mes amis, rencontrés durant cette thèse :

Mes confrères de l'ADOCT (qui restera mon bébé adoptif) Romain, Jean-Louis, Annabelle, Catherine, Florence, Sarah, Elodie, Vince, Camille, Daphné, Greg, Thomas et Armelle. Merci pour toutes ces discussions et ces moments passés à se décarcasser la tête à trouver et organiser des activités qui pouvaient plaire aux doctorants.

Merci à toutes ces personnes rencontrées par le monitorat et les formations et les soirées, Maïna, Alessandra, Magalie, Amine, Kisito, Marie, Syrie, Athmane, Abdelheq, Claire, FX, Romaric, Anthony, et tous les autres pour ces bons moments de détente et de « dé-stress ».

Un grand et énorme merci à tous mes amis de toujours :

Olivia, Julie, Raphaël, Fred, Cyril, Claire, Chaïmaa. Merci d'avoir accepté mes grands moments d'absence à certaines périodes et d'avoir partagé autant de bons moments. Merci pour votre soutien et votre amitié qui m'est chère.

Un merci tout particulier à Claire et à Benji, qui ont été là dans les moments difficiles de ma vie et à qui je dois tellement. Je vous en remercie du fond du cœur.

Un grand merci aussi à Clément, mon binôme éternel. Merci pour ton aide précieuse sur cette rédaction, ton soutien de chaque instant. Merci d'avoir été à mes côtés durant toutes ces années et merci pour tous ces bons souvenirs, du barbecue parmi les vaches aux plages de Mimizan et toutes ces soirées à refaire le monde.

Je remercie aussi ma famille :

Mon papou poule, et ma mère qui m'ont soutenu (parfois maladroitement) même s'ils n'ont jamais vraiment compris ce que je faisais. Vous m'avez laissé la possibilité de suivre ma route et de faire des études et avez assuré mon confort matériel, ma santé et mon bien-être durant toutes ces années. Un grand merci à ma sœur aînée chérie, Maylis et à mes frangins adorés, Océane et Anthony, qui sont la prunelle de mes yeux et qui remplissent mon cœur de joie.

Un merci à toute ma famille pour tous les bons moments passés ensemble, l'ambiance festive des soirées Bègue et les moments gastronomiques et joueurs des soirées Julienne. Merci à mes grands-parents (naturel et d'alliance), mes oncles et tantes, mes cousins et toute ma famille de la Réunion.

Une pensée affectueuse pour mon grand-père, Robert, ma grand-mère, Janine, et ma tante, Manon, qui nous ont malheureusement quittés durant ma thèse. Je pense très fort à vous et je vous remercie de tout ce que vous avez fait pour moi. Vous resterez à jamais au fond de mon cœur.

Enfin, un merci à mon ti loup. Merci de m'avoir supporté et merci de ta tendresse. Cela n'aura pas toujours été facile mais nous avons appris beaucoup l'un de l'autre et, quoiqu'il arrive, « nous » restera toujours un bon moment dans ma vie.

## Résumé

La cachexie est un syndrome complexe caractérisé par une balance énergétique négative. Le rôle joué par le métabolisme énergétique mitochondrial dans ce syndrome est peu connu. Nos précédents travaux montraient une diminution de la synthèse de l'ATP dans les mitochondries hépatiques en stade de cachexie cancéreuse sévère. Dans ce travail, nous démontrons, *in vitro*, que l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et du contenu en cardiolipines dans des mitochondries hépatiques saines, mime partiellement les mécanismes observés lors d'un stade de cachexie sévère. Nous observons cependant que l'altération du métabolisme mitochondrial hépatique apparaît à un stade tardif du développement de la cachexie. En stade sévère les mitochondries musculaires ne développent pas d'altération de leur efficacité de synthèse d'ATP mais une diminution de leurs capacités oxydatives.

Mots clés : cachexie cancéreuse, mitochondrie, synthèse d'ATP, cardiolipine, espèces réactives de l'oxygène.

## Résumé en anglais

Cancer cachexia is a composite syndrome, characterized by a negative energetic balance. The role played by mitochondrial energetic metabolism in this syndrome is poor known. Our past work showed a decrease of ATP synthesis efficiency in hepatic mitochondria in severe state of cancer cachexia. In this work, we demonstrate, *in vitro*, that increase of reactive oxygen species and cardiolipine content, in healthy mitochondria, can partly mimic the mechanisms observed in severe state of cancer cachexia. We observe that alteration of hepatic mitochondrial metabolism appear last during the development of cancer cachexia. In severe state of cancer cachexia, skeletal muscle mitochondria don't develop this alteration but demonstrated a decrease of oxidative capacities.

Key words: cancer cachexia, mitochondria, ATP synthesis, cardiolipine, reactive oxygen species.

# Table des matières

Remerciements .....	3
Résumé .....	5
Résumé en anglais .....	5
Table des matières .....	6
Liste des tableaux .....	11
Liste des figures .....	12
Abréviations .....	15
Avant-propos.....	17
I- Revue bibliographique.....	21
I. La cachexie.....	22
A. Définition de la cachexie cancéreuse .....	22
B. Impact de la cachexie cancéreuse sur le patient.....	23
C. Le diagnostic de cachexie.....	23
D. Prévalence de la cachexie cancéreuse .....	24
E. Symptômes de la cachexie cancéreuse.....	25
1. L'inflammation systémique.....	25
2. L'anorexie .....	31
3. Les altérations du métabolisme glucidique et le cycle de Cori.....	35
4. La fonte adipeuse.....	39
5. La fonte musculaire .....	42
F. Les facteurs tumoraux .....	49
1. Le LMF (Lipid Mobilizing factor) .....	49
2. Le PIF (Proteolysis-Inducing factor).....	50
II. Le métabolisme mitochondrial .....	51
A. La mitochondrie .....	51
1. La membrane externe mitochondriale.....	52
2. Les sites de contact mitochondriaux.....	52
3. La membrane interne mitochondriale.....	53
4. Les cardiolipines, constituants spécifiques des membranes mitochondriales.....	54
B. La phosphorylation oxydative .....	55
1. La chaîne respiratoire .....	56
2. La force proton-motrice.....	59

3.	L'ATP synthase .....	59
C.	Production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène.....	60
1.	Production d'ERO par le complexe I .....	61
2.	Production d'ERO par le complexe III.....	62
3.	Impact de la production mitochondriale d'ERO sur la phosphorylation oxydative. 63	
D.	Régulation de la phosphorylation oxydative .....	64
1.	Régulation de l'intensité de la respiration.....	64
2.	Régulation de l'efficacité de la synthèse de l'ATP .....	68
3.	Rôle des ERO dans la régulation de la phosphorylation oxydative. ....	74
4.	Rôle des CL dans la régulation de la phosphorylation oxydative .....	76
5.	Impacts physiologiques du découplage de la phosphorylation oxydative. ....	78
III.	Métabolisme énergétique et cachexie cancéreuse.....	80
A.	Diminution des apports énergétiques lors de la cachexie cancéreuse .....	80
B.	Dépenses énergétiques lors de la cachexie cancéreuse .....	81
1.	La dépense énergétique .....	81
2.	La DER et la cachexie cancéreuse .....	82
3.	Mécanismes pouvant expliquer l'augmentation de la DER lors de la cachexie. ....	83
C.	Le métabolisme énergétique mitochondrial dans la cachexie cancéreuse .....	85
1.	Le métabolisme énergétique mitochondrial musculaire dans la cachexie cancéreuse. .....	86
2.	Le métabolisme énergétique mitochondrial hépatique dans la cachexie cancéreuse. .....	87
II-	Travaux personnels.....	92
I.	Matériels et méthodes.....	93
A.	Animaux et Cellules.....	93
1.	Animaux.....	93
2.	Les Cellules et le Modèle tumoral.....	93
B.	Expérimentation animale - Conception des études .....	94
1.	Bioénergétique mitochondriale musculaire au stade sévère de cachexie cancéreuse .....	95
2.	Rôles des CL, des ERO et de leurs effets combinés sur le gaspillage énergétique des mitochondries hépatiques.....	97
3.	Cinétique d'apparition des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse.....	99

C.	Etude du fonctionnement mitochondrial .....	102
1.	Isolement des mitochondries hépatiques et musculaires.....	102
2.	Dosage des protéines .....	103
3.	Enrichissement des membranes mitochondriales en CL et phosphatidyléthanolamine.....	103
4.	Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale.....	104
5.	Mesure de l'activité de la cytochrome-c-oxydase.....	105
6.	Détermination de l'efficacité de la synthèse de l'ATP.....	105
7.	Détermination de la cinétique du gaspillage énergétique.....	107
8.	Mesure de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitochondriale.....	108
9.	Détermination du contenu en CL .....	109
10.	Détermination du contenu en PE des membranes mitochondriales .....	109
11.	Mesure du contenu en complexe de la chaîne respiratoire.....	110
D.	Etude de l'expression génique.....	112
1.	L'extraction des ARN .....	112
2.	La transcription inverse .....	113
3.	Conception des amorces.....	113
4.	La qPCR .....	114
E.	Etude morphologique du muscle squelettique .....	116
1.	Détermination de l'aire des sections transversales des fibres .....	116
2.	Détermination du typage musculaire.....	116
F.	Statistiques .....	118
II.	Résultats et discussions .....	119
A.	Bioénergétique mitochondriale musculaire au stade sévère de cachexie cancéreuse	119
1.	La fonte musculaire dans le modèle de cachexie cancéreuse : aspects quantitatifs et qualitatifs.....	120
2.	Authentification de l'activation de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-ATP dépendante.....	122
3.	Altération de la bioénergétique mitochondriale musculaire au stade de cachexie cancéreuse sévère. Rôle des ERO, du contenu en CL et de l'expression des protéines découplantes UCP2 et UCP3.....	122
4.	Discussion .....	126
B.	Rôles des CL, des ERO et de leurs effets combinés sur le gaspillage énergétique des mitochondries hépatiques.....	132

1.	Influence de l'augmentation du contenu en CL .....	134
2.	Influence de l'augmentation de la production d'ERO.....	136
3.	Effet conjoint de l'augmentation du contenu en CL et de la production d'ERO ...	139
4.	Discussion .....	142
C.	Cinétique d'apparition des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse. ....	147
1.	Evolution de la fonte adipeuse et musculaire lors de la cachexie cancéreuse.....	148
2.	Evolution de la bioénergétique mitochondriale hépatique lors de la cachexie cancéreuse .....	151
3.	Evolution de facteurs influençant la bioénergétique mitochondriale lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	154
4.	Discussion : .....	156
III-	Conclusions générales & Perspectives .....	161
A.	Altérations du métabolisme mitochondrial musculaire lors de la cachexie cancéreuse.	162
B.	Effets de l'enrichissement en CL et/ou de l'augmentation de la production d'ERO sur la bioénergétique mitochondriale hépatique .....	164
C.	Un lien possible entre le développement de la cachexie cancéreuse et les altérations mitochondriales .....	167
D.	Cinétique d'installation des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse .....	168
IV-	Fiches techniques.....	170
	Fiche technique n° : 1 Culture Cellulaire.....	171
	Fiche technique n° : 2 Isolement des mitochondries hépatiques.....	173
	Fiche technique n° : 3 Isolement des mitochondries musculaires.....	174
	Fiche technique n° : 4 Dosage des protéines.....	175
	Fiche technique n° : 5 Enrichissement des membranes mitochondriales en CL et PE .	176
	Fiche technique n° : 6 Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale .....	178
	Fiche technique n° : 7 Mesure de l'activité de la cytochrome-c-oxydase.....	180
	Fiche technique n° : 8 Détermination de l'efficacité de la synthèse d'ATP .....	181
	Fiche technique n° : 9 Détermination de la cinétique du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante .....	183
	Fiche technique n° : 10 Mesure de la production d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mitochondriale.....	185
	Fiche technique n° : 11 Détermination du contenu en cardiolipines.....	187
	Fiche technique n° : 12 Détermination du contenu en phosphatidyléthanolamines .....	189

Fiche technique n° : 13 Détermination du contenu en complexes de la chaîne respiratoire par western-blot.....	190
Fiche technique n° : 14 Extraction des Acides RiboNucléiques.....	193
Fiche technique n° : 15 La transcription inverse.....	195
Fiche technique n° : 16 LqPCR.....	196
Fiche technique n° : 17 Coloration des fibres musculaires à l'azorubine .....	197
Fiche technique n° : 18 Révélation de l'activité ATPasique sur coupes histologiques de muscle.....	198
Fiche technique n° : 19 Révélation de l'activité Succinate déshydrogénase sur coupes histologiques de muscle .....	200
Bibliographie.....	201
Publications et Communications.....	230
Annexes .....	233
Articles.....	238

## Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Contenu et composition en acides gras des cardiolipines et corrélation avec la consommation d'oxygènes en condition non phosphorylante dans les mitochondries hépatiques isolées de rats atteints de carcinose péritonéale et de rats contrôles, appariés pour la prise alimentaire.....	90
<b>Tableau II :</b> Description des anticorps utilisés. ....	111
<b>Tableau III :</b> Masses des principaux muscles du membre inférieur des rats cachectiques et pair-fed. ....	120
<b>Tableau IV :</b> Consommation d'oxygène des mitochondries isolées de <i>quadriceps</i> des rats cachectiques et pair-fed. ....	124
<b>Tableau V :</b> Production d'ERO et contenu en CL des mitochondries musculaires isolées des <i>quadriceps</i> des rats cachectiques et des rats pair-fed. ....	124
<b>Tableau VI :</b> Masses brutes du tissu adipeux des rats sains, pair-fed et cancéreux aux différents points de cinétique. ....	149
<b>Tableau VII:</b> Masses brutes du tissu musculaire des rats sains, pair-fed et cancéreux aux différents points de cinétique. ....	150
<b>Tableau VIII :</b> Masses brutes du foie des rats sains, pair-fed et cancéreux aux différents points de cinétique.....	154
<b>Tableau IX :</b> Evolution de la production d'ERO des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	155
<b>Tableau X :</b> Evolution du contenu en CL des mitochondries hépatiques isolées lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	156
<b>Tableau XI :</b> Récapitulatif de l'apparition des symptômes de la cachexie cancéreuse, évoqués par le collègue d'expert, dans notre modèle.....	158

## Liste des figures

Figure 1 : La cachexie et ses principaux symptômes. Schéma de Venn.....	22
Figure 2 : Stades de la cachexie cancéreuse.....	24
Figure 3 : Recrutement et migration des neutrophiles. ....	26
Figure 4 : Détournement de la réaction inflammatoire par la tumeur.....	29
Figure 5 : Régulation hypothalamique de la prise alimentaire.....	34
Figure 6 : Mécanisme d'action de l'insuline sur les tissus insulino-dépendant.....	38
Figure 7 : Hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux .....	41
Figure 8 : La voie de dégradation ubiquitine-protéasome-ATP dépendante.....	45
Figure 9 : Voie de la protéosynthèse IGF1 et voie de protéolyse par activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et FOXO.....	47
Figure 10 : Schéma récapitulatif des symptômes cachectiques développés en réponse au développement tumoral.....	48
Figure 11 : Organisation structurale de la mitochondrie.....	51
Figure 12 : Transport des protéines à forts poids moléculaire à travers la membrane externe mitochondriale.....	52
Figure 13 : Interactions protéiques des sites de contact mitochondriaux.....	53
Figure 14 : Les crêtes mitochondriales de la membrane interne.....	54
Figure 15 : Cardiolipine. ....	54
Figure 16 : Schéma de la phosphorylation oxydative. ....	55
Figure 17 : Le cycle Q et le transfert des électrons du CoQH <sub>2</sub> au cytochrome c.....	58
Figure 18 : Transfert des électrons, pompage de proton et réduction de la molécule d'oxygène en molécule d'eau par le complexe IV. ....	59
Figure 19 : Structure de l'ATP synthase. ....	60
Figure 20 : Production d'ERO par le flux inverse des électrons.....	62
Figure 21 : Les supercomplexes.....	66
Figure 22 : Découplage induit par les acides gras libre : hypothèse d'un découplage par « flip flop » d'acides gras protonés.....	72
Figure 23 : Modèle de l'activation de l'ANT et des UCP par les ERO via la peroxydation lipidique et voie d'action de MitoPBN.. ....	75
Figure 24 : Stabilisation des supercomplexes par interaction avec les cardiolipines.....	77

Figure 25 : Effet de la cachexie cancéreuse sur l'efficacité de la synthèse d'ATP et le gaspillage énergétique en condition non phosphorylante des mitochondries hépatiques isolées.....	89
Figure 26 : Protocole expérimental de l'étude I - Bioénergétique mitochondriale musculaire au stade sévère de cachexie cancéreuse .....	96
Figure 27 : Protocole expérimental de l'étude III – Cinétique d'apparitions des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse.....	101
Figure 28 : Mesure de la consommation d'oxygène – Les différents états respiratoires. ....	105
Figure 29 : Détermination du typage musculaire par coloration histologiques. ....	117
Figure 30: Distribution des fibres musculaires en fonction de leurs aires transversales dans le <i>quadriceps</i> des rats cachectiques et pair-fed. ....	121
Figure 31 : Aire moyenne des différents types de fibres musculaires dans le <i>quadriceps</i> des rats cachectiques et pair-fed. ....	121
Figure 32 : Expressions normalisées des gènes <i>atrogine 1</i> et <i>MURF 1</i> , marqueurs de la protéolyse musculaire, dans le muscle <i>quadriceps</i> . ....	122
Figure 33 : Efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries isolées de <i>quadriceps</i> des rats cachectiques et pair-fed. ....	123
Figure 34: Expression génique des protéines découplantes UCP2 et UCP3 dans les mitochondries isolées des rats cachectiques et pair-fed. ....	125
Figure 35 : Expression protéique et activité de la cytochrome-c-oxydase (COX) dans les mitochondries musculaires isolées des rats cachectiques et des rats pair-fed.....	125
Figure 36 : Relation entre l'activité de la COX et la consommation d'oxygène à l'état découplé dans les mitochondries musculaires isolées.....	126
Figure 37 : Enrichissement des mitochondries hépatiques en CL et en phosphatidyléthanolamine.....	134
Figure 38 : Effet de l'enrichissement en CL et en PE sur l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques. ....	135
Figure 39 : Effet de l'enrichissement en CL sur le gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques.....	135
Figure 40 : Augmentation de la production exogène d'ERO par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase. ....	136
Figure 41 : Effet de l'augmentation de la production d'ERO sur l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques. ....	137

Figure 42 : Effet de l'augmentation de la production d'ERO sur le gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques. ....	138
Figure 43 : Effet d'une forte augmentation d'ERO et de l'antioxydant mitoTEMPO sur la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique des mitochondries hépatiques. ....	138
Figure 44 : Contenu en CL et augmentation de la production d'ERO des mitochondries enrichies en CL et en présence d'une forte dose de xanthine oxydase et des mitochondries contrôles. ....	139
Figure 45 : Effet conjoint de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur l'efficacité de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques.....	140
Figure 46 : Effet conjoint de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur le gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques.....	140
Figure 47 : Effet d'un enrichissement en CL et/ou d'une augmentation de la production d'ERO et du développement d'une cachexie cancéreuse induite par carcinose péritonéale sur la bioénergétique mitochondriale hépatique.....	141
Figure 48 : Schématisation des points de cinétique .....	147
Figure 49 : Evolution du poids des rats lors du développement de la cachexie cancéreuse. .	148
Figure 50 : Evolution de la masse adipeuse lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	149
Figure 51: Evolution de la masse musculaire lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	150
Figure 52 : Evolution de l'expression génique d'atrogine 1 et de MURF 1 dans le muscle squelettique lors du développement de la cachexie cancéreuse.....	151
Figure 53 : Evolution de l'efficacité de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	152
Figure 54 : Evolution du gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	152
Figure 55 : Consommation d'oxygène en fonction des différents états respiratoires des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	153
Figure 56 : Evolution de la masse hépatique lors du développement de la cachexie cancéreuse. ....	154

## Abréviations

**4HNE** : 4-hydroxy-2-nonéal  
 **$\alpha$ MSH** :  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone  
**Ac** : Anticorps  
**ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire  
**ADP** : Adénosine 5'-diphosphate  
**AgRP** : Agouti-related protein  
**AMPc** : Adénosine Monophosphate cyclique  
**ANT** : Adenine nucleotide translocase, translocase des acides nucléiques  
**APR** : acute phase response, phase de réponse aiguë  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ARNm** : Acide ribonucléique messenger  
**ATP** : Adénosine 5'-triphosphate  
**BSA** : Sérum albumine bovine  
**CART** : Cocaine/amphétamine regulated transcript  
**CAT** : carboxyatractylate  
**CCL2** : C-C motif ligand 2  
**CD** : Cellules Dendritiques  
**CHO** : Chinese hamster ovary, cellules d'ovaires de hamster  
**CL** : Cardiolipines  
**CoQ (H<sub>2</sub>)** : Coenzyme Q (forme réduite)  
**COX** : Cytochrome c oxydase  
**CRP** : Protéine réactive C  
**Ct** : Threshold cycle, cycle seuil  
**DER** : Dépense énergétique de repos  
**DET** : Dépense énergétique totale  
**DMSO** : Diméthyl sulfoxyde  
**DPBS** : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline  
**e<sup>-</sup>** : Electrons  
**EDL** : muscle extenseur long des doigts  
**EGF** : Epithelial Growth Factor  
**ERO** : Espèces réactives de l'oxygène  
**ESL1** : Endothelial Selectin Ligand 1  
**E-Slectine** Endothéliale-sélectines  
**FAD (H<sub>2</sub>)** : flavine adénine dinucléotide hydrogénée (forme réduite)  
**FCCP** : carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone  
**FGF** : Fibroblast Growth Factor  
**GM-CSF** : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor  
**GPx** : Glutathion peroxydase  
**GTP** : Guanosine triphosphate  
**H<sup>+</sup>** : Protons  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**HIF** : Hypoxic inducing factor, facteur induit par l'hypoxie  
**hsc** : Heat-shock cognate protein  
**ICAM** : Intercellular Cell Adhesion Molecule  
**IF<sub>1</sub>** : Inhibiteur du segment F1  
**IFN $\gamma$**  : Interféron  $\gamma$   
**IL** : Interleukine

**kDa** : kilo Dalton  
**KO** : Knock-Out, délété  
**LHS** : Lipase hormono-sensible  
**LMF** : Lipid mobilising factor  
**LPL** : Lipoprotéine lipase  
**LT** : Lymphocyte T  
**MGL** : Monotriglycérides lipase  
**MICOS** : mitochondrial contact site  
**MURF 1** : Muscle-specific RING finger protein 1  
**mV** : Millivolt  
**NADH** : nicotinamide-adénine dinucléotide hydrogéné  
**NF- $\kappa$ B** : facteur nucléaire  $\kappa$  B  
**NO** : Monoxyde d'azote  
**NPY** : neuropeptide Y  
**NTS** : Noyau du tractus solitaire  
**O<sub>2</sub>** : dioxygène  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : Anion superoxyde  
**PE** : Phosphatidyléthanolamine  
**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule  
**PCR** : Polymerase chain reaction, réaction de polymérisation en chaîne  
**PF** : Pair-fed  
**Pi** : Phosphate inorganique  
**PI3K/Akt/mTOR** : Phosphatidylinositol3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin  
**PIF** : Proteolysis inducing factor, facteur d'induction de la protéolyse  
**PKC** : Protéine kinase C  
**PNN** : Polynucléaires neutrophiles  
**POMC** : Pro-opio mélanocortine  
**P-Sélectine** : Plaquettaire-sélectine  
**PSGL1** : Platelet Selectin Glycoprotein Ligand 1  
**qPCR** : PCR quantitative  
**RMN** : Résonance magnétique nucléaire  
**RCOO<sup>·</sup>** : Peroxyde d'hydrogène, radicaux libres  
**SDH** : Succinate deshydrogénase  
**SOD** : Superoxyde dismutase  
**SVF** : Sérum de veau foetal  
**TAM** : tumor-associated macrophage, macrophage associé à la tumeur  
**TGF $\beta$**  : Transforming growth factor  $\beta$   
**TGLA** : Triglycéride lipase spécifique du tissu adipeux  
**TIM** : Translocase of inner membrane, translocase de la membrane interne  
**TNF $\alpha$**  : Tumor necrosis factor  $\alpha$ , facteur de nécrose tumorale  
**TOB** : Translocase of outer membrane  $\beta$ -barrel proteins  
**TOM** : Translocase of outer membrane, Translocase de la membrane externe  
**UCP** : Protéine découplante  
**VCAM** : Vascular Cell Adhesion Molecule  
**VDAC** : Voltage dependant anionic channel, porine membranaire  
**VEGF** : Vascular endothelial growth factor  
**ZAG** : Zinc- $\alpha$ -2 glycoprotein, la glycoprotéine zinc  $\alpha$  2

# Avant-propos

La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel, complexe et progressif. Elle est caractérisée par le développement d'une inflammation systémique, une diminution de la prise alimentaire et des altérations métaboliques provoquant une balance énergétique négative responsable de pertes tissulaires adipeuses et musculaires. Cette perte de masse ne peut être inversée par un support nutritionnel conventionnel et provoque une diminution des capacités physiques et de la qualité de vie du patient. Ces bouleversements métaboliques et fonctionnels sont associés à une moindre tolérance aux traitements anti-cancéreux et provoquent inéluctablement le décès du patient (Fearon et al, 2011). Ce syndrome touche plus de 30 % des patients atteints de cancer du poumon et du colon (Pressoir et al, 2010) qui sont, avec le cancer du sein et de la prostate, les cancers les plus fréquents en France et en Europe (données de l'ARC pour la France, 2010 et de l'agence internationale pour la recherche contre le cancer, 2008). La lutte contre ce syndrome est donc un véritable enjeu de santé publique et il est urgent de développer des traitements efficaces et précoces pour contrer ce processus. Cependant, pour traiter efficacement les patients, il est nécessaire de comprendre l'ensemble des mécanismes impliqués dans ce syndrome.

La perte de poids, résultante du développement de la cachexie, a été montrée pour être étroitement liée à la diminution des chances de survie du patient (Dewys et al, 1980). Les travaux de Falconner et de ses collaborateurs ont montré un lien entre la perte de poids observée lors de la cachexie cancéreuse et la dépense énergétique de repos (Falconner et al, 1994). Le foie et muscle squelettique étant les déterminants majeurs de cette dépense énergétique de repos (Illner et al, 2000), une altération de leur métabolisme peut avoir une répercussion sur l'ensemble de l'organisme et participer à la perte de poids observée lors de la cachexie cancéreuse. Le métabolisme de ces organes est donc le sujet de nombreuses études traitant de la cachexie cancéreuse.

A l'échelle cellulaire, le métabolisme est régi par la mitochondrie qui fournit 90% de notre énergie sous forme d'ATP. Cette énergie est synthétisée au sein de la phosphorylation oxydative qui se compose de 2 entités : la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Les équivalents réduits, issus de l'alimentation, sont oxydés par les complexes de la chaîne respiratoire déclenchant un transfert d'électrons jusqu'à un accepteur final, l'O<sub>2</sub>. Ce transfert d'électrons est associé à un pompage de protons vers l'espace inter-membranaire, créant un gradient électrochimique ou force proton-motrice qui est utilisée par l'ATP synthase pour coupler le retour des protons vers la matrice mitochondriale à la phosphorylation d'un ADP

en ATP. Il existe donc un couplage entre l'oxydation des équivalents réduits et la phosphorylation de l'ADP en ATP réalisée par l'ATP synthase, dont le degré définit l'efficacité de la synthèse d'ATP.

Le découplage de la phosphorylation oxydative est associé à un gaspillage énergétique qui participe à l'augmentation des dépenses énergétiques. Une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP au niveau mitochondrial pourrait donc expliquer en partie l'hypermétabolisme observé lors de la cachexie cancéreuse. Cependant, le rôle joué par la mitochondrie dans ce syndrome est encore peu documenté.

Les résultats antérieurs, obtenus au laboratoire, ont montré que l'efficacité de la synthèse d'ATP était significativement diminuée dans les mitochondries hépatiques des rats au stade de cachexie cancéreuse sévère induite par une carcinose péritonéale. Cette altération était concomitante à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à une augmentation du contenu en cardiolipines (CL) des membranes mitochondriales hépatiques et pouvait en partie s'expliquer par une augmentation du gaspillage énergétique en condition non-phosphorylante. La perte d'efficacité de la synthèse d'ATP implique une utilisation accrue des nutriments énergétiques afin de maintenir une quantité d'ATP suffisante pour satisfaire les besoins énergétiques de l'organe. Dans une situation où la prise alimentaire est diminuée par la présence d'une anorexie, ce mécanisme participerait à l'augmentation des dépenses énergétiques et donc à la perte de poids observée lors de la cachexie cancéreuse.

**Le premier objectif de cette thèse** était d'analyser la bioénergétique mitochondriale dans le muscle squelettique, acteur majeur de la dépense énergétique de repos et cible principale du processus cachectique. Notre hypothèse était qu'un gaspillage énergétique dans les mitochondries musculaire en stade de cachexie cancéreuse sévère pouvait participer à l'hypermétabolisme observé lors de ce syndrome.

**Le deuxième objectif de cette thèse** était d'explorer les mécanismes impliqués dans l'augmentation du gaspillage énergétique mitochondrial hépatiques observée en stade très sévère de cachexie cancéreuse lors des précédents travaux de l'équipe.

Ce processus était concomitant à une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et à une augmentation du contenu en cardiolipines des membranes mitochondriales

(Dumas *et al*, 2011). Ces paramètres ayant déjà été montrés pour influencer le fonctionnement énergétique mitochondrial, ils pourraient être impliqués dans le gaspillage énergétique observé dans notre modèle. Cette étude a donc eu pour but de déterminer si une augmentation du contenu en cardiolipines et/ou une augmentation de la production d'ERO pouvaient mimer la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP et le gaspillage énergétique observés en stade sévère de cachexie cancéreuse.

**Le troisième objectif de cette thèse** était de déterminer la cinétique d'installation des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse. L'ensemble des résultats obtenus au laboratoire a été acquis dans le modèle de cachexie cancéreuse en stade sévère. Il était donc important de connaître la cinétique d'installation des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques, afin de définir les implications exactes des altérations mitochondriales observées sur le développement de ce syndrome.

# I- Revue bibliographique

# I. La cachexie

Le terme cachexie vient des mots grecs « kakos » et « hexis » qui signifie littéralement « mauvaise condition ». Son association à de nombreuses pathologies telles que l'insuffisance cardiaque (Anker et al, 1997), la broncho-pneumopathie chronique obstructive (Congleton, 1999), les maladies chroniques du rein (Fouque et al, 2008), le SIDA (Beal et al, 1995) ou le cancer rend sa description physiopathologique difficile. Jusqu'en 2006, il n'existait aucune définition officielle de la cachexie. Cette situation entraînait une absence de diagnostic clair, ne permettant pas une prise en charge optimale de ce syndrome. La communauté scientifique s'est donc mobilisée sur ce problème et a permis la mise en place d'une définition.

## A. Définition de la cachexie cancéreuse

La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel caractérisé par une balance énergétique négative qui mène à une sévère perte de poids, de masse grasse et musculaire et qui ne peut être inversée par les supports nutritionnels conventionnels.

Ce syndrome est étroitement associé au développement d'une anorexie, d'une inflammation systémique et à de multiples altérations métaboliques (glucidiques, lipidiques et protéiques). (Fearon et al, 2011; Muscaritoli et al, 2010)

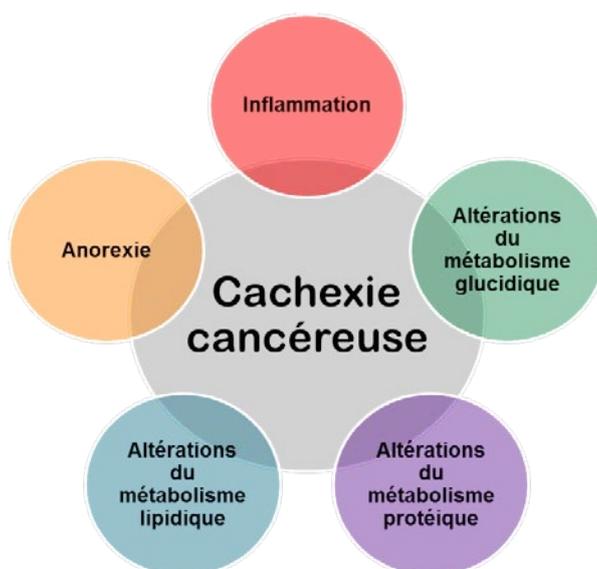


Figure 1 : La cachexie et ses principaux symptômes. Schéma de Venn

L'inflammation semble avoir un rôle pivot dans le développement de la cachexie (Deans & Wigmore, 2005) et serait corrélée à la perte de poids observée lors de ce syndrome (Deans et al, 2006; McMillan, 2009).

## B. Impact de la cachexie cancéreuse sur le patient.

La cachexie cancéreuse est un syndrome progressif, présent dès les premiers stades du développement tumoral. La perte continue de masse musculaire va entraîner un affaiblissement du patient menant à une diminution de ces capacités physiques, de son activité et de sa qualité de vie (Dodson et al, 2011). La progression de la cachexie cancéreuse est donc associée à une dégradation physique qui diminue les capacités de réponses aux traitements anticancéreux et conduit à une plus grande toxicité de ces traitements (Antoun et al, 2010). La cachexie cancéreuse mène donc à une morbidité et une mortalité accrues du patient.

## C. Le diagnostic de cachexie

Le diagnostic de cachexie cancéreuse est généralement déclaré pour un patient présentant une perte de poids supérieure à 5% de son poids initial sur les 6 derniers mois (Fearon et al, 2011). Il peut être confirmé par la présence d'une inflammation systémique et le développement de l'anorexie (l'anorexie est cliniquement définie par une prise alimentaire couvrant moins de 70% des besoins estimés).

Les récents travaux d'un panel d'expert ont permis de définir trois stades du développement de la cachexie cancéreuse chez l'humain (Fearon et al, 2011) (Figure 2) :

- **le stade de pré-cachexie**, caractérisé par une perte de poids inférieure à 5 % du poids habituel du patient sur les 6 derniers mois et le développement d'une anorexie. Ce stade peut aussi être associé une inflammation aiguë ou récurrente (Muscaritoli et al, 2010).
- **le stade de cachexie propre**, associé à une perte de poids supérieure à 5 % du poids habituel du patient sur les 6 derniers mois, une inflammation systémique et à une fonte musculaire.

- le stade de cachexie réfractaire, défini par un état pro-catabolique et une perte des capacités musculaires. Ce stade est associé à une résistance aux traitements et à une espérance de vie inférieure à 3 mois.

La cinétique de développement des différents stades de la cachexie cancéreuse semble, cependant, varier en fonction du type de cancer et des caractéristiques du patient.

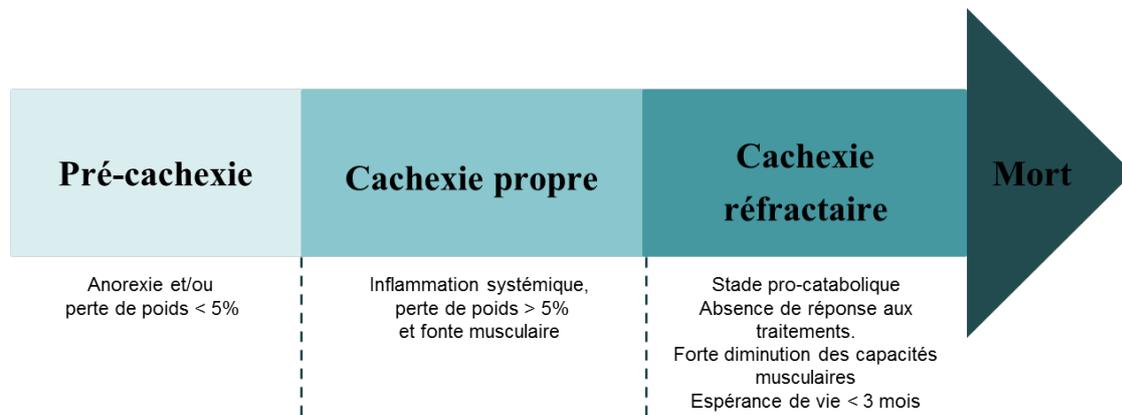


Figure 2 : **Stades de la cachexie cancéreuse.**  
(d'après Fearon et al, 2011)

L'identification d'un stade de pré-cachexie est une réelle avancée clinique et scientifique. Elle pourrait notamment permettre de faciliter l'identification de marqueurs précoces de ce syndrome.

## D. Prévalence de la cachexie cancéreuse

Ce syndrome ne touche pas tous les types de cancer de manière similaire. Les récents travaux de Pressoir et col. ont étudié la prévalence des formes sévères de ce syndrome en fonction du cancer diagnostiqué sur un panel de 1545 patients français (Pressoir et al, 2010). Ces travaux ont mis en évidence que les formes sévères du syndrome étaient faiblement représentées dans le cancer du sein (approximativement 18%) mais touchaient près de la moitié des patients atteints de cancer digestif (49,5 %) (Pressoir et al, 2010). Elles étaient notablement présentes chez 40% des patients atteints de cancer pulmonaire, et 31% des patients atteints de cancer colorectal. Ces cancers étant, avec le cancer du sein et de la prostate, les cancers prédominants en France et en Europe (sources ARC France, 2010 et société internationale de recherche contre le cancer, 2008), la lutte contre ce syndrome est donc un enjeu majeur.

## E. Symptômes de la cachexie cancéreuse

### 1. L'inflammation systémique

L'inflammation est une réponse adaptative immunitaire, déclenchée en réponse à une agression de l'organisme.

#### a. Mécanismes de l'inflammation

##### 1) Reconnaissance de l'agent initiateur de l'inflammation

Il a été montré que les lignées cellulaires tumorales et les cellules tumorales issues de patients cancéreux sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine 6 (IL6) et une cytokine chimio-attractante (ou chimiokine), l'IL8 (Sakamoto et al, 1992). L'IL6 va provoquer l'activation des cellules endothéliales avoisinantes, induisant l'expression de protéines d'adhésion membranaire, les E-sélectines (endothéliale-sélectines) et P-sélectines (plaquettaire-sélectines). L'IL8 va participer au recrutement et à la capture des cellules immunitaires. Les cellules endothéliales activées vont aussi sécréter l'IL8 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires, l'IL1 et le facteur de nécrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), qui sont indispensables à l'adhésion des cellules immunitaires. (Martignoni et al, 2005)

##### 2) Recrutement et migration des polynucléaires neutrophiles sur le site inflammatoire

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont les premières cellules immunitaires recrutées sur le site inflammatoire. Les sélectines exprimées par les cellules endothéliales se lient aux récepteurs ESL1 (Endothelial Selectin Ligand 1) et PSGL1 (Platelet Selectin Glycoprotein Ligand 1) exprimés à la surface des PNN. La liaison sélectine/récepteur et l'action des cytokines IL1 et TNF $\alpha$ , permet l'expression et l'activation des intégrines  $\beta_2$  et  $\alpha_1\beta_2$  (ou LFA1) et des intégrines  $\alpha_M\beta_2$  (ou Mac1) des PNN (Figure 3A2). Ces intégrines sont alors capables de se fixer sur les molécules d'adhésion cellulaire ICAM (Intercellular Cell Adhesion Molecule) et VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) exprimées par les cellules endothéliales, induisant l'adhésion ferme du PNN aux parois vasculaires (Figure 3A3). Une fois le PNN

adhéré, la sécrétion d'IL8 et l'expression de molécules d'adhésion PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule) permettent aux PNN de réaliser un phénomène de diapédèse pour arriver sur le site inflammatoire. (Bru et al, 2009; Wagner & Roth, 2000) (Figure 3A4). Les PNN vont alors effectuer une dégranulation, entraînant la libération de systèmes oxydatifs (espèces réactives de l'oxygène), de substances antimicrobiennes et de protéases pour permettre la dégradation de l'agent initiateur de la réaction inflammatoire (Faurischou & Borregaard, 2003).

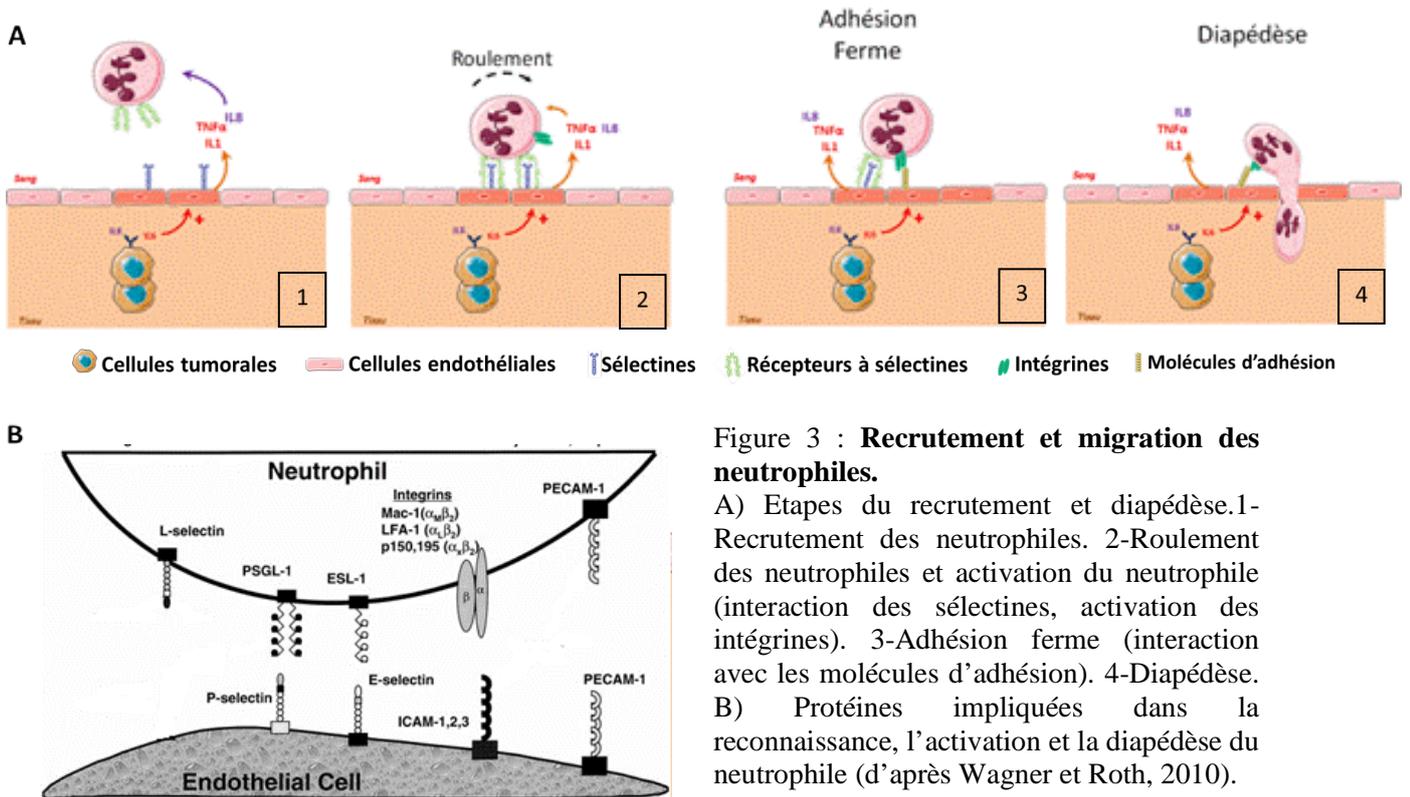


Figure 3 : **Recrutement et migration des neutrophiles.**

A) Etapes du recrutement et diapédèse. 1-Recrutement des neutrophiles. 2-Roulement des neutrophiles et activation du neutrophile (interaction des sélectines, activation des intégrines). 3-Adhésion ferme (interaction avec les molécules d'adhésion). 4-Diapédèse. B) Protéines impliquées dans la reconnaissance, l'activation et la diapédèse du neutrophile (d'après Wagner et Roth, 2010).

### 3) Amplification de la réaction inflammatoire.

La migration des PNN est suivie du recrutement massif des monocytes. Ces monocytes vont alors infiltrer le tissu inflammatoire, où la présence de cytokines et autres médiateurs de l'inflammation (notamment l'interféron  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), le  $TNF\alpha$  et l'IL 12) leur permettront de subir une maturation en macrophage. Les macrophages sont ensuite guidés sur le site inflammatoire par les chimiokines et combattent les agents infectieux et tumoraux par des mécanismes de phagocytose et des agents cytotoxiques. Les macrophages vont aussi sécréter une grande variété de médiateurs de l'inflammation (cytokines pro-inflammatoires, chimiokines, protéases). Les chimiokines sécrétées par les macrophages et l'environnement

inflammatoire vont permettre le recrutement des cellules dendritiques (CD). Ces cellules vont effectuer le lien entre la réponse immunitaire innée (action des neutrophiles et des macrophages) et la réponse immunitaire adaptative, plus spécifique, réalisée par les lymphocytes T (LT). Les cellules dendritiques sont spécialisées dans la capture, le transport et la présentation des antigènes des agents inflammatoires aux LT naïfs. La présentation de l'antigène permettra l'activation des LT et l'initiation de la réponse immunitaire adaptative. Les CD immatures possèdent un grand nombre de récepteurs aux chimiokines et de forte capacité de capture d'antigène. Elles devront, cependant, subir une étape de maturation pour acquérir leur capacité de cellules « présentatrices d'antigène ». Cette maturation est assurée par les cytokines et les facteurs inflammatoires sécrétés par les macrophages et l'environnement inflammatoire (et particulièrement par l'IL 4, l'IL 12, l'IL 13 et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor)). (Coussens & Werb, 2002; Jakobisiak et al, 2003)

Les cellules immunitaires, par le biais des chimiokines, cytokines pro-inflammatoires et autres médiateurs de l'inflammation (notamment le TNF $\alpha$ , l'IL1 et l'IL6), vont permettre l'entretien de la réaction inflammatoire jusqu'à destruction de l'agent initiateur. En cas de persistance de l'agent initiateur, la réponse inflammatoire peut évoluer vers un état de chronicité. Cette inflammation chronique est caractérisée par une accumulation anormale de cellules immunitaires et par le relargage constant de cytokines pro-inflammatoires et de médiateurs de l'inflammation.

#### 4) Résolution de l'inflammation.

Lorsque l'agent initiateur (agent infectieux, cellules tumorales) a pu être éliminé, l'inflammation entre dans une phase de résolution. Les mécanismes impliqués dans l'initiation de cette phase restent encore méconnus. La cytokine IL10 semble avoir un rôle prépondérant dans ce mécanisme de résolution. Cette cytokine, sécrétée principalement par les monocytes et les lymphocytes, possède des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Elle va notamment induire la différenciation des macrophages, le blocage de la maturation des CD et inhiber la production des cytokines pro-inflammatoires (incluant le TNF $\alpha$  et l'IL6). Les macrophages différenciés (macrophages M2) vont sécréter de nombreux facteurs pro-angiogéniques et des facteurs de croissances tels que le VEGF

(Vascular Endothelial Growth Factor), le EGF (Epithelium GF), le FGF (fibroblast GF) et le TGF $\beta$  (Transforming GF  $\beta$ ). Ces facteurs vont permettre le remodelage et la réparation du tissu et à sa néo-vascularisation (Lin & Karin, 2007; Mantovani et al, 2002).

b. Détournement de la réaction inflammatoire par la tumeur.

Bien que la réponse immunitaire anti-tumorale soit étroitement liée à la réponse inflammatoire, les cellules tumorales sont capables d'induire le détournement de la fonction des acteurs de l'immunité pour promouvoir leurs développements et la progression tumorale. Les différents facteurs et cytokines produits par la tumeur sont les protagonistes de ce mécanisme.

Une partie des cellules immunitaires est ainsi recrutée directement par les cellules tumorales et intégrée au tissu néoplasique. Les chimiokines ont un rôle pivot dans ce recrutement. Les cellules tumorales vont notamment sécréter les chimiokines IL8 et CCL2 (C-C motif ligand 2). Outre sa propriété attractante sur les monocytes, CCL2 induit aussi la différenciation des macrophages (Figure 4). Les macrophages associés à la tumeur (TAM) vont ainsi acquérir des fonctions similaires aux macrophages M2 exprimés lors de la résolution de l'inflammation. Les TAM sont les éléments clés du détournement de la réaction inflammatoire au profit du développement tumoral. Ils vont ainsi sécréter de nombreux facteurs de croissances (EGF, FGF) et des facteurs et cytokines pro-angiogéniques (VEGF et TNF $\alpha$ ) permettant le recrutement de cellules endothéliales et de fibroblastes pour la création du stroma tumoral (Figure 4). De plus, les TAM sont préférentiellement accumulés dans les régions dépourvues de vascularisation. Cette localisation induit l'expression de facteurs de transcription liés à l'hypoxie HIF2 $\alpha$  (*hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$* ) et HIF1 qui vont activer la production de VEGF et d'IL8 et stimuler l'angiogénèse.

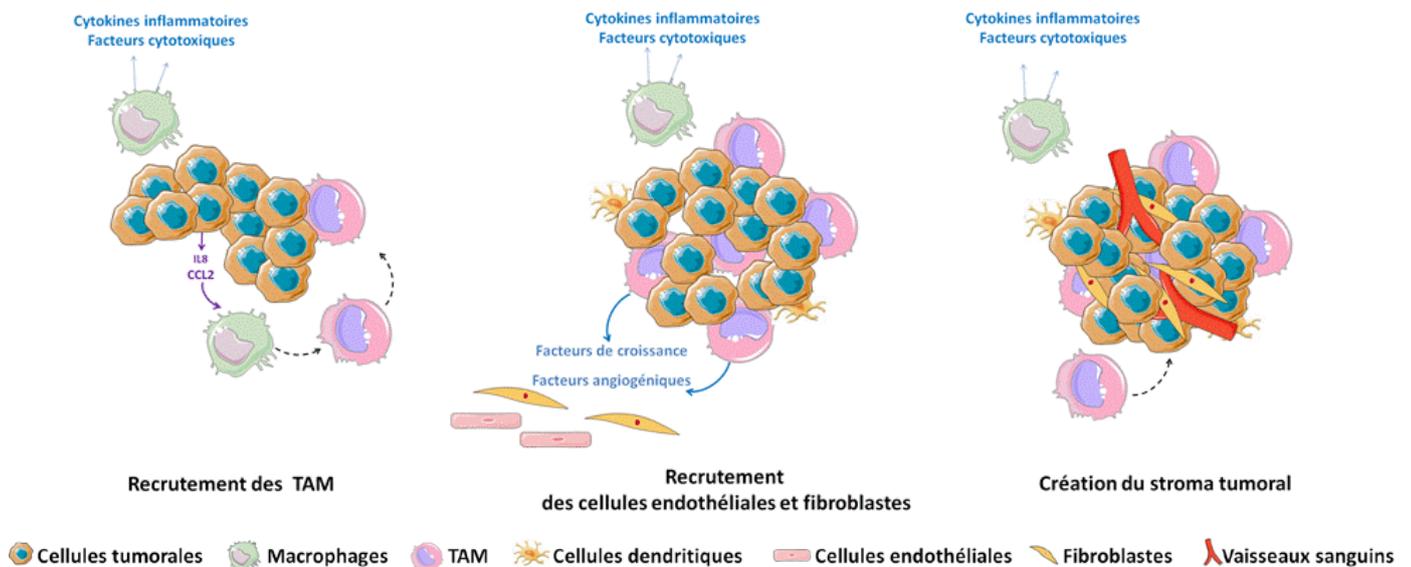


Figure 4 : **Détournement de la réaction inflammatoire par la tumeur.**

Les cellules tumorales sécrètent aussi de l'IL10 et de l'IL6 qui vont permettre le blocage de la maturation des CD. Les CD immatures seront donc en incapacité d'activer la réponse inflammatoire adaptative. Cette absence de signal de danger entraîne une tolérance du système immunitaire aux cellules tumorales. De plus, même au sein d'un même nodule tumoral, les cellules cancéreuses expriment des phénotypes hétérogènes induisant une variété d'antigènes tumoraux. Ce phénomène va fausser la réponse immunitaire adaptative déjà affaiblie par le blocage de la maturation des CD. (Mantovani et al, 2002 ; Jabobisiaz et al, 2003)

Dans le cas d'un développement tumoral où le circuit inflammatoire est détourné par la tumeur, le patient perd ces capacités d'immunité adaptative. Cependant, son immunité innée reste active, entraînant le développement d'une inflammation chronique et le relargage constant de cytokines inflammatoires dans la circulation sanguine. L'inflammation devient alors systémique et va affecter l'ensemble de l'organisme du patient.

L'inflammation systémique semble jouer un rôle central dans le développement de la cachexie cancéreuse. La concentration sérique d'IL6 a notamment été associée à la diminution de l'espérance de vie des patients atteints de cancer du poumon (Martin et al, 1999). De plus, les travaux de Strassmann et col. ont démontré que la concentration sérique d'IL6 augmentait parallèlement à la croissance tumorale chez des souris porteuses d'un adénocarcinome colique (Strassmann et al, 1992). De plus, la résection de la tumeur entraînait une chute de la

concentration sérique d'IL6 et un gain de poids (Strassman et al, 1992). Ces travaux montraient aussi que l'injection d'anticorps dirigés contre l'IL6, 6 jour après inoculation de la tumeur, permettait de réduire la perte de poids et la fonte adipeuse (Strassman et al, 1992). Les cytokines sécrétées lors de l'inflammation pourraient, en effet, expliquer, au moins en partie, les principaux symptômes observés lors de la cachexie. L'implication des cytokines a ainsi été démontrée dans la diminution de la prise alimentaire (Scarlett et al, 2007), et entraînerait l'activation de voies protéolytiques participant à la fonte musculaire (Ladner et al, 2003).

### c. La réponse de phase aiguë

En réponse à cette inflammation systémique persistante, l'organisme va se mobiliser pour lutter contre l'agent initiateur en induisant un processus de réponse de phase aiguë.

La réponse de phase aiguë est caractérisée par la production hépatique de protéines de phase aiguë permettant de lutter contre la cause de l'infection et de restaurer les dommages corporels occasionnés. La cytokine IL6 semble avoir un rôle prépondérant dans le développement de ce mécanisme (Kopf et al, 1994).

La réponse de phase aiguë va induire la synthèse de protéines de phase aiguë, telles que la protéine réactive C et le facteur du complément, qui permettront la reconnaissance du pathogène ainsi que la mobilisation et l'assistance du système immunitaire, et la production de protéines, telles que le fibrinogène, qui permettront la restauration des lésions de l'organisme. Cette synthèse implique une re-priorisation du métabolisme protéique hépatique, au détriment de la synthèse de protéines constitutives telles que l'albumine, le facteur de croissance IGF1 (*Insuline-like growth factor 1*) ou la ferritine et dépend du statut nutritionnel du patient pour l'approvisionnement de la synthèse, en acides aminés. Ainsi, lors d'une anorexie, la réduction d'apport en acides aminés va entraîner une dégradation protéique des tissus du patient (Gabay & Kushner, 1999). La nature des acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines de phase aiguë (richesse en acides aminés aromatiques) fait du muscle squelettique une cible majeure de la dégradation protéique (Reeds et al, 1994). De même, les acides aminés ingérés seront prioritairement envoyés au foie, au détriment de l'approvisionnement du muscle squelettique entraînant une incapacité de régénération.

L'implication d'une réponse de phase aiguë lors de la cachexie cancéreuse a été démontré chez des patients atteints de cancer pancréatique et de cancer du côlon, notamment, par la

diminution de la concentration plasmatique d'albumine ou l'augmentation de celle du fibrinogène (Kemik et al, 2010; Preston et al, 1998). Les travaux de Falconner et col. ont, aussi, mis en évidence qu'un taux élevé de protéine réactive C (CRP) était un marqueur négatif de la survie du patients (Falconer et al, 1994).

## 2. L'anorexie

L'anorexie se définit par une perte du désir de manger. La prévalence de l'anorexie chez les patients cancéreux a été peu étudiée. Cependant, une étude réalisée sur un large panel de patients atteints de diverses tumeurs solides en phase terminale, a déterminé une prévalence moyenne de 64 % (Pirovano et al, 1999). L'anorexie chez le patient atteint de cancer peut donc être considérée de prévalence élevée et souligne la pertinence clinique de ce symptôme.

Le développement de l'anorexie chez le patient atteint de cancer peut être lié à la localisation de la tumeur. Les cancers des voies aérodigestives supérieures peuvent, notamment, entraîner une gêne mécanique à l'alimentation. De plus, les troubles sensoriels occasionnés par le développement des tumeurs ou les traitements anticancéreux peuvent altérer la prise alimentaire (altérations du goût, perte de l'odorat, nausée, etc) (Grosvenor et al, 1989). Outre ces paramètres, la tumeur agit, également, sur la prise énergétique en entraînant des perturbations au niveau du système nerveux central.

### a. Régulation de la prise alimentaire

Bien que le comportement alimentaire soit dépendant de facteurs non biologiques (tels que l'état émotionnel, l'environnement ou l'attractivité d'un aliment), la prise alimentaire est aussi régie par une communication étroite entre le statut énergétique de l'organisme et le système nerveux central. L'hypothalamus et le tronc cérébral sont les lieux privilégiés des interactions entre les signaux périphériques et les systèmes neuroendocriniens modulant, rétroactivement, la prise alimentaire. La modification du statut énergétique corporel induit la sécrétion d'hormones par les organes périphériques qui provoquent l'activation ou l'inhibition de la prise alimentaire via des neurotransmetteurs spécifiques (Schwartz et al, 2000).

## 1) Le tronc cérébral et le contrôle de la satiété.

Le tronc cérébral régule principalement le comportement alimentaire à court-terme, via les signaux transmis par le nerf vague. Il régit la terminaison du repas et la sensation de satiété.

Le nerf vague est un nerf mixte (sensitif et moteur) possédant des projections dendritiques au niveau du réseau intramusculaire des organes du tube digestif et à proximité des muqueuses de l'intestin grêle. Il est donc capable de recueillir des informations mécaniques (distension de l'estomac, péristaltisme intestinal) et peut aussi être activé par des informations chimiques transmises par les cellules entéroendocrines via des médiateurs périphériques. Les signaux périphériques sont transmis par les projections axonales du nerf vague, au noyau du tractus solitaire, situé dans le tronc cérébral. L'activation du noyau du tractus solitaire est responsable de la sensation de satiété (Morton et al, 2006).

## 2) L'hypothalamus et le contrôle de la prise alimentaire

L'hypothalamus contrôle essentiellement le comportement alimentaire à moyen et à long terme en déterminant la fréquence des repas et les temps de latence entre ces repas.

Au sein de l'hypothalamus, le noyau arqué est le centre intégrateur des messages hormonaux. Sa proximité étroite avec la barrière hémato-encéphalique permet aux hormones libérées dans la circulation sanguine d'interagir avec les structures neuronales qui le compose. Il contient 2 populations neuronales qui exercent des effets opposés sur la prise alimentaire (Figure 5). La première population neuronale, voie orexigène, synthétise le neuropeptide Y (NPY) et l'agouti-related protein (AgRP), deux neurotransmetteurs qui stimulent la prise alimentaire. La deuxième population neuronale, voie anorexigène, de la pro-opio mélanocortine (POMC) et de CART (cocaïne/amphétamine regulated transcript), induit la libération d'un neuropeptide de la famille des mélanocortines, l' $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone) qui inhibe la prise alimentaire (Jegou et al, 2003; Woods et al, 1998).

L'activité des deux populations neuronales du noyau arqué sont principalement régulées par 4 hormones périphériques : la leptine, l'insuline, le peptide PYY<sub>(3-36)</sub> et la ghréline.

### **La leptine :**

La leptine est une hormone synthétisée par les adipocytes. Sa concentration plasmatique est proportionnelle à la masse grasse de l'individu. Ainsi, le stockage de réserves énergétiques dans le tissu adipeux provoque l'augmentation de la masse grasse et la sécrétion de leptine dans la circulation sanguine. La leptine possède des récepteurs sur les deux populations neuronales du noyau arqué. Elle induit l'inactivation des neurones NPY/AgRP et l'activation des neurones POMC/CART (Cowley et al, 2001). Il en résulte une libération d'  $\alpha$ -MSH entraînant la diminution de la prise alimentaire (Figure 5).

### **L'insuline**

L'insuline est une hormone sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. La sécrétion de cette hormone est stimulée par l'augmentation de la glycémie. Outre son action sur le métabolisme glucidique, elle possède aussi des récepteurs sur les neurones du noyau arqué. Son action est identique à celle de la leptine (Figure 5B) (Niswender & Schwartz, 2003).

### **Le PYY<sub>(3-36)</sub>**

Le PYY<sub>(3-36)</sub> est une hormone de la famille du NPY, sécrété par les cellules L de l'intestin grêle et du côlon, proportionnellement au contenu énergétique de la prise alimentaire. Sa sécrétion est inhibée pendant le jeûne. Il induit la diminution de la prise alimentaire par l'inactivation de la voie neuronale NPY/AgRP (Batterham et al, 2002).

### **La ghréline**

La ghréline est sécrétée par l'estomac. Sa concentration plasmatique est augmentée pendant le jeûne et chute après la prise alimentaire. Elle est la seule hormone orexigène connue. Elle possède des récepteurs sur les neurones NPY/AgRP et stimule la libération des neuropeptides NPY et AgRP. La libération de NPY entraîne l'augmentation de la prise alimentaire et l'AgRP va inhiber la voie neuronale POMC/CART en bloquant les récepteurs de l' $\alpha$ -MSH (Figure 5) (Nakazato et al, 2001).

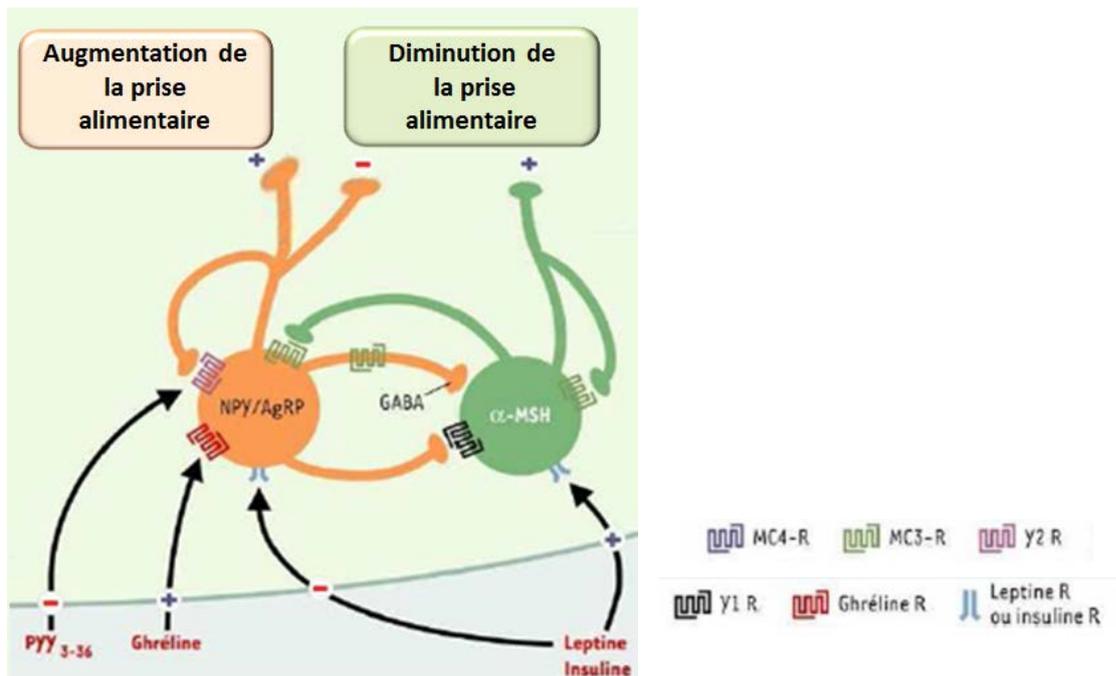


Figure 5 : **Régulation hypothalamique de la prise alimentaire.**

Voies neuronales NPY/AgRP et POMC/CART et leurs récepteurs hormonaux dans le noyau arqué de l'hypothalamus (d'après Jegou et al, 2003).

b. Les mécanismes de l'anorexie chez le patient atteint de cancer.

Le développement de l'anorexie lors de la cachexie est associé à un dysfonctionnement des voies de régulation de la prise alimentaire. Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas totalement élucidés.

Cette anorexie pourrait être secondaire à une perturbation des signaux périphériques.

L'inflammation systémique, développée lors de la cachexie cancéreuse, pourrait influencer la libération des hormones périphériques. Les cytokines, telles que  $TNF\alpha$  et  $IL1$ , sont notamment capable d'induire une augmentation de l'expression et de la concentration plasmatique de leptine (Grunfeld et al, 1996; Sarraf et al, 1997). Cependant, les recherches effectuées sur des patients atteints de cancer gastro-intestinal ou de cancer pulmonaire montrent que la concentration plasmatique de leptine n'est pas augmentée par la cachexie (Aleman et al, 2002; Wallace et al, 1998). Par conséquent, l'anorexie observée lors de la cachexie cancéreuse ne peut s'expliquer par une dérégulation de la production de leptine. De même, la production de ghréline ne semble pas altérée lors de la cachexie cancéreuse. Les travaux de Shimizu et col. ont ainsi démontré que les patients atteints de cachexie, induite par un cancer pulmonaire, avaient une concentration plasmatique de ghréline augmentée en

réponse au développement de l'anorexie (Shimizu et al, 2003). Les signaux périphériques ne seraient donc pas identifiés par l'hypothalamus.

L'inflammation systémique pourrait altérer le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire. L'injection intra-péritonéale d'IL1 $\beta$  a, notamment, été montrée pour provoquer l'activation des neurones POMC/CART, induisant une diminution de leur prise alimentaire (Scarlett et al, 2007). Cependant, les stratégies anti-inflammatoires ne parviennent pas à supprimer l'anorexie lors de la cachexie cancéreuse montrant que l'anorexie ne peut s'expliquer intégralement par le développement de l'inflammation systémique (Penna et al, 2010).

Le développement de l'anorexie pourrait donc être secondaire à un dysfonctionnement des processus de transduction des signaux périphériques. Les travaux de Chance et col. ont, notamment, mis en évidence une diminution de la réponse au NPY, s'expliquant par une diminution de l'expression de ses récepteurs chez des rats atteints de cachexie cancéreuse induite par un sarcome-MCA (Chance et al, 1995). Cependant, des études réalisant des injections intra-hypothalamiques d'AgrP sur des souris développant une cachexie cancéreuse (par infection de lipopolysaccharides d'*Escherichia coli*), ont montré une augmentation significative de la prise alimentaire et une diminution de la perte de poids par rapport aux souris recevant une injection témoin (Marks et al, 2001). Cette même étude démontrait que des souris n'exprimant pas le récepteur de l' $\alpha$ -MSH ne développaient pas d'anorexie suite à l'induction de la tumeur (Marks et al, 2001).

L'anorexie constitue un facteur majeur dans la perte de poids observée chez le patient atteint de cancer. Cependant, cette perte de poids est aussi dépendante des altérations métaboliques mises en place par le développement tumoral.

### 3. Les altérations du métabolisme glucidique et le cycle de Cori.

Le métabolisme des cellules cancéreuses est caractérisé par des mécanismes de glycolyse aérobie appelés effet Warburg (Kim & Dang, 2006). La tumeur a donc besoin de forte quantité de glucose pour générer l'énergie nécessaire à son développement. En effet, les cellules tumorales évoluent dans un environnement hypoxique. Cette hypoxie induit l'activation d'un facteur de transcription appelé HIF1 qui altère le fonctionnement mitochondrial des cellules tumorales et inactive l'enzyme responsable de l'hydrolyse du

pyruvate en acétyl-CoA (Kim et al, 2006) (Figure 6). En parallèle, ce facteur entraîne aussi une augmentation de l'activité de la lactate déshydrogénase (Semenza et al, 1994). Il est donc responsable de la réorientation des cellules tumorales vers la voie de la glycolyse anaérobie. Toutefois, la conversion du glucose en lactate est un mécanisme peu efficace en terme énergétique (Bongaerts et al, 2006) et l'expansion de la tumeur va donc nécessiter un apport en glucose de plus en plus important.

#### a. Le Cycle de Cori

Le lactate ainsi formé, ne peut être métabolisé par la tumeur. Il est excrété par les cellules tumorales et pris en charge par le foie, où il est transformé en glucose, par des mécanismes de néoglucogenèse, eux même énergétiquement peu rentables. Ce processus, appelé cycle de Cori (Cori, 1929) serait associé à une perte énergétique de 300 kcal/jour chez le patient atteint de cancer (Tisdale, 2002) et participerait, donc, à l'augmentation de la dépense énergétique observée lors de la cachexie cancéreuse.

Ce processus a été démontré lors de la cachexie cancéreuse. Ainsi, les patients atteints de cancer présentant une perte de poids montrent une concentration plasmique de lactate augmentée de 40 % (Eden et al, 1984), associée à une augmentation de la production de glucose par le foie (Holroyde et al, 1984; Koea & Shaw, 1992). Les travaux de Walenta et col. ont déterminé qu'une forte concentration sérique de lactate était associée à une diminution des chances de survie du patients atteints de cancer (Walenta et al, 2000).

#### b. Néoglucogenèse et fontes tissulaires

L'anorexie, engendrée par le développement de la cachexie, induit une diminution des apports en glucose de l'organisme. La tumeur doit donc trouver de nouvelles sources de glucose pour permettre son expansion. Elle va, pour cela, puiser dans les réserves énergétiques du patient.

La diminution de la concentration sanguine de glucose va, tout d'abord, induire la sécrétion de glucagon provoquant la glycogénolyse hépatique. Cependant, le glycogène hépatique

représente une source énergétique limitée et l'organisme doit donc trouver de nouvelles sources de glucose.

La seconde voie métabolique permettant l'augmentation de la concentration sanguine de glucose est la néoglucogenèse. Outre le lactate, la néoglucogenèse peut être réalisée à partir de glycérol ou d'acides aminés glucoformateurs. L'alanine est notamment connue pour être un important précurseur de la néoglucogenèse lors de maladies sévères (Holecek, 2002). La protéolyse musculaire et la lipolyse adipeuse fournissent donc les précurseurs nécessaires pour alimenter la tumeur en glucose. Le glycérol et les acides aminés issus de cette dégradation seront captés par le foie et convertit en pyruvate puis en glucose.

L'approvisionnement de la tumeur en énergie a donc un lien avec la fonte tissulaire observée lors de la cachexie cancéreuse.

#### c. Re-priorisation de la consommation de glucose et insulino-résistance

Outre l'approvisionnement de la tumeur en glucose par les mécanismes du cycle de Cori et de la néoglucogenèse, la tumeur pourrait induire une redirection d'une partie du glucose ingéré vers son métabolisme, par le développement d'une insulino-résistance. Cette insulino-résistance a notamment été associée au développement de la cachexie cancéreuse (Evans et al, 2008).

L'insuline est une hormone possédant un grand nombre d'actions physiologiques (régulation de la prise alimentaire, régulation de la lipogénèse). Un des rôles majeurs de l'insuline est de permettre l'incorporation du glucose dans les tissus insulino-dépendants, le muscle squelettique et le tissu adipeux (Figure 6A). Libérée dans la circulation sanguine, elle se fixe sur des récepteurs membranaires des tissus et induit la translocation du transporteur du glucose GLUT4 permettant l'entrée du glucose dans la cellule (Figure 6B). Son rôle est donc primordial dans la synthèse des réserves énergétiques de glycogène musculaire et de triglycérides dans les adipocytes. Au niveau du foie, l'insuline permet l'inhibition de la production hépatique de glucose en inhibant la néoglucogenèse (Puigserver et al, 2003).

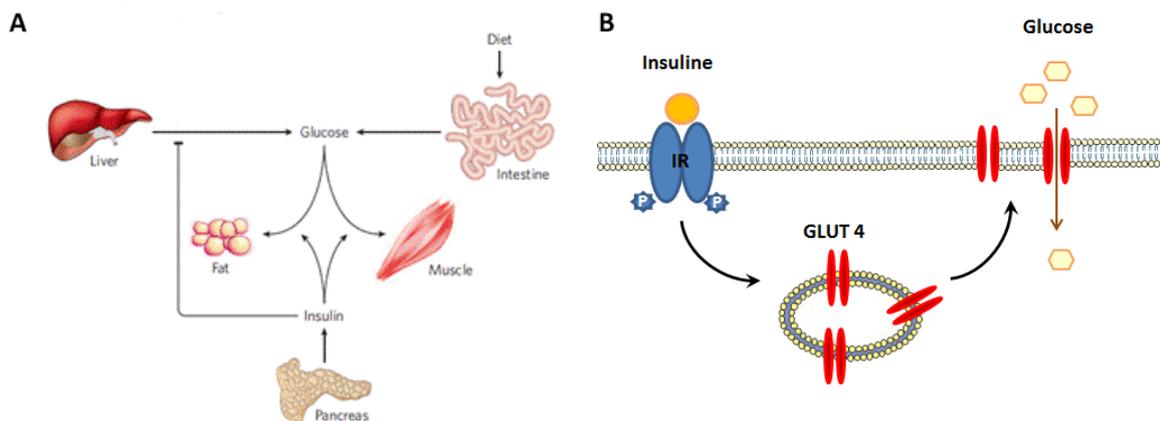


Figure 6 : **Mécanisme d'action de l'insuline sur les tissus insulino-dépendant.**

A) L'insuline permet l'incorporation du glucose dans les tissus insulino-dépendants : le tissu adipeux et le muscle (d'après Rosen et Spiegelman, 2006). B) L'insuline permet l'incorporation du glucose dans le muscle et le tissu adipeux par translocation du récepteur GLUT 4, spécifique des tissus insulino-dépendants.

Les mécanismes impliqués dans le développement de l'insulino-résistance lors de la cachexie ne sont pas totalement élucidés. Deux mécanismes semblent cependant établir un lien entre les symptômes de la cachexie et les éléments connus du développement de l'insulino-résistance.

Il a notamment été démontré que l'augmentation de la concentration sanguine en acides gras libres (et la persistance d'une concentration élevée en acides gras libres) pouvait induire la diminution de l'incorporation du glucose et de la synthèse de glycogène dans le muscle (Roden et al, 1996; Rosen & Spiegelman, 2006). Cette augmentation de la concentration sanguine en acides gras libres, a été observée lors de la cachexie cancéreuse et pourrait donc participer au mécanisme d'insulino-résistance observée dans ce syndrome (Ryden et al, 2008).

L'inflammation systémique pourrait aussi influencer ce processus. Il a notamment été démontré, *in vitro*, que le TNF  $\alpha$  induisait la phosphorylation du récepteur à l'insuline entraînant son inactivation (Feinstein et al, 1993). La fixation de l'insuline ne pourrait alors plus induire la translocation du transporteur GLUT4 et donc l'entrée du glucose dans la cellule. Le TNF  $\alpha$  agirait aussi à long terme en inhibant fortement l'expression du récepteur GLUT4 (diminution de 85 à 90% du contenu en ARNm) et du récepteur à l'insuline (Stephens & Pekala, 1991). L'IL6 pourrait aussi favoriser le développement de l'insulino-résistance mais les mécanismes de cette action restent inconnus (Bastard et al, 2006).

Cependant, les travaux de Yoshikawa et col. tendent à prouver que le développement de l'insulino-résistance chez les patients atteints de cancer n'est pas induit par le développement de la cachexie (Yoshikawa et al, 2001). Les auteurs ont en effet démontré qu'il n'existait pas de corrélation entre la diminution de l'incorporation de glucose et la perte de poids chez des patients atteints de cancer de l'estomac, du colon et du poumon (Yoshikawa et al, 2001). Les travaux de Asp et col., réalisés sur des souris atteintes d'adénocarcinome colique C26, démontrent que la tolérance à l'insuline est altérée avant la perte de poids (Asp et al, 2010). L'insulino-résistance serait donc un événement précoce du développement de la cachexie cancéreuse. Il serait donc plus probable que la mise en place de ce symptôme soit dépendante de l'inflammation systémique plutôt que de la concentration sanguine en acides gras libres. Cependant, l'augmentation de la concentration sanguine en acides gras pourrait avoir un rôle dans l'entretien, voire l'amplification, de ce symptôme.

#### 4. La fonte adipeuse.

La lipolyse du tissu adipeux est un symptôme précoce dans le développement de la cachexie cancéreuse (Fouladiun et al, 2005). Il a été estimé que les patients atteints de cancer pancréatique voyaient leur masse grasse diminuée de 23 % entre le diagnostic de leur cancer et leur décès, pour une perte de poids totale de 7% (Wigmore et al, 1997). Cette fonte adipeuse est, aussi, négativement corrélée à l'espérance de vie du patient (Murphy et al, 2010).

##### a. Inhibition de la lipogénèse lors de la cachexie cancéreuse.

Les premières études réalisées sur les causes cette fonte adipeuse mettaient en évidence un défaut du stockage des triglycérides dans le tissu adipeux (Jeevanandam et al, 1986). Le stockage des triglycérides est réalisé grâce à l'action de la lipoprotéine lipase (LPL). Présente majoritairement dans le tissu adipeux, elle hydrolyse des lipoprotéines circulant dans le sang et permet ainsi, la captation des acides gras par les adipocytes et le stockage des réserves adipeuses (Greenberg et al, 1992). Le développement de la tumeur induirait la diminution de l'expression génique et de l'activité de la LPL (Noguchi et al, 1991). Ce processus pourrait être imputable à l'action des cytokines inflammatoires. En effet, l'injection d'IL6 est capable d'induire une diminution de l'activité de la LPL *in vitro*, dans lignées immortelles d'adipocytes B9 et *in vivo*, chez des souris (Greenberg et al, 1992).

Cependant, les recherches actuelles semblent démontrer que la fonte adipeuse observée lors de la cachexie cancéreuse serait majoritairement expliquée par une augmentation de la lipolyse.

b. Augmentation de la lipolyse lors de la cachexie cancéreuse.

L'augmentation de la lipolyse a été montrée indirectement chez des patients cachectiques atteints de cancer gastro-intestinal et de cancers variés du tractus digestif, des poumons et des reins par une augmentation de la concentration en acides gras plasmatiques ou l'augmentation de l'oxydation des acides gras (Ryden et al, 2008; Zuijdgeest-van Leeuwen et al, 2000).

1) Mécanisme de la lipolyse

La lipolyse permet la dégradation des triglycérides en acides gras et glycérol par réactions enzymatiques. La lipase hormono-sensible (LHS) catalyse l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides et des diglycérides en monoglycérides. La monoglycérides lipase (MGL) permet la dégradation des monoglycérides en acides gras libres et en glycérol (Figure 7). Une triglycéride lipase spécifique du tissu adipeux (TGLA) a été découvert récemment (Zimmermann et al, 2004). Elle catalyse la dégradation des triglycérides en diglycérides et possède donc un rôle redondant à celui exercé par la LHS. On estime, en fait, qu'en conditions basales (lipolyse non stimulée), la TGLA est plus active que la LHS. Dans ces conditions, la TGLA hydrolyse les triglycérides en diglycérides qui sont alors ré-estérifiés en triglycérides ou utilisés pour la synthèse de phospholipides. L'activation de la lipolyse, notamment via l'action d'hormones, active fortement la LHS qui hydrolyse alors les diglycérides en monoglycérides, eux même, hydrolysés par la MGL en acides gras libres et en glycérol (Zechner et al, 2005) (Figure 7).

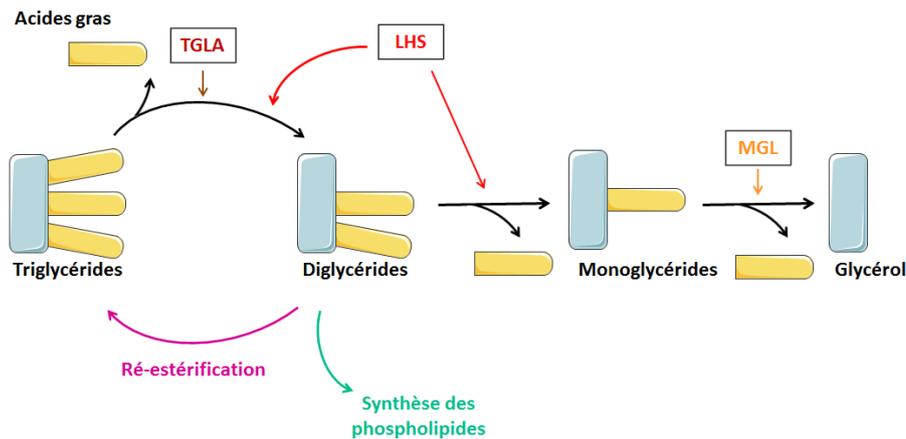


Figure 7 : Hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux

## 2) Facteurs potentiels de l'augmentation de la lipolyse lors de la cachexie.

Les études de Campling et col. ont montré que le peptide natriurétique était sécrété par les cellules cancéreuses de patients atteints de cancer du poumon (Campling et al, 1995). Le peptide natriurétique pourrait être un acteur de l'augmentation de la lipolyse observée lors de la cachexie cancéreuse (Kalra & Tigas, 2002). Le peptide natriurétique est, en effet, connu pour activer la voie de la lipolyse (Sengenès et al, 2002).

L'activation de la LHS par les catécholamines pourrait aussi constituer un mécanisme de régulation de la lipolyse lors de la cachexie cancéreuse. L'étude de Cao et col. a notamment révélée que l'augmentation de l'expression des récepteurs  $\beta$ 1-adrénergiques était associée à une augmentation de la quantité de LHS dans les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané de patients cachectiques atteints de cancer gastro-intestinal (Cao et al, 2010b).

Le rôle de la TGLA dans la lipolyse ne doit pas être sous-estimé. Une récente étude a montré que l'inactivation de cette enzyme (KO-TGLA) dans 2 modèles de cachexie induite par injection soit de cellules de carcinome pulmonaire Lewis soit et de cellules de mélanome B16 induisait une résistance au développement de la cachexie (Das et al, 2011). Ainsi, chez ces souris, la lipolyse, l'activité du protéasome et la dégradation musculaire étaient diminuées (Das et al, 2011). En outre, la délétion du gène de la LHS, dans ces modèles murins (KO-LHS), limitait la perte adipeuse et musculaire induite par la cachexie (Das et al, 2011). Cette étude montre que l'inhibition de la lipolyse permet de limiter l'atteinte musculaire induite par

la cachexie, ce qui met en évidence l'importance de cette voie dans le développement de la cachexie cancéreuse.

L'inflammation systémique développée lors de la cachexie cancéreuse pourrait aussi induire une stimulation de la fonte adipeuse. Cependant, les mécanismes impliqués dans cette régulation ne sont pas totalement élucidés (Clifford et al, 2000; Ryden et al, 2004; Ryden et al, 2002). Le TNF $\alpha$  pourrait inhiber l'expression de la périlipine A, une protéine exprimée à la surface des gouttelettes lipidiques des adipocytes (Souza et al, 1998). Cette protéine joue, en effet, un rôle majeur dans l'intégrité du tissu adipeux en limitant l'accès des enzymes impliquées dans la lipolyse aux gouttelettes lipidiques (Brasaemle et al, 2000). Une diminution de l'expression de la périlipine A induirait l'augmentation de la disponibilité de substrats lipidiques et, par conséquent, une augmentation de la lipolyse.

### 3) Devenir des acides gras libres.

L'augmentation de la lipolyse associée à la diminution de re-captage des acides gras libérés (diminution de l'activité de la LPL) induit une augmentation de la concentration plasmatique d'acides gras libres (Ryden et al, 2008). L'augmentation des acides gras circulants pourrait participer au développement de l'insulino-résistance observée lors de la cachexie cancéreuse. Les acides gras libérés pourrait aussi constituer une ressource énergétique pour l'organisme et notamment pour les organes insulino-dépendants qui, conjointement à la diminution des apports énergétiques provoquée par l'anorexie, subissent une inhibition de l'incorporation du glucose.

## 5. La fonte musculaire

La fonte musculaire reste un symptôme critique et constant de la cachexie cancéreuse. En situation extrême (peu de temps avant le décès du patient), la perte musculaire peut atteindre 75 % de leur masse musculaire initiale (Fearon, 1992). Il existe cependant une forte hétérogénéité dans la cinétique de développement de la cachexie et de la croissance tumorale selon le cancer étudié.

Ainsi, les travaux de Heymsfield et McManus, ont suivi une cohorte de patients atteints de diverses tumeurs solides, en mesurant le poids et la masse musculaire des patients sur une durée de plusieurs mois par des mesures anthropométriques, radiographiques et échographiques (Heymsfield & McManus, 1985). Une année après le diagnostic de leur cancer, les patients atteints de cancer du pancréas présentaient une perte de poids de 14% par rapport à leur poids initial et une fonte musculaire de 16 % alors que les patients atteints de cancer pulmonaire montraient, 4 mois après leur diagnostic, une perte de poids de 30% et une fonte musculaire de 21% (Heymsfield et McManus, 1985).

Une partie de la fonte du muscle squelettique peut être expliquée par les mécanismes de néoglucogenèse permettant l'approvisionnement énergétique de la tumeur. La dégradation du muscle squelettique est aussi une nécessité pour la synthèse des protéines de phase aiguë et la lutte de l'organisme face au développement tumoral. On estime qu'il faudrait hydrolyser 2 grammes de protéines musculaires pour permettre la formation de 0,9 grammes de protéines de phase aiguë (Reeds et al, 1994). Cette fonte musculaire est le résultat d'une augmentation des phénomènes de protéolyse mais aussi d'une diminution de la synthèse protéique (Tisdale, 2002).

- a. Dégradation du muscle squelettique par les phénomènes de protéolyse lors de la cachexie cancéreuse

Les principales voies protéolytiques sont la voie des calpaïnes-calcium dépendantes, la voie lysosomale et la voie ubiquitine-protéasome-ATP dépendante.

- 1) La voie protéolytique des calpaïnes-calcium dépendantes.

Les calpaïnes sont des protéases à cystéines cytosoliques, activées principalement par le calcium (Smith et al, 2008). Les études réalisées sur des patients atteints de cancer gastrique ont montré l'activation de cette voie lors de la cachexie cancéreuse (Smith et al, 2011). Les calpaïnes possèdent un nombre de substrats restreint. Elles jouent, cependant, un rôle clé dans l'initiation de la destruction des protéines myofibrillaires. Elles entraînent, en effet, la déstructuration des sarcomères permettant la libération des différentes protéines

myofibrillaires, qui sont, dès lors, accessibles pour la voie de dégradation du protéasome (Costelli et al, 2005).

## 2) La voie protéolytique lysosomale.

Le lysosome est un organite subcellulaire comprenant de nombreuses protéases. Ces protéases lysosomales sont principalement représentées par la famille des cathepsines (protéases à cystéine, acide aspartique ou sérine). Ces enzymes étant séparées du cytosol par la membrane lysosomale, cette voie de dégradation nécessite une séquestration préalable des éléments à dégrader dans un système vacuolaire. Cependant, certaines protéines peuvent être directement internalisées dans le lysosome après avoir été reconnues spécifiquement par la protéine chaperonne hsc73 (*heat-shock cognate protein 73 kDa*) (Bechet et al, 2005). L'activation des cathepsines B, L et D a été démontrée chez des patients atteints de cancer du tube digestif ou des reins et dans des modèles expérimentaux de cachexie cancéreuse (Fujita et al, 1996; Schersten & Lundholm, 1972). Cette voie protéolytique semble, cependant, avoir une implication secondaire par rapport à la voie ubiquitine-protéasome-ATP dépendante lors de la cachexie cancéreuse (Baracos et al, 1995).

## 3) La voie ubiquitine-protéasome-ATP dépendante

Parmi ces voies protéolytiques, la voie ubiquitine-protéasome-ATP dépendante semble la plus impliquée lors de la cachexie cancéreuse (Bossola et al, 2003; Temparis et al, 1994). Cette voie protéolytique comporte 2 étapes : le marquage de la protéine à dégrader par ubiquitination (attachement d'une chaîne de poly-ubiquitine) et la dégradation de la protéine marquée, par le protéasome (Figure 8).

Le mécanisme de marquage est réalisé à l'aide de trois enzymes. L'enzyme d'activation, E1, active l'ubiquitine en présence d'ATP et la transfère sur une enzyme de conjugaison E2. L'ubiquitine ligase E3 participe à l'attachement de l'ubiquitine aux différentes protéines cibles et permet à l'enzyme de conjugaison, E2, de transférer l'ubiquitine sur la protéine à dégrader. Cette étape de marquage est renouvelée pour permettre une poly-ubiquitination de la protéine ciblée. Seules les protéines liées à une chaîne d'au moins quatre molécules

d'ubiquitine sont reconnues par le protéasome. Une fois reconnue, la protéine est dégradée à l'intérieur du protéasome (Figure 8). La spécificité du système dépend essentiellement des enzymes E2 et E3 (Costelli & Baccino, 2003).

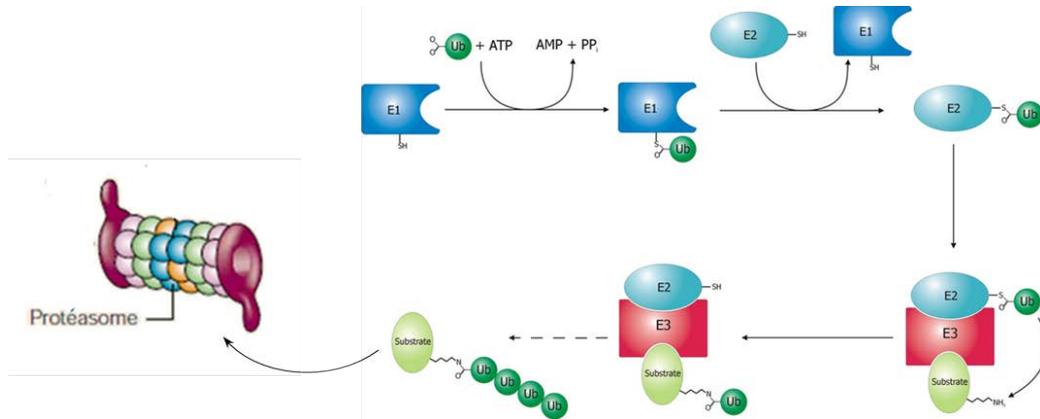


Figure 8 : La voie de dégradation ubiquitine-protéasome-ATP dépendante.

L'activation de cette voie protéolytique a été montrée, par la surexpression des différentes protéines impliquées. Les deux ubiquitines ligases (E3), spécifiques du muscle squelettique, atrogin 1 et MURF1 (*Muscle-specific RING finger protein 1*), sont, notamment, largement surexprimées dans de nombreux modèles d'atrophie musculaire et dans la cachexie cancéreuse (Acharyya et al, 2004; Bodine et al, 2001; Gomes et al, 2001; Lecker et al, 2004). Cette voie peut aussi être activée par l'action des cytokines. Le TNF $\alpha$ , IL1 et l'IFN $\gamma$  sont, notamment, capables d'induire l'expression des protéines du protéasome et de l'ubiquitine (Llovera et al, 1998).

La régulation de l'expression des protéines impliquées dans la protéolyse « ubiquitine-protéasome-ATP dépendante » est, principalement, régie par deux types de facteurs de transcription, le facteur NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Cai et al, 2004; Wyke et al, 2004) et les facteurs FOXO (*Forkhead box protein O*) (Sandri et al, 2004). L'action des cytokines sur ces voies de régulation, lors de la cachexie cancéreuse, n'est pas totalement élucidée. Cependant, le TNF $\alpha$  a été montré pour activer le facteur NF- $\kappa$ B (Li et al, 1998) et pourrait aussi induire l'expression d'atrogin via le facteur FOXO4 (Moylan et al, 2008).

D'autres molécules peuvent aussi interagir avec cette voie de signalisation lors de la cachexie cancéreuse. Les travaux de Costelli et col. ont mis en évidence l'augmentation de la

concentration plasmatique de myostatine dans un modèle de cachexie murin induite par un hépatome Yoshida AH-130 (Costelli et al, 2008). La myostatine est un facteur de croissance et de différenciation, sécrété par le muscle squelettique, qui participe à la régulation du développement musculaire. Elle est capable d'induire l'expression d'atrogine 1 via l'activation du facteur FOXO1 (McFarlane et al, 2006).

La myostatine est aussi impliquée dans l'altération de la synthèse protéique et induit la diminution de l'expression du facteur myogénique MyoD (McFarlane et al, 2006). Lors de la cachexie cancéreuse, les voies de régulation de la synthèse protéique et de la protéolyse seraient, en fait, étroitement liées. Ainsi, l'activation du facteur NF- $\kappa$ B induit une diminution de l'expression du facteur myogénique MyoD (Guttridge et al, 2000) et l'inactivation du facteur FOXO1 entraîne une augmentation de la quantité de MyoD (Liu et al, 2007a). La diminution du facteur MyoD par la voie protéolytique pourrait être réalisée par la poly-ubiquitination de ce facteur par l'intermédiaire de la protéine atrogine 1 (Tintignac et al, 2005).

#### b. Inhibition de la protéosynthèse musculaire lors de la cachexie

La diminution de la synthèse de protéine lors de la cachexie cancéreuse peut aussi s'expliquer par une voie indépendante de la protéolyse.

Le facteur de croissance IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) est un facteur anabolisant connu, synthétisé constitutivement et majoritairement par le foie et, en moindres proportions, par le muscle squelettique. Il active la protéosynthèse en stimulant l'activité des ribosomes et la libération des facteurs d'initiation de la traduction via la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (*Phosphatidylinositol3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin*) (Latres et al, 2005) (Figure 9). Le développement de la réponse de phase aiguë entraîne une diminution du taux d'IGF1 circulant, chez les patients cachectiques (Martín et al, 1999). Cependant, cette diminution de production hépatique n'altère pas la taille des fibres musculaires. En effet, le pool d'IGF1 produit par le muscle serait, en fait, suffisant pour permettre son action anabolisante (Frost & Lang, 2005). Toutefois, la diminution de l'expression d'IGF1 dans le muscle squelettique est observée dans des modèles expérimentaux de cachexie cancéreuse (Costelli et al, 2006; Penna et al, 2010). Cette diminution du contenu en IGF1 pourrait s'expliquer par le développement de l'anorexie

puisque les travaux de Lewis et col. ont montré un lien direct entre la restriction alimentaire et la concentration musculaire d'IGF1 (Lewis et al, 2003). Les travaux de Fan et col. ont, aussi, mis en évidence que le TNF $\alpha$  pourrait inhiber l'expression d'IGF1 dans le muscle squelettique (Fan et al, 1995). Cette diminution d'IGF1 va donc induire une inhibition de la protéosynthèse.

Cette voie de protéosynthèse a aussi une action sur la voie de protéolyse ubiquitine-protéasome-ATP dépendante (Figure 9). En effet, l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR va permettre l'inactivation du facteur FOXO. IGF1 a notamment été montré pour inhiber l'expression de MURF1 (Dehoux et al, 2004). Ainsi, une modification de cette voie anabolisante aura une répercussion sur les mécanismes de protéolyse. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation d'IGF1 entraîne la levée de l'inactivation de FOXO et donc l'augmentation de l'expression des ubiquitine ligases, atrogine 1 et MURF1.

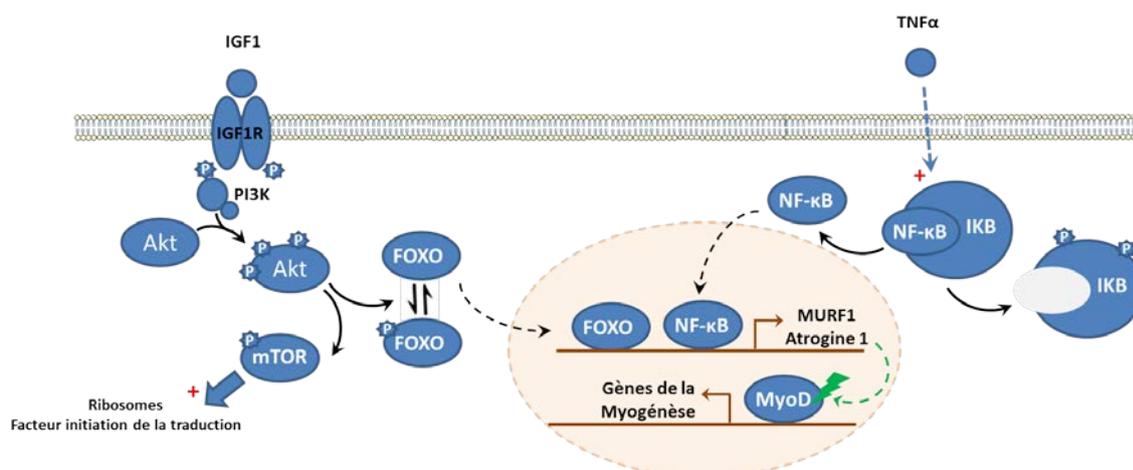


Figure 9 : Voie de la protéosynthèse IGF1 et voie de protéolyse par activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et FOXO.

Le muscle squelettique se révèle donc être une cible majeur de la cachexie cancéreuse. Il constitue une réserve en acides aminés pour l'approvisionnement de la néoglucogénèse et la synthèse des protéines de la réponse de phase aiguë. Le développement de l'anorexie participe à l'inhibition de la synthèse musculaire par diminution de l'expression d'IGF1 dans le muscle. Enfin, il subit l'action des cytokines de l'inflammation systémique entraînant une augmentation des phénomènes de protéolyse.

Le développement tumoral est donc au centre des symptômes de la cachexie cancéreuse (Figure 10). Pour combler les besoin de la tumeur en glucose, l'organisme va puiser dans ses

réserveS énergétiques, mettre en place le cycle de Cori et activer la néoglucogenèse pouvant influencer une partie de la fonte musculaire et de la fonte adipeuse. De plus, les cellules immunitaires infiltrées dans la tumeur vont induire une inflammation systémique qui participe au développement de l'anorexie. Privé d'apport énergétique, l'organisme doit alors trouver son énergie dans ses réserveS énergétiques, provoquant la fonte du tissu adipeux. La persistance de l'inflammation systémique entraîne le développement de la réponse de phase aiguë, induisant la protéolyse du muscle squelettique pour permettre la synthèse des protéines de cette phase aiguë. L'inflammation systémique participe aussi à la protéolyse du tissu musculaire et à la lipolyse du tissu adipeux entraînant la libération des acides gras dans la circulation sanguine. Ce relargage d'acide gras provoque le développement de l'insulino-résistance mais permet d'alimenter les différents organes en énergie.

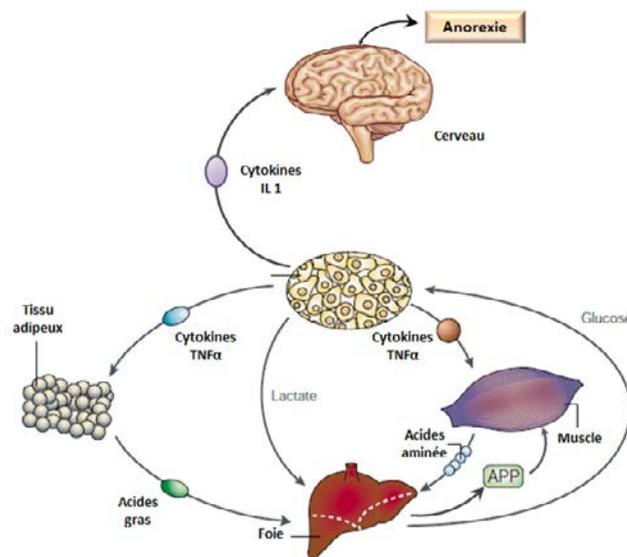


Figure 10 : **Schéma récapitulatif des symptômes cachectiques développés en réponse au développement tumoral.**

(d'après Tisdale, 2002)

La fonte du tissu adipeux et du tissu musculaire ne serait donc qu'une résultante des mécanismes mis en place par la tumeur pour satisfaire ses besoins et assurer sa croissance. Cependant, la tumeur pourrait, aussi, sécréter des facteurs influant directement l'intégrité de ces deux organes.

## F. Les facteurs tumoraux

### 1. Le LMF (Lipid Mobilizing factor)

Depuis les années 80, plusieurs facteurs tumoraux promouvant la lipolyse ont été découverts. Cependant, les premiers facteurs, le facteur thoxohormone-L découverts par Masuno et col., en 1981 et le LPF (lipolysis promoting factor) découverts par Taylor et col., en 1992, n'ont pas fait l'objet de recherches plus approfondies (Masuno et al, 1981; Taylor et al, 1992). Ces facteurs ont été délaissés au profit d'un troisième facteur identifié en 1998 par Todorov et col., le LMF (Todorov et al, 1998).

Le facteur LMF est une glycoprotéine de 43 kDa, détectée dans les cellules tumorales d'adénocarcinome murin MAC-16 et dans les urines de patients cancéreux (Todorov et al, 1998). Ce facteur possède une grande homologie de séquence protéique avec la glycoprotéine zinc  $\alpha$  2 (ZAG) leur conférant une immuno-réactivité et une action biologique similaire (Todorov et al, 1998). Les travaux de Todorov et col. ont aussi montré que l'anticorps dirigé contre la ZAG humaine était capable de neutraliser l'activité de mobilisation des lipides *in vitro* chez l'humain mais pas chez le rongeur (Todorov et al, 1998). Par conséquent, le LMF serait un facteur spécifiquement murin et le véritable facteur de mobilisation des lipides chez l'humain serait la ZAG.

La ZAG est une glycoprotéine, exprimée et sécrétée constitutivement par les cellules épithéliales de nombreux organes tels que le foie, le sein, le tractus digestif, les glandes sudoripares ou le rein (Tada et al, 1991). Cependant, cette glycoprotéine est montrée pour être surexprimée dans le foie et le tissu adipeux lors de la cachexie cancéreuse (Bing et al, 2004).

Le LMF et la ZAG sont, tous deux, capables de stimuler la fonte adipeuse (Hirai et al, 1998). Cette stimulation serait induite par une augmentation de l'activité de la LHS via sa phosphorylation par une voie de signalisation impliquant l'AMPc et la protéine kinase A (Tisdale, 2009). Ces résultats sont cependant réfutés par les travaux de Ryden et col., réalisés sur des prélèvements sanguins et des adipocytes isolés de tissu adipeux sous-cutané abdominal de patients atteints de cancer gastro-intestinal et de sujets sains (Ryden et al, 2011). Ces

travaux mettent en évidence que la concentration sérique de ZAG n'est pas corrélée au statut nutritionnel du patient et que la sécrétion de ZAG par les adipocytes n'est associée à la fonte de masse grasse ou à l'indice de masse corporelle du patient (Ryden et al, 2011). Les travaux de Ryden et col. remettent donc en question la pertinence de définir la ZAG comme un marqueur de la cachexie cancéreuse.

## 2. Le PIF (Proteolysis-Inducing factor)

Le facteur PIF est une protéoglycane de 24 kDa identifiée dans les cellules tumorales d'adénocarcinome murin MAC16 (Todorov et al, 1996). Ce facteur a été retrouvé, par immuno-détection, dans les urines de patients atteints de cancer du pancréas (Todorov et al, 1996) et serait responsable d'une fonte musculaire, induite par l'activation de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-ATP dépendante (Lorite et al, 2001).

Ce facteur possède une petite séquence protéique de 4 kDa, homologue au peptide Y-P30, impliqué dans la survie neuronale, et à la dermicine, peptide supposé oncogène du cancer du sein (Lowrie et al, 2006). Il diffère de ces peptides par son importante glycosylation comprenant des résidus glycosaminoglycannes et sulfates (Todorov et al, 1997).

Les études réalisées par transfection d'une séquence homologue humaine, non glycosylée, dans un modèle murin de cancer du sein, n'a pu reproduire les effets observés sur le muscle squelettique (Monitto et al, 2004). Son pouvoir cachectisant serait donc directement lié à la présence des glycosylations.

Cependant, l'existence de ce facteur chez l'homme est encore sujette à controverse. En effet, de récentes études sur les urines d'un large panel de patients atteints de cancer gastrique, pulmonaire et autres cancers métastatiques, ont déterminé que la protéine isolée par l'anticorps de souris MAC-16 était de l'albumine (Wieland et al, 2007). Les travaux de Todorov et col. avaient démontré une forte affinité de PIF pour cette protéine (Todorov et al, 1996) qui pourrait expliquer ce résultat. Cependant, l'étude de Wieland et col. met aussi en évidence que la réactivité de l'anticorps n'est associée ni à la survie du patients, ni à une fonte musculaire (Wieland et al, 2007).

L'existence et la pertinence de ce facteur lors de la cachexie cancéreuse restent donc encore à être démontrées.

## II. Le métabolisme mitochondrial

L'énergie, indispensable à la vie, est issue de la transformation des nutriments, en énergie chimique utilisable par la cellule, l'ATP (adénosine triphosphate). Chez les organismes aérobies, la voie de la phosphorylation oxydative constitue la principale source d'ATP. Cette voie représente la phase finale de dégradation des aliments ingérés et le lieu de la respiration cellulaire. Elle est réalisée par les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase, au sein de la mitochondrie.

### A. La mitochondrie

La mitochondrie est un organe subcellulaire formant un réseau tubulaire ramifié à l'intérieur de la cellule (Hoffmann & Avers, 1973) (Figure 11A). Ce réseau, dynamique, adapte son volume et ses ramifications en fonction des demandes énergétiques de la cellule (Egner et al, 2002). Contrairement aux autres organites subcellulaires, la mitochondrie possède deux membranes : la membrane externe et la membrane interne, qui délimitent deux compartiments distincts : l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale (Figure 11B).

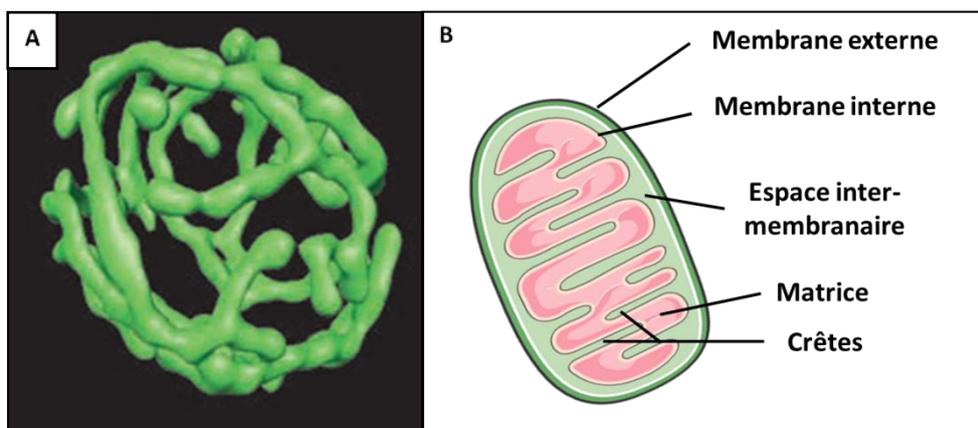


Figure 11 : **Organisation structurale de la mitochondrie.**

A) Le réseau mitochondrial cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* obtenu par microscopie confocale 4Pi-multiphotonique (Egner et al, 2002). B) Schéma de la structure interne mitochondriale.

## 1. La membrane externe mitochondriale

La membrane externe possède une composition similaire à celle de la membrane plasmique. Elle est composée à 60 % de protéines et à 40% de phospholipides. La membrane externe contient notamment de nombreuses porines membranaires appelées protéines VDAC (*Voltage dependant anionic channel*). Elles confèrent une grande perméabilité de la membrane externe à toutes les molécules de poids moléculaires inférieurs à 5 kDa. La membrane externe mitochondriale est ainsi perméable aux substrats énergétiques et aux nucléotides indispensables au fonctionnement de la phosphorylation oxydative. L'entrée de protéines de forts poids moléculaires dans la mitochondrie nécessite un peptide d'adressage. Le transport de ces protéines est réalisé par les translocases de la membrane externe appelées complexe TOM (*translocases outer membrane*) (Figure 12A). Les protéines membranaires de la membrane externe (codées par le génome nucléaire) seront transportées par le complexe TOM et intégreront la membrane externe par le complexe TOB (*translocase of outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*) (Figure 12B) (Neupert & Herrmann, 2007).

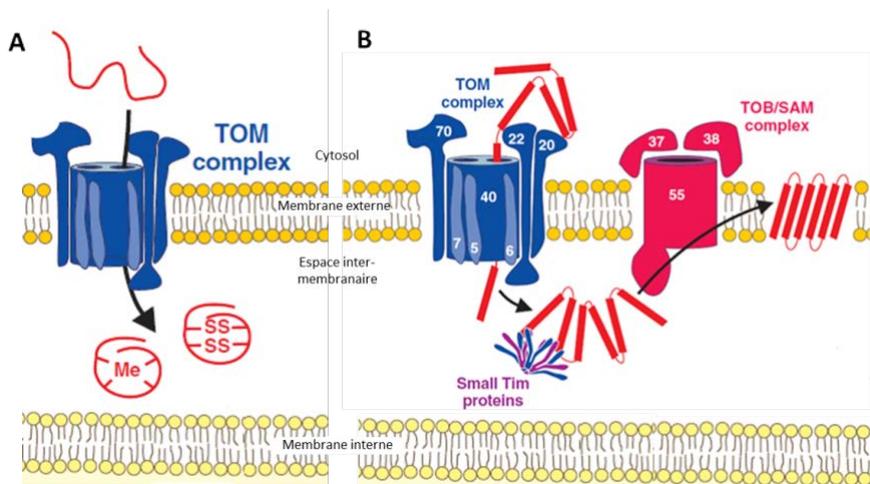


Figure 12 : **Transport des protéines à forts poids moléculaire à travers la membrane externe mitochondriale.**

A) Transport des protéines constitutives de l'espace inter-membranaire par le complexe TOM (d'après Neupert et Herrman, 2007). B) Transport et intégration des protéines membranaire de la membrane externe mitochondriale par les complexes TOM et TOB (d'après Neupert et Herrman, 2007).

## 2. Les sites de contact mitochondriaux.

Les membranes externe et interne peuvent interagir par des sites d'accolement appelés sites de contact. Ces sites sont formés par remodelage lipidique (Ardail et al, 1990) et par

l'interaction de complexes protéiques situés sur la membrane interne et sur la membrane externe tels que l'interaction du complexe TOB de la membrane externe avec le complexe du site de contact MICOS (*mitochondrial contact site*) de la membrane interne (Figure 13A) (Harner et al, 2011). Ces structures pourraient jouer un rôle sur la morphologie de la membrane interne (Harner *et al*, 2011). Ces sites de contact sont aussi les lieux privilégiés du transport des protéines de poids moléculaires élevés destinées à la matrice mitochondriale et à la membrane interne. Le complexe TIM23 (*translocases inner membrane 23*) de la membrane interne est notamment capable d'interagir avec le complexe TOM (Mokranjac et al, 2005), permettant le transfert direct des protéines à forts poids moléculaires, du cytosol à la matrice mitochondriale ou à l'intérieur de la membrane interne (Figure 13B).

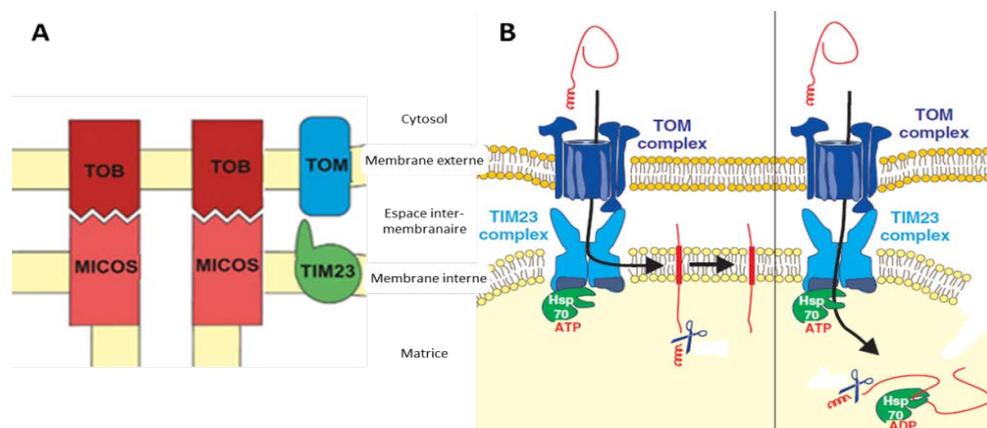


Figure 13 : **Interactions protéiques des sites de contact mitochondriaux.**

A) Schéma des interactions du complexe TOB au complexe MICOS et du complexe TIM23 au complexe TOM (d'après Harner *et al*, 2011). B) Transport des protéines à forts poids moléculaires constitutives de la membrane interne et de la matrice mitochondriale (d'après Neupert et Herrman, 2007).

### 3. La membrane interne mitochondriale

La membrane interne est très riche en protéines (75% de protéines et 25% de phospholipides). Relativement imperméable, elle ne permet la diffusion que de très petites molécules telles que le dioxygène ( $O_2$ ), le monoxyde d'azote (NO) ou l'eau ( $H_2O$ ) mais possède de nombreux transporteurs lui conférant, ainsi, une perméabilité sélective. Elle possède de nombreuses invaginations formant les crêtes mitochondriales (Figure 14). Ces crêtes mitochondriales sont reliées à la membrane interne par des structures tubulaires appelées jonctions de crêtes (Frey & Mannella, 2000). Ces crêtes mitochondriales possèdent une composition différente du reste de la membrane interne. C'est dans ces crêtes mitochondriales que sont insérés les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (Allen, 1995). Plus qu'une localisation

préférentielle, les complexes de la phosphorylation oxydative seraient, en fait, à l'origine de la création de ces structures particulières (Paumard et al, 2002).

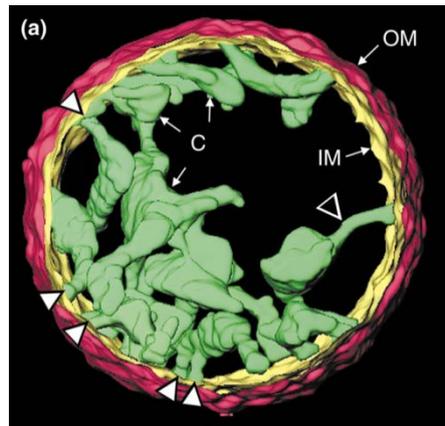


Figure 14 : **Les crêtes mitochondriales de la membrane interne.**  
Reconstitution 3D de la surface d'une mitochondrie isolée de foie de rat (Fray et Manella, 2000).

#### 4. Les cardiolipines, constituants spécifiques des membranes mitochondriales

Les cardiolipines (CL) sont des diphosphatidylglycérol (Figure 15). Elles se composent donc de 2 phosphatidylglycérol reliés par une tête glycérol et possèdent 4 chaînes d'acides gras et 2 charges négatives.

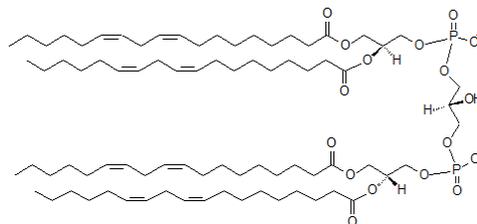


Figure 15 : **Cardiolipine.**

Ces phospholipides sont majoritairement détectés dans la membrane interne (75% de la concentration totale de cardiolipines) (Gebert et al, 2009) et représentent 18% des lipides totaux de la membrane (et 4% de ceux de la membrane externe) (Ardail et al, 1990). Les cardiolipines jouent un rôle important dans la stabilité des propriétés physiques de la membrane et des crêtes mitochondriales (Ohtsuka et al, 1993). Elles sont, aussi, étroitement associées aux protéines mitochondriales et seraient impliquées dans le fonctionnement de ces protéines. Elles pourraient, notamment, avoir un rôle de chaperonnes et permettre la bonne conformation et la bonne orientation des protéines de la chaîne respiratoire (Schlame & Ren,

2009). Par conséquent, ces phospholipides peuvent avoir un impact direct sur le fonctionnement de la phosphorylation oxydative.

## B. La phosphorylation oxydative

La mitochondrie est la « centrale énergétique » de la cellule. Elle permet la conversion, en eau et en ATP, des équivalents réduits issus des réactions de déshydrogénation (et de décarboxylation) des nutriments énergétiques, en présence de dioxygène ( $O_2$ ) et d'ADP, selon la théorie du couplage chimiosmotique (Mitchell, 1961). Cette conversion est également appelée phosphorylation oxydative.

Les équivalents réduits, la nicotinamide adénine dinucléotide ( $NADH + H^+$ ) et la flavine adénine dinucléotide ( $FADH_2$ ), sont oxydés par les complexes de la chaîne respiratoire déclenchant un transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire jusqu'à un accepteur final, l' $O_2$ . Ce transfert d'électrons est associé à un pompage de protons, de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, créant un gradient électrochimique ou force proton-motrice. L'ATP synthase utilise cette force proton-motrice pour coupler le retour des protons vers la matrice mitochondriale à la phosphorylation d'un ADP en ATP (Figure 16).

L'ATP synthétisé traverse la membrane interne mitochondriale par l'intermédiaire de la translocase ADP/ATP (ANT). L'ANT fonctionne sous forme d'un antiporteur. Ainsi, le transport de l'ATP dans l'espace inter-membranaire est concomitant à la translocation d'un ADP dans la matrice mitochondriale. Arrivé dans l'espace inter-membranaire, l'ATP pourra diffuser passivement dans le cytosol via la protéine VDAC.

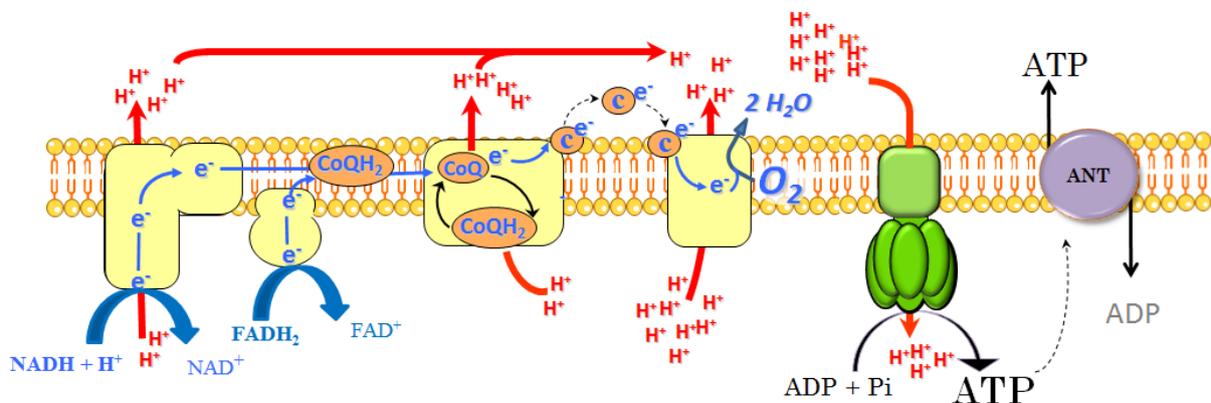


Figure 16 : **Schéma de la phosphorylation oxydative.**

$H^+$  = protons,  $e^-$  = électrons,  $CoQH_2$  = coenzyme Q (forme quinol, réduite),  $CoQ$  = coenzyme Q (forme quinone, oxydée).

Il y a donc un couplage entre les oxydations des équivalents réduits provoquant le transfert des électrons réalisées au sein de la chaîne respiratoire et la phosphorylation de l'ADP en ATP réalisée par l'ATP synthase. Ce couplage définit l'efficacité de la synthèse d'ATP.

## 1. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est, en fait, composée de 4 complexes :

- Le complexe NADH-Coenzyme Q réductase ou complexe I
  - Le complexe Succinate-Coenzyme Q réductase ou complexe II
  - Le complexe Coenzyme Q-cytochrome c réductase ou complexe III ou complexe bc<sub>1</sub>
- et le complexe cytochrome-c-oxydase ou complexe IV ou complexe aa<sub>3</sub>

Chaque complexe est constitué de plusieurs sous-unités allant de 4 sous-unités pour le complexe II à plus de 40 sous-unités pour le complexe I, chez les mammifères. Les complexes III et IV sont constitués respectivement de 11 et 13 sous-unités, chez le mammifère (Saraste, 1999). Le séquençage du génome mitochondrial par Anderson et col. en 1981, a mis en évidence que plusieurs composants protéiques clés de ces complexes étaient codés par le génome mitochondrial (Anderson et al, 1981). L'ADN mitochondrial code notamment pour 7 sous-unités du complexe I, le cytochrome b du complexe III et les sous-unités I, II et III du complexe IV (Boore, 1999). Le complexe II est le seul complexe de la chaîne respiratoire à être entièrement codé par le génome nucléaire.

Le transfert des électrons fait aussi intervenir deux transporteurs d'électrons : le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome-c.

Le CoQ (forme quinone) est un composé liposoluble qui peut se mouvoir à l'intérieur de la membrane interne. Le cytochrome-c est un composé hydrosoluble situé à proximité de la membrane interne dans l'espace inter-membranaire. Les complexes de la chaîne respiratoire étant des structures relativement statiques, ces transporteurs permettent de transférer les électrons entre les différents complexes.

La direction du flux d'électrons le long de la chaîne de transport est déterminée par le potentiel d'oxydoréduction des composants c'est-à-dire par leur faculté à perdre ou à gagner

des électrons. Les électrons se déplacent des molécules à faible potentiel d'oxydoréduction vers les molécules possédant un potentiel fort et donc du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  ou du Succinate à l'oxygène moléculaire.

a. Transfert des électrons et translocation des protons au sein du complexe I

Le complexe I permet le transfert des 2 électrons du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  au CoQ. Il possède un cofacteur, une flavine mononucléotide (FMN) qui accepte les électrons du  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (Murphy, 2009). Les électrons sont ensuite acheminés jusqu'au site de réduction du CoQ via une chaîne de 7 noyaux Fer-Soufre (Fe-S). Ce complexe permet la translocation de protons vers l'espace inter-membranaire. Cependant, les mécanismes de cette translocation restent encore inconnus.

b. Transfert des électrons au sein du complexe II

Le complexe II est aussi un complexe enzymatique du cycle de Krebs. Il participe à la chaîne respiratoire en transférant les 2 électrons du succinate au CoQ. Le complexe II possède un groupement flavine adénine dinucléotide (FAD) qui accepte les électrons du succinate et les transmet au site de liaison de CoQ via une série de centre Fe-S (Yankovskaya et al, 2003). La réduction de CoQ nécessite l'apport de 2 protons. Cependant ce complexe n'est pas doté d'une machinerie de translocation des protons. Ces protons sont, en fait, apportés par l'environnement protéique du site de liaison au CoQ.

CoQ est réduit par le complexe I ou le complexe II en  $\text{CoQH}_2$  (forme quinol). L'oxydation des équivalents réduits des nutriments conduit donc à la création d'un pool de  $\text{CoQH}_2$ , porteurs des électrons, qui se déplacent dans la membrane mitochondriale jusqu'au complexe III.

c. Transfert des électrons et translocation des protons au sein du complexe III

Le complexe III délivre les électrons du pool de  $\text{CoQH}_2$  au cytochrome c. Il couple cette réaction d'oxydoréduction à un pompage de protons à travers la membrane par un mécanisme appelé le cycle Q (Figure 17) (Crofts, 2004; Quinlan et al, 2011). Le cycle Q dépend de 2 sites fonctionnels du cytochrome b : le site  $\text{Q}_o$ , site d'oxydation de  $\text{CoQH}_2$  en CoQ, situé sur la

face cytoplasmique du complexe III et le site Qi, site de réduction du CoQ en CoQH<sub>2</sub>, situé sur la face matricielle du complexe. L'oxydation de 2 CoQH<sub>2</sub> au site d'oxydation Qo, permet la libération de 4 protons dans l'espace inter-membranaire et transmet les électrons au complexe III. Une partie des électrons est transférée directement au cytochrome c via la protéine Rieske Fe-S. L'autre partie des électrons est transférée sur le site de réduction Qi. Ces électrons permettent la réduction d'un nouveau CoQ et donc la formation d'un nouveau CoQH<sub>2</sub>. Cette réduction nécessite le pompage de protons de la matrice. Le nouveau CoQH<sub>2</sub> formé peut, de nouveau, être oxydé par le complexe III, au site Qo. Un cycle Q entraîne donc l'oxydation de 2 molécules de CoQH<sub>2</sub> en CoQ, la libération de 4 protons dans l'espace inter-membranaire et la réduction *de novo* d'une molécule de quinone CoQ en quinol CoQH<sub>2</sub>. Il nécessite le pompage de 2 protons de la matrice mitochondriale et permet la transmission de 2 électrons au cytochrome c.

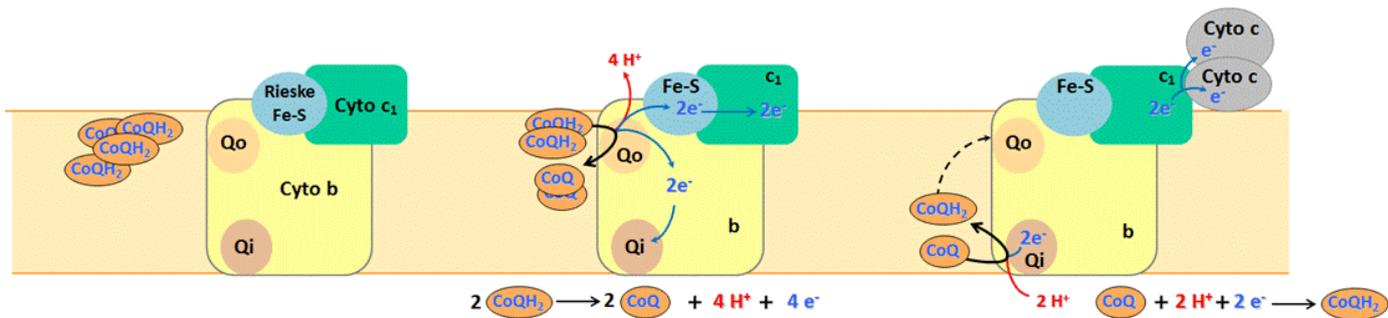


Figure 17 : Le cycle Q et le transfert des électrons du CoQH<sub>2</sub> au cytochrome c.

Le pool de CoQH<sub>2</sub> est oxydé au site Qo du cytochrome b du complexe III. Une partie des électrons est transmise au cytochrome c via la protéine Rieske et le cytochrome c1. L'autre partie est transmise au site Qi pour permettre la réduction d'un nouveau CoQ. Cyto = cytochrome, Rieske Fe-S = protéines Rieske Fe-S.

#### d. Transfert des électrons et translocation des protons au sein du complexe IV

Les électrons portés par le cytochrome c sont transférés au complexe IV. Ils vont permettre la réduction du dioxygène en 2 molécules d'eau et la translocation de 4 protons (Figure 18) (Hosler et al, 2006; Saraste, 1999). Ce mécanisme nécessite l'apport de 4 électrons. L'oxydation du cytochrome c par le complexe IV permet la libération des électrons, qui sont recueillis par le cuivre A (CuA). Ces électrons vont, ensuite, être transférés sur un noyau hème a, déclenchant la translocation de 4 protons vers l'espace inter-membranaire (Papa et al, 1998). Les électrons sont, finalement, transmis au centre binucléaire, composé de l'hème a<sub>3</sub> et du cuivre B (CuB). L'arrivée des électrons au centre binucléaire permet l'oxydation de l'O<sub>2</sub>

en 2 molécules d'H<sub>2</sub>O après une nouvelle translocation de 4 protons de la matrice, indépendante de l'hème a.

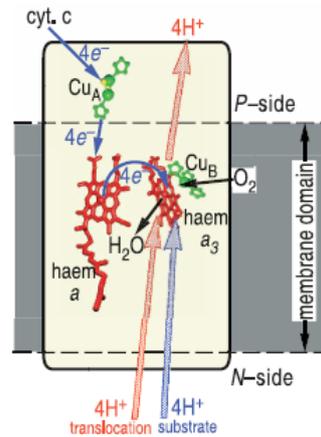


Figure 18 : **Transfert des électrons, pompage de proton et réduction de la molécule d'oxygène en molécule d'eau par le complexe IV.** (Wikstrom et al, 2003)

## 2. La force proton-motrice

La translocation des protons dans l'espace inter-membranaire est à l'origine de la force proton-motrice. Elle induit une différence de concentration en protons et de charges électriques entre la face matricielle et l'espace inter-membranaire à l'origine de la création d'un gradient électrochimique. La force proton-motrice est donc la résultante du gradient de pH et du potentiel membranaire. Sous l'action de cette force proton-motrice, les protons retournent à la matrice, par l'ATP synthase, permettant la phosphorylation d'un ADP en ATP.

## 3. L'ATP synthase

L'ATP synthase est constituée de 2 segments fonctionnels : le segment Fo et le segment F<sub>1</sub> (Figure 19). Le segment Fo, appelé stator, est un segment transmembranaire composé de multiples sous-unités formant le canal à protons. Le segment F<sub>1</sub>, appelé rotor, constitué par des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  et  $\delta$ , est le composant catalytique de l'enzyme. En effet, la sous-unité  $\alpha$  possède les sites de liaison pour l'ADP et le Pi. L'association des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  forme une structure en forme d'hélice. Elle est associée au segment Fo par la sous-unité  $\gamma$ . Le passage des protons dans le canal du segment Fo va induire la rotation de la structure en hélice via la sous-unité  $\gamma$ . Cette rotation permet la liaison entre l'ADP et le Pi (phosphate

inorganique) et la formation de l'ATP (Saraste, 1999). Cette liaison n'a pas besoin d'énergie. Cependant, la libération de l'ATP ainsi formé nécessite l'énergie apportée par la force proton-motrice.

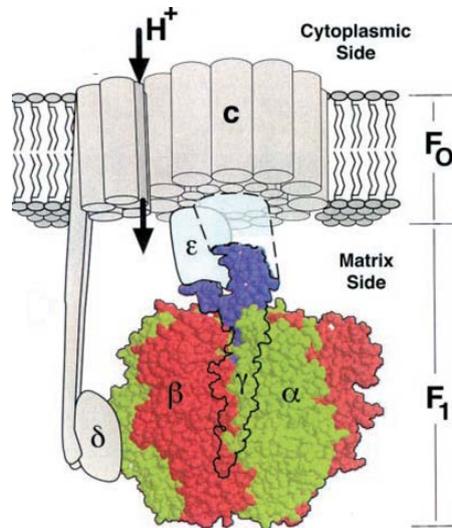


Figure 19 : **Structure de l'ATP synthase.** (Saraste , 1999)

L'ATP synthase permet donc la formation d'ATP à partir d'ADP et de Pi selon un mécanisme de rotation du segment F<sub>1</sub> dont le sens est contrôlé par le flux de protons. Cependant, en cas de disparition de la force proton-motrice, un mécanisme d'efflux de protons est susceptible de se produire au sein de l'ATP synthase. Ce mécanisme induirait une inversion du mouvement du segment F<sub>1</sub> entraînant une hydrolyse de l'ATP. Dans la mitochondrie, l'hydrolyse de l'ATP est réprimée par le peptide inhibiteur du segment F<sub>1</sub> (IF<sub>1</sub>) (Papa et al, 1996). Ce peptide se fixerait au segment F<sub>1</sub> et permettrait de bloquer le départ du dernier ATP synthétisé induisant le blocage de l'ATP synthase (Cabezon et al, 2000).

### C. Production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène.

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des espèces chimiques oxygénées pouvant induire l'oxydation d'autres molécules. Elles comprennent, notamment, l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les radicaux peroxydes (RCOO<sup>·</sup> et OH<sup>·</sup>).

Lors du fonctionnement de la phosphorylation oxydative, il arrive que des électrons quittent la chaîne respiratoire. Ils ont alors la possibilité d'interagir avec l'O<sub>2</sub> (qui possède un fort potentiel d'oxydoréduction). Le passage d'un électron sur la molécule d'O<sub>2</sub> forme un O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *In*

*vivo*, cet anion est presque instantanément pris en charge par une enzyme anti-oxydante mitochondriale, la superoxyde dismutase liée au manganèse (SOD-Mn). Cette enzyme catalyse la formation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et d'O<sub>2</sub> à partir de 2 molécules d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de 2 protons. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possède une durée de vie beaucoup plus longue que l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Il peut induire l'oxydation des molécules environnantes telles que les protéines, l'ADN et les membranes cellulaires et peut diffuser à travers les membranes biologiques. Son élimination est prise en charge par des enzymes anti-oxydantes, principalement par la glutathion peroxydase (GPx). Cette enzyme catalyse la réaction de 2 glutathions réduits et de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permettant la formation d'H<sub>2</sub>O et de glutathion disulfite. Elle possède des isoformes mitochondriales et cytosoliques.

Les travaux de Hinkle et col. et Boveris et col. ont été les premiers à démontrer la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par la mitochondrie (Boveris et al, 1972; Hinkle et al, 1967). Elle est, maintenant, considérée comme une importante source cellulaire d'ERO.

La formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nécessite une grande proximité entre l'O<sub>2</sub> et les sites de transport des électrons limitant le nombre de sites de formation des ERO. Les études réalisées sur mitochondries isolées ont permis de mettre en évidence 2 sites de formation des ERO au sein de la chaîne respiratoire : le complexe I et le complexe III (Chen et al, 2003; Kussmaul & Hirst, 2006; Liu et al, 2002).

## 1. Production d'ERO par le complexe I

Le complexe I permet la formation d'ERO selon 2 mécanismes.

Lors d'une faible demande en ATP, l'intensité de la respiration est diminuée, entraînent une augmentation du ratio NADH+H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> et une réduction des groupements FMN du complexe I. Ces groupements FMN réduits sont alors capables de transmettre des électrons à l'O<sub>2</sub> et permettent la formation d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Les travaux de Kussmaul et col. ont confirmé ce mécanisme en reproduisant la diminution de l'intensité de respiration par ajout de roténone (inhibiteur du complexe I provoquant le blocage du transfert des électrons au CoQH<sub>2</sub>) en présence de substrat du complexe I (NADH) (Kussmaul et Hirst, 2006). Cependant, le mécanisme majeur de production d'ERO par le complexe I semble se produire lors du processus de transport inverse des électrons (Figure 20). Ce mécanisme se produit lorsqu'une force proton-motrice importante est associée à fort pool de CoQH<sub>2</sub>. Dans ces conditions, la force proton-motrice permet la transmission des électrons de CoQH<sub>2</sub> au complexe I et donc le

flux inverse des électrons. Ce flux inverse d'électrons peut ainsi réduire les groupements FMN du complexe I et entraîner la formation d' $O_2^{\cdot-}$ . Ce mécanisme a été mis en évidence par les travaux de Hinkle et col. (Hinkle et al, 1967) et confirmé par les travaux de Liu et col. montrant que la production d' $O_2^{\cdot-}$ , induite par ajout de substrat du complexe II (le succinate), était inhibée par la présence de roténone (bloquant le transfert des électrons de  $CoQH_2$  au complexe I) ou par la dissipation de la force proton-motrice (Liu et al, 2002). *In vivo*, ce mécanisme est principalement associé à des conditions cellulaires hypoxiques (Jezek et Hlavata, 2005).

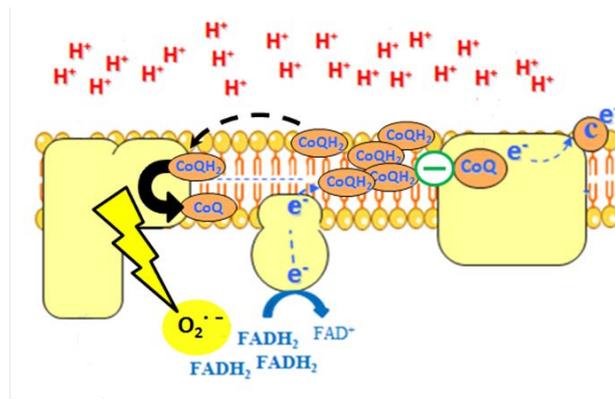


Figure 20 : **Production d'ERO par le flux inverse des électrons.**

La mitochondrie se trouve dans des conditions de faible consommation d'ATP et de forte oxydation des substrats créant une force proton-motrice importante (forte concentration de protons dans l'espace inter-membranaire) et une forte quantité de  $CoQH_2$  (état réduit). Ne pouvant être oxydés par le complexe III (saturation du complexe), les  $CoQH_2$  vont alors être transférés au complexe I. L'oxydation des  $CoQH_2$  en  $CoQ$  au complexe I provoque une réduction des groupements FMN favorisant la formation d' $O_2^{\cdot-}$ .

## 2. Production d'ERO par le complexe III

Le complexe III a longtemps été considéré comme le site majeur de la production d'ERO mitochondriale. Les travaux de Chen et col. ont notamment montré que l'ajout d'un inhibiteur spécifique du complexe III, l'antimycine A, sur des mitochondries isolées de cœur de rat induisait une forte augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ . Cette production d'ERO est directement en relation avec le cycle Q. L'antimycine A induit le blocage de ce cycle en empêchant le  $CoQ$ , oxydé au site  $Q_o$ , de rejoindre son site de réduction  $Q_i$ . Ce blocage provoque l'accumulation de  $CoQH_2$  au site d'oxydation et augmente la production d' $O_2^{\cdot-}$  au site  $Q_o$  (Chen et al, 2003). Contrairement à la production d' $O_2^{\cdot-}$  au complexe I, ce mécanisme induit la production d' $O_2^{\cdot-}$  sur la face externe de la membrane interne et une libération d'ERO dans l'espace inter-membranaire (St-Pierre et al, 2002). Cependant, cette production d'ERO

n'étant observable que par ajout d'inhibiteur, la pertinence physiologique de la production d'ERO au complexe III reste sujet à débat (Forman & Azzi, 1997; Liu et al, 2002). En conditions physiologiques, la production d'ERO par le complexe III serait donc de moindre intensité et négligeable par rapport celle du complexe I (Kudin et al, 2004; Murphy, 2009).

### 3. Impact de la production mitochondriale d'ERO sur la phosphorylation oxydative

Les premières estimations avaient suggéré que la production d'ERO représentait approximativement 1 à 2 % de la consommation d'oxygène d'un individu (Rolfe & Brown, 1997). Ce chiffre, basé sur les expériences menées *in vitro*, semble être surévalué. Les travaux réalisés avec des concentrations de substrats et une pression partielle en oxygène plus physiologiques montrent que la production d'ERO, *in vivo*, représenterait, en fait, moins de 1% de notre consommation d'oxygène (Murphy, 2009; St-Pierre et al, 2002). Cependant, la production d'ERO reste pertinente en terme biologique. En effet, des expérimentations, réalisées sur des souris invalidées pour le gène de la superoxyde dismutase mitochondriale, montrent que la perte de l'une des enzymes majeures des défenses anti-oxydantes induit des phénotypes pathologiques sévères, impliquant notamment une dégénérescence neuronale (Lebovitz et al, 1996). Les ERO peuvent aussi avoir un impact direct sur le fonctionnement de la phosphorylation oxydative en altérant les complexes de la chaîne respiratoire. Ainsi, un régime hypercalorique est associé à une augmentation de la production d'ERO et à une diminution de l'activité des complexes I et III (Yokota et al, 2009). Les travaux de Paradies et col. ont notamment montré que l'augmentation de la production d'ERO entraînait une diminution de l'activité du complexe III (Paradies et al, 2001). Ce processus serait lié à la peroxydation des cardiolipines, étroitement associées aux complexes. En effet, l'ajout de cardiolipines par fusion de liposomes permet la restauration de l'activité du complexe et ce processus n'est pas observé lors d'ajout d'autres phospholipides (phosphatidylcholine ou phosphatidyléthanolamine) ou par l'ajout de cardiolipines peroxydées (Paradies et al, 2001). Cette atteinte de l'activité des complexes respiratoires par la peroxydation des cardiolipines a aussi été démontré pour le complexe I et le complexe IV (Paradies et al, 2004; Paradies et al, 2000). Cependant, les ERO sont aussi des acteurs essentiels au fonctionnement cellulaire. Ils sont, notamment, impliqués dans la prolifération, la croissance et la survie cellulaire (Martindale & Holbrook, 2002) et participent à de nombreuses voies de signalisation comme

second messenger (Droge, 2002). L'enjeu cellulaire est donc de maintenir l'équilibre entre une production nécessaire et une production excessive d'ERO. Cet équilibre repose sur l'activité des enzymes anti-oxydantes, qui permettent la dégradation des ERO, mais aussi sur la régulation de la phosphorylation oxydative et l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, qui les produisent.

## D. Régulation de la phosphorylation oxydative

Il n'existe pas de stockage de l'ATP. La mitochondrie doit donc s'adapter en permanence à la demande énergétique de la cellule ou du tissu dont elle dépend. Cette demande d'énergie peut varier d'un facteur 1 à 10 et nécessite donc une régulation rapide de la phosphorylation oxydative (Kadenbach et al, 2010). De plus, la régulation de la phosphorylation oxydative permet aussi d'ajuster l'intensité de la force proton-motrice et donc de contrôler la production d'ERO mitochondriale. La phosphorylation oxydative peut être régulée de 2 façons. Il peut s'agir d'une régulation de sa vitesse, en régulant l'intensité de respiration et ainsi l'intensité de phosphorylation, ou d'une régulation de son efficacité, en modulant l'intensité du couplage entre la respiration et la phosphorylation.

### 1. Régulation de l'intensité de la respiration.

#### a. Principe du contrôle respiratoire

Ce mécanisme permet d'adapter l'intensité de respiration à l'intensité d'utilisation de l'ATP. Ainsi, si la consommation d'ATP est augmentée, il y aura une augmentation du transport de l'ATP vers la cellule induisant une augmentation du transport d'ADP vers la matrice mitochondriale. L'ADP va stimuler l'activité de l'ATP synthase déclenchant la dissipation de la force proton-motrice. Ce phénomène va stimuler l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, associés au pompage des protons, et donc de la respiration. De même, si l'ATP n'est pas consommé, l'activité de l'ATP synthase sera inhibée entraînant une augmentation de la force proton-motrice qui inhibera l'activité de la chaîne respiratoire (Kadenbach, 2003).

## b. Les supercomplexes.

Les complexes de la phosphorylation oxydative sont assemblés en structure supramoléculaire, les supercomplexes (Schagger & Pfeiffer, 2000). Dans les mitochondries humaines, ces supercomplexes de la chaîne respiratoire comprennent 1 monomère du complexe I, un dimère du complexe III pouvant s'associer avec 1 à 4 complexes IV ( $I_1III_2IV_{0-4}$ ) (Figure 21a). Cet assemblage possède un rôle fonctionnel important. Il permet d'optimiser le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire en diminuant le temps de diffusion des transporteurs d'électrons : le COQH<sub>2</sub> et le cytochrome c (Schagger, 2002). De plus, cette association entre complexes de la chaîne respiratoire est une véritable nécessité fonctionnelle. Ainsi, les travaux de Schagger ont démontré que le complexe I ne pouvait être intégré dans la chaîne respiratoire s'il n'était pas associé au complexe III (Schagger et al, 2004). De même, les travaux de Krause tendent à démontrer que l'ATP synthase serait constitutivement organisée sous forme homo-oligomère et que cette organisation serait requise pour son activité fonctionnelle (Krause et al, 2005). L'oligomérisation de l'ATP synthase serait aussi responsable de la formation des crêtes mitochondriales (Paumard et al, 2002). La formation des crêtes mitochondriales permet aussi l'optimisation du fonctionnement de la phosphorylation oxydative. L'invagination de la membrane interne entraîne, en effet, une diminution locale du volume de l'espace inter-membranaire dans lequel évolue le cytochrome c et les protons de la force proton-motrice. Cette structure membranaire permet donc de réduire le risque de diffusion du cytochrome c et la délocalisation de la force proton-motrice (Papa et al, 2006) (Figure 21B). L'ANT est aussi impliquée dans ces superstructures. L'association de la translocase, fonctionnant sous forme dimérique (Pebay-Peyroula et al, 2003), aux complexes de la chaîne respiratoire et à l'ATP synthase permet, ainsi, une meilleure synergie entre la synthèse et le transport de l'ATP en empêchant la diffusion des métabolites (ATP et ADP) dans la matrice mitochondriale (Claypool et al, 2008). Ainsi, ces supercomplexes permettent un fonctionnement optimal de la phosphorylation oxydative. Par conséquent, la perte de ces structures entraînerait une diminution de la vitesse de la phosphorylation oxydative.

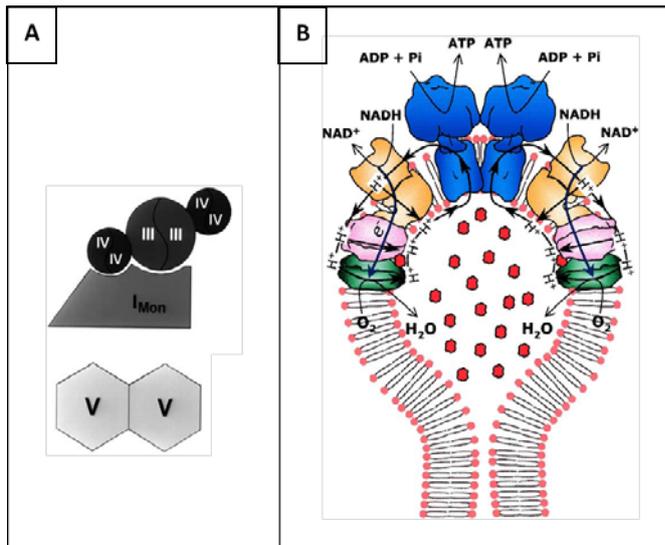


Figure 21: **Les supercomplexes.**

A) Schéma de l'association des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase en supercomplexe chez le mammifère (Schagger et al, 2002). B) La formation des crêtes mitochondriales empêche la diffusion du cytochrome c dans l'espace inter-membranaire (Papa et al, 2006).

### c. Effet allostérique de l'ATP sur le complexe IV

L'allostérie permet la régulation d'une enzyme par la fixation d'une molécule effectrice entraînant le changement de conformation de l'enzyme. Des sites de fixation à l'ADP et à l'ATP ont été mis en évidence sur le complexe IV. Les travaux d'Arnold et Kadenbach ont démontrés que l'ATP pouvait se fixer sur la sous-unité IV de la face matricielle de ce complexe induisant un changement de conformation de l'enzyme (Arnold & Kadenbach, 1997). Cette fixation induirait une diminution de la vitesse de transfert des électrons du cytochrome c au complexe IV (Arnold & Kadenbach, 1997). Ainsi, la non consommation de l'ATP formé pourrait induire cette inhibition allostérique de l'ATP et entraînerait donc une inhibition de la respiration. Cependant, l'équipe de Kadenbach suggère que cet effet allostérique nécessiterait une phosphorylation préalable du complexe IV par une voie dépendante de l'AMPC (Bender & Kadenbach, 2000). Les mécanismes exacts de cette inhibition restent donc à être éclaircis.

#### d. Régulation par la phosphorylation des complexes

La phosphorylation oxydative est aussi l'objet de régulations par phosphorylation réversible des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase. Les travaux de Nguyen et col. ont mis en évidence une interaction entre la protéine kinase C  $\delta$  et l'ATP synthase par co-immuno-précipitation dans des myocytes de rats soumis à l'hypoxie. Ils ont pu démontrer que l'activation de la PKC  $\delta$  induisait une diminution de l'activité de l'ATP synthase (Nguyen et al, 2008). La voie dépendante de l'AMPc et de la protéine kinase A semble aussi être une voie de régulation majeure de la chaîne respiratoire et, notamment, de l'activité du complexe IV. Ces effets, sur ce complexe, semblent, cependant, diverger selon les sous-unités impliquées. Ainsi, les travaux de Lee et col. ont démontré que la phosphorylation de la sous-unité I du complexe IV entraînait l'inhibition de l'enzyme (Lee et al, 2005a). A l'inverse, la phosphorylation de l'isoforme I de la sous-unité IV du complexe IV permettrait un blocage de l'inhibition allostérique de l'enzyme par l'ATP et induirait une augmentation de son activité (Acin-Perez et al, 2011). Le complexe IV n'est pas le seul complexe de la chaîne respiratoire sensible à cette régulation. Les travaux de Scacco et col. ont mis en évidence, la phosphorylation de la sous-unité de 18 kDa du complexe I par la voie dépendante de l'AMPc. Cette phosphorylation induirait une augmentation de la respiration mitochondriale (Scacco et al, 2000). Outre son action directe sur l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, cette voie de phosphorylation dépendante de l'AMPc pourrait avoir une influence directe sur la biosynthèse des complexes (Lee et al, 2005b; Papa et al, 2010).

#### e. Contrôle par modification de la transcription

Les complexes de la chaîne respiratoire sont composés de multiples sous-unités. Certaines de ses sous-unités possèdent plusieurs isoformes dont l'expression dépend du tissu ou des conditions environnementales. L'expression de ces différentes isoformes peut avoir des répercussions sur les propriétés des complexes notamment sur la régulation de leur activité. Les travaux d'Anthony et col. ont mis en évidence que les isoformes de la sous-unité VIa du complexe IV pouvait avoir une expression tissu-spécifique et que, cette variation d'isoformes induisait une modification de la régulation du complexe IV (Anthony et al, 1993). Le complexe IV possède des sites de fixation à l'ADP et à l'ATP. Si la fixation de l'ATP provoque une inhibition allostérique du complexe, l'ADP a été montré pour être un activateur

de cette enzyme. Ainsi, les travaux d'Anthony ont démontré que les mitochondries hépatiques bovine possédaient une isoforme de la sous-unité VIa différent de celle exprimée dans les mitochondries musculaire et cardiaque (respectivement, isoforme VIa-L pour le foie et VIa-H pour le muscle squelettique et le cœur). Ils ont pu observer que l'isoforme VIa-H possédait une activité augmenté par ajout d'ADP alors que l'isoforme VIa-L était totalement insensible à cet activateur (Anthony et al, 1993). Cette différence d'isoforme pourrait donc avoir un impact sur la régulation de la phosphorylation oxydative et l'adaptation de la mitochondrie au statut énergétique de la cellule et de l'organe. La sous-unité IV du complexe IV possède aussi un mode de régulation transcriptionnelle. Un environnement hypoxique favoriserait, en effet, l'expression de l'isoforme 2 de la sous-unité IV au détriment de l'isoforme 1 (Horvat et al, 2006). Contrairement à l'isoforme 1, l'isoforme 2 de la sous-unité IV est insensible à l'effet allostérique de l'ATP. Cette variation transcriptionnelle implique donc une abolition de l'inhibition par l'ATP. Elle prouve, cependant, que la cellule est capable d'induire une modification de l'expression des sous-unités des complexes respiratoires afin de s'adapter au milieu dans lequel elle évolue.

## 2. Régulation de l'efficacité de la synthèse de l'ATP

L'efficacité de la phosphorylation oxydative est déterminée par le degré du couplage entre le fonctionnement de la chaîne respiratoire (reflété par la quantité d'oxygène utilisée et la quantité de substrats oxydée) et l'activité de l'ATP synthase (reflétée par la quantité d'ATP synthétisée). Le découplage de ce processus peut résulter d'une variation de la génération ou de l'utilisation de la force proton-motrice (découplage intrinsèque) ou d'une dissipation de cette force (découplage extrinsèque).

### a. Découplage intrinsèque

Le découplage intrinsèque se déroule au sein même des complexes de la phosphorylation oxydative. Il peut concerner un découplage entre le transfert des électrons et le pompage des protons entraînant une diminution du nombre de protons pompés par électron transféré et donc une variation de la stœchiométrie  $H^+/e^-$ . Il peut aussi moduler le couplage entre l'ATP

synthase et la force proton-motrice induisant une diminution du nombre d'ATP formé pour une force proton-motrice donnée et donc une variation de la stœchiométrie ATP/H<sup>+</sup>.

#### 1) Variation de la stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup>

Les travaux de Pietrobon sont les premiers à avoir suggéré que le transport des électrons n'était pas strictement couplé au pompage des protons (Pietrobon et al, 1981).

Cette variation de stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> impliquerait essentiellement le complexe IV (Murphy & Brand, 1988). Les auteurs ont pu notamment mettre en évidence l'influence du potentiel de membrane dans ce processus. Ainsi, l'augmentation du potentiel de membrane au-delà d'une valeur critique de 180 mV induit une diminution de la stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> au sein du complexe IV (Murphy & Brand, 1988). Ce mécanisme diminue le nombre de protons pompés par électron transféré. Par conséquent, la mitochondrie devra consommer plus d'O<sub>2</sub> pour oxyder une même quantité de substrats donnée. La stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> du complexe IV pourrait être également influencée par l'activité de l'ATP synthase et la concentration en ATP mitochondriale. Ainsi, les travaux de Frank et Kadenbach ont démontré que l'augmentation du ratio ATP/ADP pourrait induire une diminution de la stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> (Frank & Kadenbach, 1996). Ce mécanisme serait lié à l'inhibition allostérique de l'ATP. Outre, son influence sur l'intensité de la respiration, le changement de conformation du complexe IV, induit par la fixation de l'ATP, pourrait altérer le couplage entre le pompage de protons et le transfert d'électrons (Frank & Kadenbach, 1996). L'effet allostérique de l'ATP aurait donc un double impact sur la bioénergétique mitochondriale en influençant l'intensité de la respiration et l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Le flux d'électrons pourrait aussi influencer la stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> du complexe IV. En effet, Capitanio et col. ont montré qu'une forte pression d'électrons dans la chaîne respiratoire induisait une diminution de la stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> du complexe (Capitanio et al, 1996).

Les mécanismes impliqués dans cette variation de stœchiométrie H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> ne sont pas totalement élucidés. Au sein du complexe IV, l'hème a serait responsable de la translocation des protons indépendante de la réduction de l'O<sub>2</sub> (et donc impliquée dans la création de la force proton-motrice (Papa et al, 1998). Capitanio et col. ont suggéré qu'une forte pression en électrons serait capable de modifier ce trajet des électrons induisant le court-circuitage de l'hème a. Les électrons passeraient donc directement du groupement CuA au centre binucléaire induisant

l'absence de translocation de protons par l'hème a. Ce nouveau trajet serait responsable de la diminution de la stœchiométrie  $H^+/e^-$  (Capitanio et al, 1996).

## 2) Variation de la stœchiométrie $H^+/ATP$ .

Le découplage intrinsèque pourrait aussi impliquer le fonctionnement de l'ATP synthase induisant une variation de la stœchiométrie  $H^+/ATP$ . Ce processus reste encore peu documenté. Les travaux de Turina et col., réalisés chez des bactéries *Rhodobacter caspulatus* et *Escherichia coli*, ont suggéré que la liaison de l'ADP et du Pi sur l'ATP synthase était indispensable au maintien de la stœchiométrie  $H^+/ATP$  et qu'une diminution de la concentration en ADP et Pi favoriserait la diminution de cette stœchiométrie (Turina et al, 2006). Ce processus reste, cependant, très peu étudié chez les eucaryotes supérieurs et la réelle implication d'une variation de la stœchiométrie  $H^+/ATP$  sur l'efficacité de la synthèse d'ATP reste à être déterminée.

Les mécanismes de découplage intrinsèque observés impliquent donc une altération de la création de la force proton-motrice (stœchiométrie  $H^+/e^-$ ) ou une altération de son utilisation (stœchiométrie  $H^+/ATP$ ) qui diminue l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Cette efficacité peut aussi être affectée par une dissipation de la force proton-motrice impliquant des mécanismes de découplage extrinsèque (ou de fuite de protons).

### b. Découplage extrinsèque.

Les mécanismes de découplage extrinsèque s'expliquent par une diffusion passive des protons à travers la membrane mitochondriale impliquant une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale. L'augmentation de la perméabilité membranaire aux protons peut être induite par une modification des propriétés membranaires ou par l'activation d'effecteurs protéiques tels que des transporteurs.

## 1) Modification des propriétés membranaires

Les travaux d'Hochman et col. ont permis de mettre en évidence l'influence de la perméabilité aux protons de la membrane interne mitochondriale sur l'efficacité de la phosphorylation oxydative (Hochman et al, 1985). Cette perméabilité membranaire aux protons pourrait être influencée par le potentiel membranaire. Les travaux d'O'Shea et col ont ainsi démontré que la conductance membranaire aux protons augmentait de manière exponentielle pour un potentiel membranaire supérieur à 150 mV (Oshea et al, 1984). Cependant, les mécanismes impliqués ne sont pas encore élucidés. Les travaux de Porter et Brand ont mis en évidence un lien proportionnel entre la conductance aux protons et la masse de l'animal (Porter & Brand, 1993). Cependant, l'augmentation de la perméabilité membranaire pourrait, en fait, s'expliquer par la nature des acides gras composant les phospholipides de la membrane interne mitochondriale. Ainsi, une augmentation du taux d'acides gras mono-insaturés et une diminution du taux d'acides gras poly-insaturés des phospholipides membranaires induisent une diminution de la fuite de protons indépendamment de la masse corporelle (Brand et al, 2003). La composition en acides gras des phospholipides la membrane mitochondriale pourrait donc jouer un rôle dans la dissipation passive de la force proton-motrice.

## 2) Découplage induit par les acides gras libres.

Les travaux de Nicholls ont démontré que l'ajout d'acides gras libres dans le milieu d'étude de mitochondries isolées de tissu adipeux brun induisait un découplage de la phosphorylation oxydative associé à une augmentation de la conductance aux protons (Nicholls, 1976). Les acides gras seraient donc capables d'induire une fuite de protons dans la membrane interne mitochondriale. Ce mécanisme pourrait s'expliquer par un phénomène de flip-flop des acides gras protonés. Les travaux de Kamp et Hamilton ont ainsi démontré que l'ajout d'acides gras libres à des vésicules phospholipidiques en suspension induisait une acidification du pH interne de la vésicule (Kamp & Hamilton, 1992). Les auteurs expliquaient ce phénomène par la bascule d'un acide gras protoné du feuillet interne au feuillet externe suivi de sa déprotonation dans le milieu intra-vésiculaire induisant la formation d'un gradient de protons à travers la membrane phospholipidique (Figure 22) (Kamp & Hamilton, 1992).

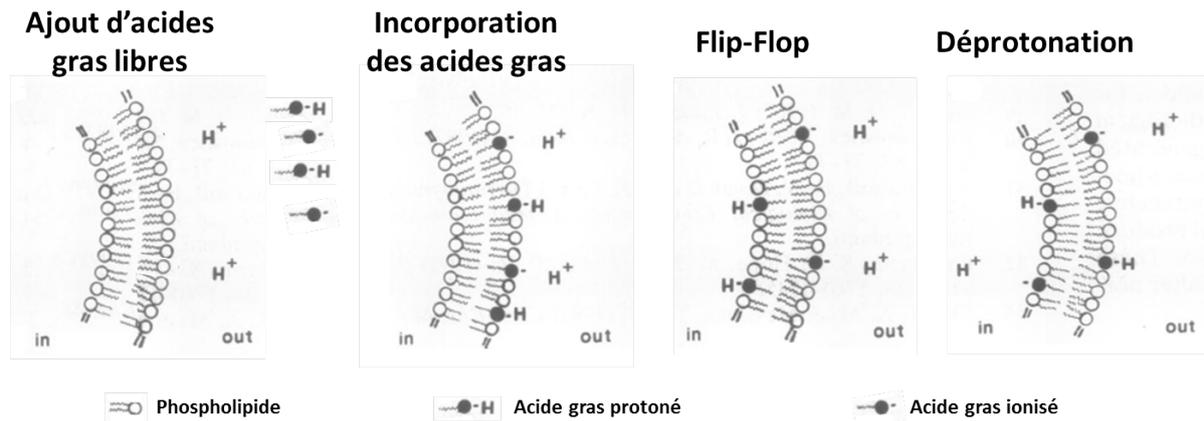


Figure 22 : **Découplage induit par les acides gras libre : hypothèse d'un découplage par « flip flop » d'acides gras protonés.** (d'après Kamp et Hamilton, 1992).

Cependant, l'implication de ce mécanisme de « flip-flop » dans le découplage de la phosphorylation oxydative reste très controversée (Kadenbach, 2003; Skulachev, 1991). Le découplage induit par l'ajout d'acides gras libres serait, en fait, dépendant d'effecteurs protéiques situés sur la membrane interne tels que les protéines découplantes (UCP) ou l'ANT (Skulachev, 1998). Les acides gras seraient donc plutôt, des activateurs de ce découplage.

### 3) Rôle de l'ANT

L'ANT semble jouer un rôle dans la dissipation de la force proton-motrice induite par les acides gras. En effet, les travaux d'Andreyev et col. ont démontré que l'ajout d'inhibiteurs spécifiques de l'ANT (acide bongkréique et carboxyatractylate ou CAT) supprimait l'effet découplant induit par une faible concentration de palmitate (Andreyev et al, 1989). Cependant les mécanismes de ce découplage restent à déterminer.

L'ANT pourrait également être impliqué dans la conductance basale aux protons. Les travaux de Brand et col. ont montré que l'invalidation du gène de l'isoforme 1 de l'ANT entraînait une diminution de la fuite de protons dans les mitochondries musculaires de souris, indépendamment de la présence d'acides gras libres (Brand et al, 2005). De même, la surexpression de cette translocase induisait une augmentation de la conductance basale aux protons de la membrane interne mitochondriale (Brand et al, 2005).

L'ANT pourrait donc être impliqué à la fois dans la conductance basale aux protons et dans le découplage induit par les acides gras. Cette implication pourrait être dépendante du type d'isoforme de l'ANT exprimé. Les travaux de Shabalina et col. ont ainsi mis en évidence l'implication de l'isoforme 2 de l'ANT dans le découplage induit par les acides gras sur des

mitochondries hépatiques de souris (Shabalina et al, 2006). Ils ont aussi démontré que ces mitochondries hépatiques n'exprimaient que très faiblement l'isoforme 1 de l'ANT. Les auteurs suggéraient que l'isoforme 1 de l'ANT était impliquée principalement dans la conductance basale aux protons et l'isoforme 2 dans le découplage induit par les acides gras libres (Shabalina et al, 2006). Cette hypothèse nécessite, toutefois, d'être confortée par de plus amples recherches.

#### 4) Les protéines découplantes UCP

Les travaux de Heaton et col. sur les mitochondries du tissu adipeux brun ont permis de mettre en évidence une autre protéine impliquée dans le découplage de la phosphorylation oxydative (Heaton et al, 1978). Cette protéine était insensible au CAT et inhibée par l'ajout de GDP. Retrouvée chez les animaux hibernants, cette protéine mitochondriale aurait un rôle essentiel dans la thermogénèse permettant la production de chaleur par le découplage de la phosphorylation oxydative (Enerback et al, 1997). Elle doit, à cette découverte, son premier nom de thermogénine qui laissera place à UCP1 (*uncoupling protein 1*). Les mécanismes impliqués dans le découplage induit par UCP1 sont encore débattus (Krauss et al, 2005).

De 1997 à 2000, de nouvelles isoformes de cette protéine découplante ont été découvertes : UCP2, UCP3, UCP4 et UCP5/BMCP1 (Fleury et al, 1997; Mao et al, 1999; VidalPuig et al, 1997; Yu et al, 2000). Cependant, l'expression de ces protéines découplantes n'induirait pas systématiquement un découplage de la phosphorylation oxydative. En effet, des travaux réalisés sur des mitochondries musculaires isolées de rats ayant subi un jeûne, montrent une augmentation de l'expression d'UCP2 et UCP3, sans altération de la conductance aux protons (Cadenas et al, 1999). L'étude de la structure et de la séquence protéique d'UCP1 a montré que les résidus Histidine 145 et 147 étaient indispensables au transfert des protons. Malgré leur homologie de séquence, UCP3 ne possède pas le résidu Histidine 147 et UCP2 n'en possède aucun (Bienengraeber et al, 1998). Le transfert des protons ne serait donc pas un mécanisme constitutif de ces protéines. Les travaux d'Echtay et col. ont mis en évidence la nécessité de co-activateur dans la réalisation du découplage par UCP2 et UCP3 (Echtay et al, 1999) et prouvé que le coenzyme Q et les ERO étaient indispensables à l'activation de ces protéines (Echtay et al, 2002; Echtay et al, 2001). Les acides gras ont également été montrés comme des activateurs potentiels (Winkler & Klingenberg, 1994).

### 3. Rôle des ERO dans la régulation de la phosphorylation oxydative.

Bien que le découplage puisse être associé à la régulation des ERO (Brand, 2000), les mécanismes impliqués dans le découplage pourraient aussi être modulés par l'action des ERO. Les travaux de Tonkonogi et al ont ainsi démontré que l'exposition de mitochondries musculaires (quadriceps humains) aux espèces réactives  $H_2O_2$  et  $OH^\cdot$ , induisait une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative, signifiée par la diminution du rapport P/O (Tonkonogi et al, 2000). Ce découplage pourrait être induit par une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons. Les travaux d'Echtay ont ainsi démontré que la conductance aux protons était augmentée par la production exogène d' $O_2^{\cdot -}$  (Echtay et al, 2002). L'action des ERO étudiés lors de ces travaux serait en fait indirecte et impliquerait les phénomènes de peroxydation lipidique (Brand et al, 2004). La peroxydation lipidique produit des réactifs alkénals. Parmi ces réactifs alkénals, le 4-hydroxy-2-nonéal (4HNE) serait directement impliqué dans le découplage de la phosphorylation oxydative. L'implication de ce composé a été mise en évidence par l'utilisation de la molécule MitoPBN. Cette molécule est un dérivé ciblant la mitochondrie de la molécule  $\alpha$ -phényl-N-tert-butylnitronne qui réagit rapidement avec les radicaux carbonés, prévenant la peroxydation lipidique, mais qui est insensible à l' $O_2^{\cdot -}$  et aux produits de cette peroxydation (Figure 23) (Murphy et al, 2003).

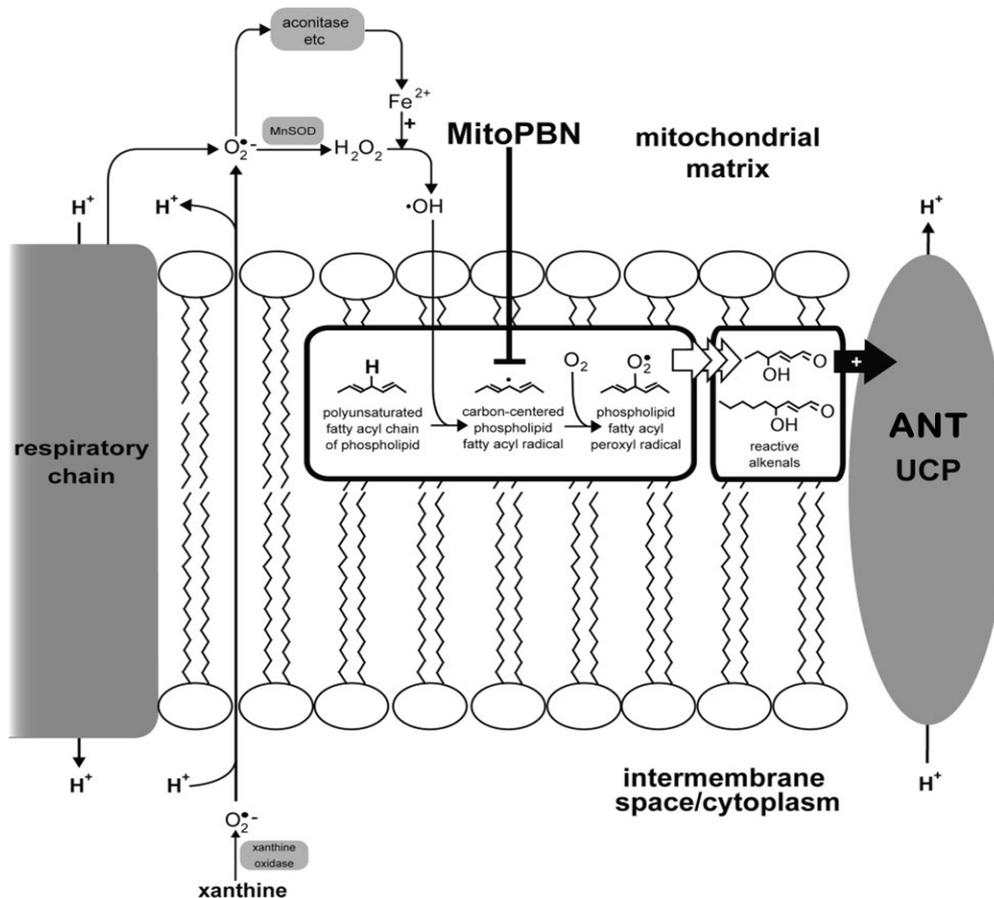


Figure 23 : **Modèle de l'activation de l'ANT et des UCP par les ERO via la peroxydation lipidique et voie d'action de MitoPBN.** (d'après Murphy et al, 2003).

Le 4HNE permettrait d'activer le découplage de la phosphorylation oxydative par l'ANT et les UCP (Echtay et al, 2003). En effet, Echtay et col. ont démontré que l'ajout de CAT et/ou de GDP permettait d'inhiber l'augmentation de la conductance aux protons induite par 4HNE (Echtay et al, 2003). Ces travaux ont aussi mis en évidence que le 4HNE pouvait induire le découplage via l'activation des UCP et de l'ANT en absence d'acides gras libres (Echtay et al, 2003). Ainsi, l'ajout de BSA ne pouvait inhiber l'augmentation de la conductance aux protons induite par 4HNE (Echtay et al, 2003). De plus, les travaux de Parker et col. ont étudié la part de chacune de ces protéines dans le découplage induit par 4HNE sur des mitochondries isolées de muscle squelettique murin (Parker et al, 2008). Par utilisation d'inhibiteurs et d'un modèle animal invalidé pour le gène codant pour UCP3, les auteurs ont pu déterminer que la part du découplage via l'ANT était de 64%, celle via l'UCP3 de 11% et que 25% de ce découplage, induit par 4HNE, viendrait de mécanismes non identifiés (Parker et al, 2008). L'ANT aurait donc un rôle primordial dans le découplage induit par les ERO.

Les mécanismes impliqués dans le découplage induit par le 4HNE ne sont pas totalement élucidés. Le 4HNE est connu pour réagir avec les acides aminés libres. Il pourrait interagir avec les résidus protéiques de l'ANT et des UCP et entraîner un changement de conformation responsable du passage des protons (Brand et al, 2003). Cette hypothèse nécessite cependant d'être confortée par des plus amples recherches.

#### 4. Rôle des CL dans la régulation de la phosphorylation oxydative

##### a. Influence des CL sur la régulation de l'intensité de la respiration

Les CL sont étroitement associées aux propriétés physiques de la membrane mitochondriale et au fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire. Les travaux d'Ohtsuka et col., réalisés sur des cellules ovariennes de hamster (CHO), ont montré que la délétion de la phosphatidylglycérophosphate synthase (PGP-S), une enzyme impliquée dans la synthèse des cardiolipines, induisait une perte des crêtes mitochondriales (Ohtsuka et al, 1993). La perte des CL induirait une augmentation de la diffusion du cytochrome c et une délocalisation de la force proton-motrice, dans l'espace inter-membranaire, qui provoqueraient le ralentissement de la phosphorylation oxydative. De plus, les CL sont indispensables à la stabilité des supercomplexes (Pfeiffer et al, 2003). Ainsi, des expériences réalisées sur des levures invalidées pour le gène *cdr1* (gène de la cardiolipine synthase, dernière enzyme de la voie de biosynthèse des CL), montrent que la perte de CL conduit à une déstabilisation des supercomplexes III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub> ainsi que de leur association avec l'ANT. Ce phénomène provoque l'augmentation du temps de diffusion du cytochrome c et une diminution du couplage entre synthèse et transport de l'ATP (Claypool et al, 2008) (Figure 24). Les travaux de Sedlák et Robinson ont aussi démontré que la perte de cardiolipines (par action de la phospholipase A2) entraînait l'altération de la structure quaternaire et de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire (Sedlak & Robinson, 1999). De même, la diminution du contenu en cardiolipines induit par une hypothyroïdie, est associée à une diminution de l'activité du complexe IV (Paradies et al, 1997). Enfin, les CL possèdent aussi la propriété de fixer les protons sur leur tête polaire et représentent donc un réservoir de protons (Kates et al, 1993). Cette canalisation des protons peut permettre une optimisation de l'activité de l'ATP synthase. Par conséquent, les CL représentent un acteur important de l'optimisation du fonctionnement de la

phosphorylation oxydative. Les paramètres influençant l'équilibre du contenu de ce phospholipide, tels que les hormones thyroïdiennes et la peroxydation lipidique, induirait une altération de la bioénergétique mitochondriale (Paradies et al, 2004; Paradies et al, 1997).

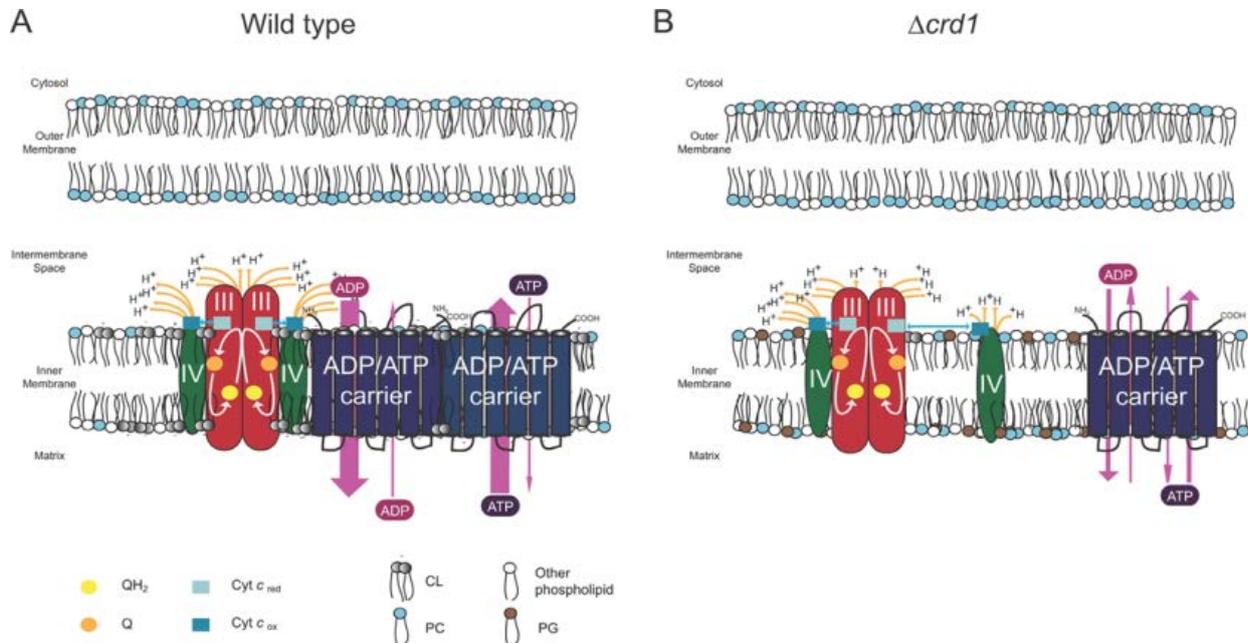


Figure 24 : **Stabilisation des supercomplexes par interaction avec les cardiolipines.**

Inactivation du gène *crd1* (cardiolipine synthase) entraîne la perte de cardiolipines est déstructure les supercomplexes (Claypool et al, 2008).

b. Influence des CL sur l'efficacité de la phosphorylation oxydative

Le contenu en CL pourrait avoir une influence sur la perméabilité membranaire aux protons et l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Cette relation a été suggérée par les recherches effectuées sur la bioénergétique mitochondriale hépatique des rats hypothyroïdiens. Les travaux de Paradies et col. ont ainsi démontré que l'hyperthyroïdie est associée à une diminution du contenu en cardiolipines (Paradies et al, 1991). Cette hyperthyroïdie est aussi associée à une augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative (augmentation du rapport ATP/O) (Nogueira et al, 2002). La diminution du contenu en cardiolipines pourrait donc être associée à l'augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Cette hypothèse a été confortée par les travaux de Bobyleva et col. montrant qu'un ajout, *in vitro*, de cardiolipines en solution, directement dans la cuve de mesure des mitochondries hépatiques isolées, induit une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons (Bobyleva et al, 1997). Cependant, les travaux réalisés sur des levures, invalidées pour le gène

*cdr1* (gène codant pour la cardiolipine synthase), ont montré que les CL induisent une protection thermique de la membrane mitochondriale face au découplage (Koshkin & Greenberg, 2000). Ces travaux ont mis en évidence que les levures sauvages présentaient un maintien du couplage de la phosphorylation oxydative lorsqu'elles évoluaient dans un milieu à 40°C alors que les levures mutantes étaient totalement découplées à cette même température (Koshkin & Greenberg, 2000). Les travaux réalisés sur des membranes lipidiques reconstituées tendent aussi à démontrer que l'intégration de CL dans une membrane lipidique diminuerait la perméabilité membranaire aux protons en permettant une meilleure organisation des phospholipides membranaires adjacents (Arcisio-Miranda et al, 2009). L'influence des CL sur l'efficacité de la phosphorylation oxydative nécessite donc de plus amples recherches.

## 5. Impacts physiologiques du découplage de la phosphorylation oxydative.

Le découplage de la phosphorylation oxydative entraîne une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Ce mécanisme de découplage participerait au métabolisme basal à hauteur de 20 % (Brand, 2000). Cette proportion est constante entre de multiples espèces démontrant la conservation des mécanismes de découplage et donc la pertinence biologique de ce processus. Outre son adaptation aux demandes métaboliques de la cellule, le découplage pourrait avoir d'autres impacts physiologiques et pathologiques le fonctionnement de l'organisme.

L'une des premières implications connues de ce découplage est son implication dans les processus de thermogénèse. Le principe de la conservation d'énergie stipule que l'énergie n'est ni créée, ni détruite mais transformée en une autre forme d'énergie. L'énergie non utilisée pour le couplage de la phosphorylation oxydative est en fait dissipée sous forme de chaleur permettant une thermogénèse (Enerback et al, 1997).

Le découplage de la phosphorylation oxydative permet aussi la régulation de la production d'ERO. En effet, la dissipation de la force proton-motrice permettrait de faciliter le transfert des électrons et diminuerait le niveau de réduction du complexe I et des CoQH<sub>2</sub> (Jezek & Hlavata, 2005).

Les travaux de Desquiret et col. ont aussi démontré qu'un léger découplage chronique de la phosphorylation oxydative entraînait une augmentation de la consommation de glucose et de la production de pyruvate de cellules humaines HepG2 (Desquiret et al, 2006). Le découplage de la phosphorylation oxydative pourrait donc influencer l'orientation métabolique de la cellule.

Cependant le dysfonctionnement de la régulation du découplage de la phosphorylation oxydative peut aussi être associé au développement de pathologies (Brand & Esteves, 2005). Ainsi le découplage serait associé à une diminution du ratio ATP/ADP dans les cellules  $\beta$  du pancréas et induirait l'altération de la sécrétion d'insuline (Krauss et al, 2005). Il participerait au développement du diabète. Le découplage de la phosphorylation oxydative peut aussi être impliqué dans la perte de poids involontaire. Les travaux de Romestaing et col. ont notamment mis en évidence que la perte de poids consécutive au développement d'une stéatose était associée à une diminution du rapport ATP/O (Romestaing et al, 2008).

### III. Métabolisme énergétique et cachexie cancéreuse.

La perte de poids résulte d'une balance énergétique négative s'expliquant par une diminution des apports énergétiques et/ou une augmentation des dépenses énergétiques.

#### A. Diminution des apports énergétiques lors de la cachexie cancéreuse

L'anorexie est un des symptômes associés au développement de la cachexie cancéreuse. Elle participe donc au dérèglement de la balance énergétique en provoquant une diminution des apports énergétiques.

Les agents stimulateurs de l'appétit, tel que l'acétate de medroxyprogestérol, induisent une augmentation de la prise alimentaire et du poids des patients (Simons et al, 1998). Cependant, ce gain de poids ne concerne que la masse adipeuse et l'acétate de medroxyprogestérol n'a aucun effet sur la perte de masse maigre du patient (Simons et al, 1998). Les premières stratégies d'augmentation de la prise alimentaire par nutrition parentérale totale, basées sur une simple augmentation de l'apport énergétique, permettaient aussi une augmentation du poids du patient (Evans et al, 1985). Cependant, cette augmentation de la masse corporelle restait transitoire et les analyses corporelles montraient que ce gain de poids était le fait d'une augmentation de masse grasse et d'eau plutôt que de masse maigre (Evans et al, 1985).

Les stratégies thérapeutiques visant la restauration de la prise énergétique ont donc une action restreinte sur la restauration de la masse musculaire démontrant que l'anorexie, seule, ne peut expliquer les changements métaboliques complexes qui se produisent lors de la cachexie.

Les expérimentations animales ont démontré que les rats atteints d'un adénocarcinome MAC 16 ou d'une carcinose péritonéale développaient une perte de poids plus importante que les rats contrôles, assujettis à une même restriction alimentaire (Bing et al, 2000; Dumas et al, 2010). En outre, cette perte de poids était associée à une fonte musculaire alors que la masse

musculaire de leur contrôle n'était pas affectée par la restriction alimentaire (Bing et al, 2000; Dumas et al, 2010).

Ces travaux suggèrent que la diminution des apports énergétiques, seule, ne peut expliquer la perte de poids observée lors de la cachexie cancéreuse. En outre, elle ne justifie pas la perte de masse musculaire, caractéristique du développement de la cachexie. Par conséquent, les altérations métaboliques semblent jouer un rôle déterminant dans la perte de poids et notamment dans la fonte musculaire, observées dans la cachexie cancéreuse.

Cette perte de poids pourrait aussi être dépendante d'une augmentation des dépenses énergétiques du patient.

## B. Dépenses énergétiques lors de la cachexie cancéreuse

### 1. La dépense énergétique

La dépense énergétique est habituellement subdivisée en 3 catégories : la dépense énergétique de repos (DER), la thermogénèse alimentaire et la dépense énergétique liée à l'activité physique.

La DER correspond au métabolisme énergétique basal qui représente la dépense énergétique minimale, incompressible, nécessaire au maintien des fonctions vitales et à l'entretien de l'organisme. Chez un sujet sédentaire sain, la DER constitue la composante majeure de la dépense énergétique totale (DET) et participerait de 60 à 80 % à cette DET (Prentice et al, 1985). La thermogénèse alimentaire correspond à la dépense énergétique nécessaire à l'absorption, la transformation, le transport et le stockage des aliments ingérés durant l'alimentation. Elle peut varier en fonction de la quantité et de la composition de l'alimentation mais ne constitue qu'une petite proportion de la DET (environ 10 %). L'activité physique est la composante la plus variable de la DET et peut représenter 10 à 30 % de cette DET selon les individus. Elle peut être séparée en 2 sous-catégories : l'activité sportive et l'activité spontanée (correspondante aux activités de la vie quotidienne telles que se tenir debout, marcher ou faire la vaisselle).

L'activité physique et la DER peuvent varier en fonction de l'âge, du sexe, du poids et de la taille du sujet. Cependant, les travaux de Cunningham et col. ont démontré que la masse maigre d'un individu pouvait expliquer 65 à 90 % de la DER (Cunningham, 1991).

La masse maigre est constituée par les organes, les os et les différents compartiments liquidiens de l'organisme. Parmi les composants de la masse maigre, le foie et le muscle squelettique semblent avoir une importance prépondérante dans le statut métabolique de l'organisme. En effet, ces 2 organes contribueraient approximativement à 50 % de la DER (Illner et al, 2000).

## 2. La DER et la cachexie cancéreuse

L'anorexie développée par le patient cachectique peut être assimilée à une restriction alimentaire. La restriction alimentaire est habituellement accompagnée d'une adaptation de l'organisme conduisant à une diminution de la DER (Blanc et al, 2003). De plus, la cachexie cancéreuse entraîne une perte de masse musculaire. La DER étant principalement déterminée par la masse maigre, cette fonte musculaire devrait, aussi, entraîner une diminution de cette DER.

Les travaux de Bosaeus et col., menés sur 297 patients atteints de cancers divers, notamment de cancer pancréatique, gastrique, biliaire ou colique, montrent, cependant, que 49% des patients cancéreux développent un hypermétabolisme (DER mesurée supérieure de 110% à la valeur prédictive de DER) (Bosaeus et al, 2001). Cette augmentation de la DER est, de plus, fortement retrouvée chez les patients montrant une forte perte de poids (>10%) (Bosaeus et al, 2001). Cependant, cette étude met aussi en évidence une variabilité importante de réponse de la DER du patient face au cancer. Cette variabilité pourrait être dépendante du type de cancer étudié. En effet, les travaux de Fredrix et col. montrent une augmentation de la DER chez des patients atteints de cancer pancréatique qui n'est pas retrouvée chez les patients atteints de cancer gastro-intestinal (Fredrix et al, 1991). Les travaux de Cao et col., réalisés sur 714 patients atteints de cancer de l'œsophage, de l'estomac, du colon, du pancréas ou de cancer pulmonaire non-petite cellules, montrent que l'augmentation de la DER est très répandue chez les patients cancéreux, à l'exception du cancer du côlon qui compte 31% de patients hypermétaboliques contre 49% pour les cancers œsophagiens ou 59% pour les cancers pancréatiques (Cao et al, 2010a). Cette étude met aussi en évidence l'importance du stade de

la maladie dans l'augmentation de la DER. Les auteurs montrent ainsi, une relation linéaire entre la DER et la durée du cancer (Cao et al, 2010a).

Cette augmentation de la DER pourrait, cependant, ne pas influencer la DET. En effet, les travaux de Moses et col. montrent que, malgré une augmentation de la DER, les patients cachectiques atteints de cancer du pancréas possèdent une DET diminuée par rapport aux valeurs prédictives de patients sains. Ce phénomène s'explique par une diminution importante de l'activité physique chez les patients cachectiques (Moses et al, 2004). Cependant, dans cette expérience, la DET des patients sains est estimée par des valeurs prédictives de DER et un coefficient prédictif d'activité physique. Cette hypothèse nécessite donc d'être confortée par une étude comparant directement des sujets sains aux sujets cachectiques.

L'ensemble de ces travaux nous permet de constater que le développement tumoral est généralement associé à une élévation de la DER. De plus, cette augmentation de la DER semble être plus fortement exprimée en cas de développement de la cachexie cancéreuse.

### 3. Mécanismes pouvant expliquer l'augmentation de la DER lors de la cachexie.

#### a. Rôle de l'inflammation

L'augmentation de la DER lors de la cachexie peut s'expliquer, au moins en partie, par les symptômes développés par le patient cachectique. En effet, Les travaux de Roubenoff et col. ont pu mettre en évidence un lien entre l'augmentation de la DER et l'inflammation, qui joue un rôle central dans le développement de la cachexie (Roubenoff et al, 1994). Ces travaux ont ainsi démontré une corrélation entre l'augmentation de la DER et la production d'IL1 $\beta$  (et de moindre importance avec celle de TNF $\alpha$ ) chez des patients atteints de cachexie rhumatoïde (Roubenoff et al, 1994). Cette corrélation entre la production d'IL1 $\beta$  ou de TNF $\alpha$  et l'augmentation de la DER a aussi été retrouvée chez des patients cachectiques atteints du SIDA (Roubenoff et al, 2002). Cependant, cet effet semble spécifique à ces cytokines. En effet, des travaux réalisés sur des patients atteints de cachexie rhumatoïde montrent que cette corrélation n'est pas retrouvée avec la production d'IL6 (Binymin et al, 2011).

L'IL1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  sont connus pour leurs implications dans le développement de certains symptômes de la cachexie cancéreuse, tel que l'anorexie ou la fonte musculaire (Braun et al,

2011; Moylan et al, 2008). Le mode d'action de ces cytokines sur l'élévation de la DER reste, cependant, à être totalement élucidé.

#### b. Rôle de l'APR

L'APR semble, elle aussi, jouer un rôle dans l'augmentation de la DER. Les travaux de Falconer et col. ont ainsi démontré, chez patients atteints de cancer pancréatique, que les patients développant une APR avaient une DER plus élevée que ceux n'en développant pas (Falconer et al, 1994). Ces résultats ont été renforcés par les travaux de Johnson et col. montrant une corrélation entre la concentration en protéine C réactive plasmatique (protéine marqueur de l'APR) et la DER des patients atteints de cancer de la gorge, des poumons et du colon (Johnson et al, 2008). L'APR étant induite par une synthèse hépatique de protéines de phase aiguë, l'augmentation de la DER associée à l'APR pourrait s'expliquer par une augmentation du métabolisme hépatique.

#### c. Rôle de la masse hépatique

Le foie est un des déterminants majeurs de la DER (Illner et al, 2000). Lors d'une restriction alimentaire, le foie voit sa masse diminuée participant ainsi à la diminution passive de la DER (Dumas et al, 2004). Lors de la cachexie cancéreuse, le foie est soumis à une forte activité métabolique (recyclage du lactate, néoglucogénèse et synthèse des protéines de l'APR). Ainsi, malgré la diminution des apports énergétiques, les travaux de Lieffers et col. ont pu mettre en évidence une augmentation de la masse hépatique chez des patients atteints de cancer colorectal avancé (Lieffers et al, 2009). De plus, ces travaux ont démontré une relation linéaire entre la masse hépatique et la DER (Lieffers et al, 2009). Les auteurs considèrent que l'augmentation de la masse hépatique représenterait une augmentation de la DER de 17 700 kcal sur les 3 derniers mois de vie du patient et pourrait contribuer à la perte de poids du patient (Lieffers et al, 2009).

#### d. Les mécanismes consommateurs d'ATP

Les altérations métaboliques hépatiques peuvent aussi avoir une influence sur cette dépense énergétique. En effet, le fonctionnement hépatique va être bouleversé par le développement de la tumeur et induire une réorientation de ces priorités métaboliques vers l'approvisionnement de la tumeur en glucose et la synthèse des protéines de l'APR pour lutter contre cette tumeur et l'inflammation qu'elle engendre. Les mécanismes impliqués, notamment les mécanismes de néoglucogenèse et le cycle de Cori, sont consommateurs d'ATP et pourraient participer à l'augmentation de la DER (Holroyde et al, 1975). Les bouleversements métaboliques du tissu musculaire squelettique peuvent aussi influencer la DER des patients cachectiques. En effet, la fonte musculaire implique une diminution de la synthèse des protéines myofibrillaires et une augmentation des phénomènes de protéolyse. Cette protéolyse musculaire est principalement réalisée par le système ubiquitine-protéasome-ATP dépendant qui requière de l'énergie sous forme d'ATP. Cette protéolyse implique aussi l'augmentation de l'expression et de la synthèse des protéines impliquées dans cette voie protéolytique, qui sont aussi des processus consommateurs d'énergie (notamment sous forme d'ATP et de GTP).

Les tissus hépatique et musculaire vont donc voir leurs demandes en ATP augmenter. La mitochondrie étant le principal organite responsable de la synthèse de l'ATP, elle pourrait jouer un rôle important dans le développement de ces altérations métaboliques.

### C. Le métabolisme énergétique mitochondrial dans la cachexie cancéreuse

Le métabolisme énergétique mitochondrial pourrait être sollicité par les mécanismes consommateurs d'ATP mis en place lors du développement de la cachexie cancéreuse. De plus, l'inflammation systémique provoquée par le développement de la tumeur peut, elle aussi, avoir des répercussions sur la bioénergétique mitochondriale. Ainsi, le TNF $\alpha$  pourrait avoir une action directe sur la régulation de la phosphorylation oxydative. Les travaux de Samavati et col., réalisés sur des hépatocytes bovins et murins, ont notamment démontré que le TNF $\alpha$  déclenchait la phosphorylation du complexe IV de la chaîne respiratoire, entraînant une diminution de la concentration en ATP dans les hépatocytes (Samavati et al, 2008). Le

TNF $\alpha$  pourrait aussi provoquer le découplage de la phosphorylation oxydative des mitochondries hépatiques (Busquets et al, 2003). Une telle altération pourrait induire un mécanisme de gaspillage énergétique entraînant une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP. La mitochondrie devrait alors consommer plus de substrats pour répondre aux demandes d'énergie de l'organisme, elles-mêmes augmentées par les mécanismes consommateurs d'ATP mis en place par le développement tumorale. Ce processus pourrait donc participer à l'augmentation des dépenses énergétiques de l'organisme. Un tel gaspillage énergétique a été mis à jour dans d'autres situations d'hypermétabolisme et notamment dans l'hyperthyroïdie où la diminution du couplage de la phosphorylation oxydative (diminution du ratio ATP/O) (Nogueira et al, 2002) est associée à une augmentation de la DER (Mitchell et al, 2010). Cependant, la bioénergétique mitochondriale lors du développement de la cachexie cancéreuse reste encore peu étudiée.

## 1. Le métabolisme énergétique mitochondrial musculaire dans la cachexie cancéreuse.

Les premières études du métabolisme musculaire, réalisées par Hochwald et col., ont mis en évidence une diminution de la concentration d'ATP dans le muscle *gastrocnemius* de rats atteints de sarcome MCA (Hochwald et al, 1996). Ce résultat a été conforté par les travaux de Constantinou et col., montrant une diminution de la vitesse de synthèse de l'ATP mesurée, *in vivo*, par résonance magnétique nucléaire (RMN) au  $^{31}\text{P}$ , sur le membre inférieur de souris atteintes de carcinome pulmonaire de Lewis par rapport à des souris saines (Constantinou et al, 2011). Dans cette l'étude, la diminution de la vitesse de synthèse de l'ATP était associée à l'augmentation de l'expression génique de la protéine UCP3 dans le muscle *gastrocnemius* (Constantinou et al, 2011). L'auteur suggérait donc que cette diminution de la synthèse d'ATP pouvait être expliquée par un découplage de la phosphorylation oxydative lié à UCP3. Ce mécanisme de découplage a aussi été soutenu par les travaux de Collins et col. et de Busquets et col. montrant l'augmentation de l'expression des protéines découplantes UCP2 et UCP3 dans le muscle *rectus abdominus* de patients atteints de cancer de l'œsophage, de l'estomac et du colon présentant une forte perte de poids (Collins et al, 2002) et dans le cœur et le muscle *gastrocnemius* de rats atteints d'hépatome Yoshida (Busquets et al, 2005). Cependant, le rôle de ces protéines découplantes dans le découplage de la chaîne respiratoire reste sujet à débat (Cioffi et al, 2009; Nedergaard & Cannon, 2003). Cette diminution de la

synthèse d'ATP pourrait aussi être expliquée par des altérations du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les travaux de White et col. ont ainsi mis en évidence une diminution du contenu protéique du cytochrome c et de la sous unité IV du complexe IV dans les muscles *gastrocnemius* et *soleus* d'un modèle murin de cachexie cancéreuse (White et al, 2011). De plus, les travaux d'Ushmorov et col. ont démontré une diminution de l'activité des complexes II, III et IV dans des mitochondries musculaires de souris atteintes de fibrome MCA-105 (Ushmorov et al, 1999).

Les études de la bioénergétique musculaire semblent donc indiquer une diminution de la synthèse d'ATP lors de la cachexie cancéreuse. Cependant, les mécanismes impliqués dans ce processus restent très largement méconnus. De plus, aucune de ces études n'a observé l'influence de la cachexie cancéreuse sur l'efficacité de la synthèse de l'ATP.

## 2. Le métabolisme énergétique mitochondrial hépatique dans la cachexie cancéreuse.

Les premiers travaux portant sur le métabolisme mitochondrial hépatique, lors de la cachexie cancéreuse, ont été réalisés par Greene et Haven en 1957. Ces travaux démontraient une augmentation de l'activité du complexe IV sur des homogénats et des mitochondries hépatiques de rats atteints de carcinome Walker 256 (Greene & Haven, 1957). Greene a poursuivi cette étude en analysant l'efficacité de la phosphorylation oxydative par la mesure du ratio P/O dans ces mêmes mitochondries (Greene, 1960). Ces travaux ont pu mettre en évidence qu'il n'existait pas de variation de ratio P/O entre les mitochondries hépatiques isolées de rat Walker 256 par rapport à celles de rats sains, appariés en alimentation (Greene, 1960). L'auteur concluait donc que les mitochondries hépatiques, par l'augmentation de l'activité du complexe IV et la préservation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative, étaient en mesure d'augmenter la production d'ATP pour s'adapter aux besoins énergétiques du sujet cancéreux (Greene, 1960).

Cependant, deux équipes de recherche ont, depuis, mis en avant une diminution de la concentration d'ATP dans le foie d'animaux cachectiques porteur d'un sarcome MCA (Schneeberger et al, 1989; Tsuburaya et al, 1995). Les travaux de Schneeberger et col. ont ainsi mesuré, par RMN  $^{31}\text{P}$ , l'évolution du ratio  $[\text{Pi}] / [\text{ATP}]$  en fonction du développement de la tumeur (sarcome MCA) et démontrent une relation linéaire entre la croissance tumorale et la diminution de ce ratio (Schneeberger et al, 1989). Le développement tumoral entraînerait

donc une déplétion du foie en ATP. Ces travaux ont été confirmés par l'étude de Tsuburaya et col. montrant, par des techniques de bioluminescence, une diminution de la concentration en ATP hépatique des rats cachectiques, porteurs d'un sarcome MCA, par rapport à des rats sains, appariés en alimentation (Tsuburaya et al, 1995). Les travaux de Tsuburaya et col. observaient aussi une diminution de 42% de la production d'ATP de ces hépatocytes par rapport à des hépatocytes isolées de rats sains, subissant la même restriction alimentaire (Tsuburaya et al, 1995). Ces travaux mettent donc en évidence, la perte des capacités des mitochondries hépatiques à générer de l'énergie chez les animaux porteurs de tumeur et semblent en contradiction avec les travaux de Greene. De plus, les travaux de Perumal et col., réalisés sur les mitochondries hépatiques issues de rattes porteuses de carcinose mammaire en forte perte de poids, démontrent une diminution de l'activité des complexe I et IV dans ces mitochondries par rapport aux mitochondries hépatiques issues de rattes saines (Perumal et al, 2005). Ces résultats semblent, de nouveau, en contradictions avec les précédents travaux de Greene.

Ces contradictions peuvent, au moins en partie, s'expliquer par la disparité des techniques utilisées. La mesure d'activité du complexe IV, réalisée par Greene et col. est, ainsi, obtenue par manométrie avec l'utilisation d'hydroquinone comme substrat de la réaction (Greene et Haven, 1957). L'utilisation de ce substrat peut, cependant, entraîner des biais d'interprétation à cause d'interactions possibles avec les autres complexes de la chaîne respiratoire.

Dans l'ensemble, ces différentes études suggèrent que le développement de la cachexie cancéreuse induirait une diminution de la synthèse d'ATP qui pourrait être associée à une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire. De plus, les travaux de Tsuburaya et col. et Perumal et col. ont démontré que la résection de la tumeur, entraînant la guérison complète des animaux étudiés, induisait la disparition des altérations mitochondriales observées (Tsuburaya et al, 1995 ; Perumal et al, 2005). Ces résultats permettent donc d'établir un lien de causalité entre les altérations de la bioénergétique mitochondriale et la cachexie cancéreuse. Cependant, les études réalisées par Schneeberger et col. et Tsuburaya et col. prennent en compte l'ensemble des réactions cellulaires et ne peuvent être individualisées au fonctionnement mitochondrial, seul. De même, les travaux de Pérumal et col. ne démontrent pas l'impact de la diminution de l'activité des complexe I et IV sur les capacités de production d'ATP mitochondrial. De nouvelles études semblaient donc nécessaires pour déterminer les modifications du métabolisme mitochondrial hépatique lors de la cachexie cancéreuse.

Notre équipe s'est donc, dans un premier temps, intéressée à l'étude de la bioénergétique hépatique en stade sévère de cachexie cancéreuse. Ces travaux ont été réalisés sur un modèle murin de cachexie cancéreuse induite par une carcinose péritonéale (Dumas et al, 2010). Notre étude s'est, principalement, concentrée sur l'analyse de l'efficacité de la phosphorylation oxydative et sur le gaspillage énergétique. Certains paramètres pouvant influencer sur la bioénergétique mitochondriale, tels que la production d'ERO et le contenu et la composition en acides gras des CL, ont aussi été explorés (Dumas et al, 2011).

Nous avons pu déterminer que les capacités oxydatives des mitochondries hépatiques étaient préservées en stade sévère de cachexie cancéreuse. Cependant, ces travaux ont mis en évidence une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques des rats cachectiques par rapport à celle de rats contrôles, assujettis à la même restriction alimentaire (Figure 25A). Cette diminution de l'efficacité de la synthèse de l'ATP témoigne d'un découplage de la phosphorylation oxydative. Nos travaux ont aussi démontré une augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante dans les mitochondries hépatiques des rats cachectiques par rapport à celles des rats contrôles (Figure 25B).

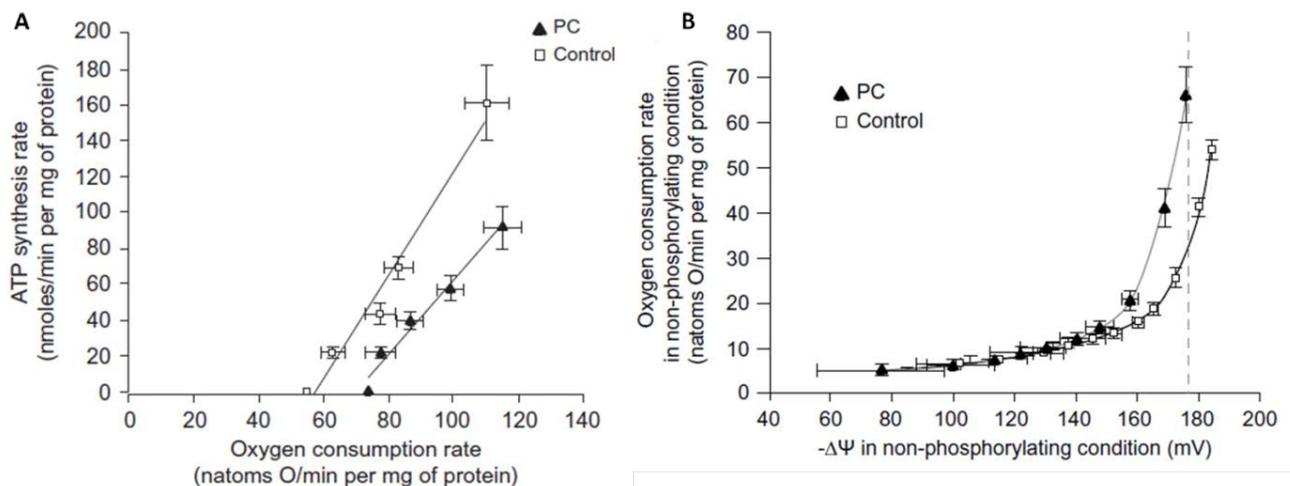


Figure 25 : Effet de la cachexie cancéreuse sur l'efficacité de la synthèse d'ATP et le gaspillage énergétique en condition non phosphorylante des mitochondries hépatiques isolées.

A) Relation entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP. Mesures réalisées sur des mitochondries hépatiques isolées de rats atteints de carcinose péritonéale (PC) et de rats sains, appariés pour la prise alimentaire (control). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 10 pour chaque groupe). (Dumas et al, 2011).

Cette augmentation du gaspillage énergétique était associée à une augmentation du contenu en CL des mitochondries hépatiques et une modification de la composition des acides gras de ces CL (augmentation du ratio n-6/n-3) (Tableau I). Les mitochondries hépatiques issues des rats atteints de carcinose péritonéale montraient, aussi, une production d'ERO 12 fois plus élevée que celle des rats contrôles (Dumas et al, 2011).

**Tableau I : Contenu et composition en acides gras des cardiolipines et corrélation avec la consommation d'oxygènes en condition non phosphorylante dans les mitochondries hépatiques isolées de rats atteints de carcinose péritonéale et de rats contrôles, appariés pour la prise alimentaire.**

PC = rats atteints d'une carcinose péritonéale, Control = rats sains, appariés pour la prise alimentaire. Valeurs exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 pour chaque groupe). # indique les différences significatives comparées aux rats contrôles et <sup>a</sup> p< 0,05 (Dumas et al, 2011)

Parameter	PC	Control	*R <sup>2</sup>
Cardiolipin content (a.u./mg of protein)	257 $\pm$ 7 #	168 $\pm$ 12	+0.64 <sup>a</sup>
Saturated (%)	9.1 $\pm$ 0.7	11.2 $\pm$ 1.4	NS
Monounsaturated (%)	31.7 $\pm$ 0.7	35.1 $\pm$ 2.0	NS
Saturated + Monounsaturated (%)	40.8 $\pm$ 1.0	46.3 $\pm$ 1.7	NS
Polyunsaturated (%)	45.4 $\pm$ 1.7	44.9 $\pm$ 2.3	NS
n-6 (%)	43.6 $\pm$ 1.6	43.9 $\pm$ 2.2	NS
n-3 (%)	1.8 $\pm$ 0.2 #	1.0 $\pm$ 0.1	NS
n-6/n-3 (%)	24.4 $\pm$ 2.8 #	44.8 $\pm$ 6.4	-0.21 <sup>a</sup>

Ces travaux ont confirmé un dysfonctionnement de la bioénergétique mitochondriale hépatique lors de la cachexie cancéreuse. Ils suggèrent que les mitochondries hépatiques des rats atteints de carcinose péritonéale doivent consommer plus de substrats pour maintenir une même production d'ATP. Mis en parallèle avec un apport énergétique diminué (développement de l'anorexie), ce processus pourrait avoir une implication dans le déséquilibre de la balance énergétique et la perte de poids observés lors de la cachexie cancéreuse.

Il reste à déterminer si la production d'ERO et les modifications de contenu et de composition des CL ont une implication sur ce processus de découplage de la phosphorylation oxydative.

De plus, il est important d'évaluer la place de ces dysfonctionnements mitochondriaux dans la cinétique d'apparition des symptômes de la cachexie cancéreuse. Le rôle des

dysfonctionnements mitochondriaux dans le déséquilibre énergétique et la perte de poids pourrait avoir des répercussions directes sur la perte de masse adipeuse et musculaire observée lors de la cachexie. Une meilleure compréhension de ces phénomènes pourrait nous permettre de proposer de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement de ce syndrome.

## II- Travaux personnels

# I. Matériels et méthodes

## A. Animaux et Cellules

### 1. Animaux

#### a. Rats de souche Berlin Druckrey IX

La souche de rats Berlin Druckrey IX, ou BDIX a été établie à Berlin en 1937 par H.Druckrey et développée par le Docteur M.S. Martin (unité INSERM U252, Dijon, France). Cette souche est maintenue en stricte consanguinité frère x sœur par l'éleveur Charles River (St Germain sur l'Arbule, France). L'utilisation de cette souche consanguine contribue à améliorer la reproductibilité de nos résultats. Elle est notamment, couramment utilisée pour l'étude des leucémies et des tumeurs malignes.

#### b. Rats de souche Sprague-Dawley

La souche de rats Sprague-Dawley, établie en 1925 par Robert Dawley, est maintenue dans une hétérogénéité constante lui permettant de développer des disparités interindividuelles.

### 2. Les Cellules et le Modèle tumoral

#### a. Cellules PROb

La lignée cellulaire PROb a été établie par le laboratoire d'immunologie de l'unité INSERM U252 et provient d'un adénocarcinome colique développé chez le rat BDIX (Martin et al, 1975). Le 1,2 diméthylhydrazine est injecté, par voie intra-péritonéale, chez le rat BDIX menant au développement d'un adénocarcinome colique. La tumeur est extraite et mise en culture. Deux populations cellulaires se distinguent : une population cellulaire, sensible à la trypsine, avec un phénotype régressif (cellule REGb) et une population, relativement

résistance à la trypsine, avec un phénotype progressif et métastatique (cellule PROb) (Martin et al, 1983). La lignée PROb est un modèle reproductible de comportement métastatique et possède une habilité à se propager *in vitro* et *in vivo* (Dunnington et al, 1987). Elle est notamment très régulièrement tumorigène chez le rat BDIX (95% de prise de greffe).

Les cellules PROb sont cultivées en étuve humide, à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>, dans un milieu RPMI (pour *Roswell Park Memorial Institute*, Longa, Belgique ; composition en annexe) enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

Le protocole de décongélation et d'entretien des cellules est détaillé dans la fiche technique 1 du manuscrit (p 171).

#### b. La Carcinose péritonéale

La carcinose péritonéale est induite par injection intra-péritonéale de  $1 \times 10^6$  de cellules PROb chez le rat de souche BDIX. Ce modèle a été mis au point par le laboratoire d'immunologie de l'unité INSERM U252. L'évolution de cette carcinose péritonéale est bien décrite et se fait de manière reproductible (Benoit et al, 2000). Deux jours après injection, les cellules tumorales infiltrent le péritoine. Les premiers nodules tumoraux s'individualisent au bout de 10 jours après induction du cancer. Ces nodules se développent progressivement et se répandent sur l'ensemble du péritoine mais aussi du pelvis et des coupes diaphragmatiques au bout de 20 jours. Les rats meurent, en moyenne, 40 jours après injection des cellules cancéreuses, avec un développement d'ascite séro-hémorragique et une cavité abdominale comblée de nodules tumoraux.

## B. Expérimentation animale - Conception des études

Les protocoles d'expérimentations animales se sont réalisés au sein de la plateforme pluriformation animalerie de la faculté de médecine de Tours. Nos travaux se sont articulés autour de trois études.

## 1. Bioénergétique mitochondriale musculaire au stade sévère de cachexie cancéreuse

L'étude de la bioénergétique mitochondriale musculaire en stade sévère de cachexie cancéreuse est réalisée sur 28 rats de souche BDIX.

### a. Etablissement et suivi des groupes expérimentaux.

Les animaux sont inclus dans l'étude à l'âge de 8 semaines. Ils sont pesés et placés en cage individuelle dès leur arrivée à l'animalerie. Après deux semaines d'acclimatation, les rats sont appariés, 2 à 2, en fonction de leur poids. Ceci nous permet de former deux groupes de 14 rats homogènes.

Le premier groupe est destiné à observer les effets de la cachexie cancéreuse. Chaque rat de ce groupe reçoit une injection intra-péritonéale de  $1 \times 10^6$  cellules cancéreuse PROb permettant le développement de la cachexie cancéreuse. Le deuxième groupe constitue notre groupe contrôle.

Afin de différencier l'effet de l'anorexie de celui du développement cachectique, chaque rat du groupe contrôle reçoit, à 4 jours d'intervalle, la même alimentation (quantité et qualité) que son homologue cancéreux. Ce deuxième groupe est, ainsi, appelé groupe « pair-fed ».

Les rats sont pesés trois fois par semaine et leur alimentation est suivie à la même fréquence.

### b. Définition du stade de cachexie cancéreuse sévère.

Le stade de cachexie sévère est défini par une prise alimentaire diminuée de plus de 40 % sur 3 relevés alimentaires consécutifs, une perte de poids, un développement d'ascite séro-hémorragique dans la paroi abdominale et un comportement de prostration.

### c. Protocole expérimental

Au développement du stade de cachexie sévère, le rat est euthanasié et exsanguiné. Le rat apparié est sacrifié 4 jours après son homologue cancéreux, pour respecter le décalage dû au

« pair-feeding ». Ce protocole a reçu l'approbation du comité éthique régional pour l'expérimentation animale Centre-Limousin (Figure26).

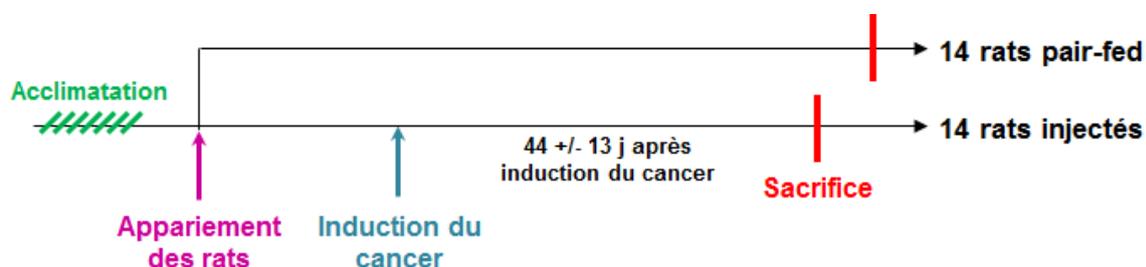


Figure 26 : **Protocole expérimental de l'étude I - Bioénergétique mitochondriale musculaire au stade sévère de cachexie cancéreuse**

Après sacrifice de l'animal, l'ensemble des muscles du membre inférieur est pesé et les muscles *quadriceps* sont collectés pour les expérimentations. Deux échantillons sont prélevés sur le *quadriceps* gauche de l'animal : le vaste intermédiaire, congelé dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide afin d'analyser la morphologie du muscle, un échantillon de 100 mg, immergé dans une solution de trizol afin d'effectuer les études génomiques. Le reste du *quadriceps* gauche et le second *quadriceps* sont plongés dans du tampon d'isolement pour permettre l'étude de la bioénergétique mitochondriale.

La majorité des expériences sur le fonctionnement mitochondrial nécessite l'utilisation de mitochondries fonctionnelles. Après isolement des mitochondries, la mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale, de l'efficacité de la synthèse d'ATP, de la production d'ERO et du contenu en CL sont réalisées dans la journée. Les mitochondries isolées restantes sont congelées à -80°C et utilisées ultérieurement pour la mesure de l'activité de la cytochrome-c-oxydase et la détermination du contenu en complexes de la chaîne respiratoire.

Les échantillons musculaires prélevés sont analysés en collaboration avec l'équipe URA83 de l'INRA de Nouzilly par la technique de qPCR (étude des gènes impliqués dans la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante et des gènes des protéines découplantes UCP2 et UCP3) et l'analyse morphologique de muscle.

## 2. Rôles des CL, des ERO et de leurs effets combinés sur le gaspillage énergétique des mitochondries hépatiques

Cette étude a pour objectif de reproduire, *ex vivo*, l'effet de l'augmentation de la concentration en CL de la membrane mitochondriale et de l'augmentation de la production d'ERO sur le gaspillage énergétique mitochondrial observé en stade de cachexie cancéreuse sévère.

Cette étude est réalisée sur 20 rats de souche BDIX et sur 20 rats de souche Sprague-Dawley.

### a. Gestion des animaux

Les animaux sont pesés à leur arrivée et placés en cage, à raison de 2 rats par cages, sans mélange de souche. Aucun suivi particulier n'est organisé et leur alimentation est confiée au personnel de l'animalerie. Le choix des animaux sacrifiés se fait de façon arbitraire.

### b. Protocole expérimental

Les rats euthanasiés sont exsanguinés. Ce protocole a reçu l'approbation du comité éthique régional pour l'expérimentation animale Centre-Limousin. Le foie des animaux est prélevé et plongé immédiatement dans du tampon d'isolement pour permettre l'étude du fonctionnement mitochondrial.

#### 1) Influence de l'augmentation du contenu en CL

Après isolement des mitochondries hépatiques, les membranes mitochondriales sont enrichies en CL ou en phosphatidyléthanolamine (PE). Les études de l'efficacité de la synthèse d'ATP, de la production d'ERO et de la cinétique du gaspillage énergétique sont réalisées dans la journée. Les résultats de ces expériences sont comparés aux résultats obtenus sur des mitochondries ayant subi le même traitement d'enrichissement, sans présence de liposomes, préparées parallèlement aux mitochondries enrichies. Le taux d'enrichissement en CL est

déterminé sur mitochondries fraîches le jour même de l'expérimentation. Le taux d'enrichissement en PE est déterminé *a posteriori*, sur les mitochondries restantes préalablement congelées à -80°C.

## 2) Influence de l'augmentation de la production d'ERO.

L'étude de l'influence de l'augmentation de la production d'ERO sur le gaspillage énergétique mitochondrial a nécessité d'augmenter artificiellement cette production. Cette augmentation artificielle repose sur le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase.

Après isolement des mitochondries hépatiques, les études de l'efficacité de la synthèse d'ATP et de la cinétique du gaspillage énergétique sont réalisées dans la journée avec ajout de ce système enzymatique directement dans la cuve de mesure. Les résultats de ces études sont comparés aux résultats obtenus, parallèlement, sur ces mêmes mitochondries, sans ajout du système. La production d'ERO obtenue par cette méthode est augmentée d'un facteur 14 fois par rapport aux mitochondries contrôles. Cette augmentation est similaire à celle observée au stade de cachexie sévère. L'étude est complétée par des analyses réalisées avec un taux d'augmentation de la production d'espèces réactive de l'oxygène intermédiaire (3 fois supérieur aux mitochondries contrôles). Le taux d'augmentation appliqué est vérifié, chaque jour d'expérimentation, par une étude de la production des ERO, en présence des mitochondries et aux concentrations de xanthine et xanthine oxydase utilisées.

## 3) Effet conjoint de l'augmentation des cardiolipines et de la production d'ERO

Après isolement des mitochondries hépatiques, les membranes mitochondriales sont enrichies en CL. Les études de l'efficacité de la synthèse d'ATP et de la cinétique du gaspillage énergétique sont réalisées dans la journée avec ajout du système enzymatique, xanthine/xanthine oxydase, directement dans la cuve de mesure. Les résultats de ces expériences sont comparées aux résultats obtenus sur des mitochondries ayant subi le même traitement d'enrichissement, sans présences de liposomes et sans ajout du système enzymatique xanthine/xanthine oxydase.

Le taux d'enrichissement en CL et le pourcentage d'augmentation de la production d'ERO sont vérifiés comme précédemment décrit, chaque journée d'expérimentation.

### 3. Cinétique d'apparition des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse.

L'étude de la cinétique d'apparition des désordres métaboliques et du dysfonctionnement mitochondrial hépatique lors du développement de la cachexie cancéreuse a nécessité l'utilisation de 61 rats de souche BDIX.

#### a. Définition des points de cinétique.

Les points de cinétique sont définis, en accord avec la cinétique de développement de la carcinose péritonéale précédemment décrite, en s'appuyant sur un symptôme cachectique facilement identifiable : l'anorexie.

Le premier point de cinétique est fixé au 10<sup>ème</sup> jour après l'induction du cancer. A ce stade, les premiers nodules tumoraux s'individualisent sans qu'il n'y ait développement d'une anorexie.

Le second point de cinétique est fixé au 20<sup>ème</sup> jour après induction du cancer. Ce point correspond à une étape déterminante du développement de la carcinose péritonéale où les nodules tumoraux se développent progressivement et se répandent sur l'ensemble du péritoine. Cette étape coïncide, dans ce modèle, avec le développement des premiers signes d'anorexie. Par conséquent, le deuxième point de cinétique est établi par l'apparition des premiers signes d'anorexie définie par une prise alimentaire diminuée de 25 % sur 3 mesures consécutives.

L'étude cinétique du développement de la carcinose péritonéale définit le point critique de la maladie à 40 jours après induction du cancer. Ce stade correspond au stade de cachexie cancéreuse sévère, avec un développement d'ascite séro-hémorragique et une cavité abdominale comblée de nodules tumoraux. A ce stade, les rats ont une prise alimentaire diminuée de 80%. Un point de cinétique intermédiaire est établi, se basant sur le développement d'une anorexie avancée et défini par une prise alimentaire diminuée de 50 % après observation des premiers signes d'anorexie.

Notre étude se porte, ainsi, sur trois points de cinétique :

- 10 jours après induction du cancer,
- 1<sup>er</sup> signes d'anorexie,
- anorexie avancée.

b. Etablissement et suivi des groupes expérimentaux.

Les animaux sont inclus dans l'étude à l'âge de 8 semaines. Ils sont pesés et placés en cage individuelle dès leur arrivée à l'animalerie. Après deux semaines d'acclimatation, les rats sont appariés, 2 à 2, en fonction de leur poids. Ceci nous permet de former deux groupes de rats homogènes.

Le premier groupe est destiné à observer les effets de la cachexie cancéreuse. Chaque rat de ce groupe reçoit une injection intra-péritonéale de  $1 \times 10^6$  cellules cancéreuse PROb permettant le développement de la cachexie cancéreuse. Le deuxième groupe constitue notre groupe contrôle.

Afin de différencier l'effet de l'anorexie de celui du développement cachectique, chaque rat de ce groupe est apparié en alimentation à son homologue cancéreux. Le deuxième groupe est, ainsi, appelé groupe « pair-fed ».

Un troisième groupe de rats, constitué de rats sains, sans restriction alimentaire, est établi pour nous permettre de prendre en compte l'effet de l'âge des rats sur les paramètres étudiés. Il est constitué en respectant l'homogénéité de poids des autres groupes.

L'appariement alimentaire n'est pas réalisé pour le point de cinétique « 10 jours après induction du cancer », les animaux ne développant pas d'anorexie. Les résultats seront donc directement comparés aux résultats du groupe de rats sains, sans restriction alimentaire.

Les rats sont pesés trois fois par semaine. La prise alimentaire des rats est suivie à la même fréquence pour le point de cinétique « 10 jours après induction du cancer » et de façon quotidienne pour les autres points de cinétique.

c. Protocole expérimental

Les rats sont euthanasiés aux stades définis précédemment et exsanguinés. Les rats appariés sont sacrifiés 4 jours après leur homologue cancéreux, pour respecter le décalage du « pair-feeding ». Les rats sains sont euthanasiés régulièrement suivant la cinétique des autres groupes. Ce protocole est répété pour chaque point de cinétique. Il a reçu l'approbation du comité éthique régional pour l'expérimentation animale Centre-Limousin (Figure 27).

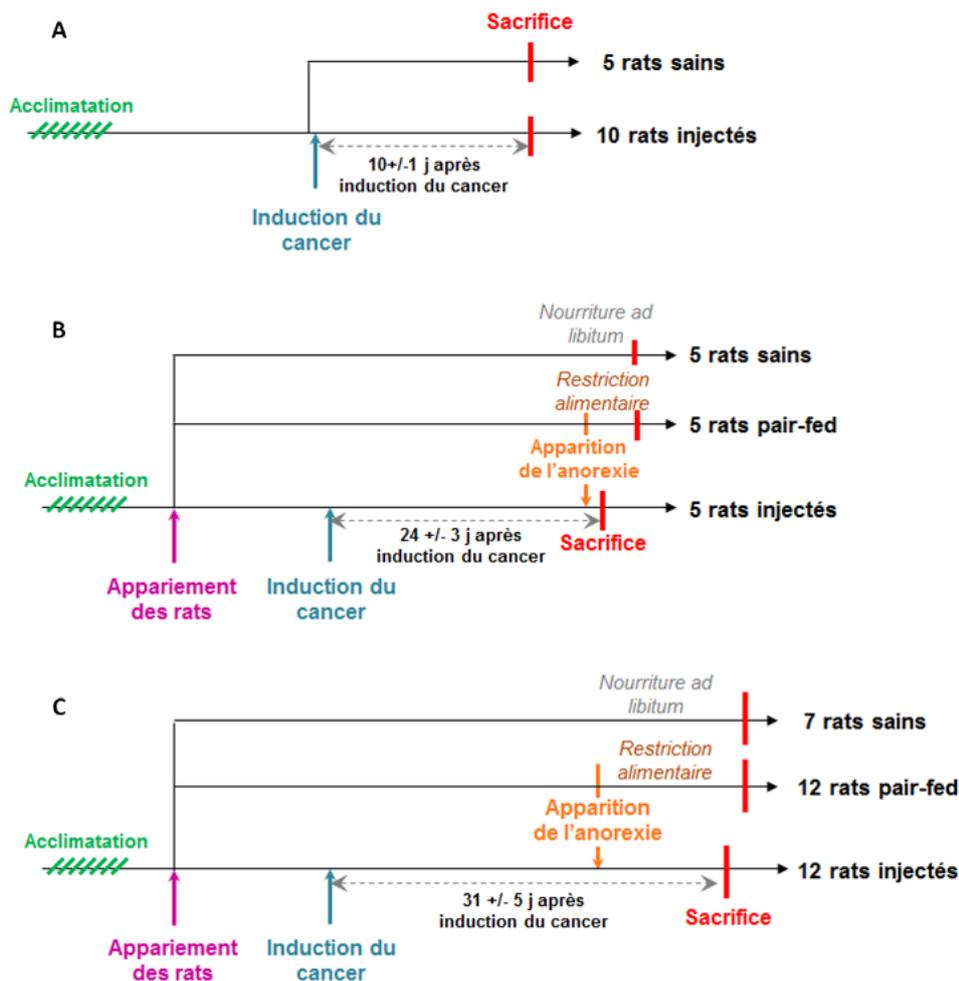


Figure 27 : Protocole expérimental de l'étude III – Cinétique d'apparitions des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse.

A) Point de cinétique - 10 jours après induction du cancer. B) Point de cinétique - Premiers signes d'anorexie. C) Point de cinétique - Anorexie avancée

Le tissu adipeux péri-rénal et rétro-péritonéal, le foie et l'ensemble des muscles du membre inférieur sont pesés pour suivre l'évolution des pertes tissulaires. Le foie est ensuite plongé dans du tampon d'isolement pour permettre l'étude de la bioénergétique mitochondriale. Un

muscle *plantaris* est congelé dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide pour permettre l'analyse morphologique du muscle. L'autre *plantaris* est immergé dans une solution de trizol afin d'effectuer les études génomiques.

Après isolement des mitochondries hépatiques, la consommation d'oxygène mitochondriale, l'efficacité de la synthèse d'ATP, la cinétique du gaspillage énergétique, la production d'ERO et la détermination du contenu en CL seront réalisées dans la journée. Les mitochondries isolées restantes seront congelées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons musculaires prélevés seront analysés en collaboration avec l'équipe URA83 de l'INRA de Nouzilly par la technique de qPCR (étude des gènes impliqués dans la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante et des gènes des protéines découplantes UCP2 et UCP3) et l'analyse morphologique de muscle.

## C. Etude du fonctionnement mitochondrial

### 1. Isolement des mitochondries hépatiques et musculaires.

Les mitochondries sont isolées sur le principe de la centrifugation différentielle.

Aussitôt après dissection, le foie et le *quadriceps* sont placés respectivement dans un tampon d'isolement (composition en annexe) et hachés finement.

Le *quadriceps* est incubé à  $4^{\circ}\text{C}$  avec une protéase (la subtilisine A). Cette étape supplémentaire est nécessaire pour permettre à la fois l'isolement des mitochondries subsarcolemmales et des mitochondries inter-myofibrillaires.

Les organes sont ensuite broyés et centrifugés. La première centrifugation permet l'élimination des noyaux et des débris cellulaires. Le surnageant est filtré à travers une gaze et centrifugé de nouveau afin de séparer les mitochondries des autres organites cellulaires. Le surnageant et les résidus graisseux sont alors éliminés, par aspiration, et le culot est re-suspendu dans du tampon d'isolement. Une dernière centrifugation permet de purifier les mitochondries. Ce dernier culot obtenu est repris dans un volume minimum de tampon d'isolement et conservé à  $4^{\circ}\text{C}$ .

Le protocole détaillé de l'isolement des mitochondries hépatiques (Dumas et al, 2011) est décrit dans la fiche technique 2 (p173). Celui des mitochondries musculaires (Roussel et al, 2000), dans la fiche technique 3 (p174).

## 2. Dosage des protéines

Le dosage protéique est réalisé par méthode de l'acide bicinchoninique (BCA, BCATM Protein Assay kit, Pierce, Pierbo). Cette méthode est basée sur la propriété de la liaison peptique à réduire les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en ions cuivreux ( $\text{Cu}^+$ ), en milieu alcalin. La quantité d'ions cuivreux réduits est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'échantillon. Le BCA chélate les ions cuivreux pour former un complexe soluble de couleur pourpre. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la quantité de protéines, est analysée par spectrophotométrie et comparée aux valeurs obtenues pour une gamme étalon d'albumine de sérum bovin. Cette comparaison permet la détermination de la concentration protéique de l'échantillon. Chaque dosage est réalisé en triplicata (protocole détaillé, fiche technique 4 p175).

## 3. Enrichissement des membranes mitochondriales en CL et phosphatidyléthanolamine.

Les mitochondries sont enrichies selon des adaptations de la technique de Petrosillo *et al*, (Petrosillo et al, 2007) (protocole, fiche technique 5, p176). Cet enrichissement se déroule en 2 étapes :

### a. Préparation des liposomes

Les CL (CL, Sigma) et la phosphatidyléthanolamine (PE, Sigma) sont solubilisées dans du tampon d'isolement. La formation des liposomes se fait par sonication (sonicateur Vibra-cell , sonics&materials, USA). Ce processus est réalisé en présence d'un courant d'azote afin d'éviter la peroxydation lipidique des liposomes.

### b. Fusion des liposomes aux membranes mitochondriales

Les liposomes sont ajoutés aux solutions de mitochondries hépatiques. L'intégration des liposomes aux membranes mitochondriales est réalisée sous agitation constante pour éviter

l'agglutination des réactifs. Les mitochondries ainsi enrichies, sont ensuite centrifugées afin de les débarrasser des résidus de liposomes. Le culot est ensuite repris dans un volume minimum de tampon d'isolement et conservé à 4°C. Cette étape est suivie d'un nouveau dosage protéique (la concentration protéique étant naturellement diminuée par l'ajout de composés lipidiques).

Les résultats obtenus sur ces mitochondries enrichies en CL et en PE seront comparés aux résultats obtenus sur un échantillon de mitochondries hépatiques ayant subi le même traitement (incubation et centrifugation) en absence de liposomes.

#### 4. Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale.

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées est mesurée par oxygraphie (oxygraphe Dual digital model 20, Rank Brothers LTD.) grâce à l'utilisation d'une électrode sensible à la concentration en oxygène (électrode de type Clark). Les mesures sont effectuées dans un tampon de respiration à 37°C pour se rapprocher des conditions physiologiques (composition en annexe). Afin d'étudier au mieux la fonctionnalité de la mitochondrie, nous la plaçons dans différents états de stimulation de la respiration :

-l'état III : La mitochondrie est mise en présence d'un substrat permettant le fonctionnement de la chaîne respiratoire et d'ADP pour permettre l'activation de l'ATP-synthase. L'addition d'ADP induit une forte consommation d'oxygène dépendante de l'utilisation de la force proton-motrice par l'ATP-synthase pour la phosphorylation de l'ADP (Figure 28A).

-l'état IV : Cet état est obtenu par addition d'oligomycine, inhibiteur de l'ATP-synthase. La force proton-motrice ne peut donc plus être utilisée pour la synthèse d'ATP. La respiration mesurée ne sera due qu'au gaspillage énergétique (Figure 28B).

-l'état découplé : Cet état correspond à l'état de respiration maximale de la chaîne respiratoire. Il est obtenu par ajout de FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone), un protonophore qui découple totalement la phosphorylation oxydative (Figure 28C).

Cette mesure nous permet d'analyser les capacités oxydatives des mitochondries. Le protocole détaillé de cette mesure est décrit dans la fiche technique 6 (p 178).

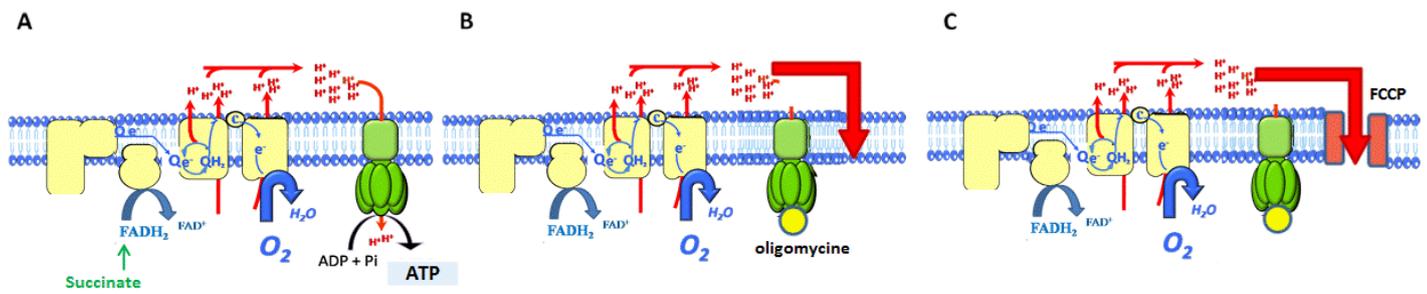


Figure 28 : **Mesure de la consommation d'oxygène – Les différents états respiratoires.**

A) Etat III, condition phosphorylante (présence de substrat et d'ADP). B) Etat IV, respiration liée au gaspillage énergétique (présence d'oligomycine). C) Etat découplé, capacité maximale de la chaîne respiratoire (présence de FCCP).

## 5. Mesure de l'activité de la cytochrome-c-oxydase

La mesure de l'activité de la cytochrome-c-oxydase se base sur la propriété de cette enzyme à oxyder le cytochrome-c (Dumas et al, 2004).

Les mitochondries sont placées dans un milieu réactionnel contenant du cytochrome-c réduit. La cinétique de disparition du cytochrome c réduit, suivie par spectrophotométrie, reflète l'activité de la cytochrome-c-oxydase. Elle nous permet de déterminer l'activité de cette enzyme en nanomoles par minute et par milligramme de protéines. Le protocole détaillé de cette mesure est décrit dans la fiche technique 7 (p180).

## 6. Détermination de l'efficacité de la synthèse de l'ATP

L'efficacité de la synthèse d'ATP est déterminée par l'étude de la relation entre consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP mesurées sur un même échantillon (protocole décrit fiche technique 8, p181).

### a. Mesure de la consommation d'oxygène

Les mitochondries isolées sont placées dans un milieu contenant du succinate, du glucose, de l'ATP et différentes doses d'hexokinase. L'hexokinase réagit avec le glucose et l'ATP pour former du glucose-6-phosphate et de l'ADP. Les différentes doses d'hexokinase permettent de

moduler la quantité d'ADP fournie à la mitochondrie pour le fonctionnement de l'ATP-synthase et d'obtenir ainsi une intensité de phosphorylation plus physiologique (intermédiaire entre l'état IV et l'état III). La consommation d'oxygène est mesurée par oxygraphie (oxygraphe Eurosep, Hansatech instrumentals) en nanoatomes d'oxygène par unité de temps et par milligramme de protéines.

En parallèle de la mesure de la consommation d'oxygène, cinq prélèvements de surnageant sont effectués à intervalle de temps régulier pour permettre la mesure de la cinétique de la synthèse d'ATP relative à la consommation d'oxygène mesurée.

#### b. Préparation des surnageants pour le dosage de l'ATP

Le surnageant est mis en contact avec une dose équivalente d'acide perchlorique qui stoppe la réaction en précipitant toutes les protéines présentes. Les échantillons sont ensuite centrifugés pour culotter les mitochondries présentes dans le prélèvement. Les surnageants sont prélevés et neutralisés avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) qui permet la précipitation de l'acide perchlorique. Une dernière centrifugation est réalisée afin d'éliminer toutes traces d'acide perchlorique. Les échantillons sont ainsi prêts pour le dosage de la concentration en ATP.

#### c. Dosage de la concentration en ATP

Le principe du dosage repose sur la transformation de l'ATP produit par la mitochondrie en nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) par l'utilisation d'un système enzymatique. Il s'agit, par conséquent, d'un dosage indirect, réalisé par l'intermédiaire du glucose-6-phosphate précédemment synthétisé.

Les surnageants sont mis en présence de NADP et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6P-DSH). Le glucose-6-phosphate contenu dans les échantillons va régir avec le NADP par l'intermédiaire de l'enzyme, permettant la formation de NADPH. La quantité de NADPH est directement proportionnelle à la quantité de glucose-6-phosphate formé, lui-même proportionnellement à la quantité d'ADP fournie à l'ATP-synthase et, par extension, à la

quantité d'ATP synthétisée par l'ATP-synthase. Nous obtenons donc une relation entre la quantité d'ATP synthétisé et le NADPH mesuré.

La mesure de la quantité de NADPH contenue dans nos prélèvements, par spectrophotométrie, nous permet de déterminer la synthèse d'ATP en nanomoles d'ATP formées par unité de temps et par milligramme de protéines.

La relation obtenue entre les valeurs de consommation d'oxygène et celles d'ATP synthétisé nous permet de tracer une droite ATP/O.

## 7. Détermination de la cinétique du gaspillage énergétique

La mesure de la cinétique du gaspillage énergétique permet d'évaluer l'intensité du découplage de la phosphorylation oxydative réalisé par dissipation de la force proton-motrice ou par la variation de la stœchiométrie  $H^+/e^-$ .

La force proton-motrice se définit comme la somme du gradient du potentiel d'hydrogène (pH) et du gradient électrique. La mesure est réalisée en présence de nigéricine, catalyseur de l'antiport  $K^+/H^+$ , qui va dissiper le gradient de pH en le transformant en un gradient électrique. Dans ces conditions, la force proton-motrice est alors égale au gradient électrique évalué par la mesure du potentiel de membrane. Par conséquent, la détermination de la cinétique du gaspillage énergétique est réalisée en étudiant la relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante. Le protocole est décrit fiche technique 9, p183.

Les mitochondries sont placées dans une cuve d'oxygraphie (oxygraphe Dual digital model 20, Rank Brothers LTD.) en présence de succinate (substrat du complexe II), de roténone (inhibiteur du complexe I, empêchant le flux inverse des électrons) et d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) qui permet de se placer dans des conditions non phosphorylantes. La consommation d'oxygène est mesurée par une électrode de type Clark comme précédemment décrit.

Le potentiel de membrane est déterminé en parallèle, dans la même cuve d'oxygraphie, par un système reposant sur l'utilisation de l'ion triphenylmethylphosphonium (TPMP<sup>+</sup>), et d'une électrode sensible à cette molécule. Le TPMP<sup>+</sup> est une molécule lipophile, sensible au

potentiel. Elle diffuse donc librement à travers la membrane mitochondriale et s'équilibre en fonction du potentiel membranaire. Ainsi, après calibration de l'électrode sensible au TPMP<sup>+</sup>, la mesure de la concentration de TPMP<sup>+</sup> à l'extérieur de la mitochondrie, nous permet une mesure indirecte de la concentration intra-mitochondriale de TPMP<sup>+</sup> et la détermination du potentiel de membrane.

La consommation d'oxygène est progressivement inhibée par l'utilisation de doses croissantes de malonate (inhibiteur du complexe II). Ces ajouts vont induire une diminution de la consommation d'oxygène entraînant la diminution du pompage de protons. En présence de nigéricine, ce processus aboutit à une diminution du potentiel de membrane. Nous obtenons donc une courbe, appelé courbe de Nicholls représentant la relation entre consommation d'oxygène et le potentiel de membrane.

## 8. Mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale

La mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondrial est un reflet de la production d'ERO par la mitochondrie. Les mitochondries sont placées dans un spectrofluorimètre (F2500, Hitachi) en présence d'un système fluorimétrique : Amplex Red/HorseRadish Peroxydase (Zhou et al, 1997). L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produit par la mitochondrie, et l'Amplex red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) réagissent avec la peroxydase pour former des molécules d'eau et un composé fluorescent : la résorufine.

Dans un premier temps, les mitochondries sont placées en condition non phosphorylante (absence d'ADP) et en présence de succinate (substrat du complexe II). Cette condition permet d'évaluer la production d'ERO induit par le complexe III et par le flux inverse des électrons. L'ajout de roténone supprime la production d'ERO induite par le flux inverse des électrons et permet de visualiser la production d'ERO induite par le complexe III.

Enfin, la mitochondrie est placée dans un état de phosphorylation par l'ajout de glucose, d'hexokinase et d'ATP. Cet état correspond à une production minimale d'ERO.

La réaction de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit avec le système AmplexRed/HorseRadish peroxydase, permet d'obtenir une droite de variation de fluorimétrie en fonction du temps. Cette droite est convertie en production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> grâce à l'utilisation d'une gamme étalon d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et permet de

déterminer la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale en nanomoles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par unité de temps et par milligramme de protéines (protocole décrit fiche technique 10, p185).

## 9. Détermination du contenu en CL

La détermination de la concentration en CL repose sur les propriétés d'une molécule fluorescente : la nonyl acridine orange ou NaO (Petit et al, 1992) qui possède la capacité de se fixer sur les CL dans un rapport de 2/1 (fixation de 2 molécules de NaO/molécule de cardiolipine). Le contenu en CL est mesuré, de manière indirecte, en ajoutant une quantité connue de NaO à une quantité connue de mitochondrie. Le mélange est incubé pour permettre l'association entre le NaO et les CL des mitochondries. Il est ensuite centrifugé pour culotter les mitochondries (et le NaO fixé aux CL). Le surnageant est analysé par spectrofluorimétrie afin de déterminer la concentration en NaO n'ayant pas fixé les CL. L'intensité de fluorescence obtenue est comparée à une gamme étalon. Le contenu en CL est obtenu en déduisant la concentration de NaO contenue dans le surnageant de celle utilisée au début de l'expérience. Le protocole est décrit fiche technique 11 p187.

## 10. Détermination du contenu en PE des membranes mitochondriales

### a. Extraction des lipides des membranes mitochondriales.

L'extraction des lipides des membranes mitochondriales est réalisée selon la technique de Bligh et Dyer (Bligh & Dyer, 1959) (Protocole décrit fiche technique 12, p189). L'utilisation d'un solvant contenant un mélange de chloroforme, méthanol et d'eau permet la déstructuration des membranes mitochondriales et la solubilisation des phospholipides. Un ajout de chloroforme et d'eau distillée et une centrifugation permet de séparer les composants membranaires en deux phases : une phase aqueuse et une phase organique permettant la séparation des constituants membranaires en fonction de leur polarité. La phase apolaire (organique), contenant les lipides des membranes mitochondriales, est filtrée sur laine de verre avec du sulfate de sodium pour éliminer les traces éventuelles d'eau et de protéines.

#### b. Isolement et quantification du contenu en PE

La séparation de PE des autres composés lipidiques est réalisée selon le principe de chromatographie d'adsorption qui permet une séparation des phospholipides en fonction de la nature de leur tête polaires. Après évaporation des solvants, l'extrait lipidique est analysé par chromatographie sur couche mince à deux dimensions. Les phospholipides séparés sont ensuite révélés sous lumières ultraviolet après brumisation de la plaque avec une solution de 2',7'-dichlorofluoresceine à 0,2% dans l'éthanol. Le contenu en PE de nos échantillons est déterminé par densitométrie grâce à l'utilisation d'une gamme étalon de PE réalisée en parallèle.

### 11. Mesure du contenu en complexe de la chaîne respiratoire

Le contenu en complexe de la chaîne respiratoire est déterminé par la technique de western-blotting. Le protocole est décrit fiche technique 13, p190.

#### a. Electrophorèse, la séparation des protéines

La séparation protéique est assurée par une électrophorèse unidimensionnelle SDS-PAGE (*Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Electrophoresis*), réalisée sous ampérage constant de 40 mA. Chaque échantillon de mitochondries isolées est additionné de tampon réducteur qui dénature les protéines et leurs confère une même charge électrique. La diffusion du champ électrique dans le gel d'électrophorèse permet donc la migration des protéines en fonction de leur poids moléculaire.

#### b. Transfert des protéines

Le transfert consiste à réaliser une empreinte du gel (*blot*). Le transfert est réalisé en condition liquide, sous ampérage constant de 190 mA. Les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (fluorure de polyvynilène, Immobilon P transfert membrane, Millipore) sous l'influence du champ électrique.

c. Saturation de la membrane et immuno-détection des protéines d'intérêts

La saturation permet le blocage des sites de fixation de la membrane non utilisés, par des protéines inertes, afin de limiter les liaisons non spécifiques lors de l'immuno-détection. Après saturation, la membrane est lavée et incubée avec un anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt (anticorps primaire, Tableau II). La membrane est ensuite lavée de nouveau afin d'éliminer les interactions non spécifiques. Elle est ensuite incubée avec un anticorps dirigé contre une région espèce-spécifique de l'anticorps primaire, appelé anticorps secondaire. Cet anticorps est couplé à une enzyme, la peroxydase du raifort (HRP pour *HorseRadish Peroxidase*). Cette enzyme participe à l'étape de révélation de la fixation anticorps/protéines d'intérêt.

**Tableau II : Description des anticorps utilisés.**

Protéines d'intérêt	Anticorps	Dilutions utilisées	Espèces de production	Fournisseurs
Complexe I	IgG1 monoclonale complexe I (ND6)	1/7000 <sup>e</sup>	Souris	MitoSciences
Complexe II	IgG2a monoclonale complexe II (FeS)	1/5000 <sup>e</sup>		
Complexe III	IgG1 monoclonale complexe III (core2)	1/20000 <sup>e</sup>		
Complexe IV	IgG2a monoclonale complexe IV (COXII) Par OXPHOS Western Blotting kit	1/10000 <sup>e</sup>		
VDAC	IgG2b monoclonale VDAC	1/21000 <sup>e</sup>		
IgG de souris	Anticorps secondaire couplé à la HRP	1/7000 <sup>e</sup>	Chèvre	SouthernBiotech

d. Révélation de l'immuno-détection

La révélation est réalisée grâce au kit ECL Western-Blotting (Enhanced ChemiLuminescence, Pierce, Pierbo) et repose sur la réaction d'oxydation du luminol (hydrazure d'acide 3-aminophthalique) par la peroxydase. Cette oxydation est réalisée en condition alcaline et en présence de peroxyde d'hydrogène et produit un composé excité, l'acide 3-aminophthalique sous forme di-anionique, qui, en revenant à son état stable, émet une lumière à 430 nm. Cette chimioluminescence est révélée sur un film autoradiographique (Kodak, Sigma), en chambre noire.

#### e. Analyse des films autoradiographiques

Après développement, les films sont scannés et analysés grâce au logiciel Quantity One.

L'intensité des signaux des protéines étudiées est normalisée par l'intensité du signal d'une protéine de référence : VDAC (tableau I). Ce témoin interne permet de prendre en compte les éventuels facteurs de variations externes (dépôts et révélation).

### D. Etude de l'expression génique

L'expression génique des protéines d'intérêt est réalisée par la technique de réaction de polymérisation en chaîne quantitative (ou quantitative polymerisation chain reaction, qPCR) (Cheng et al, 1994). Elle permet l'extrapolation de l'expression d'un gène à partir de la quantité d'ARN messager de ce gène contenue dans l'organe d'étude.

#### 1. L'extraction des ARN

L'extraction des acides nucléiques est réalisée selon la méthode d'extraction guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 2006) (protocole décrit fiche technique 14, p193).

Une portion de 100 mg de tissu (hépatique ou musculaire), collectée lors du sacrifice de l'animal, est broyée dans une solution de trizol (RiboZol™ RNA Extraction Reagent, Interchim SA, France). Le trizol est notamment composé de guanidium thiocyanate et de phénol. Le guanidium thiocyanate permet de maintenir l'intégrité des ARN pendant cette opération en neutralisant les enzymes ARNases. Après élimination des débris tissulaires, les échantillons sont additionnés de chloroforme. Le chloroforme réagit fortement avec le phénol, contenu dans le trizol, permettant une solubilisation des protéines et des lipides. La centrifugation des réactifs permet la formation de deux phases : une phase organique contenant les protéines et les lipides et une phase aqueuse, limpide, contenant les acides nucléiques. L'ajout d'isopropyl alcool, dans la phase contenant les acides nucléiques, induit une précipitation des ARN qui permet la séparation des ARN totaux de l'ADN. Le précipité

d'ARN est culoté par centrifugation et lavé dans de l'éthanol 75%, afin d'éliminer toutes traces de résidus de guanidium thiocyanate. Il est finalement repris dans de l'eau ultra pure stérile.

Les solutions d'ARN sont analysées par spectrophotomètre NanoDrop®(X). Cette analyse permet de mesurer la concentration de nos échantillons en ARN et de vérifier qu'il n'y a pas de contamination protéique. Les échantillons subissent ensuite un traitement à l'ADNase (DNA-free™, Invitrogen) afin d'éliminer les traces éventuelles d'ADN.

## 2. La transcription inverse

La transcription inverse permet la synthèse de brins d'ADN complémentaires du brin d'ARN par l'utilisation d'enzymes spécifiques : les ADN polymérase ARN dépendantes. Cet ADN complémentaire (ADNc) est constitué des régions codantes du gène et possède une meilleure stabilité que les ARN.

La méthode repose sur l'utilisation de désoxyribonucléotides hexamériques synthétisés au hasard (random primers, Promega, USA). Ils reconnaissent les séquences des ARN présents de façon aléatoire mais complémentaire et vont servir d'amorces à l'enzyme. Une première incubation à 65°C permet l'hybridation de ces amorces aux brins d'ARN. Ces composés sont, ensuite, ajoutés à un milieu réactionnel contenant l'enzyme et son tampon (SuperScript™ II Reverse transcriptase, Invitrogen,) additionné d'inhibiteur des ribonucléases, de dithiothréitol et de désoxyribonucléotides triphosphates.

Une incubation à 42°C pendant 50 min, permet l'élongation des brins d'ADNc formés. La réaction se termine par une incubation à 70°C pour une inactivation de l'enzyme. Le protocole est décrit fiche technique 15, p195.

## 3. Conception des amorces

Pour permettre la réaction de polymérisation en chaîne, nous devons créer des amorces spécifiques à chacun des gènes d'intérêt.

Les séquences à amplifier sont sélectionnées à partir de la séquence complète du gène d'intérêt disponible dans les banques de données (NCBI : National Center for Biotechnology

Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Une fois la séquence obtenue, il faut sélectionner 2 amorces par gène : 1 amorce « sens » (sélectionnée sur le brin 5'-3' d'ADN), et 1 amorce « anti-sens » (sélectionnée sur le brin 3'-5'). Il est possible de sélectionner les séquences d'amorces les plus adaptées à la réaction grâce au logiciel PRIMER 3 ([http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)). Ce logiciel nous permet de choisir les amorces en fonction de caractéristiques voulues : taille des fragments à amplifier, taille des amorces, température de fusion, etc. La spécificité de chaque amorce obtenue est vérifiée *via* le site Blast (<http://www.ncbi.nih.gov:80/BLAST/>). Les amorces utilisées sont représentées en annexe.

#### 4. La qPCR

La PCR est basée sur la propriété de l'ADN à se dénaturer et se ré-hybridiser en fonction de la température et repose sur l'action d'une famille d'enzymes : les ADN polymérases ADN dépendantes. La qPCR repose sur le suivi cycle par cycle de cette réaction au moyen d'une molécule « reporter » fluorescente capable d'émettre un rayonnement dont l'intensité est directement proportionnelle aux nombres de copies effectuées. La molécule « reporter » utilisée est le SYBR®green. C'est un agent intercalant qui pénètre de façon non spécifique l'ADN double brin. Le protocole est décrit fiche technique 16, p196.

L'échantillon d'ADNc est ajouté à un milieu réactionnel contenant les éléments nécessaires à la réplication de l'ADNc et au suivi de la réaction. Ce milieu se compose des amorces spécifiques sens et anti-sens et du mix LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche) contenant l'enzyme ADN polymérase (Fast Start *Taq* DNA polymerase), le SYBR Green et les désoxyribonucléotides triphosphate. L'ensemble des éléments est déposé en duplicata dans une plaque 96 puits et analysé par le thermocycleur LightCycler® 480 System (Roche). Le thermocycleur réalise un programme constitué de 45 cycles : 30 s à 95°C (dénaturation des doubles brins), 30 s à 60°C (hybridation des amorces) et 30 s à 72°C (élongation du nouveau brin).

A chaque cycle, l'ADNc subit une duplication observable grâce au SYBR Green. La mesure de l'expression génique est extrapolée par la détermination du cycle de seuil optique ou Ct. Il est défini par le point d'origine où la fluorescence émise dépasse le bruit de fond. Plus le

gène est exprimé, plus le nombre d'ARN messenger de ce gène sera élevé. Par conséquent, il y aura un plus grand nombre d'ADNc correspondant à ce gène et le Ct sera plus faible. Pour vérifier que la fluorescence mesurée correspond bien à l'amplicon recherché, nous réalisons une courbe de fusion. S'il n'y a qu'un pic, un seul fragment d'ADNc a été amplifié.

La première étape de la qPCR consiste à valider l'efficacité de nos amorces. Elle représente la proportion moyenne des molécules d'ADNc se dupliquant à chaque cycle. Pour effectuer cette étape, nous réalisons une gamme de dilution d'un échantillon d'ADNc standard et obtenons la droite  $\text{Log } N = f(n)$  ( $N$ =nombre de molécules amplifiées et  $n$ = nombre de cycles). L'efficacité des amorces est obtenue par la relation :

$$E = 10^{-\text{pente}}$$

Les résultats sont obtenus par la méthode de qPCR relative. La quantité de gène cible de l'échantillon est comparée à la quantité de gène cible d'un échantillon de référence constitué d'un pool de tous les échantillons étudiés. Il représente le témoin inter-plaque. Cette valeur d'expression est ensuite normalisée par l'expression d'un gène de ménage : la  $\beta$ -actine ou la cyclophiline A. Ces gènes possèdent une expression constante entre les différents échantillons et permet de s'affranchir de biais dus aux étapes d'extraction et de transcription inverse. Tout comme les gènes d'intérêt, cette référence est, elle aussi, comparée à une expression de référence inter-plaque. Une étude comparative des Ct est, ensuite, réalisée.

$$\Delta Ct = Ct (\text{référence}) - Ct (\text{échantillon})$$

$$\text{Expression} = 2^{\Delta Ct}$$

$$\text{Expression normalisée} = 2^{\Delta Ct_{\text{gène cible}}} / 2^{\Delta Ct_{\text{gène de ménage}}}$$

La technique de qPCR permet de réaliser l'étude de la protéolyse en analysant l'expression génique de 2 gènes marqueurs de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-ATP dépendante : *atrogen 1* et *MURF1*. Elle permet, aussi, d'observer les variations de l'expression génique des protéines découplantes mitochondriales : UCP2 et UCP3 lors des différentes expériences.

## E. Etude morphologique du muscle squelettique

Les muscles d'intérêt (vaste intermédiaire du quadriceps et muscle plantaire) sont congelés dans une solution d'isopentane refroidie par de l'azote liquide. Une série de coupes transversales, de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, est réalisée, à  $-20^{\circ}\text{C}$ , sur chacun des muscles. Ces coupes transversales permettent d'analyser l'aire des sections transversales des fibres et le typage de chaque muscle.

### 1. Détermination de l'aire des sections transversales des fibres

La détermination des aires des sections transversales est réalisée après coloration des fibres à l'azorubine (fiche technique 17, p197). Cette coloration permet de visualiser chaque fibre musculaire, indépendamment des autres sans en altérer la structure. La coloration à l'azorubine sert aussi de coloration de référence pour les analyses du typage musculaire.

### 2. Détermination du typage musculaire

La détermination du typage musculaire repose sur l'analyse croisée des activités enzymatiques de la myosine et de la succinate déshydrogénase. Cette analyse est réalisée par des techniques histologiques d'après Brooke et Kaiser (Brooke & Kaiser, 1969) pour l'activité ATPasique de la myosine et de Nachlas *et al*, (Nachlas et al, 1957) pour l'activité de la succinate déshydrogénase.

#### a. Activité ATPasique de la myosine

L'activité ATPasique de la myosine est analysée par réaction avec une solution contenant de l'ATP et du calcium après incubation des coupes dans un tampon acide ( $\text{pH}=4.35$ ) ou alcalin ( $\text{pH}=9.4$ ). Le phosphate inorganique libéré lors de la dégradation de l'ATP par la myosine réagit avec le calcium pour former un précipité de calcium phosphate ( $\text{CaPO}_4$ ). L'ajout d'une

solution de chlorure de cobalt et d'une solution de sulfure d'ammonium permet de convertir le précipité en sulfure de cobalt (CoS<sub>2</sub>) de coloration brunâtre (fiche technique 18, p198).

b. Activité de la succinate déshydrogénase

L'activité succinate déshydrogénase est analysée par réaction avec son substrat, le succinate, en présence de meldola blue (8-Diméthylamino-2,3-benzophénazine) et de nitrobleu tétrazolium. Le meldola blue prend en charge les électrons libérés lors de la réaction de déshydrogénation et réagit avec le nitrobleu tétrazolium pour produire une coloration pourpre (fiche technique 19, p200).

Pour chaque activité enzymatique, les colorations sont classées selon leur intensité (foncée, intermédiaire, pâle) nous permettant de déterminer, d'après la classification de Burke *et al*, (Burke *et al*, 1973), si la fibre est glycolytique (fibre de type IIb), oxydo-glycolytique (fibre de type IIa et IIx) ou oxydative (fibre de type I) (Figure 29).

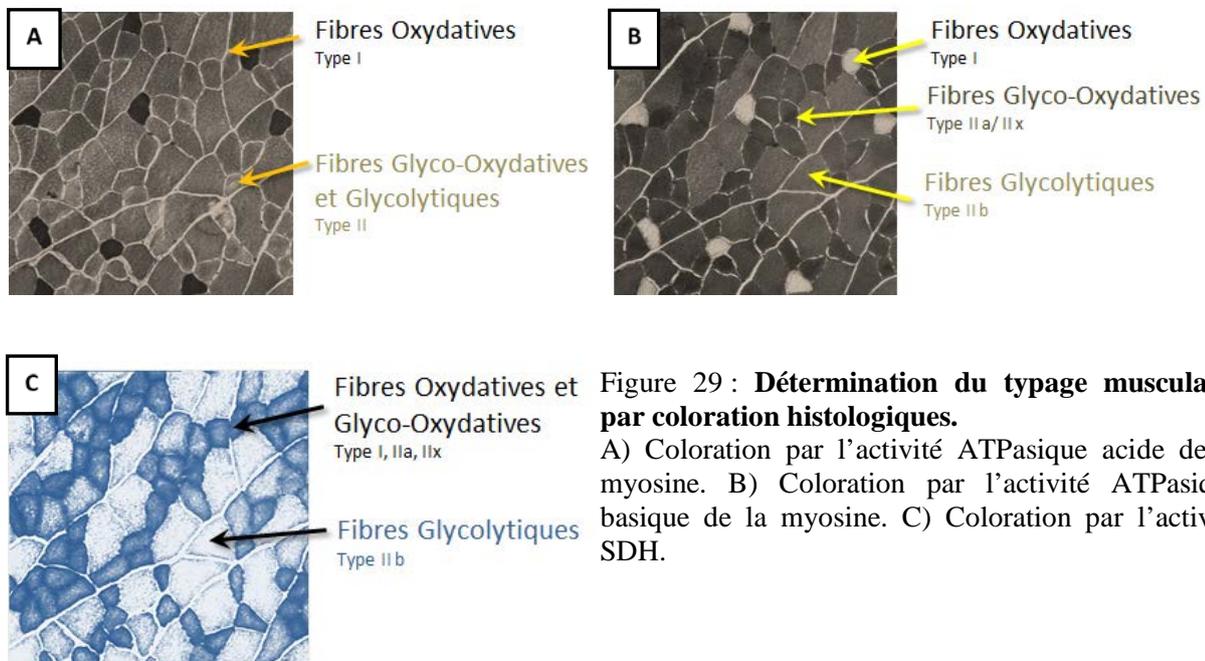


Figure 29 : **Détermination du typage musculaire par coloration histologiques.**

A) Coloration par l'activité ATPasique acide de la myosine. B) Coloration par l'activité ATPasique basique de la myosine. C) Coloration par l'activité SDH.

Chaque mesure est réalisée sur approximativement 210 fibres réparties sur 3 champs de chaque échantillon. Les analyses quantitatives sont réalisées grâce au système d'analyse d'image Visilog 4.0 (Noesis, Courtaboeuf, France).

## F. Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type exceptés les résultats obtenus pour les droites ATP/O et la cinétique du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante, exprimés en moyenne  $\pm$  écart type à la moyenne (ou SEM), afin d'alléger la représentation graphique. Les groupes de rats étudiés ayant tous un effectif inférieur à 30 individus, l'analyse statistique des comparaisons a été réalisée au moyen de tests non paramétriques.

Les études sur le fonctionnement mitochondrial musculaire au stade de cachexie cancéreuse sévère comportant deux types d'échantillons (rats cancéreux / rats « pair-fed »), ont été comparées par des tests Mann-Whitney. Les données de l'étude portant sur l'influence du contenu en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur les dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques provenant d'échantillons appariés sont analysées par des tests de Wilcoxon. Celles sur la cinétique d'apparition des dysfonctionnements mitochondriaux lors du développement de la cachexie cancéreuse comportant trois types d'échantillons, (rats sains, cancéreux et « pair-fed ») sont analysées par des tests Krukall-Wallis excepté le point de cinétique « 10 jours après induction du cancer », dont les résultats seront évalués par des tests Mann-Whitney. Enfin, les analyses recherchant un lien entre deux variables sont effectuées grâce à des tests de régression et des tests de corrélation Spearman. Le seuil de significativité statistique est de  $p < 0,05$ .

Toutes les analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel Graph Pad Prism 4.0.

## II. Résultats et discussions

### A. Bioénergétique mitochondriale musculaire au stade sévère de cachexie cancéreuse

La cachexie cancéreuse est associée à une fonte musculaire qui contribue à la diminution de la qualité de vie (fatigue précoce et perte de force physique), de la tolérance aux traitements et des chances de survie du malade (Dewys et al, 1980).

La fonte musculaire est induite par l'activation de voies protéolytiques parmi lesquelles le système ubiquitine-protéasome-ATP dépendant semble être le principal acteur (Acharyya & Guttridge, 2007; Bossola et al, 2003; Temparis et al, 1994) . L'activation de ce système protéolytique nécessite la présence d'ATP dont la mitochondrie est le principal fournisseur. Quatre-vingt-dix pour cent de l'ATP cellulaire est d'origine mitochondriale (Rolfe & Brown, 1997). A ce jour, peu d'études se sont intéressées à la bioénergétique mitochondriale dans le muscle en situation de cachexie cancéreuse. Les travaux d'Ushomorov et col. ont démontré une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire dans les mitochondries musculaires de souris atteintes de cachexie cancéreuse induite par un fibrome MCA-105 (Ushomorov et al, 1999) suggérant la possibilité d'une altération de la production d'ATP. Cependant, aucune étude n'a apporté la preuve directe d'une baisse d'efficacité de la production d'ATP par les mitochondries musculaires en situation de cachexie cancéreuse.

Cette première partie du travail de thèse conduit dans le modèle de cachexie cancéreuse induite par une carcinose péritonéale (Dumas et al, 2010) avait pour objectifs :

- 1- de quantifier et caractériser la fonte musculaire ;
- 2- d'authentifier l'existence d'une protéolyse accrue via l'activation de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-ATP dépendante ;
- 3- d'examiner le fonctionnement mitochondrial du muscle squelettique sous l'angle de la bioénergétique en incluant l'étude de facteurs connus pour influencer le fonctionnement mitochondrial tels que la production d'ERO, le contenu en CL et l'expression des protéines découplantes UCP2 et UCP3 ;

1. La fonte musculaire dans le modèle de cachexie cancéreuse : aspects quantitatifs et qualitatifs.

Le poids des 6 principaux muscles du membre inférieur que sont le *quadriceps*, le *tibialis anterior*, le *plantaris*, l'*extensor digitorum longus*, le *gastrocnemius* et le *soleus* obtenu chez le rat cachectique et chez le rat pair-fed est présenté dans le tableau III. Les poids ont été rapportés au poids corporel de chaque rat (poids sans ascite pour les rats cachectiques) afin de tenir compte des disparités pondérales des animaux.

La somme des masses musculaires du membre inférieur est significativement diminuée de 9 % lors de la cachexie cancéreuse (Tableau III,  $P < 0,0001$ ). Cette fonte musculaire touche tous les muscles étudiés excepté le muscle *soleus*.

**Tableau III : Masses des principaux muscles du membre inférieur des rats cachectiques et pair-fed.**

Les masses sont exprimées en milligrammes pour 100g du poids total du rat. Test statistique Mann-Whitney avec \* :  $p < 0,05$  (n = 11 pour chaque groupe).

	Quadriceps	Gastrocnemius	Tibialis anterior	plantaris	EDL	Soleus	Masse totale
Cachectiques	1 388 ± 76	814 ± 55	322 ± 36	138 ± 11	103 ± 27	73 ± 6	2 912 ± 166
Pair-Fed	1 544 ± 94	874 ± 68	372 ± 15	151 ± 13	111 ± 6	75 ± 5	3 202 ± 108
Fonte musculaire Pair-Fed vs Cachectiques (%)	-10,1 *	-6,8 *	-13,6 *	-8,8 *	-7,3 *	-2,1	-9,1 *

L'étude morphologique a été conduite sur le muscle *quadriceps*, muscle mixte dont la masse est réduite de 10% ( $p = 0,0004$ ) dans ce modèle expérimental. Les résultats sont présentés sur la figure 30. Chez les rats cachectiques et par comparaison aux rats pair-fed, il existe à la fois une augmentation significative de la proportion des fibres musculaires de petites aires transversales (6 fois supérieure pour les fibres de 500 à 1000  $\mu\text{m}^2$  et 2 fois supérieure pour celles de 1000 à 1500  $\mu\text{m}^2$ ,  $p < 0,05$  pour les deux catégories) et une diminution significative (ou presque) de la proportion de fibres musculaires de grandes aires transversales (4 fois inférieure pour les fibres de 5500 à 6000  $\mu\text{m}^2$  ( $p < 0,05$ ) et 4,4 fois inférieure pour celles  $> 6000 \mu\text{m}^2$  ( $p = 0,056$ )).

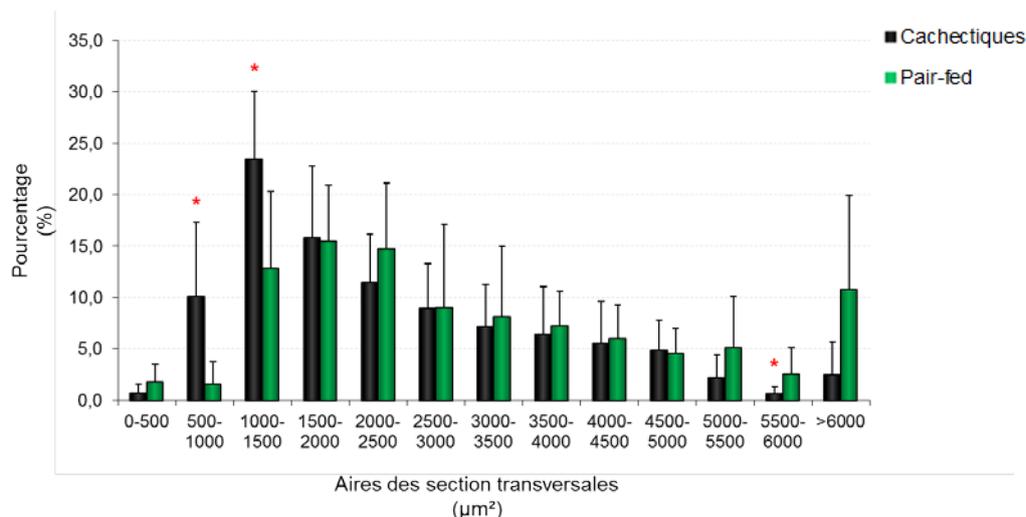


Figure 30: **Distribution des fibres musculaires en fonction de leurs aires transversales dans le *quadriceps* des rats cachectiques et pair-fed.**

Les aires transversales sont évaluées sur approximativement 150 fibres musculaires de *quadriceps* et classées proportionnellement par catégories d'aires transversales. Test statistique Mann-Whitney avec \* =  $p < 0,05$  ( $n = 10$  pour le groupe des rats cachectiques,  $n = 7$  pour le groupe des rats pair-fed).

S'agissant de la typologie des fibres, la fonte musculaire ne semble pas affecter les différents types de fibres musculaires de manière homogène (Figure 31). L'aire moyenne des fibres musculaires de type I ne diffère pas entre rats cachectiques et rats pair-fed. L'aire moyenne des fibres musculaires de type IIa/IIx et des fibres musculaires de type IIb est significativement diminuée chez les rats cachectiques, comparée aux rats pair-fed (diminution de 26 % pour les fibres IIa/IIx et de 34 % pour les fibres IIb,  $p < 0,05$  pour les deux types).

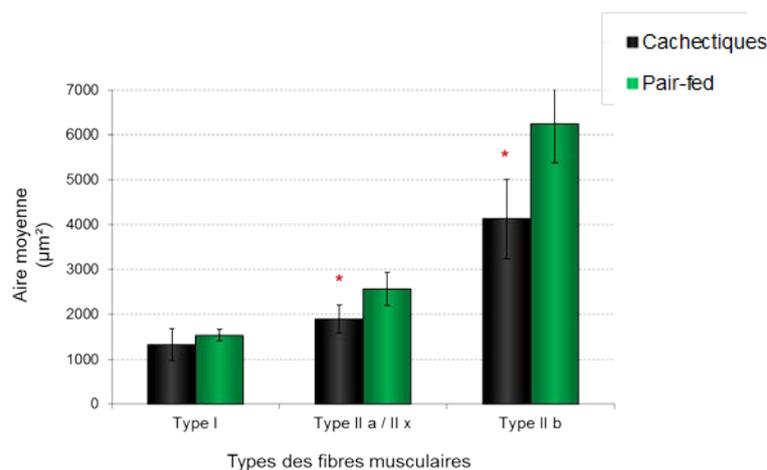


Figure 31 : **Aire moyenne des différents types de fibres musculaires dans le *quadriceps* des rats cachectiques et pair-fed.**

Les analyses sont réalisées sur, approximativement, 150 fibres par *quadriceps* de chaque rat. Test statistique Mann-Whitney avec \* =  $p < 0,05$  ( $n = 8$  pour les groupe des rats cachectiques,  $n = 3$  pour le groupe des rats pair-fed).

## 2. Authentification de l'activation de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-ATP dépendante.

L'expression des gènes *atrogine 1* et *MURF 1* est significativement augmentée chez les rats cachectiques par rapport à celle des rats pair-fed (expression augmentée de 4 fois pour *atrogine 1* et 10 fois pour *MURF1*,  $p < 0,0001$  pour les deux gènes) (Figure 32) suggérant une activation de la protéolyse induite par le système ubiquitine-protéasome-ATP dépendant.

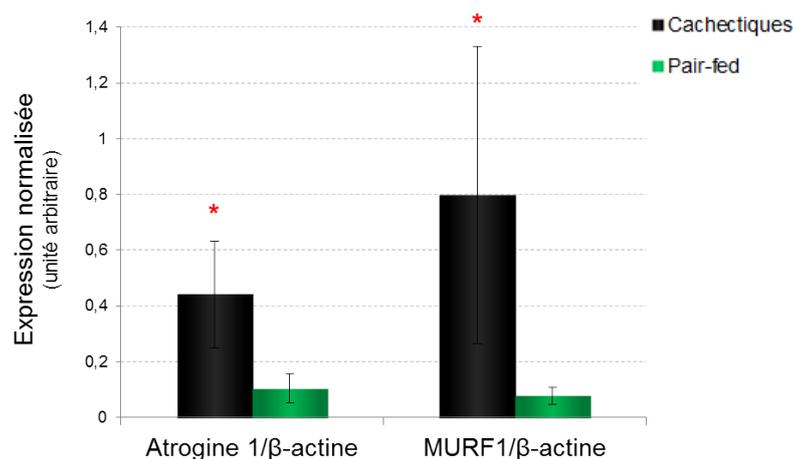


Figure 32 : **Expressions normalisées des gènes *atrogine 1* et *MURF 1*, marqueurs de la protéolyse musculaire, dans le muscle *quadriceps*.**

Les expressions sont normalisées par la quantité d'ARNm de la  $\beta$ -actine et exprimées en unités arbitraires. Test statistique Mann-Whitney avec \* :  $p < 0,05$  (n= 9 pour chaque groupe).

## 3. Altération de la bioénergétique mitochondriale musculaire au stade de cachexie cancéreuse sévère. Rôle des ERO, du contenu en CL et de l'expression des protéines découplantes UCP2 et UCP3.

- a. Les capacités maximales de synthèse de l'ATP sont réduites dans la mitochondrie musculaire en situation de cachexie cancéreuse

Les droites de régression entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP (ATP/O) possèdent des intersections et des pentes qui ne diffèrent pas significativement entre les rats cachectiques et pair-fed (Figure 33). L'efficacité de la synthèse mitochondriale d'ATP n'est pas altérée par la cachexie cancéreuse dans le muscle de rat. Ce résultat est renforcé par

l'absence d'augmentation de la consommation d'oxygène en condition non phosphorylante (état IV). Dans ces conditions, la consommation d'oxygène est liée à l'oxydation des substrats nécessaire au maintien de la force protomotrice pour faire face au gaspillage énergétique (Tableau IV). Ce résultat indique que l'intensité du gaspillage énergétique ne diffère pas dans la mitochondrie musculaire entre rats cachectiques et rats pair-fed.

Cependant, la consommation d'oxygène maximale (correspondante à la plus forte dose d'hexokinase) est significativement diminuée de 23 % dans les mitochondries musculaires des rats cachectiques par rapport aux rats pair-fed ( $649 \pm 40$  contre  $846 \pm 31$  natomes d'oxygène.min<sup>-1</sup>.mg de protéines<sup>-1</sup>,  $p=0,004$ ) entraînant une diminution non significative de 19 % de la synthèse maximale d'ATP. Cette diminution des capacités oxydatives maximales se vérifie en condition phosphorylante (état III, concentration saturante d'ADP) et en condition de découplage maximal de la chaîne respiratoire (état découplé). Dans ces deux situations, la consommation d'oxygène des mitochondries musculaires des rats cachectiques est significativement diminuée par rapport aux mitochondries des rats pair-fed (respectivement de 20 % et 16 % pour les deux conditions ;  $p=0,003$ ) (Tableau IV).

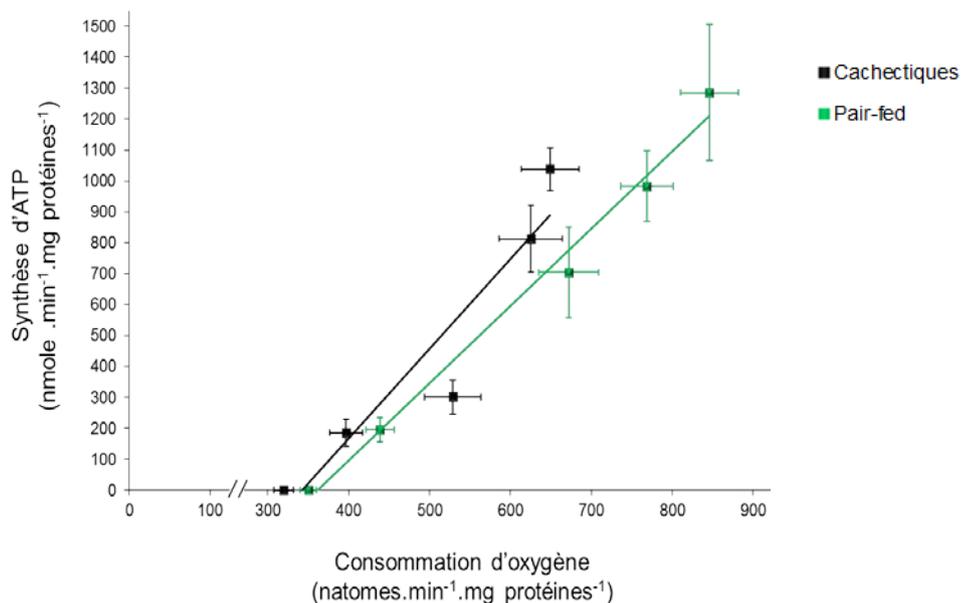


Figure 33 : Efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries isolées de *quadriceps* des rats cachectiques et pair-fed.

Relation entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP. La modulation de la synthèse d'ATP est réalisée par ajouts de doses croissantes d'hexokinase. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 10$  pour chaque groupe).

**Tableau IV : Consommation d'oxygène des mitochondries isolées de *quadriceps* des rats cachectiques et pair-fed.**

Consommations d'oxygène déterminées par oxygraphie avec utilisation du substrat succinate et exprimées en nanoatomes d'oxygène par minutes et par milligrammes de protéines. L'état phosphorylant est obtenu par ajout d'ADP. L'état IV, obtenu par ajout d'oligomycine, correspond à la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique. L'état découplé, obtenu par ajout de FCCP, correspond à l'activité maximale de la chaîne respiratoire. Test statistique Mann-Whitney avec \* =  $p < 0,05$  (n = 10 pour chaque groupe).

	Etat III (phosphorylant)	Etat IV (oligomycine)	Etat découplé (FCCP)	RCR
Cachectiques	480,8 ± 69,1	124,5 ± 17,7	508,5 ± 86,1	3,9 ± 0,6
Pair-Fed	600,0 ± 64,9	137,20 ± 14,1	603,5 ± 59,9	4,4 ± 0,5
Pair-fed vs Cachectiques (%)	-20 *	-9	-16 *	-11

- b. Étude des facteurs influençant le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La production d'ERO et le contenu en CL ne sont pas modifiés par la cachexie cancéreuse dans les mitochondries musculaires (Tableau V).

**Tableau V : Production d'ERO et contenu en CL des mitochondries musculaires isolées des *quadriceps* des rats cachectiques et des rats pair-fed.**

La production d'ERO est représentée en variation de fluorescence par minute et par milligramme de protéines. Le contenu en CL est mesuré en unité arbitraire par milligramme de protéines. Test statistique Mann-Whitney (n = 10 pour chaque groupe).

	Cachectiques	Pair-Fed	Statistiques
<b><u>Production d'ERO</u></b>			
Production complexe I et III	10,7 ± 4,4	14,2 ± 5,1	p = 0,14
Production complexe III	2,6 ± 0,5	2,9 ± 0,6	p = 0,35
Production en condition phosphorylante	2,4 ± 0,7	2,4 ± 0,8	p = 0,80
<b><u>Contenu en cardiolipines</u></b>	177 ± 9	182 ± 10	p = 0,49

L'expression génique de la protéine découplante UCP2 est significativement augmentée lors de la cachexie cancéreuse avec une expression génique de 3 fois supérieure dans les mitochondries musculaires des rats cachectiques par rapport aux rats pair-fed ( $p=0,02$ ). L'expression génique d'UCP3 n'est pas modifiée par la cachexie cancéreuse ( $p=0,63$ ) (Figure 34).

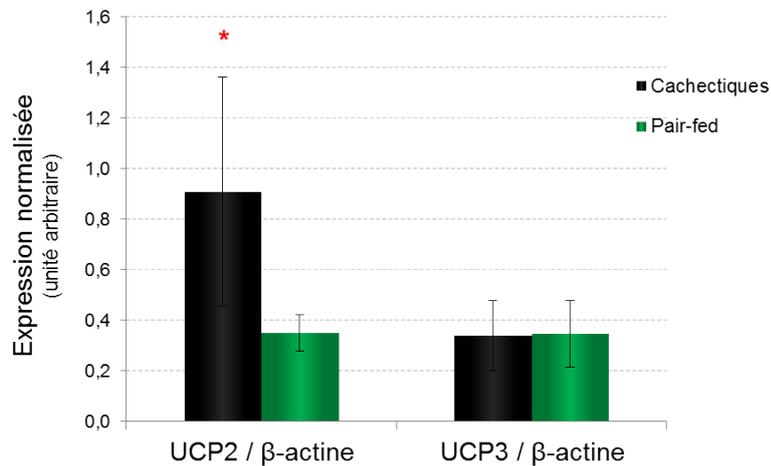


Figure 34: **Expression génique des protéines découplantes UCP2 et UCP3 dans les mitochondries isolées des rats cachectiques et pair-fed.**

Les expressions sont normalisées par la quantité d'ARNm de la β-actine et exprimées en unités arbitraires. Test statistique Mann-Whitney avec \* :  $p < 0,05$  ( $n = 9$  pour chaque groupe).

En western-blot, la cytochrome-c-oxydase ou COX (acteur clé de la régulation de l'activité de la chaîne respiratoire) n'est pas significativement modifiée lors de la cachexie cancéreuse ( $p = 0,43$ ) (Figure 35A et B). Cependant, l'activité de ce complexe est significativement réduite de 28 % dans les mitochondries musculaires isolées des rats cachectiques par rapport aux rats pair-fed ( $p = 0,03$ ) (Figure 35C). En outre, l'activité de la COX est positivement corrélée à la consommation d'oxygène à l'état découplé ( $R^2 = 0,74$  ;  $p = 0,03$ ) (Figure 36).

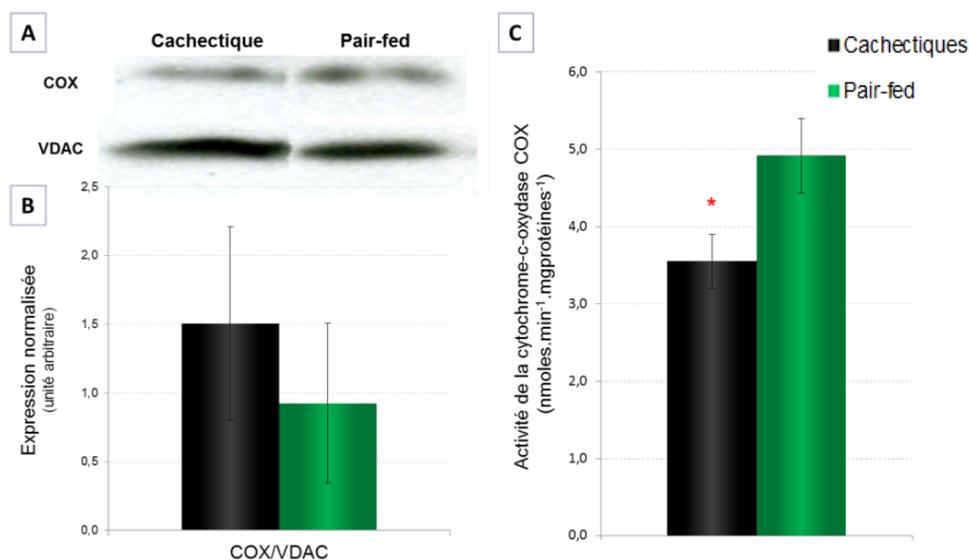


Figure 35 : **Expression protéique et activité de la cytochrome-c-oxydase (COX) dans les mitochondries musculaires isolées des rats cachectiques et des rats pair-fed.**

A) Profil obtenu par western-blotting représentatif de chaque groupe. B) Expression protéique normalisée par le contenu protéique de VDAC et exprimée en unité arbitraire ( $n = 7$  pour chaque groupe). C) Activité de la COX exprimée en nanomoles par minute et par milligramme de protéines ( $n = 4$  pour chaque groupe). Test statistique Mann-Whitney avec \* :  $p < 0,05$ .

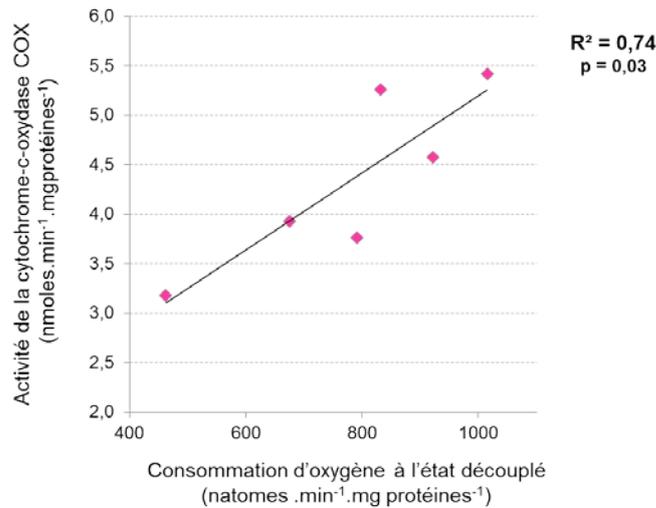


Figure 36 : **Relation entre l'activité de la COX et la consommation d'oxygène à l'état découplé dans les mitochondries musculaires isolées.**

Test de corrélation Spearman (n = 6).

#### 4. Discussion

Le modèle de cachexie cancéreuse induite par carcinose péritonéale, décrit précédemment (Dumas et al, 2010), répond aux principaux critères de cachexie que sont la présence d'une inflammation systémique, l'apparition d'une anorexie et d'une fonte tissulaire notamment musculaire (Muscaritoli et al, 2010 ; Fearon et al, 2011). La présente étude apporte des informations complémentaires sur les caractéristiques anatomo-histologiques de la perte musculaire et sur les mécanismes en cause.

Les principaux muscles du membre inférieur (le *quadriceps*, le *tibialis anterior*, le *plantaris*, l'*extensor digitorum longus*, le *gastrocnemius* et le *soleus*) voient leur masse diminuer d'environ 10% en phase terminale de cachexie par comparaison à des rats pair-fed. Cette fonte musculaire pourrait s'expliquer par une diminution de l'aire des fibres musculaires plutôt que par une diminution de leur nombre. La fonte musculaire par diminution de l'aire des fibres est retrouvée dans d'autres modèles de cachexie cancéreuse et d'autres modèles d'atrophie musculaire (Sandri et al, 2006). Bien que l'atrophie musculaire ne semble pas impliquer une diminution du nombre de fibres musculaires, nous ne pouvons exclure une implication de phénomènes apoptotiques dans la fonte musculaire dans notre modèle. Démontrée dans certains modèles animaux de cachexie cancéreuse (van Royen et al, 2000) et chez des patients atteints de cancer gastro-intestinal (Busquets et al, 2007), l'importance des

phénomènes apoptotiques dans la fonte musculaire liée à la cachexie cancéreuse reste à déterminer. Une étude approfondie de la fragmentation de l'ADN musculaire, du contenu cytosolique en cytochrome c et/ou de l'activité de la caspase 3 permettrait d'approcher le rôle de l'apoptose dans la fonte musculaire observée dans notre modèle animal.

Cette fonte musculaire touche tous les muscles étudiés à l'exception du muscle *soleus*. Le muscle *soleus* est essentiellement constitué de fibres musculaires oxydatives de type I, fibres oxydatives préservées lors de l'atrophie musculaire induite par la cachexie cancéreuse et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (Gosker et al, 2002; Yu et al, 2008). Ceci est en accord avec nos résultats de typage musculaire montrant une diminution de l'aire moyenne des fibres musculaires de type glyco-oxydatif (IIa/IIx) et glycolytique (IIB) et une préservation de l'aire moyenne des fibres musculaires de type oxydatif (I).

Nos résultats montrent une augmentation très importante de l'expression des gènes *atrogin 1* et *MURF 1* suggérant l'implication de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-ATP dépendante dans la fonte musculaire observée dans notre modèle. Le système ubiquitine-protéasome-ATP-dépendant n'est pas le seul impliqué dans l'activation de la protéolyse musculaire et d'autres voies protéolytiques telles que la voie calpaïne-calcium dépendante et la voie lysosomale peuvent être, également, concernées. L'implication de la voie lysosomale a été montrée par une augmentation de l'activité des cathepsine B et L dans le *gastrocnemus* d'un modèle de cachexie cancéreuse induite par un adénocarcinome colique-C26 (Fujita et al, 1996) et dans un modèle animal d'atrophie musculaire induite par l'interleukine 6 (Tsujinaka et al, 1996). Les travaux de Costelli et col. ont démontré que l'activité des inhibiteurs spécifiques des calpaïnes, les calpastatines, était diminuée dans le *gastrocnemius* d'un modèle de cachexie cancéreuse induite par un hépatome Yoshida AH-130, entraînant une augmentation du ratio calpaïne/calpastatine, témoin d'une activation du système calpaïne-calcium dépendante (Costelli et al, 2001). Ces voies protéolytiques pourraient agir de manière complémentaire au système ubiquitine-protéasome-ATP dépendant (Jackman & Kandarian, 2004). Des études mécanistiques complémentaires sont donc nécessaires à la caractérisation de la fonte musculaire dans notre modèle de cachexie induite par une carcinose péritonéale.

En résumé, les résultats obtenus à ce jour confirment l'existence de la fonte musculaire dans ce modèle de cachexie cancéreuse, fonte musculaire caractérisée par une diminution de l'aire des fibres musculaires glycolytiques (IIB) et oxydo-glycolytiques (IIa/IIx) induite par des mécanismes protéolytiques dépendants de la voie ubiquitine-protéasome-ATP dépendante et une préservation des fibres musculaires oxydatives (I).

La protéolyse accrue ne s'accompagne pas d'une altération de l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries musculaires des rats cachectiques par rapport aux mitochondries musculaires des rats pair-fed comme en témoignent les pentes et intersections similaires des droites de régression entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP. Ces résultats sont confirmés par des niveaux de consommation d'oxygène non différents à l'état IV entre les deux groupes de rats cancéreux et pair-fed.

L'ensemble de ces résultats permet de conclure qu'il n'existe pas de gaspillage énergétique dans les mitochondries musculaires en stade de cachexie cancéreuse sévère mais une diminution des capacités oxydatives maximales pouvant compromettre la production maximale d'ATP. Cette hypothèse complète les travaux de Constantinou qui, par RMN, ont rapporté une diminution de la vitesse de la synthèse d'ATP dans les muscles squelettiques du membre inférieur de souris atteintes d'un carcinome pulmonaire Lewis (Constantinou et al, 2011). Cette diminution ne serait pas due à une perte d'efficacité de la synthèse mais à une diminution de l'approvisionnement de l'ATP-synthase en protons secondaire à une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire. En outre, une récente étude de Huang et de ses collaborateurs a montré que la concentration en ATP cellulaire pouvait réguler l'activité du protéasome. Dans cette étude, l'inhibition de la synthèse d'ATP induite par l'oligomycine, entraînait une diminution de 20% de la concentration cellulaire de l'ATP. Cette diminution était capable d'induire l'activation du protéasome (Huang et al, 2010). Les dysfonctionnements mitochondriaux pourraient donc avoir une action directe sur la dégradation protéique observée lors de la cachexie cancéreuse. L'étude du métabolisme énergétique cellulaire permettrait de confirmer cette hypothèse et d'évaluer la conséquence des altérations mitochondriales observées sur le fonctionnement de la cellule musculaire.

La production d'ERO et le contenu en CL des membranes mitochondriales sont des régulateurs connus du fonctionnement de la chaîne respiratoire et de la phosphorylation oxydative (Hoch, 1998; Mantena et al, 2008; Ohtsuka et al, 1993). La production d'ERO est aussi connue pour favoriser le catabolisme protéique (Gomes-Marcondes & Tisdale, 2002). Les travaux issus du laboratoire ont montré une augmentation de la production d'ERO et du contenu en CL dans les mitochondries hépatiques lors de la cachexie cancéreuse (Dumas et al, 2011). Ces phénomènes ne sont pas retrouvés dans le muscle squelettique.

Le rôle régulateur des protéines découplantes UCP2 et UCP3 sur le fonctionnement de la phosphorylation oxydative reste sujet à débat (Nedergaard et Cannon, 2003 ; Cioffi et al, 2009). Dans notre étude, une augmentation de l'expression génique d'UCP2 est observée sans modification significative de l'expression génique d'UCP3. Une augmentation de l'expression génique de ces protéines découplantes a déjà été retrouvée chez des rats cachectiques par rapport à des rats sains pour UCP2 mais également pour UCP3. Toutefois l'augmentation de l'expression de ces protéines n'était plus significative lorsqu'elle était comparée au groupe pair-fed (Bing et al, 2000; Sanchis et al, 1998). L'augmentation de l'expression génique d'UCP3 semble directement liée à la restriction alimentaire en accord avec les travaux de Boss (Boss et al, 1998). Bien qu'induit par la restriction alimentaire, l'augmentation de l'expression UCP2 est aussi retrouvée dans certaines conditions pathologiques telles que la stéatose hépatique non alcoolique ou dans des modèles expérimentaux de Leishmaniose (Basu Ball et al, 2011; Serviddio et al, 2008). Certains travaux ont démontré un rôle des protéines découplantes UCP2 et UCP3 dans la régulation des ERO (Arsenijevic et al, 2000; Toime & Brand, 2010). Les mécanismes impliqués dans cette action sont encore débattus. L'expression de ces protéines pourrait induire un léger découplage de la phosphorylation oxydative qui diminuerait ainsi le potentiel de membrane et la production d'ERO (Mailloux & Harper, 2011). Cependant, la régulation des ERO par les protéines découplantes a aussi été démontrée dans des modèles n'impliquant pas de découplage. L'équipe du professeur Bouillaud émet l'hypothèse d'une régulation métabolique de la production d'ERO. Les protéines découplantes auraient un rôle de transporteur uniport du pyruvate diminuant l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire et, en conséquence, la production d'ERO (Bouillaud, 2009). Enfin, les travaux de Toime et Brand suggèrent que les protéines découplantes pourraient transférer les ERO produits sur le cytochrome c (Toime et Brand, 2010). L'action des protéines découplantes sur la régulation des ERO serait, alors, directement liée aux propriétés peroxydase du cytochrome c (Pereverzev et al, 2003). Dans notre étude, la surexpression génique d'UCP2 est observée sans augmentation de la production d'ERO. Nous pouvons suggérer que l'augmentation de l'expression d'UCP2 serait un mécanisme d'adaptation menant à une diminution de la production d'ERO, à un niveau basal, protégeant ainsi la mitochondrie des effets du stress oxydant. L'étude de la production d'ERO en présence d'inhibiteurs (GDP) et d'activateurs (acides gras et 4HNE) des UCPs, ainsi que des états respiratoires mitochondriaux en présence de pyruvate et de l'état d'oxydation du cytochrome c pourrait nous permettre d'étayer cette hypothèse.

La COX est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire. Des études ont montré que le transfert d'électrons à la molécule d'oxygène dans la COX était l'étape limitante du fonctionnement de la chaîne respiratoire dans de nombreuses lignées cellulaires et dans le muscle squelettique humain (Kunz et al, 2000; Villani & Attardi, 1997). Par conséquent, l'activité de la COX influence directement la régulation des capacités oxydatives. Nous avons concentré notre attention sur cette enzyme. La quantité de COX est inchangée dans les mitochondries musculaires lors d'un stade de cachexie cancéreuse sévère. Cependant, nous observons une diminution de son activité de 28 % dans les mitochondries musculaires des rats cachectiques par rapport à celles des rats pair-fed. Cette diminution de l'activité de la COX est en accord avec le travail d'Ushmorov et col. (Ushmorov et al, 1999). Il reste à déterminer les mécanismes impliqués dans la diminution de l'activité de la COX. Un mécanisme connu de régulation de l'activité de la COX est une inhibition allostérique par l'ATP (Kadenbach, 2003 ; Lee et al, 2005a, Acin-Perez et al, 2011). Ce mécanisme semble peu probable dans notre travail dans la mesure où les capacités maximales de synthèse d'ATP sont diminuées.

Certaines études ont montré que l'expression de l'isoforme 2, de la sous-unité IV, de la COX était accompagnée d'une abolition de l'inhibition allostérique de la cytochrome-c-oxydase par l'ATP (Horvat et al, 2006). L'analyse de l'expression des sous unités protéiques de la COX permettrait d'approfondir cette hypothèse. Les ERO influencent aussi le fonctionnement de la COX soit par un effet direct (touchant le noyau hème du complexe) soit par une action indirecte en entraînant la peroxydation des CL liées au complexe (Musatov, 2006). Cependant, la peroxydation des CL est connue pour diminuer l'activité du complexe I (Paradies et al, 2004) et du complexe III (Paradies et al, 2001). En outre, cette peroxydation lipidique est associée à une diminution du contenu en CL (Paradies et al, 2001). Dans nos expériences, la production d'ERO et le contenu en CL sont inchangés dans les mitochondries musculaires lors de la cachexie cancéreuse. Un tel mécanisme est donc peu probable dans nos conditions expérimentales. Cependant, la surexpression d'UCP2 suggérant un mécanisme compensatoire à une augmentation de la production d'ERO, une mesure de la peroxydation des CL et des activités du complexe I et III permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Une des voies de régulation possible pourrait aussi faire intervenir le monoxyde d'azote (NO). En effet, le NO semble augmenté au stade avancé de cachexie cancéreuse induite par un hépatome Yoshida HA-130 (Barreiro et al, 2005) et sous stimuli cachectisants (injection d'endotoxine) (Yu et al, 2008). En outre, son action d'inhibition de l'activité de la COX est bien décrite (Brookes et al, 2002; Cleeter et al, 1994). Cependant, les travaux de

Clerc et col. montrent que le NO est capable d'induire un meilleur couplage de la phosphorylation oxydative (réduction du « slipping » au sein de la COX) entraînant une augmentation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative (Clerc et al, 2007). Ce mécanisme semble en contradiction avec nos résultats. La mesure de la production de NO, de l'expression de la protéine NO synthase inductible (iNOS) et du taux de protéines nitrogénées permettrait d'établir une action éventuelle du NO dans notre modèle. Des travaux récents montrent que le TNF $\alpha$  inhibe l'activité de la COX en phosphorylant la sous unité I de la protéine (Samavati et al, 2008). Nos précédents travaux ayant montré une augmentation du TNF $\alpha$  sérique (Dumas et al, 2010), un tel mécanisme ne peut être exclu.

Ces hypothèses devront être vérifiées par de nouvelles études.

En résumé, ce travail montre que l'efficacité de la synthèse de l'ATP n'est pas altérée dans la mitochondrie musculaire du rat cancéreux cachectiques mais que les capacités maximales de production d'ATP sont compromises. Ceci semble être lié à une diminution de l'activité de la COX et pourrait induire une ré-orientation métabolique de la cellule vers la voie de la glycolyse anaérobie pour faire face à la demande énergétique nécessaire à la protéolyse musculaire. La baisse de rendement énergétique qui en résulte (coût de la production d'ATP par la glycolyse anaérobie) pourrait participer à l'augmentation des dépenses énergétiques en situation de cachexie cancéreuse.

## B. Rôles des CL, des ERO et de leurs effets combinés sur le gaspillage énergétique des mitochondries hépatiques

Le foie est un déterminant important de la dépense énergétique de repos (Illner et al, 2000) et il a été observé une corrélation positive entre la masse hépatique et la dépense énergétique de repos du corps entier lors d'un cancer colorectal avancé (Liefers et al, 2009). Une diminution de la concentration d'ATP dans les hépatocytes de rats développant une cachexie cancéreuse induite par un sarcome MCA a été rapportée (Hochwald et al, 1996 ; Tsuburaya et al, 1995). Plus récemment, Perumal et col. ont observé une diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire (Pérumal et al, 2005). Ces altérations du métabolisme mitochondrial hépatique pourraient jouer un rôle dans l'hypermétabolisme observé lors de la cachexie cancéreuse (Falconer et al, 1994).

Les résultats antérieurs, obtenus au laboratoire, ont montré que l'efficacité de la synthèse d'ATP était significativement diminuée dans les mitochondries hépatiques des rats au stade de cachexie cancéreuse sévère induite par une carcinose péritonéale (Dumas et al, 2011). Cette perte d'efficacité de la synthèse d'ATP implique une utilisation accrue des nutriments énergétiques afin de maintenir un taux d'ATP suffisant pour satisfaire les besoins énergétiques de l'organe. Dans une situation où la prise alimentaire est diminuée par la présence d'une anorexie, ce mécanisme pourrait participer à l'augmentation des dépenses énergétiques et donc à la perte de poids observée lors de la cachexie cancéreuse. Cette diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP pouvait, en partie, s'expliquer par une augmentation du gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP (fuite de protons et/ou slip redox) (Dumas et al, 2011). Ce processus était concomitant à une augmentation de la production d'ERO et à une augmentation du contenu en CL des membranes mitochondriales (Dumas et al, 2011).

Les ERO et CL sont connues pour influencer le fonctionnement énergétique mitochondrial. L'exposition des mitochondries musculaires isolées à des ERO induit un gaspillage énergétique (Tonkonogi et al, 2000). Une diminution du contenu en CL dans les mitochondries hépatiques (Paradies et al, 1991) et une augmentation de l'efficacité de la synthèse d'ATP dans ces mêmes mitochondries sont observées chez le rat hypothyroïdien (Nogueira et al, 2002).

Le but du présent travail était de déterminer *in vitro* si une augmentation du contenu en CL et/ou une augmentation de la production d'ERO pouvaient mimer la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP et l'augmentation du gaspillage énergétique observées dans les mitochondries hépatiques de rats au stade de cachexie cancéreuse sévère.

Les questions spécifiques posées dans ce travail sont :

1- L'augmentation du contenu en CL de la membrane mitochondriale diminue-t-elle l'efficacité de la synthèse d'ATP et augmente-t-elle le gaspillage énergétique dans des mitochondries isolées de foie sain ?

2- L'augmentation de la production exogène d'ERO s'accompagne-t-elle d'une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP et d'une augmentation du gaspillage énergétique dans des mitochondries isolées de foie sain ?

3- Quel est l'effet résultant de l'augmentation conjointe du contenu en CL et de la production exogène d'ERO sur l'efficacité de la synthèse d'ATP et le gaspillage énergétique dans des mitochondries isolées de foie sain ?

## 1. Influence de l'augmentation du contenu en CL

Le contenu en CL des membranes mitochondriales augmente de 80 % par rapport aux mitochondries hépatiques contrôles (Figure 37A). Pour examiner la spécificité des effets de l'enrichissement en CL, des mitochondries hépatiques ont été également enrichies en PE (PE). Le contenu en PE est augmenté d'un facteur 1,8 correspondant à une augmentation de 81% (Figure 37B).

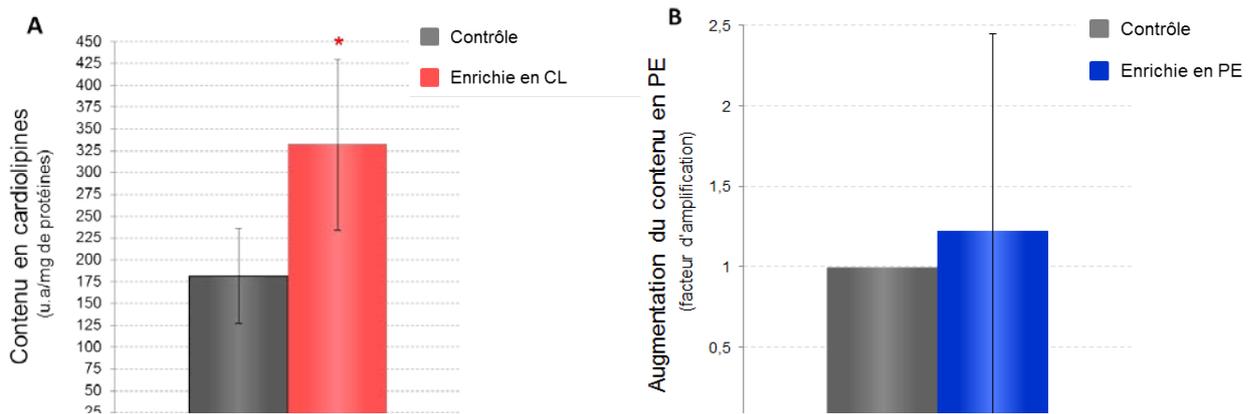


Figure 37 : **Enrichissement des mitochondries hépatiques en CL et en phosphatidyléthanolamine.** A) Mesure du contenu en CL des mitochondries hépatiques enrichies et des mitochondries hépatiques contrôles. Les concentrations en CL sont exprimées en unité arbitraire par milligramme de protéines mitochondriales (n = 7 pour chaque groupe). B) Mesure du contenu en PE des mitochondries hépatiques enrichies et des mitochondries hépatiques contrôles. Les concentrations en PE sont exprimées en facteur d'augmentation (n = 7 pour chaque groupe). Test statistiques Wilcoxon avec \* = p < 0,05.

Cette augmentation du contenu en CL des mitochondries hépatiques décale de façon significative vers la droite la relation ATP/O par rapport à celle des mitochondries contrôles (Figure 38A). Ainsi pour une même synthèse de 43 nmoles d'ATP, les mitochondries enrichies en CL augmentent leur consommation d'oxygène de 15 % par rapport aux mitochondries contrôles (respectivement,  $76 \pm 11$  et  $66 \pm 7$  natomes d'oxygènes). Cette augmentation n'est pas observée pour les mitochondries enrichies en PE (Figure 38B). Ainsi, ce travail montre que l'augmentation *in vitro* du contenu en CL des mitochondries hépatiques est associée à une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP et que cette diminution d'efficacité semble spécifique des CL.

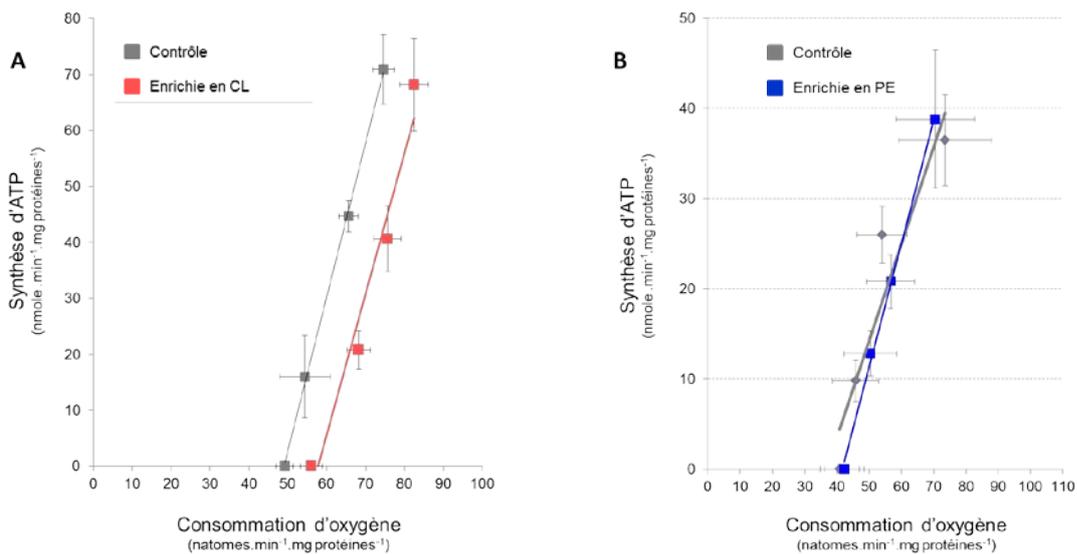


Figure 38 : **Effet de l'enrichissement en CL et en PE sur l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques.**

Relation entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP. La modulation de la synthèse d'ATP est réalisée par ajout de doses croissantes d'hexokinase. A) Effet de l'enrichissement en CL (n = 9 pour chaque groupe). B) Effet de l'enrichissement en PE (n = 7 pour chaque groupe). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

Le gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP, déterminé par la relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante, est faiblement, mais significativement, augmenté dans les mitochondries enrichies en CL par rapport aux mitochondries contrôles. Ainsi, pour maintenir un même potentiel de 164 mV, les mitochondries enrichies en CL ont une augmentation de leur consommation d'oxygène de 17 % par rapport aux mitochondries contrôles (respectivement,  $13 \pm 3$  et  $11 \pm 2$  natomes d'oxygène.min<sup>-1</sup>.mg de protéines<sup>-1</sup>) (Figure 39).

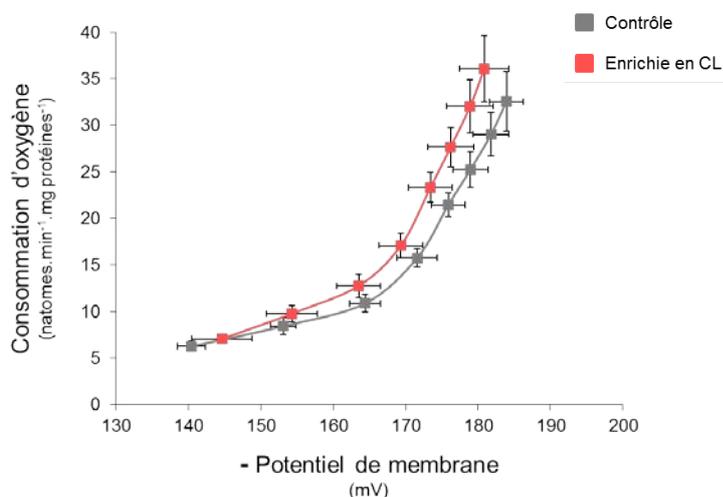


Figure 39 : **Effet de l'enrichissement en CL sur le gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques.**

Relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante. La modulation de la consommation d'oxygène est réalisée par ajout de doses croissantes de malonate (inhibiteur du complexe II). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 5 pour chaque groupe).

## 2. Influence de l'augmentation de la production d'ERO

L'augmentation de la production d'ERO est réalisée, de manière exogène, par utilisation du système enzymatique xanthine/xanthine oxydase. Les mesures sont réalisées avec 125  $\mu$ M de xanthine et 2 doses de xanthine oxydase. La dose élevée (0,036U) correspond à une augmentation de la production d'ERO similaire à celle observée au stade de cachexie sévère (14 fois supérieure aux mitochondries contrôles). La dose faible (0,0029U) constitue une augmentation de la production d'ERO intermédiaire (3 fois supérieure aux mitochondries contrôles) (Figure 40).

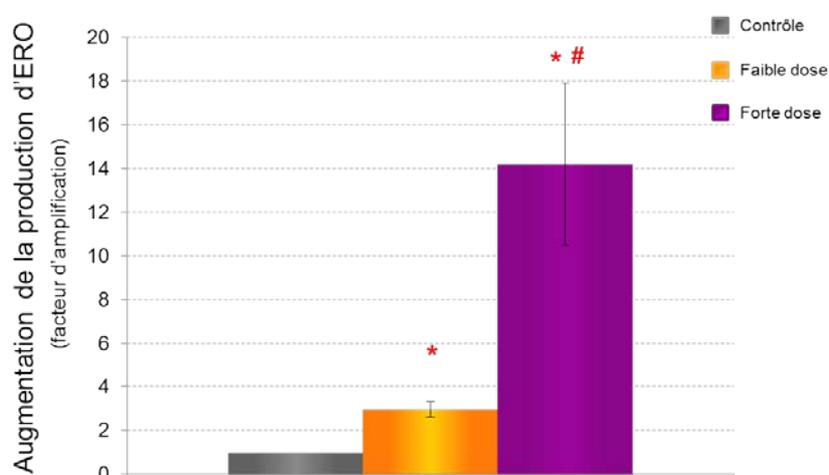


Figure 40 : **Augmentation de la production exogène d'ERO par le système enzymatique xanthine/xanthine oxydase.**

La production exogène d'ERO est exprimée par un facteur d'amplification de la production d'ERO des mitochondries contrôles. La forte dose correspond à une concentration de 0,036 U de xanthine oxydase (n = 6 pour le groupe forte dose et mitochondries contrôles). La dose faible correspond à une concentration de 0,0029 U (n = 7 pour le groupe faible dose et mitochondries contrôles). Tests statistiques Wilcoxon avec \* =  $p < 0,05$  versus contrôle et Mann-Whitney avec # =  $p < 0,05$  versus faible dose.

Seule une forte production d'ERO diminue l'efficacité de la synthèse d'ATP (figure 41). Ainsi pour une même synthèse de 42 nmoles d'ATP, les mitochondries en présence d'une forte augmentation d'ERO ont une consommation d'oxygène de 10 % supérieure à celle des mitochondries contrôles (respectivement,  $71 \pm 7$  et  $65 \pm 10$  natomes d'oxygènes) (Figure 41B).

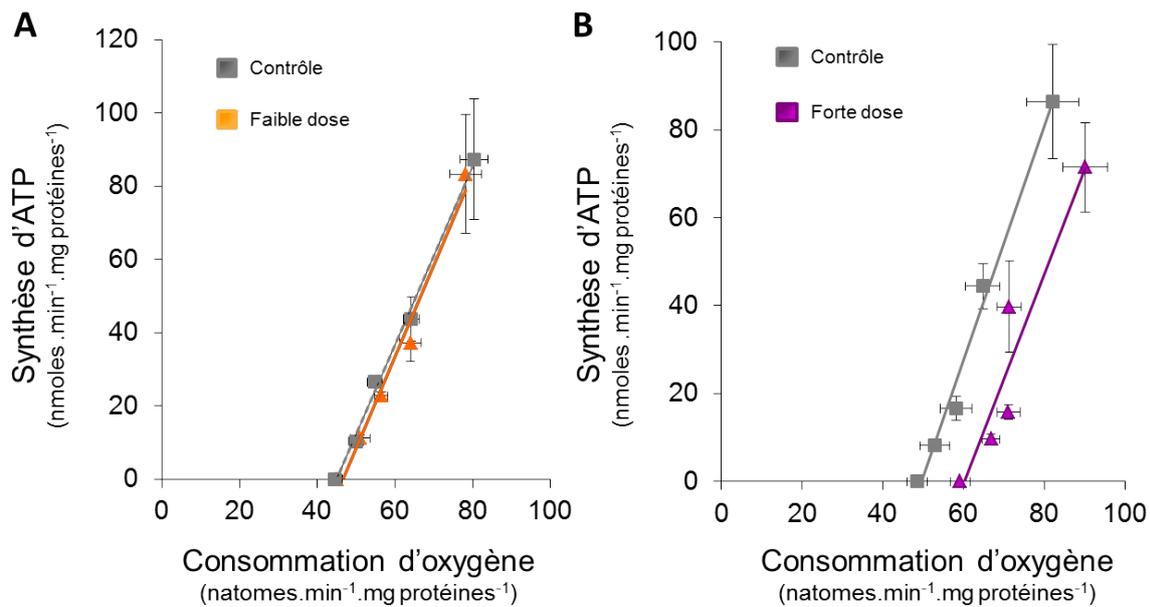


Figure 41 : **Effet de l'augmentation de la production d'ERO sur l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques.**

Relation entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP. La modulation de la synthèse d'ATP est réalisée par ajouts de doses croissantes d'hexokinase. A) La dose faible (0,0029U de xanthine oxydase) (n = 7 pour les deux groupes). B) La forte dose (0,036U de xanthine oxydase) (n = 6 pour les deux groupes). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

Malgré un potentiel membranaire maximal similaire entre nos deux groupes ( $191 \pm 17$  mV pour les mitochondries en présence d'une forte production d'ERO contre  $185 \pm 15$  mV pour les mitochondries contrôles), la consommation d'oxygène nécessaire au maintien de ce potentiel est augmentée de 38 % dans les mitochondries en présence d'une forte production d'ERO ( $42 \pm 6$  natomes d'oxygène.min<sup>-1</sup>.mg de protéines<sup>-1</sup> contre  $30 \pm 7$  pour les mitochondries contrôles,  $p < 0,05$ ). La diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP observée est donc associée à un gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP (Figure 42)

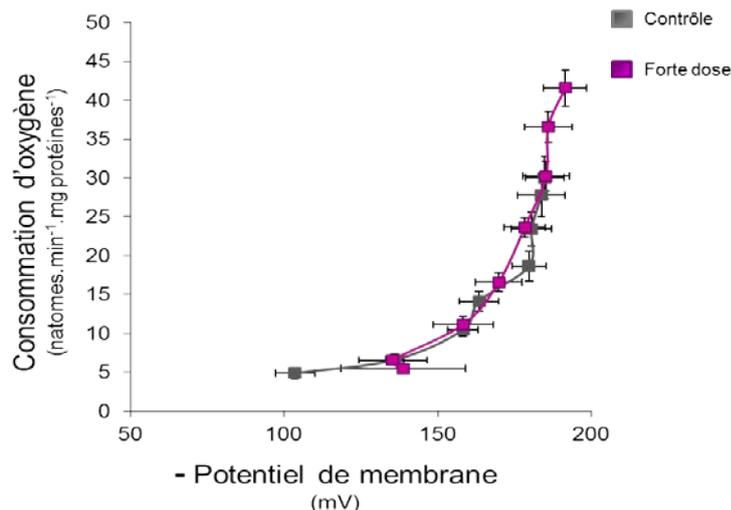


Figure 42 : **Effet de l'augmentation de la production d'ERO sur le gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques.**

Relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante. La dose forte (0,036 U de xanthine oxydase) correspond à taux d'ERO 14 fois supérieure par rapport à la production d'ERO des mitochondries contrôles. La modulation de la consommation d'oxygène est réalisée par ajout de doses croissantes de malonate (inhibiteur du complexe II). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 6 pour chaque groupe).

L'effet du système xanthine/xanthine oxydase sur la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique est réversible par ajout de 5 $\mu$ M d'un antioxydant ciblant la mitochondrie (mitoTEMPO) (Figure 43). Ceci démontre que l'effet observé est bien le résultat de l'augmentation de la production d'ERO et que cette augmentation ne semble pas induire de dommages irréversibles sur le fonctionnement mitochondrial.

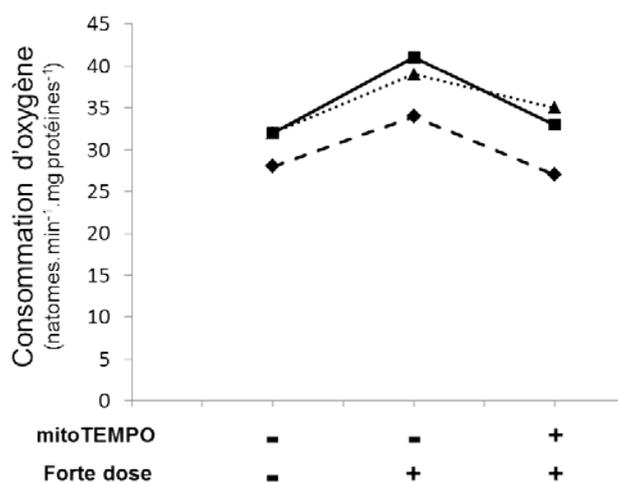


Figure 43 : **Effet d'une forte augmentation d'ERO et de l'antioxydant mitoTEMPO sur la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique des mitochondries hépatiques.**

La production d'ERO est réalisée par le système xanthine/xanthine oxydase. La concentration en xanthine est de 125 $\mu$ M, la concentration en xanthine oxydase correspond à la forte dose utilisée pour nos expériences (0,036 U). La consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique est obtenue en présence de succinate, par ajout d'oligomycine. Chaque tracé correspond à une expérience (n = 3).

### 3. Effet conjoint de l'augmentation du contenu en CL et de la production d'ERO

Dans cette expérience, l'enrichissement en CL était de 75 % et la production d'ERO augmentée de 12 fois (Figure 44).

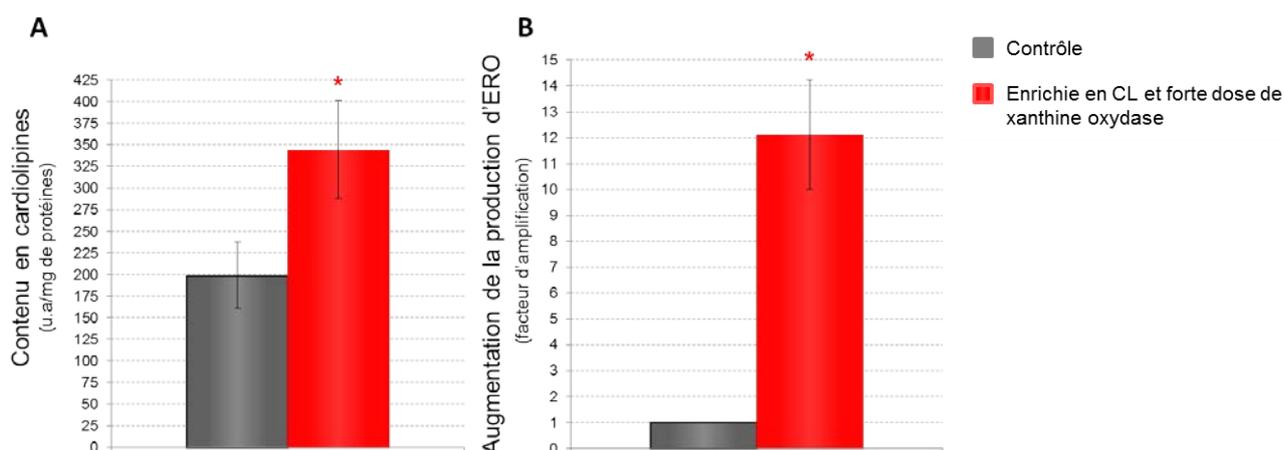


Figure 44 : Contenu en CL et augmentation de la production d'ERO des mitochondries enrichies en CL et en présence d'une forte dose de xanthine oxydase et des mitochondries contrôles.

A) Le contenu en CL est exprimé en unité arbitraire par milligramme de protéines (n = 10 pour chaque groupe). B) La production exogène d'ERO est exprimée par un facteur d'amplification de la production d'ERO des mitochondries contrôles (n = 7 pour chaque groupe). Test statistique Wilcoxon \* = p<0,05.

La droite ATP/O des mitochondries enrichies en CL et en présence d'une production d'ERO augmentée de 12 fois est décalée vers la droite par rapport à la droite ATP/O des mitochondries contrôles (Figure 8y). Par conséquent, l'effet conjoint d'un enrichissement en CL et d'une augmentation de la production d'ERO produit une diminution de l'efficacité de la synthèse de l'ATP. Ainsi pour une même synthèse de 40 nmoles d'ATP, les mitochondries en présence d'une forte augmentation d'ERO montrent une consommation d'oxygène augmentée de 15 % par rapport aux mitochondries contrôles (respectivement,  $70 \pm 13$  et  $61 \pm 12$  natomes d'oxygènes) (Figure 45)

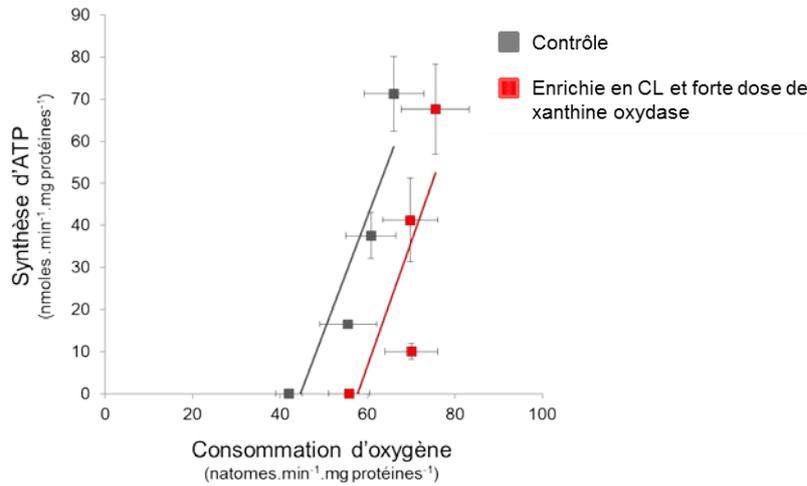


Figure 45 : **Effet conjoint de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur l'efficacité de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques.**

La concentration en CL est augmentée de 75 % et la production d'ERO est 12 fois supérieure dans les mitochondries enrichies en CL et en présence d'une forte dose de xanthine oxydase par rapport aux mitochondries contrôles. La modulation de la synthèse d'ATP est réalisée par ajouts de doses croissantes d'hexokinase. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 4 pour chaque groupe).

La diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP observée dans les mitochondries enrichies en CL et en présence d'une forte augmentation de la production d'ERO est associée à une augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante (Figure 46). Ainsi, les mitochondries enrichies en CL et en présence d'une forte augmentation de la production d'ERO consomment plus d'oxygène que les mitochondries contrôles pour maintenir un même potentiel membranaire. Pour le maintien d'un potentiel de membrane de 171 mV, la consommation d'oxygène est doublée dans les mitochondries enrichies en CL et en présence d'une forte augmentation de la production d'ERO ( $25 \pm 6$  natomes d'oxygène.min<sup>-1</sup>.mg de protéines<sup>-1</sup> contre  $11 \pm 6$  pour les mitochondries contrôles).

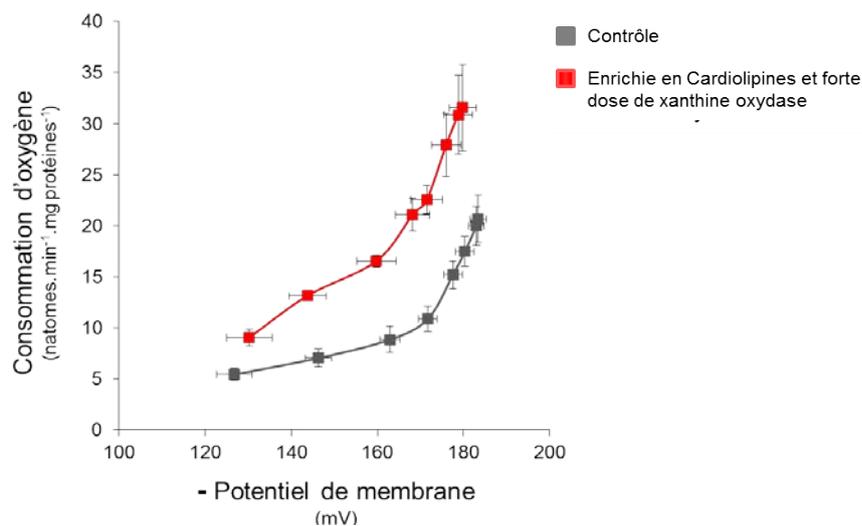


Figure 46 : **Effet conjoint de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur le gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques.**

La concentration en CL est augmentée de 75 % et la production d'ERO est 12 fois supérieure dans les mitochondries enrichies en CL et en présence d'une forte dose de xanthine oxydase par rapport aux mitochondries contrôles. La modulation de la consommation d'oxygène est réalisée par ajouts de doses croissantes de malonate (inhibiteur du complexe II). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n<sub>140</sub>

Afin de comparer les effets d'un enrichissement en CL, d'une augmentation de la production d'ERO ou de l'action conjointe de ces deux paramètres sur l'efficacité de la synthèse d'ATP, nous avons déterminé la consommation d'oxygène nécessaire à une production de 50 nmoles d'ATP par minute et par milligrammes de protéines dans les figures 38A, 41B et 45 (Figure 47). Cette consommation d'oxygène est similaire pour l'ensemble des paramètres testés (augmentation de 15 % dans les mitochondries enrichies en CL, 13 % pour les mitochondries en présence d'une forte augmentation d'ERO et 11% pour les mitochondries présentant les deux paramètres) (Figure 47). Il n'y a, par conséquent, pas d'effet additionnel de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur l'efficacité de la synthèse d'ATP (Figure 47). En outre, aucun des paramètres testés ne peut reproduire totalement la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques en stade sévère de cachexie cancéreuse (Figure 47).

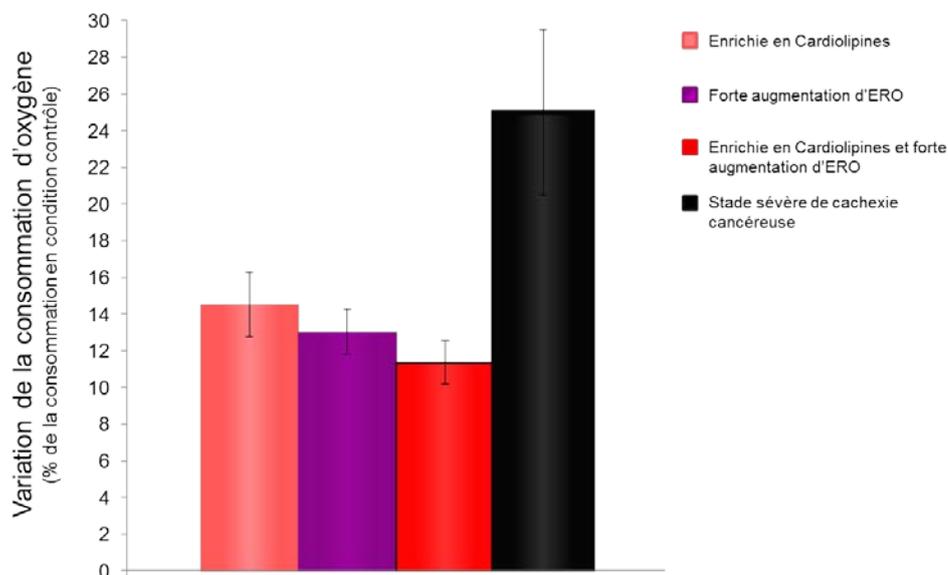


Figure 47 : **Effet d'un enrichissement en CL et/ou d'une augmentation de la production d'ERO et du développement d'une cachexie cancéreuse induite par carcinose péritonéale sur la bioénergétique mitochondriale hépatique.**

Mesure de la consommation d'oxygène nécessaire à la synthèse de 50 nmoles d'ATP par minute et par milligrammes de protéines des mitochondries hépatiques. L'enrichissement en CL montre une augmentation de 80 % du contenu en CL par rapport aux mitochondries contrôles. L'augmentation de la production d'ERO est 14 fois supérieure à celle des mitochondries contrôles (concentration de xanthine oxydase de 0,036U). L'étude de l'effet conjoint des deux précédents paramètres comporte un enrichissement de 75 % du contenu en CL et une augmentation de la production d'ERO de 12 fois supérieure par rapport aux mitochondries contrôles. Les mitochondries hépatiques des rats en stade sévère de cachexie cancéreuse présentent un contenu en CL augmenté de 55 % et une production d'ERO 12 fois supérieure aux mitochondries hépatiques des rats contrôles. ( $n \geq 4$  pour chaque groupe).

#### 4. Discussion

Des travaux antérieurs, conduits au laboratoire, ont montré une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques de rats en stade sévère de cachexie cancéreuse. Ce processus était associé à une augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante et concomitant à une augmentation de la production d'ERO et du contenu en CL des membranes mitochondriales (Dumas et al, 2011). Cette perte d'efficacité pourrait contribuer à l'hypermétabolisme et ainsi participer à la perte de poids observée lors de la cachexie cancéreuse. L'objectif de cette étude, conduite dans un but mécanistique, était de reproduire *in vitro*, sur mitochondries isolées de foie sain, les changements en CL et en ERO et d'examiner leurs effets fonctionnels sur l'efficacité de la synthèse d'ATP et le gaspillage énergétique.

A notre connaissance, notre étude est la première à montrer que l'enrichissement en CL des mitochondries hépatiques diminue l'efficacité de la synthèse d'ATP. L'augmentation de 80 % du contenu en CL provoque une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP associée à une faible mais significative augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante. Cet effet est dépendant de la nature du phospholipide. Il n'est pas retrouvé lors d'un enrichissement en PE et semble spécifique à l'enrichissement en CL. Cependant, l'augmentation du contenu en CL ne restitue pas entièrement la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP observée dans le foie de rat au stade sévère de cachexie cancéreuse (diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP de 15 % pour les mitochondries hépatiques enrichies en cardiolipines contre 25 % pour les mitochondries hépatiques des rats au stade de cachexie cancéreuse sévère).

Plusieurs éléments peuvent rendre compte de cette différence d'amplitude d'effet entre les expérimentations *in vivo* et *in vitro*. Les CL sont principalement présentes sur la membrane mitochondriale interne (approximativement 75 % contre 25% pour la membrane externe) (Gebert et al, 2009). La technique d'enrichissement en CL par fusion de liposomes utilisée dans cette étude a été précédemment décrite (Piccotti et al, 2002). Cependant, cette technique ne garantit pas l'enrichissement exclusif à la membrane interne. Il est probable qu'une partie des 80 % d'enrichissement soit localisée dans la membrane externe mitochondriale.

En outre, notre enrichissement est constitué exclusivement de CL constituées d'acide linoléique (C18 :2). L'acide linoléique est l'un des acides gras majoritaires des CL hépatiques

de rat (Schlame et al, 2000) et représente 38 % des acides gras totaux composant les CL hépatiques dans notre modèle de cachexie cancéreuse (Dumas et al, 2011). Il a été montré qu'un changement de composition en acides gras des CL est corrélé à un changement de l'efficacité de synthèse de l'ATP (Fontaine et al, 1996). Lors de la cachexie cancéreuse, nous avons précédemment démontré une variation de la composition des CL impliquant une augmentation des acides gras de la série n-3. Cette modification entraînait une diminution du ratio n-6/n-3. Nous avons établi que ce ratio n-6/n-3 était négativement corrélé à la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP (Dumas et al, 2011). Par conséquent, il semble que la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP induite par un enrichissement en CL soit aussi dépendante de la composition des CL intégrées. Dans notre étude, le recours à des CL constituées exclusivement d'acide linoléique conduit inmanquablement à une augmentation du ratio n-6/n-3 contrairement à ce qui était observé chez le rat cachectique. Ceci peut rendre compte des différences observées entre les résultats de la présente étude et ceux observés, au laboratoire, dans les mitochondries de rats au stade sévère de cachexie cancéreuse. Malgré ces différences, l'effet de l'enrichissement en CL sur la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP et l'augmentation du gaspillage énergétique mitochondrial en condition non phosphorylante est bien retrouvé.

Les travaux de Bobyleva et col. ont montré que des hépatocytes, mis en présence d'une solution de CL, présentaient une augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante (Bobyleva et al, 1997). Le mécanisme exact du découplage induit par les CL reste encore peu connu. L'augmentation de la surface membranaire induite par l'enrichissement pourrait jouer un rôle non spécifique (Porter et al, 1996). Cependant, nos travaux montrent que ce découplage n'est pas observé lors d'un enrichissement en PE. Il dépend donc plus de la spécificité de l'enrichissement en CL que d'une augmentation de la surface membranaire. Les CL peuvent jouer le rôle de transporteur de protons grâce aux charges portées par leur tête polaire (Haines & Dencher, 2002). L'augmentation du contenu en CL pourrait majorer la perméabilité membranaire aux protons, contribuant ainsi à l'augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante. Cette hypothèse est renforcée par les travaux de Piccotti qui montrent une diminution du pH de l'espace inter-membranaire secondaire à un enrichissement en CL (Piccotti et al, 2002). Le rôle des CL a aussi été démontré dans la stabilité des supercomplexes respiratoires (Pfeiffer et al, 2003). Un excès de CL dans les membranes mitochondriales pourrait, par hypothèse, entraîner une déstabilisation de ces supercomplexes et, en particulier, l'association du cytochrome c et de

l'ATP-synthase, connue pour permettre une meilleure séquestration du flux de protons (Liu et al, 2007b). Ceci participerait à une perte d'efficacité du couplage entre oxydation et phosphorylation.

Cependant, le gaspillage énergétique en condition non phosphorylante observé est de faible importance en comparaison à la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP. Ceci suggère que la diminution d'efficacité est liée à un gaspillage dépendant du fonctionnement de la phosphorylation. Il pourrait s'agir d'une altération du fonctionnement de l'ATP-synthase appelée « protons slipping » et correspondant à une diminution du couplage entre le passage de protons dans l'ATP-synthase et la quantité d'ATP phosphorylé (diminution de la stœchiométrie  $H^+/ATP$ ). L'ATP-synthase fonctionne sous forme d'homodimères, stabilisés à l'intérieur des supercomplexes respiratoires (Arnold et al, 1998; Krause et al, 2005). La déstabilisation des supercomplexes entraînerait une altération du fonctionnement de l'ATP-synthase qui pourrait participer au gaspillage énergétique en condition phosphorylante.

L'augmentation de la production d'ERO a été réalisée par un système enzymatique exogène (le système xanthine/xanthine oxydase). Cette augmentation (14 fois supérieure) était similaire à celle observée dans notre modèle au stade sévère de cachexie cancéreuse (12 fois supérieure). Une telle augmentation de la production d'ERO entraîne une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP. Cette diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP est associée à un gaspillage énergétique en condition non phosphorylante. Cependant, cette augmentation de la production d'ERO ne parvient à égaler la diminution d'efficacité de synthèse d'ATP observée *in vivo* au stade sévère de cachexie cancéreuse (Dumas et al, 2011). Le rôle des ERO sur le fonctionnement cellulaire est abondamment documenté (Droge, 2002; Valko et al, 2007). Toutefois, l'influence des ERO sur le fonctionnement mitochondrial et les mécanismes impliqués restent encore méconnus. Il a été montré qu'une exposition des mitochondries musculaires à une production d'ERO exogène diminue de 18% le ratio P/O (Tonkonogi et al, 2000). Cette diminution était associée à une augmentation de la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique (respiration à l'état IV). Tonkonogi et col. avaient suggéré que ce gaspillage énergétique pouvait s'expliquer par une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale aux protons (Tonkonogi et al, 2000). Dans notre étude, l'augmentation du gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP (augmentation de la consommation d'oxygène pour maintenir le potentiel de membrane maximal) est caractéristique d'un « slip redox ». Il s'agit d'une diminution du couplage entre le transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire et le pompage de protons par

ces mêmes complexes (diminution de la stœchiométrie  $H^+/e^-$ ). La mitochondrie doit ainsi transférer plus d'électrons pour pomper une même quantité de protons et maintenir son potentiel membranaire. Par conséquent, en condition phosphorylante, ce mécanisme induit une augmentation de la consommation d'oxygène pour permettre une même synthèse d'ATP (dépendante de l'énergie fournie par la force proton-motrice) conduisant à une diminution de l'efficacité de la synthèse. Dans notre modèle expérimental, le système xanthine/xanthine oxydase est ajouté extemporanément et les effets observés sont réversibles par ajout d'un antioxydant ciblant la mitochondrie (mitoTEMPO). La réversibilité observée suggère l'absence d'altération physique induit par le système xanthine/xanthine oxydase (pas de dommages oxydatifs des protéines ni des lipides mitochondriaux). Une peroxydation lipidique ne peut donc pas expliquer le gaspillage énergétique observé. La production d'ERO est aussi capable d'activer les protéines découplantes (UCP) dans les mitochondries rénales et musculaires (Echtay et al, 2002). Cependant, selon Larrouy et col., ces protéines découplantes seraient absentes des mitochondries hépatiques (Larrouy et al, 1997).

La diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP en présence d'une forte production d'ERO est due à un découplage du transfert des électrons et du pompage de protons (slip redox) dont les mécanismes restent à élucider. Ce gaspillage énergétique par « slip redox » n'était pas observé dans les mitochondries hépatiques isolées de rats cancéreux cachectiques. Ceci montre que l'augmentation de la production exogène d'ERO, seule, n'est pas à même de reproduire les mécanismes observés au stade sévère de cachexie cancéreuse et nécessite d'être associée à d'autres paramètres.

L'effet conjoint de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO a été déterminé sur des mitochondries hépatiques possédant un enrichissement en CL de 75% et une production d'ERO 12 fois supérieure aux mitochondries contrôles. Dans ces conditions, une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP associée à un fort gaspillage énergétique en condition non phosphorylante est obtenue. Ces conditions ne suffisent pas à reproduire la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP observée en stade sévère de cachexie cancéreuse mais comporte un gaspillage énergétique en condition non phosphorylante augmenté par rapport à un simple enrichissement en CL ou une simple augmentation de la production d'ERO. Il n'y a donc pas d'effet additif de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP.

Les CL sont connues pour être particulièrement sensibles à la peroxydation lipidique, due à leur contenu important en acides gras insaturés (Chicco & Sparagna, 2007). Il a été montré que le contenu en CL peroxydées était augmenté dans les mitochondries hépatiques de rats atteints d'hypothyroïdie (Cavallo et al, 2011). Les rats atteints d'hypothyroïdie présentent une augmentation de l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques (Nogueira et al, 2002). Une partie des CL pourrait être oxydée par l'augmentation de la production d'ERO. La peroxydation des CL pourrait entraîner une augmentation de l'efficacité de la synthèse d'ATP inhibant ainsi l'effet de l'enrichissement en CL. Cependant, le système xanthine/xanthine oxydase étant ajouté extemporanément dans nos mesures, il semble peu probable que les CL soient suffisamment peroxydées pour affecter l'action des paramètres étudiés. L'enrichissement en CL peut aussi entraîner une diminution des ERO en contribuant à l'activité peroxydase du cytochrome c (Macchioni et al, 2011). Cette activité peroxydase conduit à une peroxydation des CL et une libération du cytochrome c, activatrice des phénomènes apoptotiques (Kagan et al, 2009). L'effet de la peroxydation des CL ne peut donc être totalement exclu dans nos mesures. De nouvelles études seront nécessaires afin de déterminer les mécanismes impliquant une interaction entre la production d'ERO et le contenu en CL et définir l'effet de cette interaction sur l'efficacité de la synthèse d'ATP.

En résumé, ce travail a apporté des éléments nouveaux sur la régulation de la bioénergétique mitochondriale par les CL et les ERO.

L'enrichissement en CL et l'augmentation de la production d'ERO n'ayant pas reproduit la diminution d'efficacité de la synthèse d'ATP observée en stade sévère de cachexie cancéreuse, cela démontre que d'autres mécanismes sont impliqués. Par exemple, le rôle du TNF $\alpha$  pourrait être testé puisque sa concentration sérique était significativement augmentée dans notre modèle en stade de cachexie cancéreuse sévère, et qu'il a été démontré que le TNF $\alpha$  inhibait *in vitro* la phosphorylation oxydative (Busquets et al, 2003; Samavati et al, 2008).

## C. Cinétique d'apparition des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse.

L'ensemble des résultats acquis dans le laboratoire a été obtenu dans le modèle de cachexie cancéreuse à un stade de dénutrition sévère. Dans une perspective d'intervention nutritionnelle et/ou pharmacologique à visée préventive et/ou curative, il est important de connaître la cinétique d'installation des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques. C'est l'objectif de cette troisième partie du travail

A cet effet, nous avons réalisé une analyse séquentielle du développement de la cachexie cancéreuse dans notre modèle en établissant 3 stades d'évolution de la maladie (Figure 48). Le premier point de cinétique a été fixé au 10<sup>ème</sup> jour après l'induction du cancer. A ce stade, l'anorexie est encore absente (pas de groupe pair-fed). Le deuxième point de cinétique correspond aux premiers signes d'anorexie (*i.e.* la prise alimentaire est diminuée de 25 % sur 3 relevés consécutifs). Enfin, le dernier point de cinétique est marqué par une anorexie avancée (correspondant à une prise alimentaire diminuée de 50%).

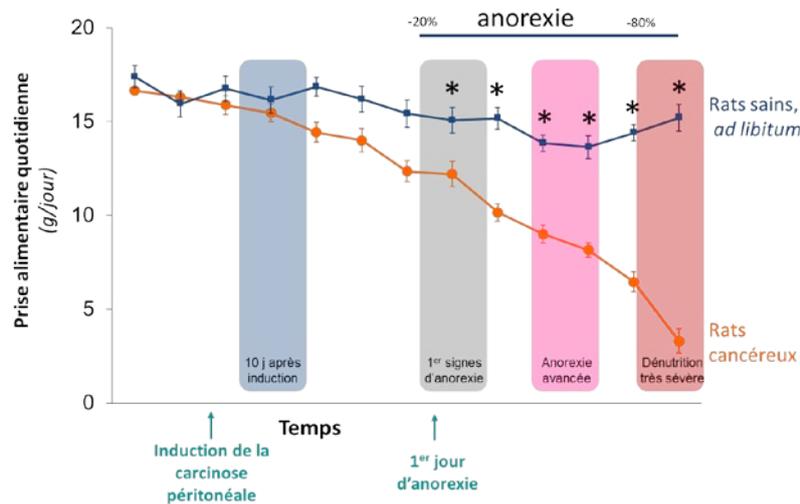


Figure 48 : Schématisation des points de cinétique

A chaque point de cinétique, la masse corporelle, du tissu adipeux, des muscles squelettiques et du foie et le métabolisme énergétique mitochondrial ont été déterminés.

## 1. Evolution de la fonte adipeuse et musculaire lors de la cachexie cancéreuse.

Afin de prendre en compte la variation de masse relative à l'âge des rats, nous exprimons la masse des rats et des tissus en pourcentage par rapport à la moyenne des rats sains *ad libitum*.

Le poids des rats cancéreux est inférieur de 8% à ceux des rats sains, nourris *ad libitum* au 10<sup>ème</sup> jour post-induction (Figure 49). Cet effet est relatif à un défaut d'appariement qui a été corrigé pour les autres points de cinétique. Nous pouvons observer une baisse de masse corporelle des rats cancéreux de 4 % aux premiers signes d'anorexie (Figure 49). Sans être significative, cette perte de poids est confirmée au stade d'anorexie avancée avec une diminution de 10 % de la masse corporelle des rats cancéreux par rapport aux rats sains, nourris *ad libitum* (Figure 49).

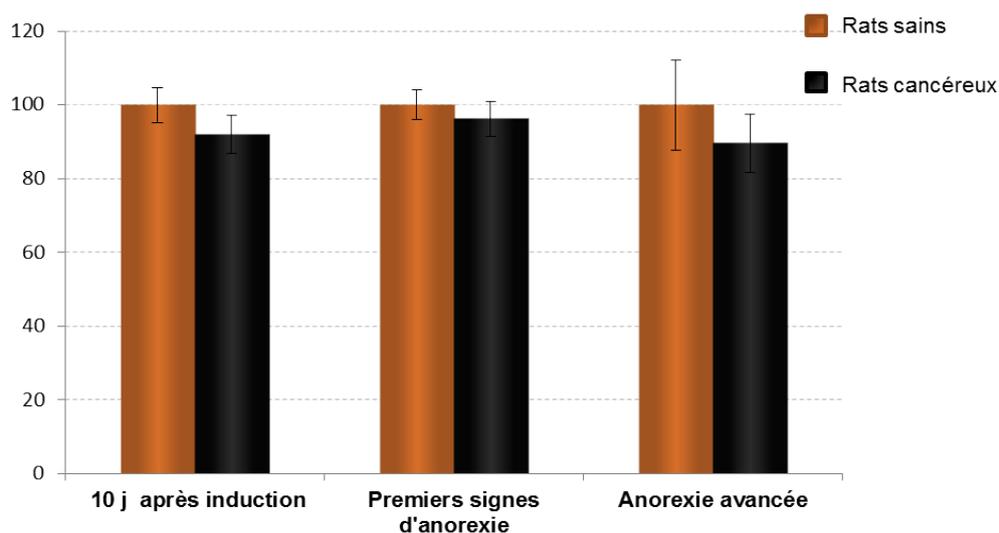


Figure 49 : **Evolution du poids des rats lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

Le poids des rats est exprimé en pourcentage par rapport à la moyenne des poids des rats sains du même point de cinétique. Test statistique Mann-Whitney avec \* :  $p < 0,05$  *versus* rats sains. Dix jours après induction du cancer : sains :  $n = 5$ , cancéreux :  $n = 10$ ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupe ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux.

La masse du tissu adipeux des rats cancéreux est significativement diminuée dès les premiers signes d'anorexie (- 44 % par rapport aux rats sains, nourris *ad libitum*) (Figure 50). Nous n'observons pas de perte supplémentaire en stade d'anorexie avancée. Cependant, bien que d'intensité supérieure, cette perte de tissu adipeux n'est pas significativement différente de la fonte adipeuse observée chez les rats pair-fed aux premiers signes d'anorexie et devient même similaire à celle observé chez les rats pair-fed au stade d'anorexie avancée (44 % pour les rats

développant une cachexie cancéreuse contre 36 % pour les rats pair-fed) (Figure 50). Les masses brutes sont données dans le tableau VI.

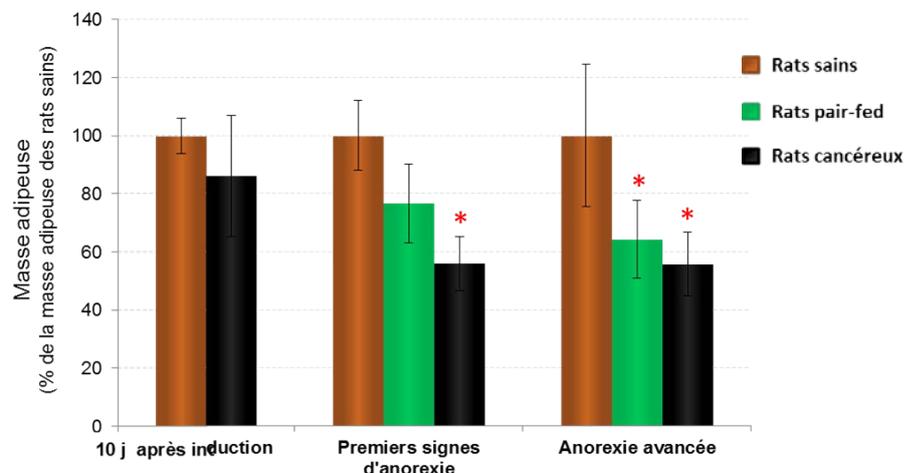


Figure 50 : **Evolution de la masse adipeuse lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

La masse des tissus est exprimée en pourcentage par rapport à la moyenne des masses des tissus des rats sains du même point de cinétique. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétique avec \* :  $p < 0,05$  versus rats sains (Point de cinétique 10 j après induction du cancer :  $n = 5$  pour les rats sains et  $n = 10$  pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupe ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux et pour le groupe pair-fed).

Tableau VI : **Masses brutes du tissu adipeux des rats sains, pair-fed et cancéreux aux différents points de cinétique.**

Les masses brutes sont exprimées en milligrammes. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétiques avec \* :  $p < 0,05$  versus rats sains (Point de cinétique 10 j après induction du cancer :  $n = 5$  pour les rats sains et  $n = 10$  pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupes ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux et pour le groupe pair-fed).

	10j après induction		Premiers signes d'anorexie			Anorexie avancée		
	Sains	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux
<b>Masse Brute</b>								
Tissu Adipeux	8680 ± 528	7471 ± 1814	9980 ± 1197	7642 ± 1360	5584 ± 922	12917 ± 3174	8290 ± 1730	7189 ± 1420
% versus Sains		-14		-23	-44 *		-36 *	-44 *
% versus Pair-fed					-27			-13

La masse musculaire des rats cancéreux est inférieure de 8 % par rapport aux rats sains au 10ème jour après l'induction du cancer (Figure 51). Cependant, cette perte musculaire n'est pas retrouvée aux premiers signes d'anorexie. En stade d'anorexie avancée, la masse musculaire des rats cancéreux est significativement diminuée de 11 % par rapport aux rats

sains. A ce stade, les rats cancéreux ont aussi, une perte musculaire significative par rapport aux rats pair-fed (9 %) (Figure 51). Les masses brutes sont données tableau VII.

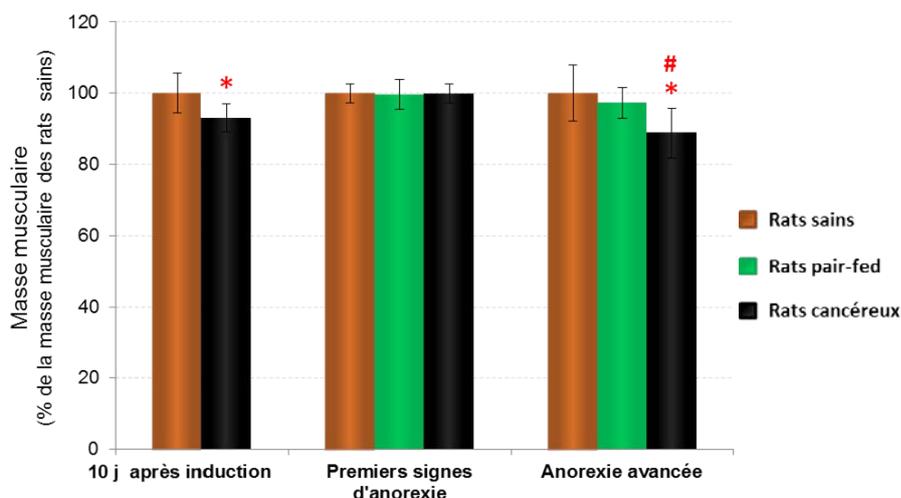


Figure 51: Evolution de la masse musculaire lors du développement de la cachexie cancéreuse.

La masse des tissus est exprimée en pourcentage par rapport à la moyenne des masses des tissus des rats sains du même point de cinétique. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétiques avec \* :  $p < 0,05$  versus rats sains et avec # =  $p < 0,05$  versus rats pair-fed. (Point de cinétique 10 j après induction du cancer :  $n = 5$  pour les rats sains et  $n = 10$  pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupe ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux et pour le groupe pair-fed).

Tableau VII: Masses brutes du tissu musculaire des rats sains, pair-fed et cancéreux aux différents points de cinétique.

Les masses brutes sont exprimées en milligrammes. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétiques avec \* :  $p < 0,05$  versus rats sains (Point de cinétique 10 j après induction du cancer :  $n = 5$  pour les rats sains et  $n = 10$  pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupes ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux et pour le groupe pair-fed).

	10j après induction		Premiers signes d'anorexie			Anorexie avancée		
	Sains	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux
<b>Masse Brute</b>								
Muscle	11391 ± 641	10598 ± 455	10890 ± 293	10782 ± 453	10813 ± 287	11670 ± 871	10864 ± 491	9923 ± 779
% versus Sains		7*		0	0		-3	-11*
% versus Pair-fed					0			-9#

La fonte musculaire observée chez les rats cancéreux, en stade d'anorexie avancée, coïncide avec l'augmentation de l'expression des protéines atrogine 1 et MURF1 impliquées dans la voie protéolytique ubiquitine-protéasome-ATP dépendante (Figure 52). A ce stade, l'expression d'*atrogine 1* est, en effet, 4 fois supérieure chez les rats cancéreux par rapport

aux rats sains et 3 fois supérieure à celle des rats pair-fed ( $p < 0,05$ ) (Figure 52A). Malgré une hausse de 74 %, l'expression de *MURF 1* n'est pas significativement augmentée chez les rats cancéreux par rapport aux rats pair-fed. Cependant, le gène *MURF 1* est significativement surexprimé chez les rats cancéreux par rapport aux rats sains (+97 %,  $p < 0,05$ ) (Figure 52B).

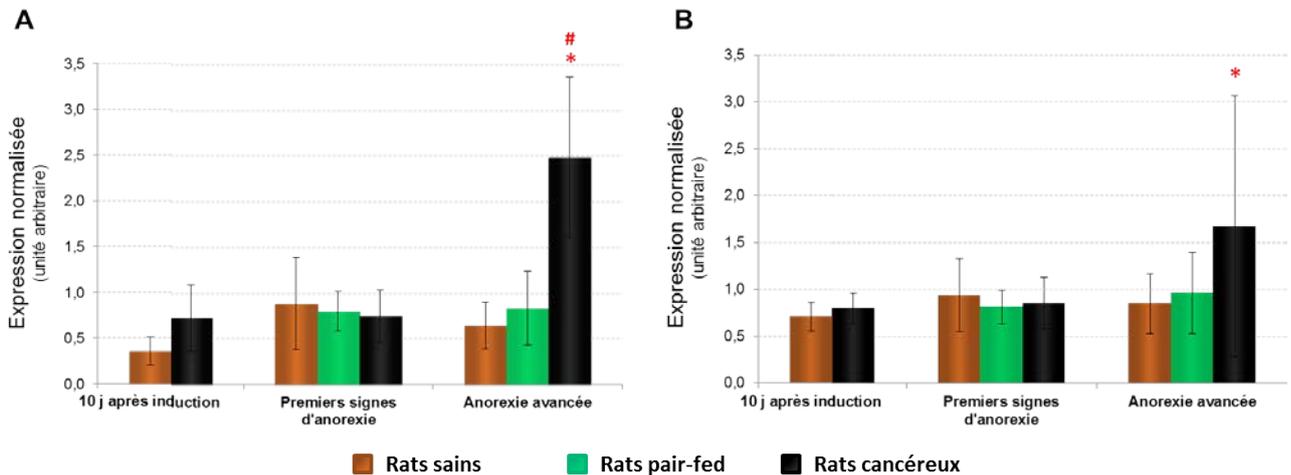
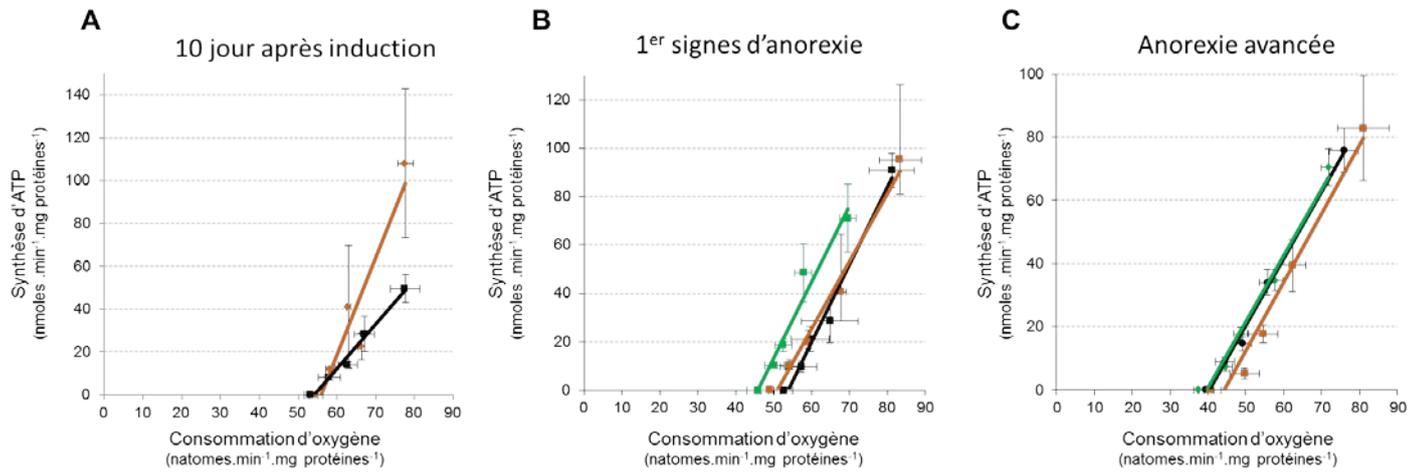


Figure 52 : **Evolution de l'expression génique d'atrogine 1 et de MURF 1 dans le muscle squelettique lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

Les expressions sont normalisées par la quantité d'ARNm de la cyclophiline A et exprimées en unités arbitraires. A) Expression génique d'*atrogine 1*. B) Expression génique de *MURF1*. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétique avec \* :  $p < 0,05$  versus rats sains et avec # =  $p < 0,05$  versus rats pair-fed. (Point de cinétique 10 j après induction du cancer :  $n = 5$  pour les rats sains et  $n = 10$  pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupes ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux et pour le groupe des rats pair-fed).

## 2. Evolution de la bioénergétique mitochondriale hépatique lors de la cachexie cancéreuse

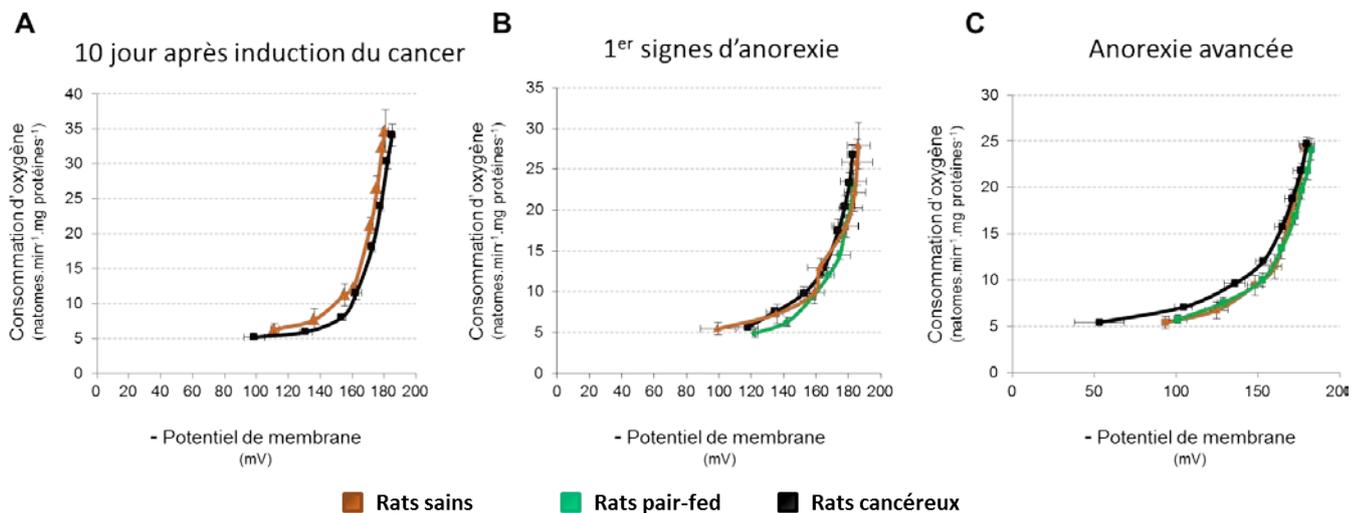
Dix jours après induction du cancer, nous n'observons pas de diminution significative de l'efficacité de la synthèse d'ATP dans les mitochondries hépatiques des rats cancéreux (Figure 53A). Il faut, toutefois, noter une grande variabilité des résultats dans le groupe de rats contrôles. Lors des premiers signes d'anorexie, les résultats ne montrent pas de variation significative de l'efficacité de la synthèse d'ATP. De même, en stade d'anorexie avancée, les droites ATP/O des rats cancéreux, des rats sains et des rats pair-fed ne sont pas significativement décalées (Figure 53C).



**Figure 53 : Evolution de l'efficacité de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

Relation entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP. A) Dix jours après induction du cancer ( $n = 3$  pour le groupe de rats sains et  $n = 10$  pour le groupe de rats cancéreux). B) Aux premiers signes d'anorexie ( $n = 2$  pour le groupe de rats sains,  $n = 5$  pour les groupes des rats pair-fed et des rats cancéreux). C) En stade d'anorexie avancée ( $n = 4$  pour le groupe des rats sains,  $n = 9$  pour les deux autres groupes). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

Ces résultats sont renforcés par l'absence de gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP chez les rats cancéreux. En effet, les courbes représentant la relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante sont similaires entre les mitochondries hépatiques des rats cancéreux, des rats sains et des rats pair-fed à tous les points de cinétique (Figure 54).



**Figure 54 : Evolution du gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

Relation entre la consommation d'oxygène et le potentiel de membrane en condition non phosphorylante. A) Dix jours après induction du cancer ( $n = 3$  pour le groupe de rats contrôles et  $n = 10$  pour le groupe de rats cancéreux). B) Aux premiers signes d'anorexie ( $n = 2$  pour le groupe de rats sains,  $n = 5$  pour les deux autres groupes). C) En stade d'anorexie avancée ( $n = 4$  pour le groupe des rats sains,  $n = 9$  pour les deux autres groupes). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

En cohérence avec les résultats de l'efficacité de la synthèse d'ATP et du gaspillage énergétique, nous n'observons pas de variation de la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique entre nos différents groupes (Figure 55). Quel que soit le point de cinétique étudié, les consommations d'oxygène en condition phosphorylante (état III) et en condition d'activité maximale de la chaîne respiratoire (état découplé) ne sont pas significativement différentes entre les divers groupes de rats (Figure 55).

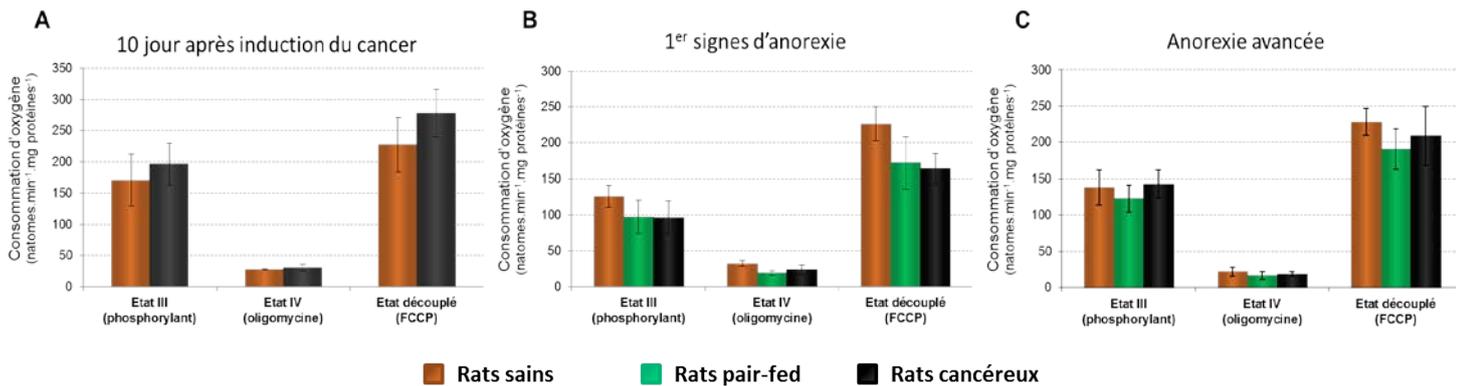


Figure 55 : **Consommation d'oxygène en fonction des différents états respiratoires des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

A) Dix jours après induction du cancer (n = 3 pour le groupe de rats contrôles et n = 10 pour le groupe de rats cancéreux). B) Aux premiers signes d'anorexie (n = 2 pour le groupe de rats sains, n = 5 pour les deux autres groupes). C) En stade d'anorexie avancée (n = 4 pour les rats sains, n = 8 pour le groupe des rats pair-fed et n = 9 pour le groupe des rats cancéreux). Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétique.

En parallèle de l'analyse de la bioénergétique hépatique, nous avons effectué un suivi de la masse du foie. L'évolution de la masse hépatique est exprimée en pourcentage par rapport à la moyenne des masses hépatiques des rats sains (Figure 56). Nous pouvons constater que la restriction calorique induit une diminution de la masse hépatique dès les premiers signes d'anorexie (-28 % de masse hépatique par rapport aux rats sains,  $p < 0,01$ ) qui reste stable en stade d'anorexie avancée (Figure 56). Bien que subissant la même restriction calorique, les rats cancéreux ont une masse hépatique stable par rapport aux rats sains, aux premiers signes d'anorexie, représentant une augmentation de la masse hépatique de 45% par rapport aux rats pair-fed. Malgré une alimentation identique, la masse hépatique des rats cancéreux reste supérieure de 57 % à celle des rats pair-fed ( $p < 0,001$ ) en stade d'anorexie avancée (Figure 56). Les valeurs brutes sont données dans le tableau VIII.

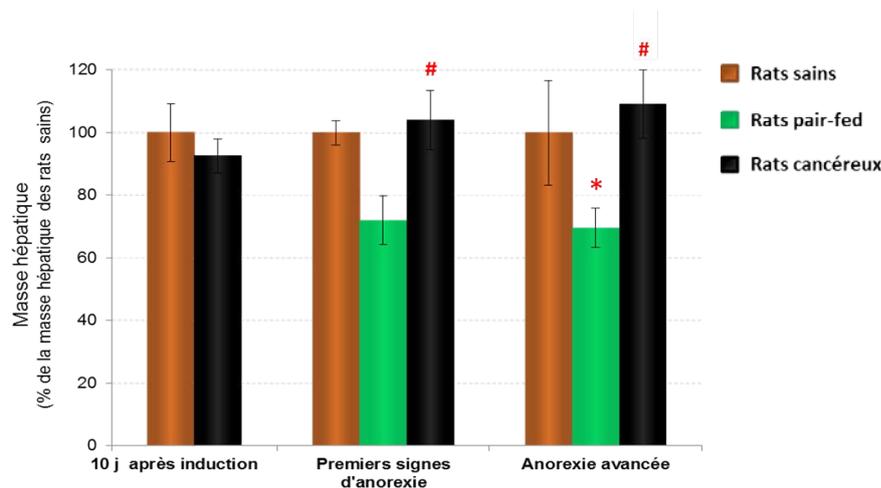


Figure 56 : **Evolution de la masse hépatique lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

La masse des tissus est exprimée en pourcentage par rapport à la moyenne des masses des tissus des rats sains du même point de cinétique. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétiques avec \* :  $p < 0,05$  versus rats sains et avec # =  $p < 0,05$  versus rats pair-fed. (Point de cinétique 10 j après induction du cancer :  $n = 5$  pour les rats sains et  $n = 10$  pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupe ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux et pour le groupe pair-fed).

Tableau VIII : **Masses brutes du foie des rats sains, pair-fed et cancéreux aux différents points de cinétique.**

Les masses brutes sont exprimées en milligrammes. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétiques avec \* :  $p < 0,05$  versus rats sains (Point de cinétique 10 j après induction du cancer :  $n = 5$  pour les rats sains et  $n = 10$  pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie :  $n = 5$  pour chaque groupes ; Anorexie avancée :  $n = 6$  pour les rats sains,  $n = 12$  pour le groupe des rats cancéreux et pour le groupe pair-fed).

	10j après induction		Premiers signes d'anorexie			Anorexie avancée		
	Sains	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux
<b>Masse Brute</b>								
Foie	12358 ± 1173	11723 ± 682	11160 ± 439	8044 ± 867	11620 ± 1047	11249 ± 1878	7829 ± 705	12284 ± 1221
% versus Sains		7		- 28	4		-30 *	9
% versus Pair-fed					45 #			57 #

### 3. Evolution de facteurs influençant la bioénergétique mitochondriale lors du développement de la cachexie cancéreuse.

Le premier facteur étudié est la production d'ERO des mitochondries hépatiques (Tableau IX). La production d'ERO reste inchangée entre nos différents groupes au 10ème jour après

induction du cancer et aux premiers signes d'anorexie. Nous observons une production d'ERO en condition phosphorylante significativement inférieure de 14% dans les mitochondries hépatiques des rats pair-fed par rapport aux rats cancéreux au stade d'anorexie avancée (Tableaux IX). Cependant, à ce même stade, la production d'ERO est similaire entre les mitochondries hépatiques des rats sains et des rats cancéreux (Tableaux IX).

**Tableau IX : Evolution de la production d'ERO des mitochondries hépatiques lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

Production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> représentée en variation de fluorescence par minute et par milligramme de protéines. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétique. (Point de cinétique 10 j après induction du cancer : n = 3 pour les rats sains et n = 10 pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie : n = 2 pour le groupe des rats sains, n = 5 pour les deux autres groupes ; Anorexie avancée : n = 4 pour les rats sains, n = 9 pour le groupe des rats pair-fed et le groupe des rats cancéreux).

	10j après induction		Premiers signes d'anorexie			Anorexie avancée		
	Sains	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux
<b>Production d'ERO</b>								
<b>Complexe I et III</b>	84 ± 3	82 ± 17	115 ± 1	85 ± 17	89 ± 21	90 ± 12	76 ± 15	78 ± 13
statistiques	p = 1		p = 0,09			p = 0,29		
<b>Complexe III</b>	38 ± 4	37 ± 9	66 ± 14	50 ± 12	55 ± 9	44 ± 5	39 ± 5	44 ± 3
statistiques	p = 0,61		p = 0,44			p = 0,09		
<b>Condition phosphorylante</b>	37 ± 5	38 ± 5	56 ± 1	48 ± 9	53 ± 4	41 ± 1	<b>37 ± 4</b>	<b>42 ± 3</b>
statistiques	p = 0,60		p = 0,22			p = 0,01		

Le deuxième facteur étudié est la quantité de CL dans les membranes mitochondriales hépatiques. Nous n'observons pas de modification du contenu en CL entre nos différents groupes au 10<sup>ème</sup> jour après induction du cancer et aux premiers signes d'anorexie (Tableau X). Au stade d'anorexie avancée, les mitochondries des rats pair-fed ont un contenu en CL significativement diminué par rapport aux rats sains (p < 0,05) (Tableau X). Malgré une prise alimentaire identique, cette diminution n'est pas observée dans les mitochondries hépatiques des rats cancéreux (Tableau X).

**Tableau X : Evolution du contenu en CL des mitochondries hépatiques isolées lors du développement de la cachexie cancéreuse.**

Le contenu en CL est mesuré en u.a. par milligramme de protéines. Test statistique Mann-Whitney pour le point de cinétique 10 j après induction du cancer et Kruskal-Wallis pour les autres points de cinétique. (Point de cinétique 10 j après induction du cancer : n = 3 pour les rats sains et n = 10 pour les rats cancéreux ; Premiers signes d'anorexie : n = 2 pour le groupe des rats sains, n = 5 pour les deux autres groupes ; Anorexie avancée : n = 4 pour les rats sains, n = 9 pour les groupes des rats pair-fed et des rats cancéreux).

	10j après induction		Premiers signes d'anorexie			Anorexie avancée		
	Sains	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux	Sains	Pair-fed	Cancéreux
<b>Contenu en CL</b>	165 ± 19	192 ± 16	165 ± 26	178 ± 31	201 ± 32	<b>192 ± 24</b>	<b>157 ± 20</b>	168 ± 18
statistiques	p = 0,08		p = 0,27			p = 0,03 Sains versus Pair-fed : p < 0,05		

#### 4. Discussion :

Les précédents travaux de notre équipe avaient mis en évidence une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP associée à une augmentation du gaspillage d'énergie au sein des mitochondries hépatiques en stade sévère de cachexie cancéreuse (Dumas et al, 2011). Ces altérations du métabolisme mitochondrial hépatique pourraient jouer un rôle dans l'hypermétabolisme observé lors de la cachexie cancéreuse. L'objectif de ce travail était donc de déterminer la place des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques dans la cinétique d'apparition des symptômes liés à la cachexie cancéreuse.

Les récents travaux d'un panel d'expert ont permis de définir trois stades du développement de la cachexie cancéreuse chez l'humain (Fearon et al, 2011, schéma en introduction p24) : le stade de pré-cachexie induisant une perte de poids inférieure à 5 % et/ou le développement d'une anorexie, un stade de cachexie propre s'exprimant par une perte de poids supérieure à 5 % associée à une inflammation systémique et à une fonte musculaire et un stade de cachexie réfractaire où les bouleversements métaboliques et la perte des capacités musculaires entraînent une moindre tolérance aux traitements et donc une diminution des chances de survie.

Notre premier point de cinétique a été réalisé 10 jours après induction du cancer. Ce stade correspond à l'individualisation des premiers nodules tumoraux dans la cavité péritonéale des

rats ayant subis l'injection. A ce stade, nos résultats montrent, chez les rats cancéreux, une préservation du tissu adipeux et une diminution de la masse musculaire qui n'est pas associée à l'activation des gènes impliqués dans la protéolyse ubiquitine-ATP dépendante. Cette différence de masse musculaire est probablement due à un défaut d'appariement des groupes de rats. En effet, le suivi effectué sur le poids des rats montre que le poids des rats cancéreux est de 8 % inférieur à celui des rats sains (cf Figure 49).

Notre deuxième point de cinétique est défini par les premiers signes d'anorexie. Ceci correspond à une période de  $24 \pm 3$  jours après induction du cancer. Cette période coïncide avec l'expansion du cancer dans notre modèle (Benoit et al, 2000). L'expansion du cancer s'accompagne donc du développement de l'anorexie. Lors des premiers signes d'anorexie, la masse adipeuse des rats cancéreux est significativement diminuée par rapport aux rats sains nourris *ad libitum* (-44 %) mais pas par rapport aux rats sains pair-fed. La diminution de la masse adipeuse est donc directement liée aux apports caloriques. Nous n'observons pas de diminution de la masse musculaire à ce stade du développement de la cachexie. Ce point de cinétique est également associé à une perte de poids de 4% des rats cancéreux par rapport aux rats sains.

Notre dernier point de cinétique est défini par une anorexie avancée (diminution de 50 % de la prise alimentaire). L'ensemble des rats cancéreux montre une anorexie avancée dans une période de  $31 \pm 5$  jours après induction du cancer. A ce stade, nous n'observons pas d'atteintes supplémentaires du tissu adipeux chez les rats cancéreux par rapport aux premiers signes d'anorexie. Cette fonte adipeuse reste donc associée au développement de l'anorexie (étant similaire à celle des rats pair-fed). Cependant, ce stade est marqué par une atteinte musculaire des rats cancéreux avec une diminution significative de 11 % de la masse musculaire par rapport aux rats sains. Cette fonte musculaire n'est pas liée à l'anorexie seule puisque la masse musculaire des rats pair-fed est supérieure de 10 % par rapport à celle des rats cancéreux. Cette fonte musculaire est donc la conséquence d'altérations métaboliques associées au développement de la cachexie cancéreuse. Cette diminution de la masse musculaire est concomitante avec la surexpression des gènes liés à la protéolyse ubiquitine-protéasome-ATP dépendante renforçant l'implication de ce système protéolytique dans la fonte musculaire observée lors de la cachexie cancéreuse. A ce stade, les rats cancéreux ont aussi une perte de poids de 11% par rapport aux rats sains.

La description des signes cliniques dans notre modèle semble finalement assez proche de ce qui a été décrit récemment (Fearon et al, 2011). En stade de premiers signes d'anorexie, les rats cancéreux sont donc légèrement anorexiques et ont une perte de poids totale de 4 %. Ce point de cinétique peut donc correspondre à un stade de pré-cachexie. En stade d'anorexie avancée, nous observons, dans notre modèle, une perte musculaire et une perte de masse globale de 11 %. Ce point peut donc correspondre au stade de cachexie propre. Enfin les données précédemment rapportées dans le laboratoire au point « stade sévère de cachexie cancéreuse » (Dumas et al, 2010), ont montré chez les rats cancéreux, une forte perte adipeuse et musculaire (respectivement, -65 % et -23 % par rapport à des rats sains) reflétant un stade catabolique important, une perte de poids (-18 %) et une anorexie très sévère (-80 %). Ce stade peut donc correspondre au stade de cachexie réfractaire. (Tableau récapitulatif XI).

**Tableau XI : Récapitulatif de l'apparition des symptômes de la cachexie cancéreuse, évoqués par le collège d'expert, dans notre modèle.**

+ :présence du symptôme et - : absence. Le stade pro-catabolique correspond un état où les perturbations métaboliques sont telles qu'elles mènent le rat au décès en moins de 3jours.

	Anorexie	Perte de poids > 5%	Fonte musculaire	Stade pro-catabolique
10 j après induction	-	+/-	+/-	-
Premiers signes d'anorexie	+/-	-	-	-
Anorexie avancée	+	+	+	-
Stade très sévère	+	+	+	+

Ce travail est le premier à notre connaissance à étudier la place du métabolisme énergétique mitochondrial dans l'évolution de la cachexie cancéreuse. Quel que soit le point de cinétique étudié dans ce présent travail, les résultats ne montrent pas d'altération du fonctionnement mitochondrial hépatique chez les rats cancéreux. Par conséquent, l'apparition d'une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP au sein des mitochondries hépatiques serait un phénomène tardif dans l'évolution de la cachexie cancéreuse et ne serait présente qu'entre un état de cachexie propre et un état de cachexie réfractaire. Il semble donc que le gaspillage énergétique mitochondrial hépatique présent chez des rats cancéreux très dénutris ne soit pas à l'origine des premiers désordres métaboliques observés (fonte musculaire, perte de poids) au cours de l'évolution de la cachexie cancéreuse. Au contraire, nos résultats suggèrent plutôt que l'altération du métabolisme énergétique mitochondrial hépatique participe à l'aggravation

de la cachexie cancéreuse et notamment au passage à un état de « non-retour » ou cachexie réfractaire. Ajoutée aux autres désordres métaboliques cette altération de la synthèse d'ATP mitochondrial hépatique pourrait, ainsi, participer à dégrader l'état nutritionnel de l'hôte. Nos résultats ne permettent pas d'étudier directement la relation de causalité entre l'altération du métabolisme énergétique mitochondrial et l'hypermétabolisme corps entier observé dans la cachexie cancéreuse. Il apparaît ainsi nécessaire de compléter ces travaux par une analyse des dépenses énergétiques corps entier au cours de l'évolution de la cachexie afin de déterminer quand apparaît l'hypermétabolisme dans notre modèle. Dans la cinétique, le stade sévère de cachexie se situe 7 jours après le stade d'anorexie avancée. L'établissement d'un point de cinétique intermédiaire entre ces deux stades semble donc délicat et renforce la nécessité d'une nouvelle approche expérimentale telle que l'utilisation de cages métaboliques permettant le suivi de la dépense énergétique. D'un autre côté, il n'est pas exclu que les dysfonctionnements mitochondriaux ne soient pas la cause mais la conséquence de certains désordres métaboliques associées à la cachexie.

Nos résultats montrent que la masse hépatique des rats cancéreux est identique à celle des rats sains, nourris *ad libitum* et supérieure à celle des rats sains pair-fed. Le foie est un des déterminants majeurs de la dépense énergétique de repos (Illner et al, 2000). De plus il a été observé que la masse hépatique était corrélée de manière positive avec la dépense énergétique de repos dans des cas de cancer colorectal avancé (Liefers et al, 2009). Il est donc envisageable que dans notre modèle le foie participe à l'hypermétabolisme en partie par un effet de masse.

En outre, il serait nécessaire d'explorer la cinétique de la bioénergétique mitochondriale musculaire au cours de nos différents points de cinétique. Lors de nos précédents travaux, nous avons, en effet, observé une altération des capacités oxydatives au stade de cachexie réfractaire (étude I). Les travaux de Huang et col. ont montré qu'une diminution de la concentration cellulaire d'ATP pouvait induire l'activation du protéasome (Huang et al, 2010). Il pourrait donc exister un lien entre la diminution des capacités oxydatives et la surexpression du système ubiquitine-protéasome-ATP dépendant observée au stade d'anorexie avancée. L'étude de la bioénergétique mitochondriale musculaire à ce point de cinétique nous permettrait d'appuyer cette hypothèse.

En résumé ce travail montre que l'altération du métabolisme énergétique mitochondrial hépatique ne fait pas partie des premiers désordres métaboliques associés à la cachexie

cancéreuse et apparait assez tardivement dans l'évolution de la maladie. Nous pouvons faire l'hypothèse que l'anomalie de la synthèse d'ATP au sein des mitochondries hépatiques participerait ainsi plutôt au passage d'un état de cachexie propre à un état de cachexie réfractaire signe du décès certain du patient porteur du cancer. Bien que la relation avec l'hypermétabolisme n'ait pas pu être établie, le métabolisme énergétique mitochondrial hépatique reste une cible dans la lutte contre la cachexie cancéreuse.

# III- Conclusions générales & Perspectives

## A. Altérations du métabolisme mitochondrial musculaire lors de la cachexie cancéreuse

Les travaux d'Hochwald et col. ont été parmi les premiers à suggérer une altération du métabolisme mitochondrial musculaire en mettant en évidence une diminution de la concentration en ATP dans le *gastrocnemius* de rats atteints de sarcome MCA (Hochwald et al, 1996). Les récents travaux de Constantinou et col. ont confirmé cette hypothèse en démontrant, *in vivo*, par résonance magnétique nucléaire (RMN) au  $^{31}\text{P}$ , une diminution de la vitesse de synthèse de l'ATP sur le membre inférieur de souris atteintes de carcinome pulmonaire de Lewis par rapport à des souris saines (Constantinou et al, 2011). Ces travaux semblaient indiquer une diminution de la capacité de synthèse d'ATP lors de la cachexie cancéreuse. Cependant, aucune étude n'a déterminé si cette diminution de la synthèse de l'ATP était associée à une baisse d'efficacité de la phosphorylation oxydative des mitochondries musculaires.

**Le premier objectif de cette thèse était de déterminer si la bioénergétique mitochondriale musculaire pouvait être altérée au stade de cachexie cancéreuse sévère et si ces altérations pouvaient induire une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP.**

Nos résultats ont pu démontrer que les mitochondries musculaires présentaient une altération de la bioénergétique mitochondriale lors de la cachexie cancéreuse. Ce dysfonctionnement n'était cependant pas associé à une altération de l'efficacité de la synthèse d'ATP mais à une diminution des capacités oxydatives qui pouvait s'expliquer, au moins en partie, par une diminution de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire

Les travaux de Romestaing et de ses collaborateurs ont mis en évidence que l'inhibition de ce complexe par du cyanure de sodium augmentait le rapport ATP/O impliquant un meilleur couplage de la phosphorylation oxydative (Romestaing et al, 2008). Ce complexe a notamment été identifié comme le site privilégié de la variation de stœchiométrie  $\text{H}^+/\text{e}^-$  pouvant induire un gaspillage énergétique (Murphy & Brand, 1988). La diminution de l'activité du complexe IV pourrait donc représenter un mécanisme adaptatif permettant le maintien de l'efficacité de la synthèse d'ATP au sein des cellules musculaires. Ces données

suggèrent que, dans notre modèle expérimental, la diminution de l'activité du complexe IV devrait être associée à une augmentation de l'efficacité de la synthèse d'ATP. Nous n'observons cependant aucune modification de cette efficacité. Nous pourrions émettre l'hypothèse que le gain d'efficacité induit par la diminution de l'activité du complexe IV pourrait être compensé par l'existence d'un gaspillage énergétique. Ainsi, ce gaspillage énergétique ne permettrait pas d'observer l'effet de la diminution de l'activité du complexe IV sur l'efficacité de la synthèse d'ATP. En contrepartie, le gain d'efficacité de la synthèse d'ATP induit par la diminution de l'activité du complexe IV ne permettrait pas d'observer l'existence de ce découplage. L'étude cinétique de l'apparition du gaspillage énergétique et de la diminution de l'activité du complexe IV, lors du développement de la cachexie cancéreuse, nous permettrait de déterminer si l'existence d'une augmentation de la perméabilité membranaire n'est pas masquée par la diminution de l'activité du complexe IV.

Cependant, la diminution des capacités oxydatives mitochondriales musculaires pourrait aussi induire une diminution de la concentration d'ATP cellulaire. Les travaux de Huang et de ses collaborateurs ont démontré *in vitro* qu'une diminution de 20% de la concentration cellulaire de l'ATP était capable d'induire l'activation du protéasome (Huang et al, 2010). Les dysfonctionnements mitochondriaux pourraient donc avoir une action directe sur la dégradation protéique observée lors de la cachexie cancéreuse. Cette hypothèse pourrait être renforcée en étudiant, sur cellules musculaires, l'effet de la diminution des capacités oxydatives mitochondriales sur la protéolyse. Nous pourrions notamment observer l'effet d'un ajout de doses croissantes d'oligomycine sur l'expression génique des protéines atrogène 1 et MURF 1 ou sur l'activité du protéasome.

## B. Effets de l'enrichissement en CL et/ou de l'augmentation de la production d'ERO sur la bioénergétique mitochondriale hépatique

Les résultats antérieurs, obtenus au laboratoire, avaient déterminé que l'efficacité de la synthèse d'ATP était significativement diminuée dans les mitochondries hépatiques au stade de cachexie cancéreuse sévère induite par une carcinose péritonéale (Dumas et al, 2011). Cette perte d'efficacité pouvait, en partie, s'expliquer par une augmentation du gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP (fuite de protons et/ou slip redox) (Dumas et al, 2011). Ce processus était concomitant à une augmentation de la production d'ERO et à une augmentation du contenu en CL des membranes mitochondriales (Dumas et al, 2011).

**Le deuxième objectif de cette thèse était donc de déterminer, *in vitro*, si l'augmentation du contenu en CL et/ou de la production d'ERO pouvait reproduire les effets fonctionnels sur l'efficacité de la synthèse d'ATP et le gaspillage énergétique observés dans les mitochondries hépatiques de rats au stade de cachexie cancéreuse sévère.**

L'augmentation du contenu en CL (80 %) et l'augmentation de la production d'ERO (14 fois supérieure) provoquent une diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP associée à une augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante. L'effet conjoint de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO ne provoque pas d'effet additif sur la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP mais induit cependant une augmentation du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante par rapport à un simple enrichissement en CL ou à une simple augmentation de la production d'ERO. Cependant, aucune des conditions testées ne parvient à reproduire la diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP observée en stade sévère de cachexie cancéreuse.

Ce travail a apporté des éléments nouveaux sur la régulation de la bioénergétique mitochondriale par les CL et les ERO. A notre connaissance, notre étude est la première à démontrer que l'enrichissement en CL des mitochondries hépatiques diminue l'efficacité de la synthèse d'ATP. Ces résultats semblent aussi indiquer que le gaspillage énergétique induit par

chacun des paramètres ne soit pas de même nature. La diminution de l'efficacité de la synthèse d'ATP en présence d'un enrichissement des membranes mitochondriale en CL serait associée à une augmentation de la perméabilité membranaire alors que la forte production d'ERO pourrait induire un découplage du transfert des électrons et du pompage de protons (slip redox). Le complexe IV est connu comme un acteur majeur du découplage de la phosphorylation oxydative par variation de stœchiométrie  $H^+/e^-$  (slip redox) (Murphy & Brand, 1988). L'analyse de l'activité du complexe IV par des méthodes d'oxygraphie pourrait permettre d'observer l'effet des ERO sur la variation de la stœchiométrie  $H^+/e^-$  au complexe IV. L'étude de l'effet d'un ajout de cyanure de sodium, sur le découplage observé, pourrait aussi valider ou infirmer cette hypothèse. Ces données pourraient ensuite être comparées à l'effet de la cachexie cancéreuse sévère sur l'activité du complexe IV.

Malgré les différences observées dans les mécanismes d'action de l'enrichissement en CL et de l'augmentation de la production d'ERO sur le gaspillage énergétique en condition non phosphorylante, l'effet conjoint de ces deux paramètres entraîne une augmentation de ce gaspillage. Cette observation semble démontrer que les mécanismes impliqués, d'une part, dans l'effet de l'enrichissement en CL et, d'autre part, dans l'effet de l'augmentation de la production d'ERO peuvent interagir. Bien que la peroxydation lipidique soit peu probable dans nos conditions expérimentales, il serait essentiel de mesurer l'effet de l'augmentation de la production d'ERO sur la peroxydation des CL afin d'invalider définitivement cette hypothèse.

Cependant, dans notre expérimentation, l'enrichissement en CL et l'augmentation de la production d'ERO ne parviennent pas à reproduire la diminution de la synthèse d'ATP observée dans notre modèle en stade de cachexie cancéreuse sévère.

Une partie de ces disparités peut s'expliquer par les systèmes utilisés pour mimer les effets de l'augmentation de la production d'ERO et du contenu en CL observés lors de la cachexie cancéreuse. Les études antérieures, réalisées au laboratoire, avaient, notamment, démontré que la composition en acides gras des cardiolipines était modifiée au stade de cachexie cancéreuse sévère (Dumas et al, 2011). De plus, cette modification entraînait une diminution du ratio n-6/n-3, ratio négativement corrélé à la consommation d'oxygène liée au gaspillage énergétique indépendant de la synthèse d'ATP (Dumas et al, 2011). Les études réalisées lors de ce travail de thèse n'ont pu tester qu'un enrichissement en CL commercialisées composées à 88 % d'acide linoléique (seule forme commerciale disponible). Pour renforcer notre

connaissance sur l'effet de l'enrichissement en CL sur la bioénergétique mitochondriale, le laboratoire travaille actuellement à la mise au point de la synthèse de CL composées d'acides gras variés afin d'évaluer l'impact de la composition en acide gras des CL sur le gaspillage énergétique. L'un des objectifs de l'équipe est notamment de réaliser un enrichissement en CL composé d'acides gras poly-insaturés n-3 afin de mimer la diminution du ratio n-6/n-3 observée. De même, l'augmentation de la production d'ERO est réalisée par un système exogène. Il pourrait donc y avoir des différences entre le facteur d'augmentation mesuré et la quantité d'ERO pénétrant effectivement dans la mitochondrie. L'utilisation de la molécule MitoTEMPO nous permet de confirmer que l'effet observé est bien imputable à l'augmentation de la production d'ERO. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que cette production exogène ne puisse altérer d'autres structures (telles que la membrane externe ou les éléments de la face cytosolique de la membrane interne) qui pourraient avoir un impact sur le fonctionnement mitochondrial observé. Ces travaux suggèrent aussi que les altérations mitochondriales observées pourraient impliquer d'autres mécanismes.

## C. Un lien possible entre le développement de la cachexie cancéreuse et les altérations mitochondriales

Les travaux de Tsuburaya et de ses collaborateurs avaient mis en évidence que la résection de la tumeur induisait la disparition de la cachexie cancéreuse et l'abolition des altérations métaboliques hépatiques observées (Tsuburaya et al, 1995). Ces constatations établissent un lien de causalité entre le développement de la cachexie cancéreuse et l'apparition des altérations de la bioénergétique mitochondriale. Ce mécanisme nécessite l'implication d'un facteur déclencheur. L'inflammation systémique pourrait participer à ce mécanisme, notamment par l'intermédiaire du TNF $\alpha$ . Le rôle du TNF $\alpha$  a notamment été démontré, *in vitro*, dans le découplage de la phosphorylation oxydative (Busquet et al, 2003) et dans l'inhibition de l'activité du complexe IV (Samavati et al, 2008).

Les expériences antérieures, réalisées au laboratoire, ont mis en évidence que la concentration sérique de cette cytokine était significativement augmentée dans notre modèle en stade de cachexie cancéreuse sévère. Il pourrait donc représenter un lien entre le développement de la cachexie cancéreuse et les altérations mitochondriales observées dans nos travaux. L'étude de l'effet du TNF $\alpha$  sur l'efficacité de la synthèse d'ATP et le gaspillage énergétique en conditions non phosphorylante pourrait nous permettre d'approfondir cette hypothèse. De plus, l'effet du TNF $\alpha$  sur le contenu en CL mitochondriales et sur la production d'ERO pourrait aussi nous permettre d'établir un lien entre la cachexie cancéreuse et les altérations mitochondriales observées.

Le TNF $\alpha$  étant une cytokine aux effets pléthoriques, son implication dans les altérations bioénergétiques devra, dans un premier temps, être testée sur des lignées cellulaires (hépatocyte ou fibroblaste) ou par injection intra-musculaire.

## D. Cinétique d'installation des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse

Le métabolisme hépatique est fortement activé lors du développement de la cachexie cancéreuse (mécanisme de néoglucogénèse, synthèse des protéines de l'APR) nécessitant un apport soutenu en ATP. Les études antérieures, réalisées au laboratoire, ont mis en évidence un gaspillage énergétique dans les mitochondries hépatiques en stade de cachexie cancéreuse sévère. Les mitochondries hépatiques doivent consommer plus de substrats pour maintenir une même production d'ATP. L'augmentation de l'intensité de l'oxydation des substrats pourrait induire une augmentation de la DER. Les altérations mitochondriales pourraient participer au déséquilibre de la balance énergétique et la perte de poids observés lors de la cachexie cancéreuse.

**Le troisième objectif de cette thèse était donc de déterminer la cinétique d'installation des dysfonctionnements mitochondriaux hépatiques lors de la cachexie cancéreuse.**

Notre étude a montré que l'altération du métabolisme énergétique mitochondrial hépatique apparaît tardivement dans l'évolution de la maladie. L'atteinte mitochondriale est notamment postérieure au développement de la fonte tissulaire caractéristique de la cachexie cancéreuse. Ces résultats mettent en évidence que le gaspillage énergétique mitochondrial hépatique n'est pas à l'initiation de l'hypermétabolisme.

Nous pouvons cependant faire l'hypothèse que l'anomalie de la synthèse d'ATP au sein des mitochondries hépatiques participerait ainsi au passage de l'état de cachexie à celui de cachexie réfractaire (Fearon 2011). L'apparition des dysfonctionnements mitochondriaux pourrait donc représenter une dépense énergétique supplémentaire menant l'individu à un état de rupture et à une incapacité à faire face à la maladie.

La définition, dans notre modèle de cachexie cancéreuse, d'un point intermédiaire entre le stade d'anorexie avancée et le stade de cachexie sévère pourrait permettre de confirmer cette

hypothèse. Le suivi des animaux en cage de calorimétrie indirecte pourrait faciliter l'établissement de ce point en permettant de mesurer la DER.

Si cette hypothèse est validée, la lutte contre les altérations mitochondriales pourrait avoir un impact majeur sur les chances de survie du patient. Elle participerait au maintien du patient en état stable, lui permettant de continuer son traitement thérapeutique contre le cancer.

Bien que la relation avec l'initiation de l'hypermétabolisme n'ait pas pu être établie, les altérations mitochondriales observées représentent un symptôme délétère pour le patient. Il est donc primordial d'établir une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans ces dysfonctionnements mitochondriaux. Ce travail de thèse constitue donc une étape dans la compréhension des altérations du métabolisme énergétique mitochondrial lors de la cachexie cancéreuse.

## IV- Fiches techniques

Fiche technique n° : 1

## Culture Cellulaire

Les cellules PROb sont cultivées dans un milieu de culture RPMI (pour *Roswell Park Memorial Institute*, Longa, Belgique ; composition en annexe) enrichi en 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

Leur stockage est réalisé, dans une cryothèque (-180°C), dans un milieu contenant du diméthyl sulfoxyde (DMSO). La décongélation se réalise rapidement en conditions stériles.

### ❖ Décongélation des cellules

Au préalable, remplir un flacon de culture de 75 cm<sup>3</sup> de 12 mL de tampon RPMI 10% SVF et le placer dans une étuve humide à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> afin d'ajuster sa température.

- Nettoyer le cryotube contenant les cellules à l'éthanol 70%.
- Décongeler le cryotube au bain-marie, à 37°C.
- Une fois décongelé, re-nettoyer le tube avec de l'éthanol 70%.
- Sous la hotte à flux laminaire, transvaser les cellules dans le flacon 75 cm<sup>3</sup> préalablement préparé.
  
- Au bout de 24h, aspirer le milieu de culture et réintroduire 13 mL de tampon RPMI 10% SVF.

### ❖ Trypsination des cellules

*Volumes utilisés pour un flacon de 75 cm<sup>3</sup>*

- Aspirer le milieu de culture des cellules.
- Réaliser 3 rinçages de 12 mL de DPBS sans calcium ni magnésium (composition en annexe).
- Réaliser 1 rinçage avec 2,5 mL de solution de trypsine.
- Incuber les cellules avec 1,5 mL de solution de trypsine en étuve humide à 37°C pendant 5 min.
- Appliquer des chocs mécaniques pour permettre un bon décollement des cellules.
- Stopper la réaction de la trypsine en ajoutant 11,5 mL de milieu RPMI 10 % SVF.

Les cellules peuvent être comptées sur cellules de Malassez.

❖ **Préparation des cellules pour l'injection**

Après comptage, les cellules sont centrifugées à 700 g pendant 5 min avec une vitesse de décélération lente. Cette étape permet de culotter les cellules sans les abimer. Le surnageant est aspiré et les cellules sont remise en suspension dans le volume de milieu RPMI 10% SVF nécessaire pour obtenir la concentration désirée ( $1 \times 10^6$  cell/mL).

Fiche technique n° : 2

## Isolement des mitochondries hépatiques

selon des adaptations de la technique de Krahenbuhl *et al.* (1994).

Toutes les étapes se font à +4°C.

- Hacher le foie en petits morceaux (ciseaux) dans le tampon d'isolement. Rincer 3 à 4 fois, avec du tampon d'isolement froid (10ml/g de foie), jusqu'à ce que le surnageant soit clair.
- Homogénéiser, dans 10ml volumes de tampon d'isolement/g de foie, au Potter (7 aller-retours, 750 tours/min) jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène.
- Centrifuger à 800 g pendant 10 min et à +4°C, pour éliminer les noyaux et débris cellulaires.
- Filtrer le surnageant, sur une couche de gaze, et le centrifuger à 8000 g pendant 10 min et à +4°C.
- Eliminer un maximum de surnageant, sans perturber le culot. Le suspendre dans 1mL de milieu d'isolement froid puis ajouter 10 mL de tampon d'isolement.
- Refaire une centrifugation de 10 min à 8000 g et à +4°C, pour bien nettoyer la strate blanchâtre entourant le culot (lipides).
- Suspendre le culot dans un 1mL de tampon d'isolement et le conserver dans la glace.

Fiche technique n° : 3

## Isolement des mitochondries musculaires

selon des adaptations de la technique de Roussel *et al.* (2000).

Toutes les étapes se font à +4°C.

- Nettoyer l'échantillon de tous les dépôts fibreux et nerveux qui se trouvent à sa surface.
- Disséquer finement l'échantillon (ciseaux) dans le tampon d'isolement froid (10ml/g de muscle).
- Ajouter la protéase (subtilisine A : 1mg/g de muscle) puis homogénéiser immédiatement au Potter (5 aller-retours, 1000 tours/min).
- Diluer 2 fois l'homogénat avec le tampon d'isolement et homogénéiser, de nouveau, au Potter (5 aller-retours, 1000 tours/min)
- Centrifuger à 800 g pendant 10 min et à +4°C, pour éliminer les noyaux et débris cellulaires.
- Filtrer le surnageant, sur une couche de gaze, et le centrifuger à 10000 g pendant 10 min et à +4°C.
- Eliminer un maximum de surnageant, sans perturber le culot. Le suspendre dans 1mL de milieu d'isolement froid puis ajouter 10 mL de tampon d'isolement.
- Refaire une centrifugation de 10 min à 10000 g et à +4°C, pour bien nettoyer la strate blanchâtre entourant le culot (lipides).
- Suspendre le culot dans un 1mL de tampon d'isolement et le conserver dans la glace.

Fiche technique n° : 4

## Dosage des protéines

Le dosage est réalisé par la méthode BCA (acide bicinchoninique), grâce à l'utilisation du kit BCATM Protein Assay kit, Pierce, Pierbo.

- Réaliser une gamme étalon d'albumine de sérum bovin : 0 mg/mL, 125 mg/mL, 250 mg/mL, 500 mg/mL, 750 mg/mL, et 1000 mg/mL.

- Réaliser des dilutions de la solution à mesurer :

Solution mitochondriale hépatique : 1/50<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup> et 1/150<sup>e</sup>

Solution mitochondriale musculaire : 1/20<sup>e</sup>, 1/50<sup>e</sup>

Le dosage se réalise sur une plaque 96puits.

- Déposer 10 µL de solution étalon ou d'échantillon puis ajouter 200 µL de réactif (50A :1B) par puits

-Incuber 30 min à 37°C

-Lecture de la plaque sur le lecteur de microplaque à la longueur d'onde  $\lambda = 562$  nm.

Fiche technique n° : 5

## **Enrichissement des membranes mitochondriales en cardiolipines et phosphatidyléthanolamines**

Selon les adaptations de la technique de Petrosillo *et al*, (2007)

### ❖ **Préparation liposomes :**

- Solubiliser les lipides désirés dans du tampon d'isolement selon le ratio :

Cardiolipines : 2,5 mg / mL de tampon

Phosphatidyléthanolamine : 1 mg / mL de tampon.

-Placer le mélange dans un tube en verre en présence d'un courant d'azote. Le tube est bouché avec un parafilm pour éviter l'évaporation de l'azote.

-Activer la sonication : (sonicateur Vibra-cell , sonics&materials, USA)

Paramètres: Amplitude = 95

Puissance = 5-9 W

Pulser = 4

Durée = 2 min 30

Faire 4 cycles.

### ❖ **Fusion des liposomes avec les mitochondries :**

- Introduire les liposomes dans la solution mitochondriale selon le ratio :

Cardiolipine : 1,4 mg de liposomes pour 2 mg de mitochondries.

Phosphatidyléthanolamine : 0,45 mg de liposomes pour 2 mg de mitochondries.

- Agitation (agitateur MR 3001) à 100 tours/min, à 30°C (t = 50) pendant 8 min.

- Centrifugation à 10000 g, à température ambiante pendant 10 min.

- Reprise du culot dans 200  $\mu$ l tampon isolement foie.

- Dosage protéines dilution 1/50<sup>e</sup> et 1/100<sup>e</sup>.

Fiche technique n° : 6

## Mesure de la consommation d'oxygène mitochondriale

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées est déterminée avec un oxygraphe (oxygraphe Dual digital model 20, Rank Brothers LTD.) à l'aide d'une électrode sensible à l'oxygène (électrode de type Clark). Les mesures sont effectuées à 37°C dans du tampon de respiration (composition en annexe) et indiquent des vitesses d'utilisation de l'oxygène par unité de temps et par mg de protéines mitochondriales.

### ❖ Mitochondries hépatiques :

#### Mesure de la consommation d'oxygène faisant intervenir le complexe II :

Dans la cuve de mesure :

Milieu respiration (avec mitochondries : qsp 1000 µl)

2,5 µM roténone

0,5 mg mitochondries

Puis ajout de :

5 mM succinate - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 2 min)*

300 µM ADP - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 1 min)*

1 µg oligomycine - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 4 min)*

2 µM FCCP - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 1 min)*

### ❖ Mitochondries musculaires :

#### Mesure de la consommation d'oxygène faisant intervenir le complexe II :

Dans la cuve de mesure :

Milieu respiration (avec mitochondries : qsp 1000 µl)

2,5 µM roténone

0,2 mg mitochondries

Puis ajout de :

**5 mM succinate** - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 2 min)*

**300  $\mu$ M ADP** - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 1 min)*

**1  $\mu$ g oligomycine** - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 4 min)*

**2  $\mu$ M FCCP** - *Attendre la stabilité du signal (approximativement 1 min)*

Fiche technique n° : 7

## Mesure de l'activité de la cytochrome-c-oxydase

Selon la technique de Dumas et al, (2004).

Ce dosage consiste à mesurer l'oxydation du cytochrome c :



### ❖ Technique :

#### 1) Réaliser une solution de cytochrome c réduit 80 µM (réduction entre 92 et 97%).

- Réaliser une solution de Cytochrome c oxydé (13,0 mg/ml H<sub>2</sub>O)

- Diluer cette solution dans du tampon phosphate pH 7,0 : 0,8 ml + 9,2 ml de tampon.  
=Solution C

-Oxyder 1 ml de Solution C par quelques cristaux de Ferricyanure de Potassium = **Solution O**

-Réduire 1 ml de Solution C par quelques cristaux de Dithionite de Sodium = **Solution R**

- Mesurer le rapport de D.O. (550/560 nm) des différentes solutions.

*Le rapport sera : proche de 1,1 pour le 0% de réduction et supérieur à 7 pour le 100% de réduction.*

- Ajouter par fractions de 20 µl le Cytochrome c réduit obtenu précédemment (**solution R**) aux 8 ml de Cytochrome C oxydé (**solution C**) restant et mesurer le rapport de façon à être à 92-97% de réduction.

**(D.O. 550 nm solution C = 0.92 à 0.97 x (D.O. 550 nm solution R - D.O. 550 nm solution O)).**

#### 2) Mesure de l'activité de la cytochrome-c-oxydase

- Incuber 990 µl de solution de cytochrome c réduit 2 minutes à 37°C.

- Démarrer la mesure par l'ajout de **5 µg** de protéines mitochondriales isolées.

- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C (cinétique d'ordre 1).

$$\varepsilon_{\text{cyt c}} = 18500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{Cm}^{-1}$$

Fiche technique n° : 8

## **Détermination de l'efficacité de la synthèse d'ATP**

Selon la technique de Dumas *et al*, (2011).

### ❖ **Mesure de la consommation d'oxygène**

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées est déterminée avec un oxygraphe (oxygraphe Eurosep, Hansatech instrumentals) à l'aide d'une électrode sensible à l'oxygène (électrode de Clark). Les mesures sont effectuées à 37°C dans de tampon de respiration et indiquent des vitesses d'utilisation de l'oxygène par unité de temps et par mg de protéines mitochondriales.

Dans la cuve de mesure :

Milieu respiration (avec mitochondries, ATP et glucose : qsp 2000 µl)  
125 µM ATP  
20 mM glucose  
2,5 µM roténone  
2 mg mitochondries

- Démarrer la mesure par l'ajout de succinate 5 mM
- Attendre un taux de respiration stable et effectuer 5 prélèvements de 200 µl de la solution réactionnelle à 30s d'intervalle.
- Les prélèvements sont insérer dans 5 aliquots contenant 200 µL d'acide perchlorique 10% - EDTA 20 mM

Renouveler la mesure, en présence de doses croissantes d'héxokinase (5 – 180 mUI/ml).

### ❖ **Préparation des échantillons pour le dosage de l'ATP**

- Centrifuger les échantillons 10 min à 10 000 g et prélever le surnageant.
- Neutraliser le surnageant avec de l'hydroxyde de potassium (KOH) 3M.

- Centrifuger, de nouveaux, 10 min à 10 000 g.

❖ **Dosage de l'ATP**

- Dans un tube eppendorff, introduire 700 $\mu$ L de tampon de mesure ATP/O (composition en annexe).

- Ajouter le NADP pour obtenir une concentration finale de 0,5 mM.

- Ajouter 200  $\mu$ L d'échantillons.

- Démarrer la réaction en ajoutant 0,1 UI de G 6-PDH.

- Incuber 1 heure à 37°C.

- Lire l'absorbance à la longueur d'onde  $\lambda=340$  nm.  $\epsilon$  NADPH = 6220 M<sup>-1</sup>. Cm<sup>-1</sup>

Fiche technique n° : 9

## Détermination de la cinétique du gaspillage énergétique en condition non phosphorylante

Selon la technique de Dumas et al, (2011)

La consommation d'oxygène des mitochondries isolées est déterminée avec un oxygraphe (oxygraphe Dual digital model 20, Rank Brothers LTD.) à l'aide d'une électrode sensible à l'oxygène (électrode de type Clark). En parallèle, dans la même cuve de mesure, le potentiel de membrane est déterminé par une électrode sensible au TPMP<sup>+</sup>. Les mesures sont effectuées à 37°C dans de tampon de respiration. Les différents points obtenus correspondent donc à la consommation d'oxygène nécessaire pour le maintien d'un potentiel de membrane donné et décrivent ainsi une cinétique indicative de l'efficacité de l'utilisation de l'énergie rédox de la mitochondrie.

Dans la cuve de mesure :

Milieu respiration (avec mitochondries: qsp 2000 µl)

2,5 µM roténone

1 mg mitochondries

2 µg oligomycine

160 ng nigéricine

- Attendre la stabilité de l'électrode TPMP<sup>+</sup>

- Effectuer 4 ajouts successives de 0,5 µM de TPMP<sup>+</sup> en attendant la stabilité de l'électrode entre chaque addition

Puis ajout de :

5 mM succinate - Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP<sup>+</sup>

0,25 mM malonate - Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP<sup>+</sup>

0,25 mM malonate - Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP<sup>+</sup>

0,25 mM malonate - Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP<sup>+</sup>

0,50 mM malonate - Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP<sup>+</sup>

0,75 mM malonate - Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP<sup>+</sup>

1,25 mM malonate - *Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP+*

1,25 mM malonate - *Attendre 4 minutes la stabilité de l'électrode TPMP+*

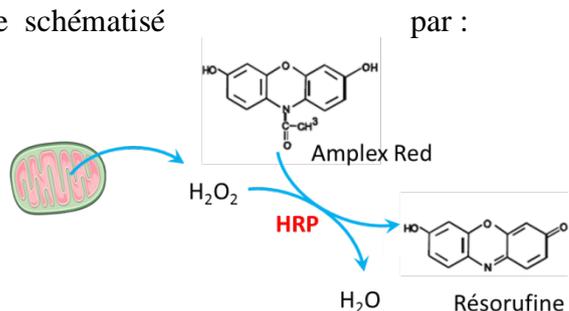
- Dissiper le potentiel électrique par l'ajout de 2  $\mu\text{M}$  de FCCP

Fiche technique n° : 10

## Mesure de la production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondriale

Cette étude est réalisée grâce à l'utilisation de la sonde AmplexRed (Zhou *et al*, 1997). La lecture des mesure est réalisée par spectrofluorimétrie ( $\lambda$  excitation = 560nm/  $\lambda$  émission = 584nm) à 37°C et sous agitation constante et comparée à une gamme étalon d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La réaction peut-être schématisé



### ❖ Mesure de la production maximale de ROS et de la production par le complexes III:

Dans une cuve de spectrofluorimètre :

Milieu ROS (avec mitochondries, ATP et glucose : qsp 2 ml)

125  $\mu$ M ATP

20 mM glucose

1  $\mu$ M amplex red

10 UI HRP

1 mg mitochondries - *Attendre une ligne de base stable*

Puis ajout :

à t = 90 s : 5 mM succinate - *Attendre la stabilité du signal*

à t = 180 s : 2,5  $\mu$ M roténone - *Attendre la stabilité du signal*

### ❖ Mesure de la production minimale de ROS :

Dans une cuve de spectrofluorimètre :

Milieu ROS (avec mitochondries, ATP et glucose : qsp 2 ml)

125 µM ATP

20 mM glucose

1 µM amplex red

10 UI HRP

2,5 µM roténone

1 mg mitochondries - *Attendre une ligne de base stable*

Puis ajout :

à t = 90 s : 5 mM succinate - *Attendre la stabilité du signal*

à t = 180 s : 160 UI héxokinase - *Attendre la stabilité du signal*

### ❖ Augmentation de la production de ROS exogène par le système Xanthine/Xanthine oxydase

L'étude de l'influence de la production d'espère réactives de l'oxygène sur l'efficacité de la synthèse d'ATP a nécessité d'augmenter artificiellement cette production. Le système utilisé repose sur l'action de la xanthine oxydase. Cette production se caractérise par la réaction :



Après tests, les concentrations choisies sont de 2,5 µM de xanthine et 0,36 UI de xanthine oxydase.

Fiche technique n° : 11

## Détermination du contenu en cardiolipines

Cette étude est réalisée grâce à l'utilisation d'une molécule fluorescente : le 10-nonyl acridine orange (NaO,  $\lambda$  excitation = 496nm /  $\lambda$  émission = 530 nm). Il s'agit d'un dosage indirect. La lecture des mesures est réalisée au spectrofluorimètre à 37°C et sous agitation constante et comparée à une gamme étalon.

Réalisation de 4 solutions :

### Solution 1

Milieu d'isolement (avec mitochondrie : qsp 2 ml)

200  $\mu$ M NaO

0,4 mg de mitochondries

### Solution 2

Milieu d'isolement (avec mitochondrie : qsp 2 ml)

80  $\mu$ M NaO

0,2 mg de mitochondries

### Solution 3

Milieu d'isolement (avec mitochondrie : qsp 2 ml)

150  $\mu$ M NaO

0,3 mg de mitochondries

### Solution 4

Milieu d'isolement (avec mitochondrie : qsp 2 ml)

150  $\mu$ M NaO

0,2 mg de mitochondries

Les solutions sont incubées 10 min à 37°C puis centrifugées 10 min à 10 000 g. Les surnageant sont analysés par spectrofluorimétrie. L'utilisation de la gamme étalon nous permet de déduire la concentration en NaO du surnageant.

La centrifugation permet le culottage des mitochondries et du NaO lié aux cardiolipines.

Le surnageant est analysé afin de déterminer la concentration en NaO n'ayant pas réagi.

La détermination de la concentration de NaO lié se fait par déduction de la concentration mesurée, de la concentration initiale.

Fiche technique n° : 12

## Détermination du contenu en phosphatidyléthanolamine

### ❖ Extraction des lipides des membranes mitochondriales.

L'extraction des lipides des membranes mitochondriales est réalisée selon la technique de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959).

- Désorganisation des membranes lipidiques des mitochondries préalablement isolées par ajout d'un solvant contenant un mélange de chloroforme, méthanol et d'eau (1 :2 :0.8 v/v).
- Ajouter du chloroforme et d'eau distillée (v/v) et centrifuger à 2000 tours/minute pendant 5 min.

Cette étape permet de séparer les composants membranaires en fonction de leur polarité.

- Filtrer la phase apolaire sur laine de verre avec du sulfate de sodium
- Après évaporation du solvant, l'extrait lipidique est analysé par chromatographie sur couche mince à deux dimensions.

### ❖ Isolement et quantification du contenu en PE

La séparation de PE des autres composés lipidiques est réalisée selon le principe de chromatographie d'adsorption qui permet une séparation des phospholipides en fonction de la nature de leur tête polaires.

- Déposer les lipides recueillis sur une plaque de silice pour une première migration.
- Après migration, sécher la plaque.
- Tourner la plaque de silice à 90° puis réaliser la seconde migration
- Après la seconde migration, sécher la plaque puis la brumiser avec une solution de 2',7'-dichlorofluoresceine à 0,2% dans l'éthanol.
- Révéler les phospholipides séparés sous lumières ultraviolet

Le contenu en PE de nos échantillons est déterminé par densitométrie grâce à l'utilisation d'une gamme étalon de PE réalisée en parallèle.

## **Détermination du contenu en complexes de la chaîne respiratoire par western-blot**

### ❖ Préparation des échantillons

- A partir des échantillons de mitochondries isolées, préparer des solutions de travail à 1 mg / mL.
- Dans un eppendorff, mettre 5 µg de protéines, 10 µL d'eau distillée et 5 µL de bleu de charge.
- Vortexer et centrifuger les solutions. Laisser agir le tampon 5 min et congeler les solutions à -20°C jusqu'à utilisation.

### ❖ Electrophorèse SDS-PAGE

- Couler un gel à 12,5 % d'acrylamide dans votre montage. Laisser polymériser 15 min.
- Couler un gel de concentration et introduire les peignes. Laisser polymériser 15 min.
- Introduire votre gel dans une cuve d'électrophorèse et remplir la cuve de tampon d'électrophorèse.
- Déposer les échantillons à analyser dans les puits formés par les peignes.
- Mettre le système sous ampérage constant à 40 mA et attendre la fin de la migration.

### ❖ Transfert du gel sur la membrane PVDF

- Une fois la migration terminée, incuber le gel 30 min dans du tampon de transfert.
- Activer la membrane PVDF en l'incubant 1 min dans un bain de méthanol.
- Une fois activée, la mettre dans un bain de tampon de transfert jusqu'à utilisation (< à 10 min).
- Réaliser le montage de transfert dans la cuve X Cell II™ Blot Module d'Invitrogen.

Placer 2 éponges imbibées de tampon de transfert dans la cuve puis insérer 1 papier whatmann, le gel, la membrane PVDF et, de nouveau, 1 papier whatmann. Recouvrir d'éponges imbibées de tampon de transfert.

- Fermer le montage hermétiquement et le remplir de tampon de transfert.

Le transfert se réalise sous ampérage constant, à 190 mA, pendant 2h.

#### ❖ **Saturation de la membrane**

- Une fois le transfert terminé, placer la membrane dans une boîte de proportion similaire, contenant du tampon de lavage et mettre sous agitation (600 tours / min)

- Une fois rincée, incuber la membrane, 2 h, sous agitation (300 tours/min), dans une solution de saturation composée de tampon de lavage additionné de 5% de lait écrémé (lait écrémé en poudre, Régilait®).

#### ❖ **Immuno-détection**

- Effectuer 3 lavages de 5 min dans du tampon de lavage sous agitation (600 tours/min).

- Incuber la membrane 2 h, sous agitation (300 tours/min), dans une solution contenant l'anticorps primaire à la concentration voulue, composé de tampon de lavage additionné de 0,1 % de lait écrémé (lait écrémé en poudre, Régilait®).

- Effectuer, de nouveau, 3 lavages de 5 min dans du tampon de lavage sous agitation (600 tours/min).

- Incuber la membrane 1 h, sous agitation (300 tours/min), dans une solution contenant l'anticorps secondaire à la concentration voulue, composé de tampon de lavage additionné de 0,1 % de lait écrémé (lait écrémé en poudre, Régilait®).

## ❖ Révélation

- Effectuer, de nouveau, 3 lavages de 5 min dans du tampon de lavage sous agitation (600 tours/min).

La révélation se fait grâce au kit ECL Western-Blotting (Enhanced ChemiLuminescence, Pierce, Pierbo).

- Préparer la solution de révélation comme indiquée dans le protocole.

- Effectuer un bref séchage de la membrane sur du papier absorbant et la plonger dans la solution de révélation, 1 min, sous agitation.

- Déposer la membrane dans un système de révélation (caisse noire) et procéder au développement du signal.

- Appliquer un film autoradiographique au vis-à-vis de la membrane suivant le temps d'exposition voulu. Une fois exposé, plonger le film dans une solution de révélation jusqu'à apparition du signal, puis le placer dans un bain de fixation.

- Après séchage du film, procéder à l'analyse du signal.

Fiche technique n° : 14

## **Extraction des Acides RiboNucléiques**

Cette étude est réalisée selon des adaptations de la méthode d'extraction guanidium thiocyanate-phenol-chloroforme de Chomczynski et Sacchi (2006).

Les échantillons ( $\approx 100\text{mg}$ ) sont stockés dans des cryotubes contenant 1 mL de trizol et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation.

### **❖ Extraction**

- Laisser décongeler les échantillons et procéder à leur broyage.
- Centrifuger les cryotubes 10 min, à 12000 g à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Récupérer le surnageant et les incuber 5 min à température ambiante.
- Ajouter 0,2 mL de chloroforme et agiter vigoureusement pendant 15 secondes.
- Incuber 2 à 3 min à température ambiante et centrifuger 15 min, à 12000 g et à  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Les tubes centrifugés vont présenter 3 phases.
  - une phase d'aspect crémeuse rosâtre (constitué des débris lipidiques), située dans le fond du tube,
  - une interphase blanche, très fine (contenant les protéines)et une phase plutôt limpide contenant les acides nucléiques (située au surnageant).
- Récupérer la phase aqueuse, surnageante, et ajouter 0,5 mL d'isopropyl alcool.
- Incuber 10 min à température ambiante et centrifuger 10 min à 12 000 g et à  $4^{\circ}\text{C}$ .

- Jeter le surnageant et laver le culot en ajoutant 1 mL d'éthanol à 75 %.
- Vortexer et centrifuger 5 min à 7500 g à 4°C.
- Jeter, de nouveaux, le surnageant et laisser évaporer les traces d'éthanol (environ 15 min).
- Reprendre le culot dans 30 µL d'eau EUPS.

#### ❖ Traitement à l'ADNase

Le traitement à l'ADNase est réalisé par utilisation du kit DNA-free™ (Invitrogen).

- A partir de solution d'ARN à 0,5 µg / µL, ajouter 1 µL de tampon DNase et 1 µL de DNase.
  - Incuber 20 min à 37°C
  - Ajouter 2 µL de DNase Inactivation et incuber 2 min à température ambiante.
  - Centrifuger 1 min à 10 000 g.
- Les échantillons peuvent ensuite être congelé à -20°C jusqu'à utilisation

Fiche technique n° : 15

## La transcription inverse

Cette manipulation est réalisée par l'utilisation des amorces random primers (Promega) et du kit SuperScript™ II Reverse transcriptase (Invitrogen).

- Réaliser une solution contenant 5  $\mu\text{L}$  d'eau ultra pure stérile, 1  $\mu\text{L}$  de désoxiribonucléotides et 1  $\mu\text{L}$  de random primers.
- Ajouter 5  $\mu\text{L}$  de solution d'ARN à 0,5  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  et incubé 5 min à 65°C.
- Centrifuger brièvement les échantillons et les mettre dans la glace.
- Ajouter 4  $\mu\text{L}$  de First-Stand Buffer, 2  $\mu\text{L}$  de dithiothréitol à 0,1 M, 1  $\mu\text{L}$  de Rnase inhibitor (30U /  $\mu\text{L}$ ) et 1  $\mu\text{L}$  de Super Script II (200U)
- Incuber 50 min à 42°C puis 15 min à 70°C
- Stocker les échantillons à -20°C jusqu'à utilisation.

## **La réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel ou qPCR**

Cette étude est réalisée selon des adaptations de la technique de Chen *et al*, (1994), par l'utilisation du kit LightCycler®480 SYBR Green I Master (Roche).

- Les échantillons d'ADNc doivent être dilués à la concentration souhaitée selon les amorces utilisées.
- Préparer une solution contenant, pour chaque échantillon analysé, 10 µL de mix LightCycler®480 SYBR Green I Master, 3 µL d'eau ultra pure stérile, 1 µL d'amorce « sens » et 1 µL d'amorces « anti-sens ».
- Déposer 15 µL de cette solution dans chaque puits d'une plaque 96 puits.
- Ajouter 5 µL d'ADNc dilué par puits.
- Fermer hermétiquement la plaque grâce à un autocollant et la centrifuger brièvement.
- Insérer la plaque dans le thermocycleur (ici, LightCycler® 480 System, Roche) et lancer le programme voulu.

Fiche technique n° : 17

## **Coloration des fibres musculaires à l'azorubine**

Les colorations nécessitent de réaliser des coupes transversales de 12 µm d'épaisseur déposées sur une lame en verre.

- Laisser sécher les coupes 1 h à température ambiante.
- Fixer les coupes 5 min en plongeant la lame dans le fixateur.
- Rincer rapidement à l'eau.
- Plonger la lame dans la solution de coloration et incuber pendant 1 h.
- Rincer la lame à l'eau.
- Déshydrater les lames en les trempant, rapidement, 3 fois dans des bains successifs :  
Ethanol 80 %, Ethanol 95 %, Ethanol 100 %, Acétone (2 bains), Trichloroéthane (2 bains).
- Monter la lamelle dans du baume du Canada.

## **Révélation de l'activité ATPasique sur coupes histologiques de muscle**

Cette analyse est réalisée par des techniques histologiques d'après modification des techniques de Brooke et Kaiser (1969). Les colorations nécessitent de réaliser des coupes transversales de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur déposées sur une lame en verre.

### **❖ Prétraitement pour la révélation de l'activité myosine ATPase acide**

- Incuber la lame 10 min dans un tampon acide.
- Rincer abondamment la lame dans un tampon Tris-HCl 100 mM.

### **❖ Prétraitement pour la révélation de l'activité myosine ATPase basique**

- Fixer la lame au formaldéhyde 4% pendant 5 min.
- Incuber la lame 10 min dans un tampon basique.

### **❖ Révélation de l'activité myosine ATPase**

- Incuber les lames, 5 min, dans une solution d'ATP à 2,8 mM.
- Rincer dans une solution de Chlorure de calcium à 35 mM, 3 fois 3 min.
- Plonger les lames dans une solution de chlorure de cobalt, à 2 %, pendant 3 min.

- Rincer à l'eau distillée 3 fois 3 min

- Plonger les lames dans une solution de sulfure d'ammonium 1% pendant 3 min

- Rincer pendant 20 min à l'eau courante

- Déshydrater les lames en les trempant, rapidement, 3 fois dans des bains successifs :

Alcool 80% - Alcool 95% - Alcool 100 % - Acétone (2 bains) - Méthylcyclohexane (2 bains)

- Monter les lames avec de l'Entellan (milieu de montage)

Mettre 1 à 2 gouttes d'Entellan sur la lame et recouvrir aussitôt avec la lamelle pour éviter le dessèchement des coupes. Puis, faire sortir les bulles d'air entre la lame et la lamelle.

Fiche technique n° : 19

## **Révélation de l'activité Succinate déshydrogénase sur coupes histologiques de muscle**

Cette analyse est réalisée par des techniques histologiques d'après modification des techniques de Nachlas et al, (1957). Les colorations nécessitent de réaliser des coupes transversales de 12 µm d'épaisseur déposer sur une lame en verre.

- Entourer les coupes avec le crayon « Dakopen ».
- Déposer quelques gouttes de solution d'incubation sur les coupes. Ne pas faire déborder.
- Mettre les lames dans l'étuve à 37°C pendant 30 à 40 min.
- Rincer rapidement dans du NaCl 0,9%
- Incuber les lames pendant 10 min dans le fixateur à température ambiante.
- Déshydrater les lames en les trempant, rapidement, 3 fois dans des bains successifs :  
Alcool 80% - Alcool 95% - Alcool 100 % - Acétone (2 bains) - Méthylcyclohexane (2 bains)
- Monter les lames avec de l'Entellan (milieu de montage)  
Mettre 1 à 2 gouttes d'Entellan sur la lame et recouvrir, aussitôt, avec la lamelle pour éviter le dessèchement des coupes. Puis, faire sortir les bulles d'air entre la lame et la lamelle.

# Bibliographie

# A

Acharyya S, Guttridge DC (2007) Cancer cachexia signaling pathways continue to emerge yet much still points to the proteasome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**: 1356-1361

Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, Guttridge DC (2004) Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest* **114**: 370-378

Acin-Perez R, Gatti DL, Bai YD, Manfredi G (2011) Protein Phosphorylation and Prevention of Cytochrome Oxidase Inhibition by ATP: Coupled Mechanisms of Energy Metabolism Regulation. *Cell Metab* **13**: 712-719

Aleman MR, Santolaria F, Batista N, de la Vega MJ, Gonzalez-Reimers E, Milena A, Llanos M, Gomez-Sirvent JL (2002) Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition? *Cytokine* **19**: 21-26

Allen RD (1995) Membrane tubulation and proton pumps. *Protoplasma* **189**: 1-8

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Debruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**: 457-465

Andreyev AY, Bondareva TO, Dedukhova VI, Mokhova EN, Skulachev VP, Tsofina LM, Volkov NI, Vygodina TV (1989) The ATP-ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty-acids on mitochondria. *Eur J Biochem* **182**: 585-592

Anker SD, Ponikowski P, Varney S, Chua TP, Clark AL, WebbPeploe KM, Harrington D, Kox WJ, PooleWilson PA, Coats AJS (1997) Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet* **349**: 1050-1053

Anthony G, Reimann A, Kadenbach B (1993) Tissue-specific regulation of bovine heart cytochrome-c-oxidase activity by ADP via interaction with subunit-VIA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1652-1656

Antoun S, Baracos VE, Birdsell L, Escudier B, Sawyer MB (2010) Low body mass index and sarcopenia associated with dose-limiting toxicity of sorafenib in patients with renal cell carcinoma. *Ann Oncol* **21**: 1594-1598

Arcisio-Miranda M, Abdulkader F, Brunaldi K, Curi R, Procopio J (2009) Proton flux induced by free fatty acids across phospholipid bilayers: New evidences based on short-circuit measurements in planar lipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **484**: 63-69

Ardail D, Privat JP, Egretcharlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P (1990) Mitochondrial contact sites - lipid-composition and dynamics. *J Biol Chem* **265**: 18797-18802

Arnold I, Pfeiffer K, Neupert W, Stuart RA, Schagger H (1998) Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* **17**: 7170-7178

Arnold S, Kadenbach B (1997) Cell respiration is controlled by ATP, an allosteric inhibitor of cytochrome-c oxidase. *Eur J Biochem* **249**: 350-354

Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, Couplan E, Alves-Guerra MC, Gubern M, Surwit R, Bouillaud F, Richard D, Collins S, Ricquier D (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* **26**: 435-439

Asp ML, Tian M, Wendel AA, Belury MA (2010) Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer* **126**: 756-763

## B

Baracos VE, Devivo C, Hoyle DHR, Goldberg AL (1995) Activation of the atp-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal-muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **268**: E996-E1006

Barreiro E, de la Puente B, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Gea J, Argiles JM (2005) Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett* **579**: 1646-1652

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B (2006) Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* **17**: 4-12

Basu Ball W, Kar S, Mukherjee M, Chande AG, Mukhopadhyaya R, Das PK (2011) Uncoupling protein 2 negatively regulates mitochondrial reactive oxygen species generation and induces phosphatase-mediated anti-inflammatory response in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* **187**: 1322-1332

Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR (2002) Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature* **418**: 650-654

Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV (1995) Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight-loss in patients with aids. *J Pain Symptom Manage* **10**: 89-97

Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Cornbaret L, Attaix D (2005) Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2098-2114

- Bender E, Kadenbach B (2000) The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett* **466**: 130-134
- Benoit L, Duvillard C, Beltramo JL, Brunet-Lecomte P, Chauffert B (2000) Intraperitoneal cisplatin plus epinephrine and surgical debulking for the treatment of advanced peritoneal carcinomatosis in the rat. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique* **24**: 26-30
- Bienengraeber M, Echtay KS, Klingenberg M (1998) H<sup>+</sup> transport by uncoupling protein (UCP-1) is dependent on a histidine pair, absent in UCP-2 and UCP-3. *Biochemistry* **37**: 3-8
- Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ, Trayhurn P (2004) Zinc-alpha 2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 2500-2505
- Bing C, Brown M, King P, Collins P, Tisdale MJ, Williams G (2000) Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. *Cancer Res* **60**: 2405-2410
- Binyamin K, Herrick A, Carlson G, Hopkins S (2011) The effect of disease activity on body composition and resting energy expenditure in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of inflammation research* **4**: 61-66
- Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, Newton W, Wink K, Baum S, Ramsey J (2003) Energy expenditure of Rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **88**: 16-23
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**: 911-917
- Bobyleva V, Bellei M, Paziienza TL, Muscatello U (1997) Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria. *Biochem Mol Biol Int* **41**: 469-480
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VKM, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na EQ, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**: 1704-1708
- Bongaerts GPA, van Hatteren HK, Verhagen CAM, Wagener DJT (2006) Cancer cachexia demonstrates the energetic impact of gluconeogenesis in human metabolism. *Med Hypotheses* **67**: 1213-1222
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* **27**: 1767-1780
- Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E, Lundholm K (2001) Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *Int J Cancer* **93**: 380-383
- Boss O, Samec S, Kuhne F, Bijlenga P, Assimacopoulos-Jeannet F, Seydoux J, Giacobino JP, Muzzin P (1998) Uncoupling protein-3 expression in rodent skeletal muscle is modulated by food intake but not by changes in environmental temperature. *J Biol Chem* **273**: 5-8

Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Grieco G, Bonelli G, Pacelli F, Fanelli FR, Doglietto GB, Baccino FM (2003) Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Ann Surg* **237**: 384-389

Bouillaud F (2009) UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing. *Biochim Biophys Acta* **1787**: 377-383

Boveris A, Oshino N, Chance B (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical journal* **128**: 617-630

Brand MD (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Exp Gerontol* **35**: 811-820

Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N (2004) Mitochondrial superoxide: Production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* **37**: 755-767

Brand MD, Esteves TC (2005) Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab* **2**: 85-93

Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ (2005) The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* **392**: 353-362

Brand MD, Turner N, Ocloo A, Else PL, Hulbert AJ (2003) Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. *Biochem J* **376**: 741-748

Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruija-Gray J, Kimmel AR, Londos C (2000) Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* **275**: 38486-38493

Braun TP, Zhu X, Szumowski M, Scott GD, Grossberg AJ, Levasseur PR, Graham K, Khan S, Damaraju S, Colmers WF, Baracos VE, Marks DL (2011) Central nervous system inflammation induces muscle atrophy via activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Exp Med* **208**: 2449-2463

Brooke MH, Kaiser KK (1969) Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **17**: 431-432

Brookes PS, Levonen AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* **33**: 755-764

Bru A, Souto JC, Alcolea S, Anton R, Remacha A, Camacho M, Soler M, Bru I, Porres A, Vila L (2009) Tumour Cell Lines HT-29 and FaDu Produce Proinflammatory Cytokines and Activate Neutrophils In Vitro: Possible Applications for Neutrophil-Based Antitumour Treatment. *Mediat Inflamm*

Burke RE, Levine DN, Tsairis P, Zajac FE, 3rd (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *The Journal of physiology* **234**: 723-748

Busquets S, Almendro V, Barreiro E, Figueras M, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ (2005) Activation of UCPs gene expression in skeletal muscle can be independent on both circulating fatty acids and food intake involvement of ROS in a model of mouse cancer cachexia. *FEBS Lett* **579**: 717-722

Busquets S, Aranda X, Ribas-Carbo M, Azcon-Bieto J, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (2003) Tumour necrosis factor-alpha uncouples respiration in isolated rat mitochondria. *Cytokine* **22**: 1-4

Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, Lopez-Soriano FJ, Fearon KC, Argiles JM (2007) Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clin Nutr* **26**: 614-618

## C

Cabezón E, Butler PJG, Runswick MJ, Walker JE (2000) Modulation of the oligomerization state of the bovine F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein, IF<sub>1</sub>, by pH. *J Biol Chem* **275**: 25460-25464

Cadenas S, Buckingham JA, Samec S, Seydoux J, Din N, Dulloo AG, Brand MD (1999) UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* **462**: 257-260

Cai DS, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Oh BC, Lidov HGW, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ, Shoelson SE (2004) IKK beta/NF-kappa B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119**: 285-298

Campling BG, Sarda IR, Baer KA, Pang SC, Baker HM, Lofters WS, Flynn TG (1995) Secretion of atrial-natriuretic-peptide and vasopressin by small-cell lung-cancer. *Cancer* **75**: 2442-2451

Cao D-x, Wu G-h, Zhang B, Quan Y-j, Wei J, Jin H, Jiang Y, Yang Z-a (2010a) Resting energy expenditure and body composition in patients with newly detected cancer. *Clin Nutr* **29**: 72-77

Cao DX, Wu GH, Yang ZA, Zhang B, Jiang Y, Han YS, He GD, Zhuang QL, Wang YF, Huang ZL, Xi QL (2010b) Role of beta 1-adrenoceptor in increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Sci* **101**: 1639-1645

Capitanio N, Capitanio G, Demarinis DA, DeNitto E, Massari S, Papa S (1996) Factors affecting the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: Influence of the rate of electron flow and transmembrane Delta pH. *Biochemistry* **35**: 10800-10806

- Cavallo A, Gnoni A, Conte E, Siculella L, Zanotti F, Papa S, Gnoni GV (2011) 3,5-diiodo-L-thyronine increases FoF1-ATP synthase activity and cardiolipin level in liver mitochondria of hypothyroid rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **43**: 349-357
- Chance WT, Balasubramaniam A, Fischer JE (1995) Neuropeptide-Y and the development of cancer anorexia. *Ann Surg* **221**: 579-589
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria - Central role of complex III. *J Biol Chem* **278**: 36027-36031
- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic dna. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5695-5699
- Chicco AJ, Sparagna GC (2007) Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol-Cell Physiol* **292**: C33-C44
- Chomczynski P, Sacchi N (2006) The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* **1**: 581-585
- Cioffi F, Senese R, de Lange P, Goglia F, Lanni A, Lombardi A (2009) Uncoupling proteins: A complex journey to function discovery. *Biofactors* **35**: 417-428
- Claypool SM, Oktay Y, Boonthung P, Loo JA, Koehler CM (2008) Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* **182**: 937-950
- Cleeter MWJ, Cooper JM, Darleyusmar VM, Moncada S, Schapira AHV (1994) Reversible inhibition of cytochrome-c-oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory-chain, by nitric-oxide - implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* **345**: 50-54
- Clerc P, Rigoulet M, Leverve X, Fontaine E (2007) Nitric oxide increases oxidative phosphorylation efficiency. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**: 158-166
- Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ (2000) Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* **275**: 5011-5015
- Collins P, Bing C, McCulloch P, Williams G (2002) Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans. *Br J Cancer* **86**: 372-375
- Congleton J (1999) The pulmonary cachexia syndrome: aspects of energy balance. *Proc Nutr Soc* **58**: 321-328
- Constantinou C, Cristine Fontes De Oliveira C, Mintzopoulos D, Busquets S, He J, Kesarwan M, Mindrinos M, Rahme LG, Argiles JM, Tzika AA (2011) Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. *International Journal of Molecular Medicine* **27**: 15-24

Cori CF (1929) The Rate of Absorption of Epinephrine from the Subcutaneous Tissue. *Science* **70**: 355-356

Costelli P, Baccino FM (2003) Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **6**: 407-412

Costelli P, De Tullio R, Baccino FM, Melloni E (2001) Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br J Cancer* **84**: 946-950

Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, Bonelli G, Doglietto GB, Baccino FM, Fanelli FR (2008) Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest* **38**: 531-538

Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Penna F, Reffo P, Bonetto A, Busquets S, Bonelli G, Lopez-Soriano FJ, Doglietto GB, Argiles JM, Baccino FM, Fanelli FR (2006) IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* **291**: R674-R683

Costelli P, Reffo P, Penna F, Autelli R, Bonelli G, Baccino FA (2005) Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2134-2146

Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* **420**: 860-867

Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cordan MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411**: 480-484

Crofts AR (2004) The cytochrome bc(1) complex: Function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* **66**: 689-733

Cunningham JJ (1991) Body-composition as a determinant of energy-expenditure - a synthetic review and a proposed general prediction equation. *American Journal of Clinical Nutrition* **54**: 963-969

## D

Das SK, Eder S, Schauer S, Diwocky C, Temmel H, Guertl B, Gorkiewicz G, Tamilarasan KP, Kumari P, Trauner M, Zimmermann R, Vesely P, Haemmerle G, Zechner R, Hoefler G (2011) Adipose Triglyceride Lipase Contributes to Cancer-Associated Cachexia. *Science* **333**: 233-238

Deans C, Wigmore SJ (2005) Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**: 265-269

Deans DAC, Wigmore SJ, Gilmour H, Paterson-Brown S, Ross JA, Fearon KCH (2006) Elevated tumour interleukin-1 beta is associated with systemic inflammation: a marker of reduced survival in gastro-oesophageal cancer. *Br J Cancer* **95**: 1568-1575

Dehoux M, Van Beneden R, Pasko N, Lause P, Verniers J, Underwood L, Ketelslegers JM, Thissen JP (2004) Role of the insulin-like growth factor I decline in the induction of atrogen-1/MAFbx during fasting and diabetes. *Endocrinology* **145**: 4806-4812

Desquiret V, Loiseau D, Jacques C, Douay O, Malthiery Y, Ritz P, Roussel D (2006) Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1757**: 21-30

Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO, Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT (1980) Prognostic effect of weight-loss prior to chemotherapy in cancer-patients. *Am J Med* **69**: 491-497

Dodson S, Baracos VE, Jatoi A, Evans WJ, Cella D, Dalton JT, Steiner MS (2011) Muscle Wasting in Cancer Cachexia: Clinical Implications, Diagnosis, and Emerging Treatment Strategies. In *Annual Review of Medicine, Vol 62, 2011*, Caskey CT (ed), Vol. 62, pp 265-279. Palo Alto: Annual Reviews

Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95

Dumas J-F, Goupille C, Julienne CM, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, Servais S, Couet C (2011) Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *Journal of Hepatology* **54**: 320-327

Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Fandeur L, Bougnoux P, Servais S, Couet C (2010) N-3 PUFA-Enriched Diet Delays the Occurrence of Cancer Cachexia in Rat With Peritoneal Carcinosis. *Nutr Cancer* **62**: 343-350

Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P (2004) Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj* **1670**: 126-131

Dunnington DJ, Buscarino C, Gennaro D, Greig R, Poste G (1987) Characterization of an animal-model of metastatic colon-carcinoma. *Int J Cancer* **39**: 248-254

## E

Echtay KS, Esteves TC, Pakay JL, Jekabsons MB, Lambert AJ, Portero-Otin M, Pamplona R, Vidal-Puig AJ, Wang S, Roebuck SJ, Brand MD (2003) A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *Embo J* **22**: 4103-4110

Echtay KS, Liu QY, Caskey T, Winkler E, Frischmuth K, Bienengraber M, Klingenberg M (1999) Regulation of UCP3 by nucleotides is different from regulation of UCP1. *FEBS Lett* **450**: 8-12

Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, Harper JA, Roebuck SJ, Morrison A, Pickering S, Clapham JC, Brand MD (2002) Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**: 96-99

Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M (2001) Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H<sup>+</sup> transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 1416-1421

Eden E, Edstrom S, Bennegard K, Schersten T, Lundholm K (1984) Glucose flux in relation to energy-expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. *Cancer Res* **44**: 1718-1724

Egner A, Jakobs S, Hell SW (2002) Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 3370-3375

Enerback S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, Kozak LP (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature* **387**: 90-94

Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Fanelli FR, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R, Anker SD, Boyce A, Nuckolls G (2008) Cachexia: A new definition. *Clin Nutr* **27**: 793-799

Evans WK, Makuch R, Clamon GH, Feld R, Weiner RS, Moran E, Blum R, Shepherd FA, Jeejeebhoy KN, Dewys WD (1985) Limited impact of total parenteral-nutrition on nutritional-status during treatment for small cell lung-cancer. *Cancer Res* **45**: 3347-3353

## F

Falconer JS, Fearon KCH, Plester CE, Ross JA, Carter DC (1994) Cytokines, the acute-phase response, and resting energy-expenditure in cachectic patients with pancreatic-cancer. *Ann Surg* **219**: 325-331

Fan J, Char D, Bagby GJ, Gelato MC, Lang CH (1995) Regulation of insulin-like growth-factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by tumor-necrosis-factor. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* **269**: R1204-R1212

Faurschou M, Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**: 1317-1327

Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S, Baracos VE (2011) Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol* **12**: 489-495

Fearon KCH (1992) The mechanisms and treatment of weight-loss in cancer. *Proc Nutr Soc* **51**: 251-265

Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A (1993) Tumor-necrosis-factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin-receptor and its substrates. *J Biol Chem* **268**: 26055-26058

Fleury C, Neverova M, Collins S, Raimbault S, Champigny O, LeviMeyrueis C, Bouillaud F, Seldin MF, Surwit RS, Ricquier D, Warden CH (1997) Uncoupling protein-2: A novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nature Genet* **15**: 269-272

Fontaine EM, Moussa M, Devin A, Garcia J, Ghisolfi J, Rigoulet M, Leverve XM (1996) Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1276**: 181-187

Forman HJ, Azzi A (1997) On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: Thoughts regarding its role in pathophysiology. *Faseb J* **11**: 374-375

Fouladiun M, Korner U, Bosaeus I, Daneryd P, Hylander A, Lundholm KG (2005) Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care - Correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer* **103**: 2189-2198

Fouque D, Kalantar-Zadeh K, Kopple J, Cano N, Chauveau P, Cuppari L, Franch H, Guarnieri G, Ikizler TA, Kaysen G, Lindholm B, Massy Z, Mitch W, Pineda E, Stenvinkel P, Trevinho-Becerra A, Wanner C (2008) A proposed nomenclature and diagnostic criteria for protein-energy wasting in acute and chronic kidney disease. *Kidney Int* **73**: 391-398

Frank V, Kadenbach B (1996) Regulation of the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. *FEBS Lett* **382**: 121-124

Fredrix E, Soeters PB, Wouters EFM, Deerenberg IM, Vonmeyenfeldt MF, Saris WHM (1991) Effect of different tumor types on resting energy-expenditure. *Cancer Res* **51**: 6138-6141

Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends BiochemSci* **25**: 319-324

Frost RA, Lang CH (2005) Skeletal muscle cytokines: regulation by pathogen-associated molecules and catabolic hormones. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**: 255-263

Fujita J, Tsujinaka T, Yano M, Ebisui C, Saito H, Katsume A, Akamatsu K, Ohsugi Y, Shiozaki H, Monden M (1996) Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways. *Int J Cancer* **68**: 637-643

## G

Gabay C, Kushner I (1999) Mechanisms of disease: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* **340**: 448-454

Gebert N, Joshi AS, Kutik S, Becker T, McKenzie M, Guan XL, Mooga VP, Stroud DA, Kulkarni G, Wenk MR, Rehling P, Meisinger C, Ryan MT, Wiedemann N, Greenberg ML, Pfanner N (2009) Mitochondrial Cardiolipin Involved in Outer-Membrane Protein Biogenesis: Implications for Barth Syndrome. *Curr Biol* **19**: 2133-2139

Gomes-Marcondes MCC, Tisdale MJ (2002) Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett* **180**: 69-74

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 14440-14445

Gosker HR, Engelen M, van Mameren H, van Dijk PJ, van der Vusse GJ, Wouters EFM, Schols A (2002) Muscle fiber type IX atrophy is involved in the loss of fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Clinical Nutrition* **76**: 113-119

Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO, Jablons D (1992) Interleukin 6 reduces lipoprotein-lipase activity in adipose-tissue of mice invivo and in 3T3-L1 adipocytes - a possible role for interleukin-6 in cancer cachexia. *Cancer Res* **52**: 4113-4116

Greene AA (1960) Oxidative phosphorylation in liver mitochondria of the rat bearing Walker carcinoma 256. *Cancer Res* **20**: 233-236

Greene AA, Haven FL (1957) Cytochrome oxidase in the liver of the rat bearing Walker carcinoma 256. *Cancer Res* **17**: 613-617

Grosvenor M, Bulcavage L, Chlebowski RT (1989) Symptoms potentially influencing weight-loss in a cancer population - correlations with primary site, nutritional-status, and chemotherapy administration. *Cancer* **63**: 330-334

Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollock A, Moser A, Friedman J, Feingold KR (1996) Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters - A role for leptin in the anorexia of infection. *J Clin Invest* **97**: 2152-2157

Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY, Baldwin AS (2000) NF-kappa B-induced loss of MyoD messenger RNA: Possible role in muscle decay and cachexia. *Science* **289**: 2363-2366

## H

Haines TH, Dencher NA (2002) Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **528**: 35-39

Harner M, Korner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W (2011) The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *Embo J* **30**: 4356-4370

Heaton GM, Wagenvoort RJ, Kemp A, Nicholls DG (1978) Brown-adipose-tissue mitochondria - photoaffinity labeling of regulatory site of energy-dissipation. *Eur J Biochem* **82**: 515-521

Heymsfield SB, McManus CB (1985) Tissue-components of weight-loss in cancer-patients - a new method of study and preliminary-observations. *Cancer* **55**: 238-249

Hinkle PC, Butow RA, Racker E, Chance B (1967) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XV. Reverse electron transfer in the flavin-cytochrome beta region of the respiratory chain of beef heart submitochondrial particles. *The Journal of biological chemistry* **242**: 5169-5173

Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA, Tisdale MJ (1998) Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res* **58**: 2359-2365

Hoch FL (1998) Minireview: Cardiolipins and mitochondrial proton-selective leakage. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **30**: 511-532

Hochman J, Fergusonmiller S, Schindler M (1985) Mobility in the mitochondrial electron-transport chain. *Biochemistry* **24**: 2509-2516

Hochwald SN, Harrison LE, Port JL, Blumberg D, Brennan MF, Burt M (1996) Depletion of high energy phosphate compounds in the tumor-bearing state and reversal after tumor resection. *Surgery* **120**: 534-541

Hoffmann HP, Avers CJ (1973) Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science (New York, NY)* **181**: 749-751

Holecek M (2002) Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutrition* **18**: 130-133

Holroyde CP, Gabuzda TG, Putnam RC, Paul P, Reichard GA (1975) Altered glucose-metabolism in metastatic carcinoma. *Cancer Res* **35**: 3710-3714

Holroyde CP, Skutches CL, Boden G, Reichard GA (1984) Glucose-metabolism in cachectic patients with colorectal-cancer. *Cancer Res* **44**: 5910-5913

Horvat S, Beyer C, Arnold S (2006) Effect of hypoxia on the transcription pattern of subunit isoforms and the kinetics of cytochrome c oxidase in cortical astrocytes and cerebellar neurons. *J Neurochem* **99**: 937-951

Hosler JP, Ferguson-Miller S, Mills DA (2006) Energy transduction: Proton transfer through the respiratory complexes. In *Annual Review of Biochemistry* Vol. 75, pp 165-187. Palo Alto: Annual Reviews

Huang H, Zhang X, Li S, Liu N, Lian W, McDowell E, Zhou P, Zhao C, Guo H, Zhang C, Yang C, Wen G, Dong X, Lu L, Ma N, Dong W, Dou QP, Wang X, Liu J (2010) Physiological levels of ATP negatively regulate proteasome function. *Cell Research* **20**: 1372-1385

## I / J

Illner K, Brinkmann G, Heller M, Bosy-Westphal A, Muller MJ (2000) Metabolically active components of fat free mass and resting energy expenditure in nonobese adults. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **278**: E308-E315

Jackman RW, Kandarian SC (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol-Cell Physiol* **287**: C834-C843

Jakobisiak M, Lasek W, Golab J (2003) Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* **90**: 103-122

Jeevanandam M, Horowitz GD, Lowry SF, Brennan MF (1986) Cancer cachexia and the rate of whole-body lipolysis in man. *Metab-Clin Exp* **35**: 304-310

Jegou S, Mounien L, Boutelet I, Vaudry H (2003) [The YY3-36 peptide, a new therapeutic weapon against obesity?]. *Medecine sciences : M/S* **19**: 537-539

Jezeq P, Hlavata L (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int J Biochem Cell Biol* **37**: 2478-2503

Johnson G, Salle A, Lorimier G, Laccourreye L, Enon B, Blin V, Jousset Y, Arnaud J-P, Malthiery Y, Simard G, Ritz P (2008) Cancer cachexia: Measured and predicted resting energy expenditures for nutritional needs evaluation. *Nutrition* **24**: 443-450

## K

Kadenbach B (2003) Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1604**: 77-94

Kadenbach B, Ramzan R, Wen L, Vogt S (2010) New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj* **1800**: 205-212

Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, Jiang JF, Stoyanovsky DA, Wipf P, Kochanek PM, Greenberger JS, Pitt B, Shvedova AA, Borisenko G (2009) Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med* **46**: 1439-1453

- Kalra PR, Tigas S (2002) Regulation of lipolysis: natriuretic peptides and the development of cachexia. *Int J Cardiol* **85**: 125-132
- Kamp F, Hamilton JA (1992) pH gradients across phospholipid-membranes caused by fast flip-flop of unionized fatty-acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 11367-11370
- Kates M, Syz JY, Gosser D, Haines TH (1993) pH-dissociation characteristics of cardiolipin and its 2'-deoxy analog. *Lipids* **28**: 877-882
- Kemik O, Sumer A, Kemik AS, Hasirci I, Purisa S, Dulger AC, Demiriz B, Tuzun S (2010) The relationship among acute-phase response proteins, cytokines and hormones in cachectic patients with colon cancer. *World J Surg Oncol* **8**
- Kim JW, Dang CV (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* **66**: 8927-8930
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* **3**: 177-185
- Koea JB, Shaw JHF (1992) The effect of tumor bulk on the metabolic response to cancer. *Ann Surg* **215**: 282-288
- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Kohler G (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**: 339-342
- Koshkin V, Greenberg ML (2000) Oxidative phosphorylation in cardiolipin-lacking yeast mitochondria. *Biochem J* **347**: 687-691
- Krause F, Reifschneider NH, Goto S, Dencher NA (2005) Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **329**: 583-590
- Krauss S, Zhang CY, Lowell BB (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 248-261
- Kudin AP, Bimpong-Buta NYB, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 4127-4135
- Kunz WS, Kudin A, Vielhaber S, Elger CE, Attardi G, Villani G (2000) Flux control of cytochrome c oxidase in human skeletal muscle. *J Biol Chem* **275**: 27741-27745
- Kussmaul L, Hirst J (2006) The mechanism of superoxide production by NADH : ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7607-7612

## L

Ladner KJ, Caliguri MA, Guttridge DC (2003) Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF-kappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem* **278**: 2294-2303

Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, ViguierBascands N, LeviMeyrueis C, Fleury C, Pecqueur C, Nibbelink M, Andre M, Casteilla L, Ricquier D (1997) Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 760-764

Latres E, Amini AR, Amini AA, Griffiths J, Martin FJ, Wei Y, Lin HC, Yancopoulos GD, Glass DJ (2005) 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**: 2737-2744

Lebovitz RM, Zhang HJ, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu NF, Huang S, Matzuk MM (1996) Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9782-9787

Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J* **18**: 39-51

Lee I, Salomon AR, Ficarro S, Mathes I, Lottspeich F, Grossman LI, Huttemann M (2005a) cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem* **280**: 6094-6100

Lee J, Kim CH, Simon DK, Aminova LR, Andreyev AY, Kushnareva YE, Murphy AN, Lonze BE, Kim KS, Ginty DD, Ferrante RJ, Ryu H, Ratan RR (2005b) Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival. *J Biol Chem* **280**: 40398-40401

Lewis MI, Li HY, Huang ZS, Biring MS, Cercek BJ, Fournier M (2003) Influence of varying degrees of malnutrition on IGF-I expression in the rat diaphragm. *J Appl Physiol* **95**: 555-562

Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR, Reid MB (1998) Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappa B activation in response to tumor necrosis factor alpha. *Faseb J* **12**: 871-880

Lieffers JR, Mourtzakis M, Hall KD, McCargar LJ, Prado CMM, Baracos VE (2009) A visceraally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands. *American Journal of Clinical Nutrition* **89**: 1173-1179

Lin WW, Karin M (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* **117**: 1175-1183

Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R, Sun LQ (2007a) Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Cancer Gene Ther* **14**: 945-952

Liu X, Gong X, Hicks DB, Krulwich TA, Yu L, Yu C-A (2007b) Interaction between cytochrome caa(3) and F1F0-ATP synthase of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 is demonstrated by saturation transfer electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry assays. *Biochemistry* **46**: 306-313

Liu YB, Fiskum G, Schubert D (2002) Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**: 780-787

Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano J, Garcia-Martinez C, Busquets S, Alvarez B, Agell N, Costelli P, Lopez-Soriano FJ, Celada A, Argiles JM (1998) Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer Lett* **133**: 83-87

Lorite MJ, Smith HJ, Arnold JA, Morris A, Thompson MG, Tisdale MJ (2001) Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). *Br J Cancer* **85**: 297-302

Lowrie AG, Wigmore SJ, Wright DJ, Waddell ID, Ross JA (2006) Dermcidin expression in hepatic cells improves survival without N-glycosylation, but requires asparagine residues. *Br J Cancer* **94**: 1663-1671

## M

Macchioni L, Davidescu M, Mannucci R, Francescangeli E, Nicoletti I, Roberti R, Corazzi L (2011) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disposal in cardiolipin-enriched brain mitochondria is due to increased cytochrome c peroxidase activity. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1811**: 203-208

Mailloux RJ, Harper M-E (2011) Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* **51**: 1106-1115

Mantena SK, King AL, Andringa KK, Eccleston HB, Bailey SM (2008) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radic Biol Med* **44**: 1259-1272

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* **23**: 549-555

Mao WG, Yu XX, Zhong A, Li WL, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan GH (1999) UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells. *FEBS Lett* **443**: 326-330

- Marks DL, Ling N, Cone RD (2001) Role of the central melanocortin system in cachexia. *Cancer Res* **61**: 1432-1438
- Martignoni ME, Kunze P, Hildebrandt W, Kunzli B, Berberat P, Giese T, Kloters O, Hammer J, Buchler MW, Giese NA, Friess H (2005) Role of mononuclear cells and inflammatory cytokines in pancreatic cancer-related cachexia. *Clin Cancer Res* **11**: 5802-5808
- Martin F, Caignard A, Jeannin JF, Leclerc A, Martin M (1983) Selection by trypsin of 2-sublines of rat colon cancer-cells forming progressive or regressive tumors. *Int J Cancer* **32**: 623-627
- Martin F, Knobel S, Martin M, Bordes M (1975) Carcinofetal antigen located on membrane of cells from rat intestinal carcinoma in culture. *Cancer Res* **35**: 333-336
- Martin F, Santolaria F, Batista N, Milena A, Gonzalez-Reimers E, Brito MJ, Oramas J (1999) Cytokine levels (IL-6 and INF-gamma), acute phase response and nutritional status as prognostic factors in lung cancer. *Cytokine* **11**: 80-86
- Martindale JL, Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**: 1-15
- Masuno H, Yamasaki N, Okuda H (1981) Purification and characterization of a lipolytic factor (toxohormone-I) from cell-free fluid of ascites sarcoma-180. *Cancer Res* **41**: 284-288
- McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R (2006) Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappa B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* **209**: 501-514
- McMillan DC (2009) Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **12**: 223-226
- Mitchell CS, Savage DB, Dufour S, Schoenmakers N, Murgatroyd P, Befroy D, Halsall D, Northcott S, Raymond-Barker P, Curran S, Henning E, Keogh J, Owen P, Lazarus J, Rothman DL, Farooqi IS, Shulman GI, Chatterjee K, Petersen KF (2010) Resistance to thyroid hormone is associated with raised energy expenditure, muscle mitochondrial uncoupling, and hyperphagia. *J Clin Invest* **120**: 1345-1354
- Mitchell P (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**: 144-148
- Mokranjac D, Popov-Celeketic D, Hell K, Neupert W (2005) Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J Biol Chem* **280**: 23437-23440
- Monitto CL, Dong SM, Jen J, Sidransky D (2004) Characterization of a human homologue of proteolysis-inducing factor and its role in cancer cachexia. *Clin Cancer Res* **10**: 5862-5869
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**: 289-295

Moses AWG, Slater C, Preston T, Barber MD, Fearon KCH (2004) Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer* **90**: 996-1002

Moylan JS, Smith JD, Chambers MA, McLoughlin TJ, Reid MB (2008) TNF induction of atrogen-1/MAFbx mRNA depends on Foxo4 expression but not AKT-Foxo1/3 signaling. *Am J Physiol-Cell Physiol* **295**: C986-C993

Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13

Murphy MP, Brand MD (1988) The stoichiometry of charge translocation by cytochrome-oxidase and the cytochrome-bc1 complex of mitochondria at high membrane-potential. *Eur J Biochem* **173**: 645-651

Murphy MP, Echtay KS, Blaikie FH, Asin-Cayuela J, Cocheme HM, Green K, Buckingham JA, Taylor ER, Hurrell F, Hughes G, Miwa S, Cooper CE, Svistunenko DA, Smith RAJ, Brand MD (2003) Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation - Studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *J Biol Chem* **278**: 48534-48545

Murphy RA, Wilke MS, Perrine M, Pawlowicz M, Mourtzakis M, Lieffers JR, Maneshgar M, Bruera E, Clandinin MT, Baracos VE, Mazurak VC (2010) Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: Relationship to survival in advanced cancer patients. *Clin Nutr* **29**: 482-487

Musatov A (2006) Contribution of peroxidized cardiolipin to inactivation of bovine heart cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med* **41**: 238-246

Muscaritoli M, Anker SD, Argiles J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, Boirie Y, Bosaeus I, Cederholm T, Costelli P, Fearon KC, Laviano A, Maggio M, Fanelli FR, Schneider SM, Schols A, Sieber CC (2010) Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". *Clin Nutr* **29**: 154-159

## N

Nachlas MM, Tsou KC, De Souza E, Cheng CS, Seligman AM (1957) Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **5**: 420-436

Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S (2001) A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* **409**: 194-198

Nedergaard J, Cannon B (2003) The 'novel' 'ncoupling' proteins UCP2 and UCP3: what do they really do? Pros and cons for suggested functions. *Exp Physiol* **88**: 65-84

Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. In *Annual Review of Biochemistry* Vol. 76, pp 723-749. Palo Alto: Annual Reviews

Nguyen T, Oghi M, Johnson JA (2008) Delta Protein Kinase C Interacts with the d Subunit of the F1F0 ATPase in Neonatal Cardiac Myocytes Exposed to Hypoxia or Phorbol Ester Implications for F1F0 ATPase regulation. *J Biol Chem* **283**: 29831-29840

Nicholls DG (1976) Bioenergetics of brown adipose-tissue mitochondria. *FEBS Lett* **61**: 103-110

Niswender KD, Schwartz MW (2003) Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front Neuroendocrinol* **24**: 1-10

Noguchi Y, Vydelingum NA, Younes RN, Fried SK, Brennan MF (1991) Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein-lipase activity and messenger-rna levels. *Cancer Res* **51**: 863-869

Nogueira V, Walter L, Averet N, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve XM (2002) Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **34**: 55-66

## O / P

Ohtsuka T, Nishijima M, Suzuki K, Akamatsu Y (1993) Mitochondrial dysfunction of a cultured chinese-hamster ovary cell mutant deficient in cardiolipin. *J Biol Chem* **268**: 22914-22919

Oshea PS, Petrone G, Casey RP, Azzi A (1984) The current-voltage relationships of liposomes and mitochondria. *Biochem J* **219**: 719-726

Papa S, Capitanio N, Villani G (1998) A cooperative model for protonmotive heme-copper oxidases. The role of heme a in the proton pump of cytochrome c oxidase. *FEBS Lett* **439**: 1-8

Papa S, Lorusso M, Di Paola M (2006) Cooperativity and flexibility of the protonmotive activity of mitochondrial respiratory chain. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1757**: 428-436

Papa S, Scacco S, De Rasmio D, Signorile A, Papa F, Panelli D, Nicastro A, Scaringi R, Santeramo A, Roca E, Trentadue R, Larizza M (2010) cAMP-dependent protein kinase regulates post-translational processing and expression of complex I subunits in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1797**: 649-658

Papa S, Zanotti F, Cocco T, Perrucci C, Candita C, Minuto M (1996) Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial F0F1 ATP synthase. *Eur J Biochem* **240**: 461-467

- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM (2004) Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart - Involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *CircRes* **94**: 53-59
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2000) The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain on the cytochrome c oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Lett* **466**: 323-326
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Ruggiero FM (2001) Reactive oxygen species generated by the mitochondrial respiratory chain affect the complex III activity via cardiolipin peroxidation in beef-heart submitochondrial particles. *Mitochondrion* **1**: 151-159
- Paradies G, Petrosillo G, Ruggiero FM (1997) Cardiolipin-dependent decrease of cytochrome c oxidase activity in heart mitochondria from hypothyroid rats. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1319**: 5-8
- Paradies G, Ruggiero FM, Dinoi P (1991) The influence of hypothyroidism on the transport of phosphate and on the lipid-composition in rat-liver mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1070**: 180-186
- Parker N, Vidal-Puig A, Brand MD (2008) Stimulation of mitochondrial proton conductance by hydroxynonenal requires a high membrane potential. *Bioscience Reports* **28**: 83-88
- Paumard P, Vaillier J, Couлары B, Schaeffer J, Soubannier V, Mueller DM, Brethes D, di Rago JP, Velours J (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J* **21**: 221-230
- Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trezeguet V, Lauquin GJM, Brandolin R (2003) Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractylolide. *Nature* **426**: 39-44
- Penna F, Minero VG, Costamagna D, Bonelli G, Baccino FM, Costelli P (2010) Anti-cytokine strategies for the treatment of cancer-related anorexia and cachexia. *Expert Opin Biol Ther* **10**: 1241-1250
- Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP (2003) Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochem Soc Trans* **31**: 1312-1315
- Perumal SS, Shanthi P, Sachdanandam P (2005) Energy-modulating vitamins--a new combinatorial therapy prevents cancer cachexia in rat mammary carcinoma. *The British journal of nutrition* **93**: 901-909
- Petit JM, Maftah A, Ratinaud MH, Julien R (1992) N-10-nonyl acridine-orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated-mitochondria. *Eur J Biochem* **209**: 267-273
- Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FA, Ferri D, Paradies G (2007) Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement

of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1767**: 1260-1267

Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML, Schagger H (2003) Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* **278**: 52873-52880

Piccotti L, Marchetti C, Migliorati G, Roberti R, Corazzi L (2002) Exogenous phospholipids specifically affect transmembrane potential of brain mitochondria and cytochrome c release. *J Biol Chem* **277**: 12075-12081

Pietrobon D, Azzone GF, Walz D (1981) Effect of funiculosin and antimycin-a on the redox-driven h<sup>+</sup>-pumps in mitochondria - on the nature of leaks. *Eur J Biochem* **117**: 389-394

Pirovano M, Maltoni M, Nanni O, Marinari M, Indelli M, Zaninetta G, Petrella V, Barni S, Zecca E, Scarpi E, Labianca R, Amadori D, Luporini G, Italian M, Study Grp Palliat C (1999) A new palliative prognostic score: A first step for the staging of terminally ill cancer patients. *J Pain Symptom Manage* **17**: 231-239

Porter RK, Brand MD (1993) Body-mass dependence of H<sup>+</sup> leak in mitochondria and its relevance to metabolic-rate. *Nature* **362**: 628-630

Porter RK, Hulbert AJ, Brand MD (1996) Allometry of mitochondrial proton leak: Influence of membrane surface area and fatty acid composition. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* **271**: R1550-R1560

Prentice AM, Coward WA, Davies HL, Murgatroyd PR, Black AE, Goldberg GR, Ashford J, Sawyer M, Whitehead RG (1985) Unexpectedly low-levels of energy-expenditure in healthy women. *Lancet* **1**: 1419-1422

Pressoir M, Desne S, Berchery D, Rossignol G, Poiree B, Meslier M, Traversier S, Vittot M, Simon M, Gekiere JP, Meuric J, Serot F, Falewee MN, Rodrigues I, Senesse P, Vasson MP, Chelle F, Maget B, Antoun S, Bachmann P (2010) Prevalence, risk factors and clinical implications of malnutrition in French Comprehensive Cancer Centres. *Br J Cancer* **102**: 966-971

Preston T, Slater C, McMillan DC, Falconer JS, Shenkin A, Fearon KCH (1998) Fibrinogen synthesis is elevated in fasting cancer patients with an acute phase response. *J Nutr* **128**: 1355-1360

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong HJ, Accili D, Spiegelman BM (2003) Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 alpha interaction. *Nature* **423**: 550-555

## Q / R

Quinlan CL, Gerencser AA, Treberg JR, Brand MD (2011) The Mechanism of Superoxide Production by the Antimycin-inhibited Mitochondrial Q-cycle. *J Biol Chem* **286**: 31361-31372

Reeds PJ, Fjeld CR, Jahoor F (1994) Do the differences between the amino-acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states. *J Nutr* **124**: 906-910

Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI (1996) Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest* **97**: 2859-2865

Rolfe DFS, Brown GC (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* **77**: 731-758

Romestaing C, Piquet MA, Letexier D, Rey B, Mourier A, Servais S, Belouze M, Rouleau V, Dautresme M, Ollivier I, Favier R, Rigoulet M, Duchamp C, Sibille B (2008) Mitochondrial adaptations to steatohepatitis induced by a methionine- and choline-deficient diet. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **294**: E110-E119

Rosen ED, Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**: 847-853

Roubenoff R, Grinspoon S, Skolnik PR, Tchetchgen E, Abad L, Spiegelman D, Knox T, Gorbach S (2002) Role of cytokines and testosterone in regulating lean body mass and resting energy expenditure in HIV-infected men. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **283**: E138-E145

Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawsonhughes B, Dinarello CA, Rosenberg IH (1994) Rheumatoid cachexia - cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest* **93**: 2379-2386

Roussel D, Lhenry F, Ecochard L, Sempore B, Rouanet JL, Favier R (2000) Differential effects of endurance training and creatine depletion on regional mitochondrial adaptations in rat skeletal muscle. *Biochem J* **350**: 547-553

Ryden M, Agustsson T, Andersson J, Bolinder J, Toft E, Arner P (2011) Adipose zinc-alpha2-glycoprotein is a catabolic marker in cancer and noncancerous states. *Journal of internal medicine*

Ryden M, Agustsson T, Laurencikiene J, Britton T, Sjolín E, Isaksson B, Permert J, Arner P (2008) Lipolysis - Not inflammation, cell death, or lipogenesis - Is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. *Cancer* **113**: 1695-1704

Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, Perbeck L, Dicker A, Arner P (2004) Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: 168-175

Ryden M, Dicker A, van Hermelen V, Hauner H, Brunberg M, Perbeck L, Lonnqvist F, Arner P (2002) Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem* **277**: 1085-1091

## S

Sakamoto K, Masuda T, Mita S, Ishiko T, Nakashima Y, Arakawa H, Egami H, Harada S, Matsushima K, Ogawa M (1992) Interleukin-8 is constitutively and commonly produced by various human carcinoma cell-lines. *Int J Clin Lab Res* **22**: 216-219

Samavati L, Lee I, Mathes I, Lottspeich F, Huttemann M (2008) Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **283**: 21134-21144

Sanchis D, Busquets S, Alvarez B, Ricquier D, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (1998) Skeletal muscle UCP2 and UCP3 gene expression in a rat cancer cachexia model. *FEBS Lett* **436**: 415-418

Sandri M, Lin JD, Handschin C, Yang WL, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL, Spiegelman BM (2006) PGC-1 alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16260-16265

Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL (2004) Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**: 399-412

Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**: 1488-1493

Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR (1997) Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: Potential role in inflammatory anorexia. *J Exp Med* **185**: 171-175

Scacco S, Vergari R, Scarpulla RC, Technikova-Dobrova Z, Sardanelli A, Lambo R, Lorusso V, Papa S (2000) cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18-kDa (IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures. *J Biol Chem* **275**: 17578-17582

Scarlett JM, Jobst EE, Enriori PJ, Bowe DD, Batra AK, Grant WF, Cowley MA, Marks DL (2007) Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. *Endocrinology* **148**: 4217-4225

Schagger H (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1555**: 154-159

Schagger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C, Brandt U (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J Biol Chem* **279**: 36349-36353

Schagger H, Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* **19**: 1777-1783

- Schersten T, Lundholm K (1972) Lysosomal enzyme activity in muscle tissue from patients with malignant tumor. *Cancer* **30**: 1246-1251
- Schlame M, Ren MD (2009) The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta-Biomembr* **1788**: 2080-2083
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML (2000) The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research* **39**: 257-288
- Schneeberger AL, Thompson RT, Driedger AA, Finley RJ, Inculet RI (1989) Effect of cancer on the in vivo energy-state of rat-liver and skeletal-muscle. *Cancer Res* **49**: 1160-1164
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**: 661-671
- Sedlak E, Robinson NC (1999) Phospholipase A(2) digestion of cardiolipin bound to bovine cytochrome c oxidase alters both activity and quaternary structure. *Biochemistry* **38**: 14966-14972
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic-enzymes by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* **269**: 23757-23763
- Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Moulin A, Berlan M, Bouloumie A, Lafontan M, Galitzky J (2002) Natriuretic peptide-dependent lipolysis in fat cells is a primate specificity. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* **283**: R257-R265
- Serviddio G, Bellanti F, Tamborra R, Rollo T, Capitanio N, Romano AD, Sastre J, Vendemiale G, Altomare E (2008) Uncoupling protein-2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia-reperfusion injury. *Gut* **57**: 957-965
- Shabalina IG, Kramarova TV, Nedergaard J, Cannon B (2006) Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively. *Biochem J* **399**: 405-414
- Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N (2003) Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* **9**: 774-778
- Simons J, Schols A, Hoefnagels JMJ, Westerterp KR, ten Velde GPM, Wouters EFM (1998) Effects of medroxyprogesterone acetate on food intake, body composition, and resting energy expenditure in patients with advanced, nonhormone-sensitive cancer - A randomized, placebo-controlled trial. *Cancer* **82**: 553-560
- Skulachev VP (1991) Fatty-acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative-phosphorylation. *FEBS Lett* **294**: 158-162
- Skulachev VP (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1363**: 100-124

Smith IJ, Aversa Z, Hasselgren PO, Pacelli F, Rosa F, Doglietto GB, Bossola M (2011) Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. *Muscle Nerve* **43**: 410-414

Smith IJ, Lecker SH, Hasselgren PO (2008) Calpain activity and muscle wasting in sepsis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **295**: E762-E771

Souza SC, de Vargas LM, Yamamoto MT, Lien P, Franciosa MD, Moss LG, Greenberg AS (1998) Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **273**: 24665-24669

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* **277**: 44784-44790

Stephens JM, Pekala PH (1991) Transcriptional repression of the glut4 and c/ebp genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor-necrosis-factor-alpha. *J Biol Chem* **266**: 21839-21845

Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO (1992) Evidence for the involvement of interleukin-6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* **89**: 1681-1684

## T

Tada T, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H, Eimoto T (1991) Immunohistochemical localization of zn-alpha-2-glycoprotein in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* **39**: 1221-1226

Taylor DD, Gerceltaylor C, Jenis LG, Devereux DF (1992) Identification of a human tumor-derived lipolysis-promoting factor. *Cancer Res* **52**: 829-834

Temparis S, Asensi M, Taillandier D, Arousseau E, Larbaud D, Obled A, Bechet D, Ferrara M, Estrela JM, Attaix D (1994) Increased atp-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal-muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res* **54**: 5568-5573

Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA (2005) Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **280**: 2847-2856

Tisdale MJ (2002) Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **2**: 862-871

Tisdale MJ (2009) Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiol Rev* **89**: 381-410

Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M (1996) Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* **379**: 739-742

Todorov PT, Deacon M, Tisdale MJ (1997) Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. *J Biol Chem* **272**: 12279-12288

Todorov PT, McDevitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I, Tisdale MJ (1998) Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. *Cancer Res* **58**: 2353-2358

Toime LJ, Brand MD (2010) Uncoupling protein-3 lowers reactive oxygen species production in isolated mitochondria. *Free Radic Biol Med* **49**: 606-611

Tonkonogi M, Walsh B, Svensson M, Sahlin K (2000) Mitochondrial function and antioxidative defence in human muscle: effects of endurance training and oxidative stress. *J Physiol-London* **528**: 379-388

Tsuburaya A, Blumberg D, Burt M, Brennan MF (1995) Energy depletion in the liver and in isolated hepatocytes of tumor-bearing animals. *Journal of Surgical Research* **59**: 421-427

Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, Tanaka K, Katsume A, Ohsugi Y, Shiozaki H, Monden M (1996) Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest* **97**: 244-249

Turina P, Rebecchi A, D'Alessandro M, Anefors S, Melandri BA (2006) Modulation of proton pumping efficiency in bacterial ATP synthases. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1757**: 320-325

## *U / V*

Ushmorov A, Hack V, Droge W (1999) Differential reconstitution of mitochondrial respiratory chain activity and plasma redox state by cysteine and ornithine in a model of cancer cachexia. *Cancer Res* **59**: 3527-3534

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 44-84

van Royen M, Carbo N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM (2000) DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun* **270**: 533-537

VidalPuig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB (1997) UCP3: An uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 79-82

Villani G, Attardi G (1997) In vivo control of respiration by cytochrome c oxidase in wild-type and mitochondrial DNA mutation-carrying human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1166-1171

## W

Wagner JG, Roth RA (2000) Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* **52**: 349-374

Walenta S, Wetterling M, Lehrke M, Schwickert G, Sundfor K, Rofstad EK, Mueller-Klieser W (2000) High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* **60**: 916-921

Wallace AM, Sattar N, McMillan DC (1998) Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients. *Clin Cancer Res* **4**: 2977-2979

White JP, Baltgalvis KA, Puppa MJ, Sato S, Baynes JW, Carson JA (2011) Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* **300**: R201-R211

Wieland BM, Stewart GD, Skipworth RJE, Sangster K, Fearon KCH, Ross JA, Reiman TJ, Easaw J, Ivourtzakis M, Kumar V, Pak BJ, Calder K, Filippato S G, Kremastinos DT, Icic MP, Baracos VE (2007) Is there a human homologue to the murine proteolysis inducing factor? *Clin Cancer Res* **13**: 4984-4992

Wigmore SJ, Plester CE, Richardson RA, Fearon KCH (1997) Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer* **75**: 106-109

Wikstrom M, Verkhovsky MI, Hummer G (2003) Water-gated mechanism of proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* **1604**: 61-65

Winkler E, Klingenberg M (1994) Effect of fatty-acids on h<sup>+</sup> transport activity of the reconstituted uncoupling protein. *J Biol Chem* **269**: 2508-2515

Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Schwartz MW (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* **280**: 1378-1383

Wyke SM, Russell ST, Tisdale MJ (2004) Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappa B activation. *Br J Cancer* **91**: 1742-1750

## Y

Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* **299**: 700-704

Yokota T, Kinugawa S, Hirabayashi K, Matsushima S, Inoue N, Ohta Y, Hamaguchi S, Sobirin MA, Ono T, Suga T, Kuroda S, Tanaka S, Terasaki F, Okita K, Tsutsui H (2009) Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol-Heart Circul Physiol* **297**: H1069-H1077

Yoskikawa T, Noguchi Y, Doi C, Makino T, Nomura K (2001) Insulin resistance in patients with cancer: Relationships with tumor site, tumor stage, body-weight loss, acute-phase response, and energy expenditure. *Nutrition* **17**: 590-593

Yu XX, Mao WG, Zhong A, Schow P, Brush J, Sherwood SW, Adams SH, Pan GH (2000) Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation. *Faseb J* **14**: 1611-1618

Yu Z, Li P, Zhang M, Hannink M, Stamler JS, Yan Z (2008) Fiber Type-Specific Nitric Oxide Protects Oxidative Myofibers against Cachectic Stimuli. *Plos One* **3**

## Z

Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R (2005) Lipolysis: pathway under construction. *Curr Opin Lipidology* **16**: 333-340

Zhou MJ, Diwu ZJ, PanchukVoloshina N, Haugland RP (1997) A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: Applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Analytical Biochemistry* **253**: 162-168

Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**: 1383-1386

Zuijdgheest-van Leeuwen SD, van den Berg JWO, Wattimena JLD, van der Gaast A, Swart GR, Wilson JHP, Dagnelie PC (2000) Lipolysis and lipid oxidation in weight-losing cancer patients and healthy subjects. *Metab-Clin Exp* **49**: 931-936

# Publications et Communications

## ❖ Publications

- **Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis.**

*Dumas JF, Goupille C, Julienne CM, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, Servais S, Couet C*

J Hepatol. 2011 Feb;54(2):320-7.

- **Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency.**

*Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Berri C, Collin A, Tesseraud S, Couet C and Servais S.*

soumis à J Cachexia Sarcopenia Muscle.

- **Increased cardiolipin content and ROS production in isolated rat liver mitochondria mimic energy wasting accompanying cancer cachexia**

*Julienne CM, Tardieu M, Pinault M, Cerclet C, Chevalier S, Bougnoux P, Labarthe F, Couet C, Servais S and Dumas JF.*

soumis à Hepatology.

## ❖ Communications orales

### **Y a-t-il un rôle du métabolisme énergétique mitochondrial dans la cachexie cancéreuse?**

Etude dans un modèle murin de carcinose péritonéale

*Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Bougnoux P, Servais S et Couet C*

4<sup>èmes</sup> Journées du Cancéropôle Grand Ouest, 19 et 20 Octobre 2009

### **Implication de la mitochondrie musculaire dans l'hypermétabolisme lors de la cachexie cancéreuse ?**

*Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Tesseraud S, Collin A, Berri C, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, Couet C et Servais S*

8<sup>ème</sup> Journées Francophones de Nutrition, 8-10 Décembre 2010.

**Cinétique d'apparition des désordres métaboliques lors de la dénutrition cancéreuse.**  
Etude dans un modèle murin de carcinose péritonéale

*Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Bougnoux P, Couet C et Servais S*

Axe Valorisation des Produits de la Mer, Cancéropôle Grand Ouest, 24-25 mars 2011.

❖ Communications écrites

**Does energy wasting in skeletal muscle mitochondria could play a role in hypermetabolism observed in cancer cachexia?** Study in a model of peritoneal carcinocis-induced cachexia

*Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Bougnoux P, Couet C et Servais S*

5th Cachexia conference, 5-8 Décembre 2009

**Les cardiolipines influencent le gaspillage énergétique dans les mitochondries hépatiques d'un modèle murin de cachexie cancéreuse.**

*Julienne CM, Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, Couet C et Servais S*

5<sup>èmes</sup> Journées du Cancéropôle Grand Ouest, 17 et 18 Octobre 2010

**La cachexie cancéreuse est associée à une limitation des capacités oxydatives des mitochondries du muscle squelettique sans altération de l'efficacité de production de l'ATP**

*Julienne CM, Dumas JF, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, Couet C et Servais S*

5<sup>ème</sup> Colloque Meetochondrie, 2-5 Mai 2011

# Annexes

## Annexe 1 : Culture Cellulaire

### Milieu RPMI

g/L

#### Sels inorganique

Calcium Nitrate	0.1
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.05
Potassium Chloride	0.4
Sodium Chloride	6.0
Sodium Phosphate Dibasic (anhydrous)	0.8

#### Acides aminés

L-Arginine	0.2
L-Asparagine (anhydrous)	0.05
L-Aspartic Acid	0.02
L-Cystine.2HC	0.07
L-Glutamic Acid	0.02
L-Glutamine	0.3
Glycine	0.01
L-Histidine	0.015
Hydroxy-L-Proline	0.02
L-Isoleucine	0.05
L-Leucine	0.05
L-Lysine.HCl	0.04
L-Methionine	0.015
L-Phenylalanine	0.015
L-Proline	0.02
L-Serine	0.03
L-Threonine	0.02
L-Tryptophan	0.005
L-Tyrosine	0.3
L-Valine	0.02

#### Vitamines

D-Biotin	0.0002
Choline Chloride	0.003
Folic Acid	0.001
myo-Inositol	0.035
Niacinamide	0.001
p-Amino Benzoic Acid	0.001
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.00025
Pyridoxine	0.001
Riboflavin	0.0002
Thiamine	0.001
Vitamin B-12	0.000005

#### Autres

D-Glucose	2.0
Glutathione (reduced)	0.001
Phenol Red	0.0053
Sodium Bicarbonate	2.0

### Dulbecco's Phosphate Buffered saline

Phosphate de potassium	1,4 mM
Phosphate de sodium	8mM
Chlorure de sodium	140mM
Chlorure de potassium	2,7mM

## Annexe 2 : Fonctionnement mitochondrial

### Tampon isolement foie

---

Saccharose	250mM
EGTA	1mM
Tris-HCl	20mM

pH 7.4

### Tampon isolement muscle

---

Saccharose	250mM
EDTA	1mM
Tris-HCl	20mM

pH 7.4

### Tampon d'activité de la cytochrome-c-oxydase tampon phosphate

---

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	50mM
--------------------------	------

pH 7.4

### Tampon de mesure de la synthèse d'ATP

---

Triéthanolamine chlorohydrate	50mM
EDTA	3,75mM
$\text{MgCl}_2$	0,1%

pH 7,4

### Tampon de respiration

---

KCl	120mM
EGTA	1mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5mM
HEPES	3mM
$\text{MgCl}_2$	2mM
Sérum albumine	0,3%

pH 7.4

### Tampon de mesure de la production de ROS

---

Saccharose	250mM
EGTA	0,1mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,5mM
Tris-HCl	20mM
$\text{MgCl}_2$	2mM
Sérum albumine	0,3%

pH 7.4

## Annexe 3 : Western-Blotting

### Pour 2 gels de migration

Eau distillée	5,2mL
Tris 1M pH8,6	9mL
Acrylamide 30 %	10,4mL
Sodium dodécyl sulfate 10%	190µL

### Extemporaneément

Persulfate d'ammonium	190µL
N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthyl diamine	20µL

### Pour 2 gels de concentration

Eau distillée	5,8mL
Tris 1M pH6,8	1,3mL
Acrylamide 30 %	880µL
Sodium dodécyl sulfate 10%	45µL

### Extemporaneément

Persulfate d'ammonium	45µL
N,N,N',N'-tétra-méthyl-éthyl diamine	8µL

### Tampon réducteur ou bleu de charge

Tris-HCl	125mM
Glycérol	20%
B-mercaptoéthanol	10%
Sodium dodécyl sulfate	4,6%
Bleu de bromophénol	0,002%

### Tampon de lavage

DPBS
Tween 20 0,05%
pH 11

### Tampon d'électrophorèse

Tris-base	25mM
Glycine	92mM
Sodium dodécyl sulfate	0,1%

pH 8,3

### Tampon de transfert

<i>3-(CyclohexylAmino)-1-Propane Sulfonique</i> ou CAPS	2mM
Méthanol	10%

pH 11

## Annexe 4 : Amorces de qPCR

**Tableau: Description des amorces utilisées pour les études par qPCR.**

Gènes d'intérêt	Amorces	Séquences	Numéro d'accèsion	Taille du fragments (pb)	Efficacité
Atrogin-1	sens	5' TTA TGC ACG CTG GTC CAG A 3'	NM_13352	170	1.92
	anti-sens	5' TGT AAG CAC ACA GGC AGG TC 3'			
MurF1	sens	5' GGT GCC TAC TTG CTC CTT GT 3'	NM_080903	203	2.07
	anti-sens	5' TCA CCT GGT GGC TGT TTT C 3'			
UCP2	sens	5' ACA AGA CCA TTG CAC GAG AG 3'	AB010743	293	2.12
	anti-sens	5' CAT GGT CAG GGC ACA GTG GC 3'			
UCP3	sens	5' GTG ACC TAT GAC ATC ATC AAG GA 3'	NM_013167	89	2.01
	anti-sens	5' GCT CCA AAG GCA GAG ACA AAG 3'			

# Articles

*Revised article (minor revision) submitted February 9 2012 to JCSM*

*JCSM-D-11-00028R1*

**Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle  
mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production  
efficiency**

Julienne C.M.<sup>1,2</sup>, Dumas JF.<sup>1,2</sup>, Goupille C.<sup>1,3</sup>, Pinault M.<sup>1,2</sup>, Berri C.<sup>4</sup>, Collin A.<sup>4</sup>, Tesseraud  
S.<sup>4</sup>,  
Couet C.<sup>1,2,3</sup> and Servais S.<sup>1,2,5</sup>.

<sup>1</sup> INSERM U921, Nutrition, Croissance et Cancer, 37032 Tours, France

<sup>2</sup> Université François Rabelais, 37032 Tours, France

<sup>3</sup> CHRU Bretonneau, Tours, F-37044 France

<sup>4</sup> INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly, France.

<sup>5</sup> IUT, Tours, F-37082 France

## **Abstract**

*Background* Cancer cachexia is a complex syndrome related to a negative energy balance resulting in muscle wasting. Implication of muscle mitochondrial bioenergetics alterations during cancer cachexia was suggested. Therefore the aim of this study was to explore the efficiency of oxidative phosphorylation in skeletal muscle mitochondria in a preclinical model of cancer cachexia.

*Methods* BDIX rats with peritoneal carcinosis (PC) were used as a model of cancer cachexia with healthy pair-fed rats (PF) as control. Hindlimb muscle morphology and fibre type composition were analysed in parallel with ubiquitin ligases and UCP gene expression. Oxidative phosphorylation was investigated in isolated muscle mitochondria by measuring oxygen consumption and ATP synthesis rate.

*Results* PC rat underwent significant muscle wasting affecting fast glycolytic muscles due to a reduction in fibre cross sectional area. MuRF-1 and MAFbx gene expression were significantly increased (9 and 3.5 fold, respectively) in the muscle of PC compared to PF rats. Oxygen consumption in non-phosphorylating state and the ATP/O were similar in both groups. Muscle UCP2 gene was overexpressed in PC rats. State III and uncoupled state were significantly lower in muscle mitochondria from PC rats with a parallel reduction in complex IV activity (-30%).

*Conclusion* This study demonstrated that there was neither alteration in ATP synthesis efficiency nor mitochondrial uncoupling in skeletal muscle of cachectic rats despite UCP2 gene overexpression. Muscle mitochondrial oxidative capacities were reduced due to a decrease in complex IV activity. This mitochondrial bioenergetics alteration could participate to insulin resistance, lipid droplet accumulation and lactate production.

**Keywords:** muscle atrophy, PROb-BDIX model, energy wasting, cardiolipin, UCP, COX IV

## Introduction

Cancer cachexia is a complex syndrome that encompasses a wide range of metabolic, hormonal and cytokine-related abnormalities leading to a negative energy balance due to both anorexia and hypermetabolism resulting in a wasting syndrome. The accelerated breakdown of muscle and adipose tissues providing substrates to the host and the tumour is responsible for the depletion of lipid and protein stores and account for most of the weight loss (1). Skeletal muscle atrophy is a major factor involved in cancer cachexia since it contributes to physical disability, weakness, decreased capacity of wound healing and reduces responsiveness to chemotherapy. Skeletal muscle loss in cancer cachexia is due to fibre atrophy, which seems to affect predominantly glycolytic fibres (2, 3). Research efforts have led to better understanding of the molecular and signalling mechanisms responsible for skeletal muscle atrophy in cancer cachexia. Studies in animals (4) as well as in human (5) emphasize ubiquitin-proteasome pathway as the main mechanism for myofibrillar proteins degradation. Muscle atrophy F box (MAFbx)/atrogin 1 and muscle RING finger 1 (MuRF1), muscle-specific E3 ligases with function in protein ubiquitination, have been shown to mediate proteasome-dependent protein degradation in cancer cachexia (4, 6). The ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis is an ATP requiring process. Therefore, we can logically wonder how muscle mitochondria deals with this high energy needs for proteolysis in cancer cachexia. The mitochondrial respiratory chain ATP synthesis by the  $F_1F_0$ ATP synthase is coupled to oxygen consumption (oxidation). The coupling of the oxidative phosphorylation is modulated in order to maintain energy homeostasis with a compromise between the rate and efficiency of ATP synthesis. During high energy demand, the cost for a high rate of ATP synthesis in mitochondria is a decreased efficiency. These processes represent energy wasting since all oxygen consumed will not be converted into ATP (7, 8). In this way, we can hypothesize that in a situation of high muscle proteolysis as in cancer cachexia, muscle mitochondria could be the place of energy wasting. If energy wasting (reduction in ATP production efficiency) is occurring in skeletal muscle mitochondria, it could participate significantly to cancer cachexia by increasing energy expenditure since skeletal muscle accounts for 15 to 30 % of the basal energy expenditure (9).

Pioneer indirect evidences for a reduction in oxidative phosphorylation efficiency in skeletal muscle mitochondria in cancer cachexia came from studies reporting uncoupling protein 2 and 3 (UCP) genes overexpression in skeletal muscle in animal model of cancer cachexia (10-15) as well as in patients with cancer (16), or other wasting diseases (17). Overexpression of UCP2 and 3 were considered by these authors as possibly associated to mitochondrial

uncoupling, but never experimentally proved. Recently, Constantinou and collaborators (15), using *in vivo*  $^{31}\text{P}$  nuclear magnetic resonance, published interesting data reinforcing the idea that muscle energy production capacities are affected in cancer cachexia. Indeed, skeletal muscle ATP synthesis rate was significantly reduced in mouse model of cancer cachexia. However, to our knowledge, only one study has investigated muscle mitochondrial respiratory chain function in a rat cancer cachexia model (18). Ushmorov and co-workers found a reduction in oxygen consumption in phosphorylating state (with ATP synthesis) in isolated skeletal muscle mitochondria but data on ATP synthesis efficiency and energy wasting were lacking. Another recent study reported a reduction in cytochrome c oxidase IV (COX IV) protein expression in skeletal muscle of ApcMin/+ cachectic mice (19). Despite these indirect evidences and arguments, efficiency of skeletal muscle mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer cachexia is still unexplored while it can significantly affect energy balance. Therefore, the aim of this study was to determine if efficiency of oxidative phosphorylation is impaired in skeletal muscle mitochondria in a preclinical model of cancer cachexia in rat.

## **Experimental Procedures**

### **Animal care and experimental design**

The present investigation received the agreement of the French Ethic Committee “Region Centre” and was performed in accordance with the French guiding principles in the care and use of animals. Twenty healthy immunocompetent male Berlin-Druckrey IX (BDIX) rats were supplied by Charles River laboratories (L’Arbresle, France) at 8 weeks of age ( $195 \pm 2$  g). After arrival, the rats were housed three per cage and were fed ad libitum and weighed weekly.

We used the PROb-BDIX model of cancer cachexia as described previously (20). At 9 weeks of age, rats were individually housed and acclimated for 2 weeks. During this period body weight and food intake were measured every two days. Then, rats were divided into 3 groups as follows: i) one fed ad libitum with tumour inoculation (peritoneal carcinosis, PC; n=10) that received a single IP injection of  $10^6$  of PROb cells in 1 ml of RPMI 1640 medium (20), ii) one healthy group fed ad libitum, received an IP injection of 1 ml of RPMI 1640 medium without tumour inoculation (Hal; n=10), and iii) one healthy group pair-fed to PC rats (PF, n=10). PF rats, weight-matched to PC rats, received an IP injection of 1 ml of RPMI 1640 medium without tumour inoculation. The use of a pair-fed group as control allowed us to

discriminate between the effects of anorexia and hypermetabolism related to cancer cachexia on the parameters measured in this study. The amount of food for the PF rats was based on the food intake measured every two days in PC rats until sacrifice (each PC rat was paired with a PF rat).

As we described previously (for details see (20) and (21)), when PC rats reached severe cachexia state (sacrifice time) food intake was significantly reduced (severe anorexia, -75 +/- 4% of reduction in comparison to Hal rats). Food intake reduction was progressive during peritoneal carcinosis development and became statistically significant from 24 days after cancer induction (-20%) until sacrifice (35 days after cancer induction; (75 +/- 4 %)

Body weight (ascites free) of PC rats at sacrifice was significantly lower than in Hal (305 +/- 29 vs 378 +/- 28 g, respectively) and PF rats (332 +/- 21 g) (results published in (20)). Moreover, body weight of PF rats at sacrifice time was significantly lower than in Hal group (20). Overall body weight gain was drastically reduced in PC compared to PF rats (0.02 vs 0.1 g/day/100 g of body weight, respectively (20)). At this advanced state of cancer cachexia, TNF $\alpha$  level in serum was higher in PC than in Hal and PF rats (14 fold and 27 fold respectively) with similar level between Hal and PF rats (20).

### **Tissue collection**

Each PF rat was euthanized two days after the paired PC rat, to ensure adequate food restriction period. After blood and ascites collection, muscles were rapidly removed and weighed. The right *Quadriceps* was immediately placed in ice-cold isolation medium (sucrose 250 mM, EDTA 1 mM, Tris/HCl 20 mM, pH 7.4) for mitochondrial preparation. Intermediate *Vastus* of the other *Quadriceps* was frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen for later histological analyses. Portions of *Quadriceps* muscle were frozen for RNA and other analyses. All samples were stored at -80°C until analysis.

### ***Quadriceps* fibre type and morphometry**

Serial cross-sections (12  $\mu$ m thick) of *Quadriceps* muscle were performed at -20 °C using a cryostat microtome. All staining procedures were performed according to Rémignon et al. (22). Myofibrillar ATPase activities were assessed after acidic and alkaline pre-incubation at pH 4.35 and 9.40, respectively. Succinate dehydrogenase (SDH) activity was also evaluated. Fibres were classified as type I, IIa, IIx, and IIb according to the classification procedure described by Lind and Kernell (23). Fibre number by field and fibre cross-sectional area (CSA) were determined on muscle sections stained with azorubin. For each sample, mean

CSA was determined on approximately 150 fibres in two random fields. All quantitative analyses were carried out by using a computerized image analysis system (Visilog 4.0, Noesis, Courtaboeuf, France).

### **Ubiquitin-proteasome pathway related protein and UCP 2 and 3 gene expression**

Total RNA was extracted using Trizol according to the manufacturer's recommendations. After RNase-Free DNase treatment, RNA was reverse-transcribed using Super Script II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and Random primers (Promega, Charbonnieres-les-bains, France). Quantitative real-time RT-PCRs were performed in duplicate using an ABI Prism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers chosen for studying the gene expression of two ubiquitin-protein ligases ((E3) MuRF-1 and Atrogin-1/MAFbx) and UCP2 and 3 were specifically designed and validated (Table 1). All primers were obtained from Eurogentec SA (Angers, France). The cycling conditions consisted in a denaturation step (95 °C for 10 min) and 35 cycles of amplification, including both denaturation for 15 s at 95 °C and annealing-extension for 1 min at 60 °C (62°C for UCP2). At the end of the PCR, dissociation was performed by slowly heating the samples from 60 to 95 °C and continuous recording of the decrease in SYBR Green fluorescence resulting from the dissociation of double-stranded DNA. Mean PCR efficiency for each target gene was determined by performing 5 to 6 serial dilutions of a cDNA pool. The threshold cycle (Ct), defined as the cycle at which an increase in fluorescence above a defined baseline can be first detected, was determined for each sample. The mRNA levels were estimated based on the Ct deviation of an unknown sample versus a control cDNA (consisting of a pool of rat muscle cDNA) according to the equation proposed by Pfaffl (24). Beta-actin was chosen as the reference gene to standardize data.

### **Preparation of mitochondria**

At sacrifice time, muscle mitochondria were isolated by differential centrifugation as previously described (25). After mincing, muscle was homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer (7 strokes) in isolation medium with protease subtilisin A (1 mg/g of muscle). Then, the homogenate was diluted two times and centrifuged at 800 g for 10 min. The resulting supernatant was filtered and centrifuged at 10 000 g for 10 min. The pellet of muscle mitochondria was resuspended in isolation medium and then centrifuged (10 000 g, 10 min.). The resulting pellet was resuspended in isolation medium and protein concentration was determined using the Bicinchoninic acid Assay kit (Interchim) with BSA used as a standard.

After protein concentration determination, mitochondrial solution was supplemented with 0.3% (w/v) fatty acid free BSA.

### **Mitochondria oxygen consumption**

Oxygen was measured using a Clark oxygen electrode (Hansatech, and Rank Brothers Ltd) as previously described (25). Mitochondria ( $0.2 \text{ mg.ml}^{-1}$ ) were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a respiratory reaction medium (KCl 120 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, EGTA 1 mM,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, Hepes 3 mM, pH 7.4) saturated with ambient air. Oxygen consumption rate was measured with succinate (5 mM) as substrate in presence of rotenone ( $2.5 \mu\text{M}$ , complex I inhibitor). Next, oxygen consumption in phosphorylating state (state III) was initiated by the addition of ADP ( $300 \mu\text{M}$ ). Then, oligomycin ( $2 \mu\text{g/mg}$  of protein, inhibitor of ATP synthase) was added to measure non-phosphorylating oxygen consumption rate (state IV). Afterwards, the uncoupled state of oxygen consumption was initiated by the addition of carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP,  $2 \mu\text{M}$ ). The Respiratory Control Ratio (RCR) refers to the ratio state 3 / state IV.

The integrity of isolated mitochondria was checked by addition of exogenous cytochrome c. A significant increase in oxygen consumption after cytochrome c is an index of damaged mitochondria.

### **Mitochondrial ATP synthesis**

The rate of ATP synthesis was followed by glucose 6-phosphate accumulation using an ADP regenerating system based on hexokinase plus glucose and ATP as previously described (21). The respiratory reaction medium as described above was supplemented with 5 mM succinate,  $5 \mu\text{M}$  rotenone, 20 mM glucose, and  $125 \mu\text{M}$  ATP. ATP synthesis was modulated by a sequential increase in hexokinase concentration at  $37^\circ\text{C}$ . Glucose 6-phosphate formation was monitored from NADPH content by spectrophotometry at 340 nm.

### **Determination of cytochrom c oxydase protein expression by Western Blotting**

Equal amounts of *Quadriceps* mitochondrial proteins ( $5 \mu\text{g}$ ) were boiled in the loading buffer and resolved by 12.5 % SDS polyacrylamide gels. For immunoblotting, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon P transfert membrane; Millipore) with 3-(cyclohexylamino)-1-propane sulfonic acid electroblotting buffer for 2 h at 150 mA. The blot was blocked overnight in a blocking buffer (5 % non-fat milk in phosphate buffered saline solution; PBS), washed three times in PBS-Tween 20 for 5 min, and probed

for 2h at room temperature with a monoclonal antibody anti-Complex IV (1:20,000; Mitosciences). The blot was washed three times for 5 min in PBS-Tween 20 and probed for 1 h at room temperature with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:3,000; SouthernBiotech). Signals were visualized on high-performance chemiluminescence film (Sigma) using an enhanced chemiluminescence procedure (Amersham France). The membranes were scanned and the signals were analyzed with Quantity One software (Bio-Rad).

### **Cytochrome c Oxidase activity**

Cytochrome c oxidase (COX) activity was measured by spectrophotometry in isolated *Quadriceps* mitochondria (10 µg of protein) as previously described (26).

### **Cardiolipin content**

Cardiolipins were quantified by incubating (10 min, 37°C) 0.2 mg mitochondrial protein in 2 ml of isolation medium containing increasing concentrations of 10-N-nonyl acridine orange (NAO; 80-150 µM) (21). Then, samples were centrifuged at 10000 g for 10 min and unbound NAO was measured in supernatants with a fluorescence spectrophotometer (Hitachi) (excitation-emission: 496–530 nm). The amount of dyes bound was calculated by subtracting the amount found in the supernatant from the total added amount.

### **Statistical analysis**

Data are presented as mean +/- standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed by using Graph Pad Prism®. Differences between groups were analyzed by non parametric Mann-Whitney test. Correlations were analyzed by Spearman non parametric test. Differences of  $p < 0.05$  were considered significant.

## **Results**

### *Peritoneal carcinosis induces muscle wasting.*

Muscle loss was evaluated on main hindlimb muscles, with various compositions in fibre type, as *Quadriceps* (Quad), *Extensor digitorum longus* (EDL), *Gastrocnemius* (Gast), *Plantaris* (PL), *Soleus* (Sol), and *Tibialis anterior* (TA). There was no effect of calorie restriction per se (PF rats vs Hal rats) on the 6 muscles weights (Table 2). All muscles but

slow oxidative *Soleus* had a significant weight reduction (from 7 to 10 %) in PC rats compared to PF rats (Table 2).

*Muscle loss is due to fibre atrophy and is related to an up-regulation of ubiquitin proteasome related genes.*

Gene expression of MuRF-1 and MAFbx in Quadriceps was largely significantly increased in PC rats compared to PF and Hal rats (Figure 1).

Analysis of fibre type composition and cross sectional area (CSA) in Quadriceps muscle demonstrated a significant reduction in fibre CSA in PC rats in comparison to PF rats (Figure 2). PC rats had a significant increase in proportion of fibres with CSA of 500 to 1000  $\mu\text{m}$  and 1000 to 1500  $\mu\text{m}$  (6 fold and 2 fold increase, respectively) in comparison to PF rats. At the opposite, the % of larger fibres ( $> 5500\mu\text{m}$ ) was lower in PC rats than in PF rats (5500 to 6000  $\mu\text{m}$ : 3 fold with  $p < 0.05$  and  $> 6000 \mu\text{m}$ : 4 fold with  $p = 0.055$ ) (Figure 2a). Compared to PF rats, the mean CSA area of type IIa/IIx and IIb fibres in the Quadriceps of PC rats were significantly reduced (-27 % and -33 %, respectively; Figure 2b).

*Evidences for muscle mitochondria bioenergetics alterations in cachectic rats.*

The linear relationship between ATP synthesis rate and oxygen consumption (ATP/O) was similar between PC and PF rats (Figure 3) since intercept and slope of the two regression lines were not different. However, the oxygen consumption at the highest hexokinase concentration (highest ATP synthesis rate) was significantly lower in PC compared to PF (649 +/- 36 and 846 +/- 36 nAtoms O.min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>, respectively,  $p = 0.004$ ). In the same way, at the highest oxygen consumption common to PC and PF rats of the ATP to oxygen consumption relationship, ATP synthesis rate was reduced by 20 % in PC rats compared to PF rats, without reaching statistically significant difference.

Oxygen consumption of *Quadriceps* mitochondria in phosphorylating state (state III) and uncoupled state (with FCCP) was significantly reduced (-20 % and -16 %, respectively) in PC rats compared to PF rats (Table 3). These differences between PC and PF rats were not due to damages induced by mitochondrial isolation procedure. In fact, cytochrome c stimulation of oxygen consumption (%) was low and similar in both groups (PC: 8.8 +/- 3.5 and PF: 7.0 +/- 3.4). The oxygen consumption in non-phosphorylating state (state IV, with oligomycin) in PC rats was not different from PF rats. Respiratory control ratio (state III to state IV ratio) of skeletal muscle mitochondria was not affected by peritoneal carcinosis-induced cachexia

(Table 3). *Quadriceps* UCP2 gene expression was 3.7 times higher in PC rats compared to PF rats. However, UCP3 gene expression was similar between both groups (Figure 4).

*Reduction in muscle mitochondrial oxidative capacities is due to reduction in cytochrome c oxidase activity.*

Cytochrome c oxidase (complex IV) expression was similar in PC and PF rats (Figure 5a and 5b). The activity of complex IV was significantly reduced by 30 % in PC rats compared to PF rats (Figure 5c). There was a positive significant correlation ( $R^2$ : 0.74,  $p$ = 0.033) between complex IV activity and maximal oxygen consumption (uncoupled state) (Figure 6). This correlation was the same when complex IV activity was determined by oxygraphy (with TMPD ascorbate as substrate,  $R^2$ : 0.8,  $p$ = 0.01, data not shown).

*Lower oxidative capacities are not associated to cardiolipin content modification*

Cardiolipin content in *Quadriceps* mitochondria was similar in PC and PF rats (respectively, 177 +/- 9 vs 182 +/- 10 nmol.mg of protein<sup>-1</sup>).

## **Discussion**

Cancer cachexia is the consequence of a negative energy balance due to both anorexia and hypermetabolism, resulting in a wasting syndrome. Skeletal muscle atrophy is a main target of cancer cachexia. Direct and indirect evidences suggested the implication of mitochondrial bioenergetics disorders in muscle loss during cancer cachexia. Hypotheses about these bioenergetics disorders are mitochondrial uncoupling and/or alteration of ATP synthesis rate. Therefore, the aim of this study was to determine if efficiency of oxidative phosphorylation is impaired in skeletal muscle mitochondria in a preclinical model of cancer cachexia in rat.

We had previously validated the model of cancer induced by peritoneal carcinosis in BD IX rats (20). It is a useful preclinical model in cancer cachexia field because peritoneal carcinosis is a serious clinical situation with a poor prognosis that is frequent in several cancer types, such as ovarian, pancreatic, stomach, or colorectal cancers. We have demonstrated the occurrence of hallmarks of the syndrome: anorexia, systemic inflammation, white adipose and skeletal muscle wasting. Furthermore, the use of pair-fed rats demonstrated the presence of a hypermetabolism (20). The first step of the present study was to check if the model of peritoneal carcinosis-induced cachexia in BD IX rats was presenting the main specific characteristics of muscle wasting described in animal and human studies. Focusing on main

hindlimb muscles as *Quadriceps* (Quad), *Extensor digitorum longus* (EDL), *Gastrocnemius* (Gast), *Plantaris* (PL), *Soleus* (Sol), and *Tibialis anterior* (TA) that presented various compositions in fibre type, we found that the *Soleus* was the only muscle unaffected by peritoneal carcinosis. These results are in agreement with previous studies reporting that fast glycolytic muscles are more susceptible to wasting in cancer cachexia (27). Muscle wasting in the present study was associated to large increase in the expression of two major genes involved in the ubiquitin proteasome system, MuRF-1 and MAFbx, in quadriceps PC rats in comparison to Hal and PF rats as reported by numerous studies (4, 6).

Since there was no difference between Hal and PF rats in muscle weight and proteolysis related gene expression we chosen to use PF rats as control for PC rats for the analysis of the following data. Moreover, the aim of the present study was to investigate if energy wasting (reduction in ATP production efficiency) was occurring in skeletal muscle mitochondria keeping in mind that it could contribute to cancer cachexia related hypermetabolism. In this way, the pair-fed group allowed us to discriminate between the effects of anorexia and hypermetabolism related to cancer cachexia on the parameters measured in this study.

Muscle morphology study indicates that muscle loss observed in rat with peritoneal carcinosis was due to a reduction in fibre CSA rather than in its number. From these data we can conclude that peritoneal carcinosis induction in BDIX rats reached all characteristics of cancer cachexia since in addition to what we described previously (20), there was a clear muscle atrophy affecting fast-twitch fibres associated to large up-regulation of the ubiquitin proteasome pathway. Thus the PROb-BDIX model is a suitable model to investigate mechanisms involved in cancer cachexia and specifically to study mitochondrial bioenergetics in *Quadriceps* muscle wasting.

In order to elucidate if there are alterations in energy production yield in skeletal muscle mitochondria in cancer cachexia we performed a complete analysis of mitochondrial bioenergetics. Our study is the first investigating efficiency of oxidative phosphorylation, in isolated skeletal muscle mitochondria in a preclinical cancer cachexia model. The ATP synthesis efficiency was sought by measuring the relationship between oxygen consumption and ATP synthesis rate (ATP/O). The ATP/O was similar between PC and PF rats. Therefore we clearly demonstrated that ATP synthesis efficiency was unchanged in *Quadriceps* mitochondria in our rat model of cancer cachexia (Figure 3).

The absence of alteration in oxidative phosphorylation efficiency in PC rats compared to PF rats is contradictory with the previously suggested mitochondrial uncoupling (by UCPs) reported in skeletal muscle (10-12, 14-16). In our study, the absence of mitochondrial

uncoupling was confirmed by the similar oxygen consumption in non-phosphorylating state (state IV) in PC rats and PF rats. In fact, state IV is described as the oxygen consumption necessary to compensate loss of electrochemical gradient, considered as uncoupling due to proton leak. Moreover, respiratory control ratio (state III / state IV) of skeletal muscle mitochondria was not affected by peritoneal carcinosis-induced cachexia. Absence of uncoupling was concomitant with overexpression of UCP2 gene in skeletal muscle in PC rats compared to PF. Surprisingly there was not difference in UCP3 expression. This later data needs to be compared with study that had designed pair-fed groups as calorie restriction is well known to increase UCP2 and UCP3 expression (28, 29). Since PF rats had a significant increase of 74 % in UCP3 gene expression in comparison to Hal rats (data not shown) our study is in agreement with studies reporting that UCP3 gene expression is related to calorie intake (10, 11). As mitochondrial uncoupling is unlikely, our data clearly questioned the role of UCP2 in skeletal muscle during cancer cachexia. Physiological and pathological roles of UCP2 and 3 are still a large subject of debate (30). However, we can highlight the suggested function of UCP2 as antioxidant defence by reducing mitochondrial reactive oxygen species production (ROS) (31, 32). To reinforce this potential antioxidant role of UCP2, we have shown that there was no difference in *Quadriceps* mitochondrial ROS production in PC and PF rats (data not shown).

Even though the global analysis (slope and intercept) of ATP/O indicates no alteration in ATP synthesis efficiency, some difference come to the light. In this way, the oxygen consumption at the highest hexokinase concentration (highest ATP synthesis rate) was significantly lower in PC compared to PF (Figure 3). In the same way, at the highest oxygen consumption common to PC and PF rats of ATP/O, ATP synthesis rate was reduced by 20 % in PC rats compared to PF rats, without reaching statistically significant difference. Our data are in agreement with the significant reduction in skeletal muscle ATP synthesis rate, measured *in vivo* by <sup>31</sup>P NMR, in mice implanted with Lewis lung carcinoma (15). This suggest that the reduction in the rate of ATP synthesis observed *in vivo* is rather due to a reduction in the respiratory chain activity than an alteration of the ATP synthesis efficiency.

We confirmed the reduction in respiratory chain activity by performing oxygraphic measurement on isolated mitochondria. In fact, *Quadriceps* mitochondrial oxygen consumption in phosphorylating state and in uncoupled state was significantly reduced in PC rats compared to PF rats. These data clearly demonstrate a lower muscle mitochondrial oxidative capacities in PC rats compared to PF suggesting alterations in content and/or activity of respiratory chain complexes. Because complex IV is one of the main regulator

oxidative phosphorylation in skeletal muscle (33), we measured activity and protein content of this respiratory complex. While complex IV expression was unaffected by cancer cachexia, activity was significantly decrease in PC compared to PF rats. Such dysfunctions were reported by Ushmurov and collaborators (18) with C57BL/6 mice bearing fibrosarcoma MCA-105 as model of cancer cachexia. These authors demonstrated that in phosphorylating state, skeletal muscle mitochondria from tumour bearing mice displayed significant reduction in oxygen consumption at complexes II-III and IV in comparison to control mice. More specifically, as the protocol was set by Ushmurov and co-workers, the measurement of “complexes II-III” activities was in fact “complex II-III-IV” activities since complex IV is the final electron acceptor of the respiratory chain. Thus by reporting around the same % of reduction (-20 and -25 %) in the activities of complexes “II-III-IV” and IV alone, these authors provided evidence for an alteration in complex IV activity in skeletal muscle isolated mitochondria from cachectic animals in complete accordance with our data. We confirmed the specific implication of complex IV in oxidative capacities reduction with a positive significant correlation between COX activity and uncoupled state oxygen consumption (Figure 6).

Among regulators of complex IV activity, cardiolipins, a specific phospholipid class of mitochondrial membranes, have been clearly identified (34). In the present study, the cardiolipin content in *Quadriceps* mitochondria was not affected by cancer cachexia. As oxidative stress was clearly associated to muscle wasting (3) we cannot exclude the occurrence of cardiolipin peroxidation that was reported to affect COX activity (35). Direct oxidative damages of complex IV by lipid-derived protein adducts (4-HNE and MDA) cannot be rule out since protein oxidative damages were reported in gastrocnemius muscle in AH-130 Yoshida hepatoma rat model (3). However, these authors found ATP synthase as the only oxidative phosphorylation related protein affected by lipid peroxidation byproducts. Lastly, because COX activity is known to be regulated by ATP (36) we can hypothesize that reduction in COX is due to a higher allosteric ATP – inhibition by modulation of COX phosphorylation.

A reduced mitochondrial oxidative capacity in muscle during cancer cachexia is somehow paradoxical since proteolysis by the ubiquitin proteasome system is ATP dependant. In this condition additional ATP supply is produced by anaerobic glycolytic energy pathways with lactate production. Thus skeletal muscle mitochondrial alterations could participate significantly to the increase in plasma lactate concentration supplying the futile Cori cycle that participate to the increase in whole body energy needs. Moreover, we can speculate that

reduction in skeletal muscle oxidative capacities could play a significant role in i) lipid droplet accumulation (37) and ii) insulin resistance (38) that are occurring during cancer cachexia (1).

## **Conclusion**

The PROb-BDIX rat model is suitable to investigate mechanisms involved in cancer cachexia and specifically in muscle wasting and potential implication of mitochondrial bioenergetics alterations. Moreover, this model can be used to test nutritional and pharmacological strategies to limit muscle atrophy in cancer cachexia. First, our study confirms that skeletal muscle mitochondrial bioenergetics alterations are present in cancer cachexia. The nature of these alterations is not related to energy wasting but to a reduction in mitochondrial oxidative capacities due to a decrease in complex IV activity. This could be responsible for a reduction in ATP production in muscle mitochondria without modification of ATP synthesis efficiency. The present study brings new pieces in the puzzle of mitochondrial implication in muscle wasting. Mechanisms implicated in the reduction in muscle mitochondrial complex IV activity in cachectic rat need to be fully explored.

## **Acknowledgments**

This work was supported by Ligue Contre le Cancer (committee 37 and 28) and “Conseil Régional de la Région Centre”. Julienne C.M. PhD was supported by “Conseil Régional de la Région Centre”. Dumas J.F. was supported by a grant from “Conseil Régional de la Région Centre” and “Société Francophone Nutrition Clinique et Métabolisme » (SFNEP). Goupille C. was supported by CHRU Bretonneau Tours.

The authors thank Sabine Crochet and Thierry Bordeau (INRA, UR83 Recherches Avicoles, F-37380 Nouzilly) for their skilled technical assistance, and Valérie Schnubel, George Roseau, Jérôme Montharu and Michele Demonte for their help in animal care at the animal facility (College of Medicine).

The authors of this manuscript certify that they complied with the Ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of cachexia, Sarcopenia and Muscle (39).

**Conflicts of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

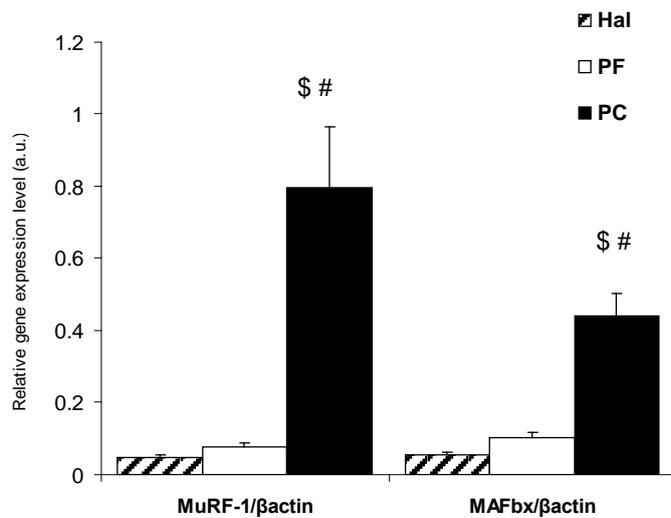
## References

1. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev* 2009;89(2):381-410.
2. Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, Wang H, Saji M, Carathers M, et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell* 2005;8(5):421-32.
3. Marin-Corral J, Fontes CC, Pascual-Guardia S, Sanchez F, Oliván M, Argiles JM, et al. Redox balance and carbonylated proteins in limb and heart muscles of cachectic rats. *Antioxid Redox Signal* 2010;12(3):365-80.
4. Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Busquets S. Mechanisms to explain wasting of muscle and fat in cancer cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 2007;1(4):293-8.
5. Khal J, Hine AV, Fearon KC, Dejong CH, Tisdale MJ. Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(10):2196-206.
6. Attaix D, Combaret L, Bechet D, Taillandier D. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy in cachexia. *Curr Opin Support Palliat Care* 2008;2(4):262-6.
7. Nogueira V, Rigoulet M, Piquet MA, Devin A, Fontaine E, Leverve XM. Mitochondrial respiratory chain adjustment to cellular energy demand. *J Biol Chem* 2001;276(49):46104-10.
8. Leverve XM. Mitochondrial function and substrate availability. *Crit Care Med* 2007;35(9 Suppl):S454-60.
9. Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997;77(3):731-58.
10. Sanchis D, Busquets S, Alvarez B, Ricquier D, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Skeletal muscle UCP2 and UCP3 gene expression in a rat cancer cachexia model. *FEBS Lett* 1998;436(3):415-8.
11. Bing C, Brown M, King P, Collins P, Tisdale MJ, Williams G. Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. *Cancer Res* 2000;60(9):2405-10.
12. Busquets S, Carbo N, Almendro V, Figueras M, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM. Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia? *FEBS Lett* 2001;505(2):255-8.
13. Bing C, Russell ST, Beckett EE, Collins P, Taylor S, Barraclough R, et al. Expression of uncoupling proteins-1, -2 and -3 mRNA is induced by an adenocarcinoma-derived lipid-mobilizing factor. *Br J Cancer* 2002;86(4):612-8.
14. Busquets S, Almendro V, Barreiro E, Figueras M, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Activation of UCPs gene expression in skeletal muscle can be independent on both circulating fatty acids and food intake. Involvement of ROS in a model of mouse cancer cachexia. *FEBS Lett* 2005;579(3):717-22.
15. Constantinou C, Fontes de Oliveira CC, Mintzopoulos D, Busquets S, He J, Kesarwani M, et al. Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. *Int J Mol Med* 2011;27(1):15-24.
16. Collins P, Bing C, McCulloch P, Williams G. Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans. *Br J Cancer* 2002;86(3):372-5.
17. Tzika AA, Mintzopoulos D, Mindrinos M, Zhang J, Rahme LG, Tompkins RG. Microarray analysis suggests that burn injury results in mitochondrial dysfunction in human skeletal muscle. *Int J Mol Med* 2009;24(3):387-92.

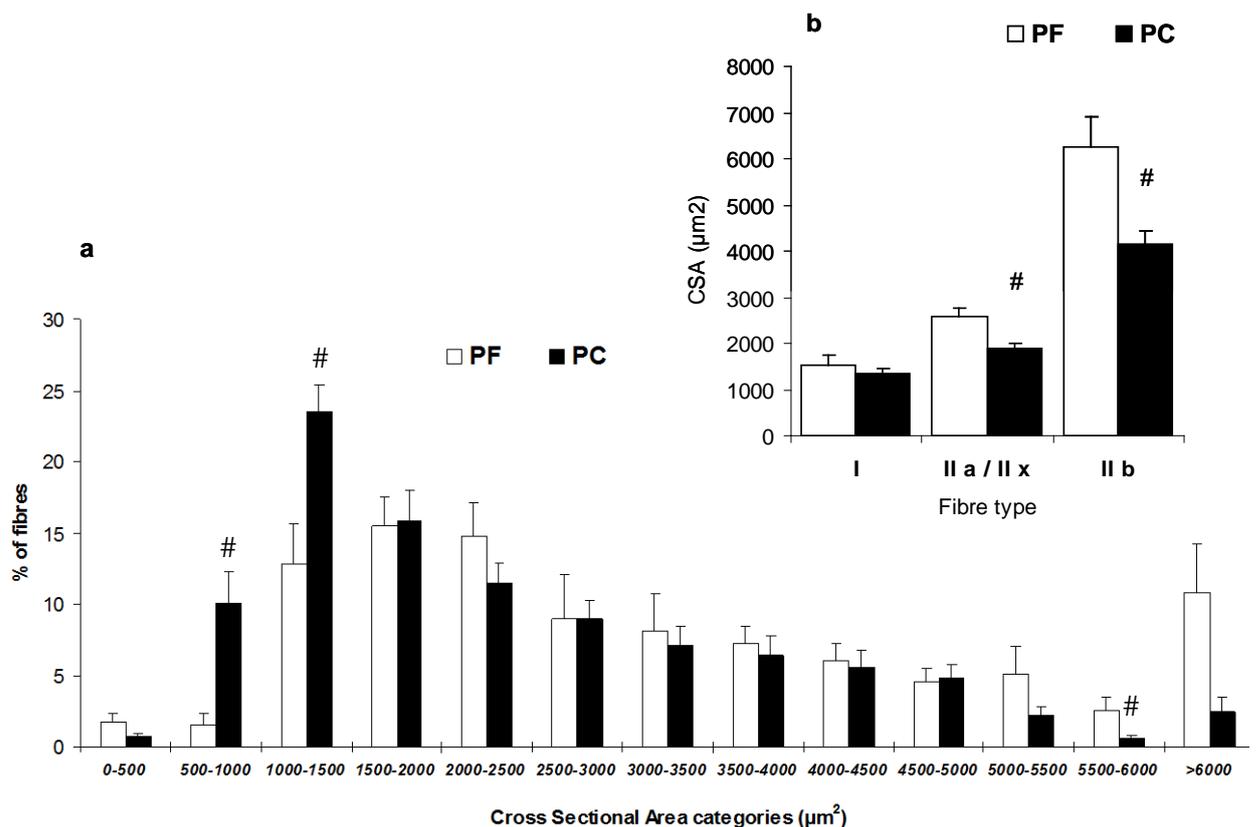
18. Ushmorov A, Hack V, Droge W. Differential reconstitution of mitochondrial respiratory chain activity and plasma redox state by cysteine and ornithine in a model of cancer cachexia. *Cancer Res* 1999;59(14):3527-34.
19. White JP, Baltgalvis KA, Puppa MJ, Sato S, Baynes JW, Carson JA. Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;300(2):R201-11.
20. Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Fandeur L, Bougnoux P, Servais S, et al. n-3 PUFA-enriched diet delays the occurrence of cancer cachexia in rat with peritoneal carcinosis. *Nutr Cancer* 2010;62(3):343-50.
21. Dumas JF, Goupille C, Julienne CM, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, et al. Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *J Hepatol* 2011;54(2):320-7.
22. Remignon H, Gardahaut MF, Marche G, Ricard FH. Selection for rapid growth increases the number and the size of muscle fibres without changing their typing in chickens. *J Muscle Res Cell Motil* 1995;16(2):95-102.
23. Lind A, Kernell D. Myofibrillar ATPase histochemistry of rat skeletal muscles: a "two-dimensional" quantitative approach. *J Histochem Cytochem* 1991;39(5):589-97.
24. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):e45.
25. Servais S, Couturier K, Koubi H, Rouanet JL, Desplanches D, Sornay-Mayet MH, et al. Effect of voluntary exercise on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *Free Radic Biol Med* 2003;35(1):24-32.
26. Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, et al. Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 2004;1670(2):126-31.
27. Acharyya S, Guttridge DC. Cancer cachexia signaling pathways continue to emerge yet much still points to the proteasome. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1356-61.
28. Asami DK, McDonald RB, Hagopian K, Horwitz BA, Warman D, Hsiao A, et al. Effect of aging, caloric restriction, and uncoupling protein 3 (UCP3) on mitochondrial proton leak in mice. *Exp Gerontol* 2008;43(12):1069-76.
29. Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, Harper ME. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;289(3):E429-38.
30. Cioffi F, Senese R, de Lange P, Goglia F, Lanni A, Lombardi A. Uncoupling proteins: a complex journey to function discovery. *Biofactors* 2009;35(5):417-28.
31. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B, et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 2000;26(4):435-9.
32. Mailloux RJ, Harper ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 2011;51(6):1106-15.
33. Rossignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP. Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* 2000;347 Pt 1:45-53.
34. Schlame M, Ren M. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788(10):2080-3.
35. Musatov A. Contribution of peroxidized cardiolipin to inactivation of bovine heart cytochrome c oxidase. *Free Radic Biol Med* 2006;41(2):238-46.

36. Kadenbach B, Ramzan R, Wen L, Vogt S. New extension of the Mitchell Theory for oxidative phosphorylation in mitochondria of living organisms. *Biochim Biophys Acta* 2010;1800(3):205-12.
37. Stephens NA, Skipworth RJ, Macdonald AJ, Greig CA, Ross JA, Fearon KC. Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients. *J Cachex Sarcopenia Muscle* 2011;2(2):111-117.
38. Dumas JF, Simard G, Flamment M, Ducluzeau PH, Ritz P. Is skeletal muscle mitochondrial dysfunction a cause or an indirect consequence of insulin resistance in humans? *Diabetes Metab* 2009;35(3):159-67.
39. Von Haehling S, Morley JE, Coats AJ, Anker SD. Ethical guidelines for authorship and publishing in the Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. *J Cachex Sarcopenia Muscle*;1(1):7-8.

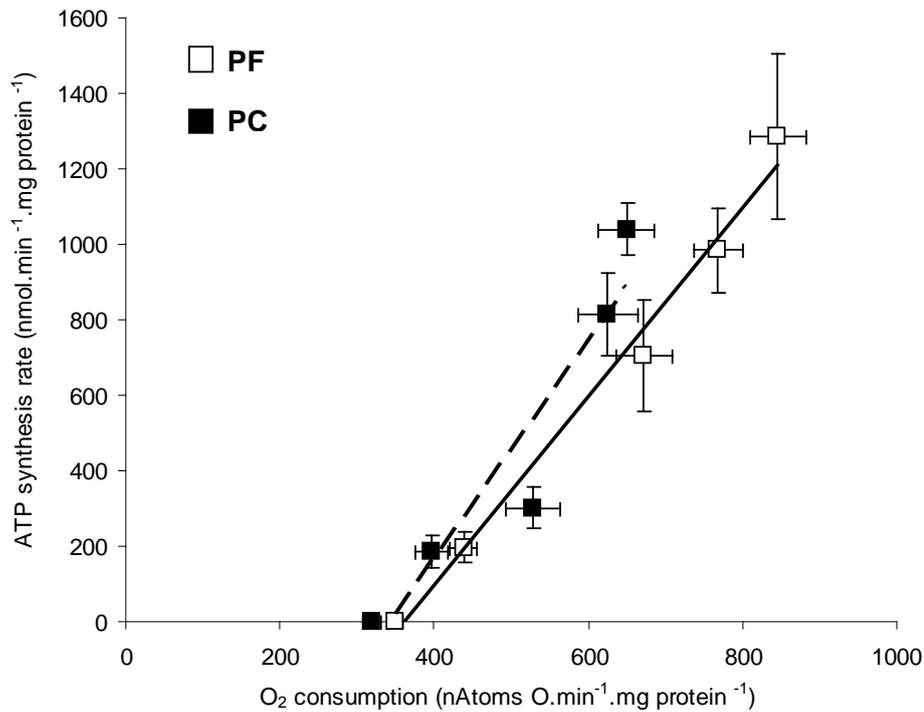
## Figures



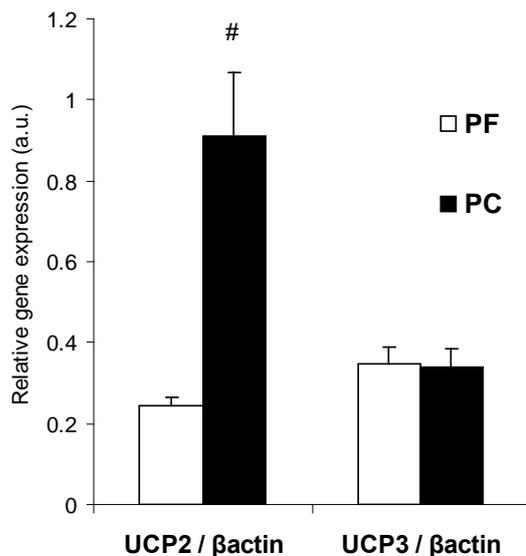
**Figure 1: Proteolysis in Quadriceps muscle from Peritoneal Carcinosis (PC), Pair-Fed (PF) and Healthy *ad libitum* (Hal) rats.** MuRF-1 and MAFbx gene expression, with PF (n=10) and PC (n=10). Gene expression levels were normalized for  $\beta$ -actin mRNA. Values are means  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . #, significantly different from PF.



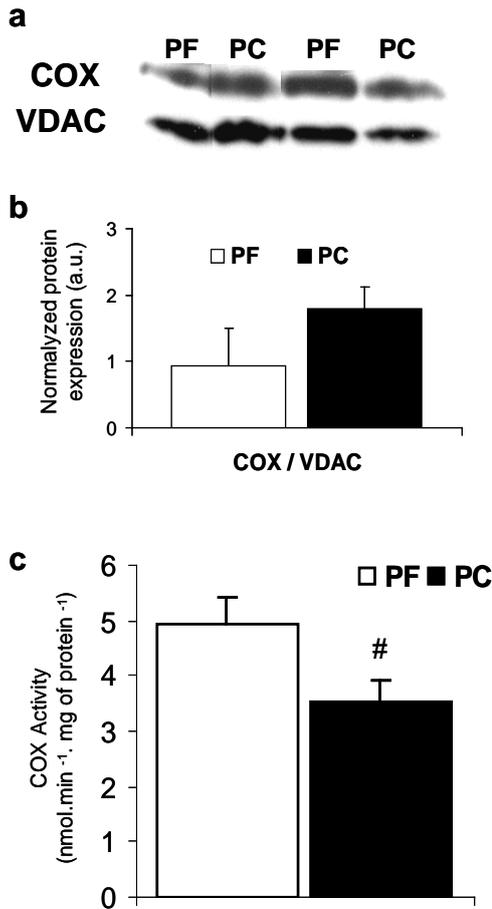
**Figure 2: Distribution of *Quadriceps* fibres according to cross sectional area (CSA) and mean cross sectional area of type I, IIa/IIx and IIb fibres in Pair-Fed (PF) and Peritoneal Carcinosis (PC) rats.** With a) distribution of Quadriceps fibres and b) mean cross sectional area. CSA were determined on approximately 150 fibres in two random fields in PF rats (n = 4) and PC rats (n = 7). Values are means  $\pm$  SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . #, significantly different from PF.



**Figure 3: Efficiency of ATP synthesis in isolated *Quadriceps* mitochondria from Pair-Fed (PF) and Peritoneal Carcinosis (PC) rats.** ATP/O: Relationship between oxygen consumption and ATP synthesis rate. With PF (n=10) and PC (n=10), ATP synthesis was measured by addition of increasing hexokinase concentration. Values are means +/- SEM.

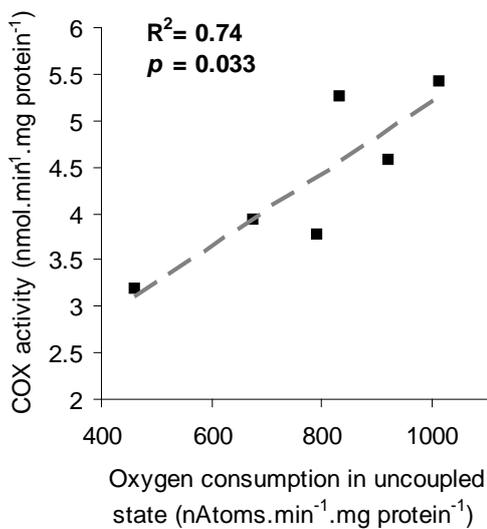


**Figure 4: UCP2 and UCP3 gene expression in isolated *Quadriceps* mitochondria from Pair-Fed (PF) and Peritoneal Carcinosis (PC) rats.** With PF (n=8) and PC (n=8). Values are means +/- SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . #, significantly different from PF.



**Figure 5: Cytochrome c oxidase (COX) protein expression and activity in isolated *Quadriceps* mitochondria from Pair-Fed (PF) and Peritoneal Carcinosis (PC) rats.** a) Western blots of COX protein expression, b) Quantification using Quantity One software (Bio-Rad) of the ratio COX / VDAC protein expression. With PF (n=6) PC (n=6), c) Enzymatic activity of COX. With PF (n=4) and PC (n=4). Values are means +/- SEM. Statistical significance set at  $p < 0.05$ . #, significantly

and  
was



**Figure 6: Relationship between cytochrome c oxidase activity and maximal oxygen consumption in uncoupled state in *Quadriceps* isolated mitochondria.** The correlation was tested by non parametric Spearman test.

## Tables

**Table 1: Oligonucleotide primer sequences used for qPCR analysis.** MAFbx: Muscle atrophy F box or atrogin 1, MuRF1: muscle RING finger 1, UCP: uncoupling protein 2 and 3.

Gene	Primers	Product size (bp)	Accession number
MuRf-1	Forward:5'GGT GCC TAC TTG CTC CTT GT3' Reverse: 5'TCA CCT GGT GGC TGT TTT C3'	203	AY059627.1
MAFbx	Forward:5'TTA TGC ACG CTG GTC CAG A3' Reverse: 5'TGT AAG CAC ACA GGC AGG TC3'	170	NM_133521
UCP2	Forward: 5'-ACA AGA CCA TTG CAC GAG AG-3' Reverse: 5'-CAT GGT CAG GGC ACA GTG GC-3'	293	AF039033
UCP3	Forward: 5'GTG ACC TAT GAC ATC ATC AAG GA3' Reverse: 5'GCT CCA AAG GCA GAG ACA AAG3'	89	NM_013167
b-actin	Forward: 5'CTG GCT CCT AGC ACC ATG AA3' Reverse: 5'CTG CTT GCT GAT CCA CAT CT5'	103	NM_031144

**Table 2: Hindlimb muscles weight in Healthy ad libitum (Hal), Pair-Fed (PF) and Peritoneal Carcinosis (PC) rats.** a) expressed in mg of muscle and b) expressed in mg per 100 g of body weight (BW). With, Quad: *Quadriceps*, EDL: *Extensor digitorum longus*, TA: *Tibialis anterior*, Sol: *Soleus*, PL: *Plantaris* and Gast: *Gastronemius*. Values are the mean of the left and right muscle weights. With Hal (n=10), PF (n=10) and PC (n=10). Values are means +/- SEM. Statistical significance was set at p < 0.05. \$: significantly different from Hal and #: significantly different from PF.

a)	Quad	EDL	TA	Sol	PL	Gast
mg						
Hal	5692 +/- 265	398 +/- 38	1261 +/- 43	259 +/- 28	559 +/- 94	3149 +/- 333
PF	5131 +/- 561	367 +/- 25	1233 +/- 64	248 +/- 14	500 +/- 39	2888 +/- 164
PC	4226 +/- 409 \$ #	309 +/- 59 \$ #	976 +/- 101 \$ #	224 +/- 32 \$ #	418 +/- 28 \$ #	2471 +/- 174 \$ #
b)						
mg/100g of BW						
Hal	1538 +/- 91	108 +/- 13	341 +/- 20	70 +/- 8	153 +/- 24	867 +/- 115
PF	1544 +/- 94	111 +/- 6	372 +/- 15	75 +/- 5	151 +/- 12	874 +/- 68
PC	1388 +/- 76 \$ #	103 +/- 27 #	322 +/- 36 #	73 +/- 6	138 +/- 11 #	814 +/- 55 #

**Table 3: Mitochondrial oxygen consumption in *Quadriceps* of Pair-Fed (PF) and Peritoneal Carcinosis (PC) rats.** With PF (n=10) and PC (n=10). The measurements were run with succinate as energy substrate. State III: phosphorylating state was performed in presence of ADP; state IV: non phosphorylating state was obtained after addition of oligomycin; uncoupled state was determined with the uncoupling reagent FCCP. The Respiratory Control Ratio (RCR) was calculated as State III / State IV. Values are means +/- SEM. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . #, significantly different from PF.

	in natoms/min/mg of proteins	State III	State IV	Uncoupled state	RCR
<b>PF</b>		600 +/- 20	137 +/- 4	603 +/- 18	4.4 +/- 0.2
<b>PC</b>		480 +/- 20 <sup>#</sup>	124 +/- 5	508 +/- 25 <sup>#</sup>	3.9 +/- 0.2

*Submitted January 17 2012 to Hepatology*

*HEP-12-0108*

**Increased cardiolipin content and ROS production in isolated rat liver mitochondria mimic energy wasting accompanying cancer cachexia**

Cloé Mimsy Julienne<sup>a, b</sup>, Marine Tardieu<sup>a, c</sup>, Stéphan Chevalier<sup>a, b</sup>, Michelle Pinault<sup>a, b</sup>,  
Cynthia Cerclet<sup>a</sup>, Philippe Bougnoux<sup>a, b, c</sup>, François Labarthe<sup>a, c</sup>, Charles Couet<sup>a, b, c</sup> Stéphane  
Servais<sup>a, b, d, 1</sup> and Jean-François Dumas<sup>a, b, 1</sup>

<sup>a</sup> INSERM U1069, “Nutrition, Growth and Cancer”, F-37032 Tours, France

<sup>b</sup> Université François Rabelais, F-37032 Tours, France

<sup>c</sup> CHRU Bretonneau, Tours, F-37044, France

<sup>d</sup> IUT, Tours, F-37082, France

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work

## Abstract

Oxidative phosphorylation efficiency was reduced in liver mitochondria of rats with cancer-induced cachexia, highlighting a specific role for the liver in this pathology. Such alteration in rat liver mitochondria was accompanied by both an accumulation of cardiolipin and an increased production of reactive oxygen species (ROS). The aim of this study was to characterize the involvement of ROS and cardiolipin in the bioenergetics changes detected in cachectic rats. We tested on isolated liver mitochondria whether comparable increases in cardiolipin content or ROS production were sufficient to mimic *in vitro* the alteration of oxidative phosphorylation efficiency measured *in vivo*. Liver mitochondria, isolated from healthy rats, were exposed to cardiolipin- or phosphatidylethanolamine-enriched liposomes and/or to exogenous xanthine/xanthine oxidase-induced ROS. The efficiency of oxidative phosphorylation and non-phosphorylating energy wasting were subsequently evaluated and assessed against the mitochondrial cardiolipin content and ROS production. *In vitro* enrichment in cardiolipin or exposure to exogenous ROS decreased the oxidative phosphorylation efficiency in liver mitochondria. The energy wasting was increased in non-phosphorylating condition upon exposures to either cardiolipin or ROS. The efficiency of oxidative phosphorylation was not further increased by ROS and cardiolipin co-treatment. However, the effect of enrichment in cardiolipin was additive to the effect of ROS on energy wasting in non-phosphorylating condition. *Conclusion:* *In vitro* increases in cardiolipin content and ROS production were able to reproduce the increased non-phosphorylating energy wasting, and part of the reduced oxidative phosphorylation efficiency, measured in liver mitochondria of rats with cancer cachexia. These mechanistic data supportive of a crucial role of cardiolipin, and ROS in liver-specific alterations, during cancer cachexia provides us with new medical opportunities to counteract this syndrome.

**Keywords:** ATP synthesis, oxidative phosphorylation, phospholipids, reactive oxygen species, undernutrition.

**Abbreviations:** ANT, adenine nucleotide translocase; CL, cardiolipin; NAO, 10-N-nonyl acridine orange; PE, phosphatidylethanolamine; ROS, reactive oxygen species; XO, xanthine oxidase.

## Introduction

Weight loss characterizes cancer cachexia which is a complex and multifactorial syndrome impairing quality of life and decreasing median survival (1-2). In cancer patients, such weight loss is characterized by a negative energy balance, due to both anorexia and increased whole body energy expenditure (3).

Several observations suggested that the liver, a highly metabolic and energetically demanding organ (4), might play an important role in increased energy expenditure associated with cancer cachexia. Firstly, liver mass was increased in both advanced colorectal cancer cachexia patients (5) and in a preclinical model of cancer cachexia (6). Secondly, liver mitochondrial energy metabolism was altered in several rodent models of cancer cachexia (7-9). Thirdly, the efficiency of oxidative phosphorylation was decreased in the liver mitochondria of a rat model of peritoneal carcinosis with advanced cachexia (10). This suggested that liver mitochondria from cachectic rats would need to consume more nutrients than liver mitochondria from healthy rats, to maintain sufficient ATP synthesis rate.

Ninety percents of ATP required by respiring cells is produced by the mitochondrial oxidative phosphorylation (4). In this process, phosphorylation of ADP to ATP by the  $F_1F_0$ ATPase is coupled to oxygen consumption providing the final reductor of nutrients in the mitochondrial respiratory chain. However, the coupling (i.e. the efficiency of oxidative phosphorylation) is not perfect and some of the energy potential of nutrients is dissipated into heat instead of being converted into ATP. Such energy wasting is inversely correlated to the efficiency of oxidative phosphorylation but positively correlated to the quantity of used nutrients to satisfy the ATP demand. In turn, high-metabolic-rate organs such as the liver are regarded as important contributors to resting whole body energy expenditure (11) which might be increased by energy wasting.

We recently showed that the reduced efficiency of oxidative phosphorylation measured in liver mitochondria of rats with cancer cachexia was associated to increases in both cardiolipin content (a specific phospholipid of the mitochondrial inner membrane; +55%) and reactive oxygen species (ROS) production (x12 fold) (10). These *in vivo* results suggested that cardiolipin and/or ROS might be involved in liver-specific energy wasting associated to increased energy expenditure during cancer cachexia. An increase of non-phosphorylating energy wasting has been observed in isolated rat liver mitochondria exposed *in vitro* to exogenous cardiolipin (12).

The present study was carried out to detail the effects of cardiolipin and ROS on liver mitochondrial bioenergetics to provide essential mechanistic data characterizing the role of the liver in cancer-induced cachexia. We tested on isolated liver mitochondria equivalent levels of increases in cardiolipin content or ROS production to that measured *in vivo* in the liver mitochondria of cancer cachectic rats. We also measured the effects of combined exposures of cardiolipin and ROS on liver bioenergetic parameters.

## **Materials and methods**

### **Animals and preparation of liver mitochondria**

The study, performed in accordance with the French guiding principles in the care and use of animals, was approved by the Ethic Committee (#2010-34). Sprague-Dawley male rats were supplied by Charles River laboratories (France) at 8 weeks of age. Rats were fed *ad libitum* and housed in a temperature-controlled room (22°C) with a 12h light/dark cycle. After euthanasia, livers were rapidly removed and mitochondria were isolated (10).

### **Experimental design**

A batch of isolated mitochondria was separated into 5 groups: i) no treatment (control), treated with ii) cardiolipin (CL), iii) phosphatidylethanolamine (PE), iv) 125 µM xanthine and xanthine oxidase (XOX; 0.0029 or 0.036 U) to produce exogenous ROS (ROS) (13) and v) with both cardiolipin and 125 µM xanthine and 0.036 U XOX (CL+ROS).

### **Enrichment in cardiolipin or phosphoethanolamine**

Phospholipids were incorporated to liposome membranes to allow the enrichment of liver mitochondrial membranes. Essentially as previously described (14), liposomes were prepared by sonicating 1.4 mg of CL (Sigma, St Quentin Fallavier, France) or 0.5 mg of PE (Sigma, St Quentin Fallavier, France) in 1 ml of isolation medium with the microtip probe of a Vibra Cell sonifier (mod. 75022; Bioblock, France) at 40W for 3 cycles of 2.5 min in a ice bath under N<sub>2</sub> stream. Mitochondria (2 mg) were added to 1 ml of freshly sonicated liposomes at 30°C with constant stirring to prepare the liposome–mitochondrial membrane fusion. After 8 min of incubation, phospholipid-enriched mitochondria were centrifuged at 10000 g for 10 min to remove the liposomes excess. The mitochondrial pellet was then washed and resuspended with isolation medium. The ability of exogenous fused cardiolipin to reach the

inner mitochondrial membrane has been previously described in a study using a similar protocol to enrich mitochondria with cardiolipin (15). Eighty-eight percent of the fatty acids composing the exogenously added cardiolipin were linoleic acid.

### **Mitochondrial efficiency of oxidative phosphorylation**

The kinetic response of oxygen consumption to a variation in ATP synthesis is described in the Supporting Materials and Methods.

### **Mitochondrial non-phosphorylating energy wasting**

This was determined as we previously described (16). For details see the Supporting Materials and Methods.

### **Mitochondrial reactive oxygen species production**

ROS production was evaluated by measuring of hydrogen peroxide-induced fluorescence of 1  $\mu$ M Amplex Red (Interchim, France) (10). For details see the Supporting Materials and Methods.

### **Cardiolipin content**

Cardiolipin content was measured by using of 10-N-nonyl acridine orange (NAO) as we previously described (10).

### **Other Experimental Procedures**

Cancer cachexia experiment, determination of phosphatidylethanolamine content, mitoTEMPO experiment and calcium retention capacity measurement are described in the supporting information.

### **Statistical analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Differences between groups were analyzed by Mann-Whitney test for non paired observations or Wilcoxon signed-ranked test for two related samples.  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

### **Increasing mitochondrial cardiolipin content reduced the efficiency of oxidative phosphorylation**

The cardiolipin content of liver mitochondria exposed to cardiolipin liposomes was significantly increased by  $84 \pm 6\%$  (Fig. 1A). Such an increase provoked a reduction in the efficiency of oxidative phosphorylation since the linear relationship between oxygen consumption and ATP synthesis of the CL group was shifted to the right (Fig. 1B). The intercept of the regression line were different between the two groups:  $49 \pm 2$  vs  $56 \pm 3$  in control and CL groups, respectively ( $p < 0.05$ ). Slopes of the regression lines were not different:  $2.9 \pm 0.3$  vs  $2.3 \pm 0.3$  in control and CL groups, respectively. Thus, for a given ATP synthesis rate, oxygen consumption was significantly higher in mitochondria enriched with cardiolipin than in control mitochondria. An enrichment of mitochondrial membrane with phosphatidylethanolamine, in a similar range to cardiolipin ( $81 \pm 49\%$ ), did not affect the efficiency of oxidative phosphorylation (Fig. 1C). The increased cardiolipin content was also associated to a significant increase in non-phosphorylating energy wasting since oxygen consumption dedicated to processes unrelated to ATP synthesis was increased ( $11 \pm 2\%$ ) (Fig. 1D) even if membrane potential was not significantly modified in mitochondria enriched in cardiolipin ( $184 \pm 2$  vs  $181 \pm 3$  mV in control and cardiolipin-enriched mitochondria, respectively; supplement Fig. S1A). In addition, ROS production was significantly lower ( $-11\% \pm 4\%$ ) in cardiolipin-enriched mitochondria than in control mitochondria (Fig. 1E).

### **Increasing ROS production reduced the efficiency of oxidative phosphorylation**

The effect of exogenous ROS on the efficiency of oxidative phosphorylation was tested with a high (0.036 U) and a low dose (0.0029 U) of XO. The high dose was chosen to mimic the 12-fold greater ROS production observed in rats with cancer cachexia (10). ROS production was increased by 3-fold ( $2.9 \pm 0.1$ ) with the low dose and by 14-fold ( $13.8 \pm 2.5$ ) with the high dose of XO (Fig. 2A). The efficiency of oxidative phosphorylation was decreased by ROS in liver mitochondria only for the high dose of XO (Fig. 2B and C). In turn, the linear relationship between oxygen consumption and ATP synthesis was shifted to the right in high dose XO-treated mitochondria compared to control mitochondria (Fig. 2C). The intercept of the regression lines were different between the two groups:  $49 \pm 3$  vs  $59 \pm 2$  in control and XO high dose mitochondria, respectively ( $p < 0.05$ ). Slopes of the regression lines were not

different:  $2.7 \pm 0.2$  vs  $2.4 \pm 0.3$  in control and XOX high dose group, respectively. Thus, for a given ATP synthesis rate, oxygen consumption was significantly higher in liver mitochondria incubated with high dose of XOX than control mitochondria (Fig 2C). The high dose of XOX inducing ROS, but not the low dose, was also associated to a significant increase in non-phosphorylating energy wasting since oxygen consumption dedicated to processes unrelated to ATP synthesis was increased ( $42 \pm 10\%$ ) (Fig. 2D) even if membrane potential was not significantly modified in XOX high dose-treated mitochondria ( $186 \pm 6$  vs  $191 \pm 7$  mV in control and XOX high dose group, respectively; supplement Fig. S1B and C). In these experimental conditions, exogenous ROS entered into mitochondria since the increase in non-phosphorylating oxygen consumption induced by the high dose of XOX was not present when mitoTEMPO (a mitochondria-targeted antioxidant) was added to mitochondria before or after XOX (supplement Fig. S2A and B).

### **Increasing both cardiolipin content and ROS production did not further reduce the efficiency of oxidative phosphorylation**

We next checked the combined effect of increasing ROS production (high dose of XOX) and cardiolipin content on the efficiency of oxidative phosphorylation. Cardiolipin content and ROS production were respectively increased by  $75 \pm 7\%$  (Fig 3A) and by 12-fold (Fig 3B) in mitochondria of the CL+ROS group, compared to control. As shown in figure 3C, the efficiency of oxidative phosphorylation was lower in mitochondria of CL+ROS group, compared to control. In turn, the linear relationship between oxygen consumption and ATP synthesis of the CL+ROS group was shifted to the right (Fig. 3C). The intercept of the regression lines were different between the two groups:  $42 \pm 3$  vs  $56 \pm 5$  in control and CL+ROS groups, respectively ( $p < 0.05$ ). Slopes of the regression lines were not different:  $2.2 \pm 0.5$  vs  $3.5 \pm 0.3$  in control and CL+ROS groups, respectively. In order to compare the effects modulated *in vitro* by increasing cardiolipin or ROS or cardiolipin + ROS (Figures 1B, 2C and 3C) to the effect observed in rats with cancer cachexia (10), we calculated the oxygen consumption necessary to synthesize 50 nmoles ATP/min per mg of protein in these three conditions (Table 1). Increases in oxygen consumption induced by ROS (Table 1, ROS,  $+13 \pm 8\%$ ), by cardiolipin enrichment (Table 1, CL,  $+15 \pm 6\%$ ) or by cardiolipin enrichment together with ROS production (Table 1, CL+ROS,  $+11 \pm 7\%$ ) were in the same range. Finally, neither enrichment in cardiolipin nor the increase in ROS production nor the combined effects were sufficient to completely reproduce the reduction of oxidative

phosphorylation efficiency measured during cancer cachexia ( $+25 \pm 9\%$  from (10) copied in Table 1).

### **Increasing both cardiolipin content and ROS production further stimulated non-phosphorylating energy wasting**

Increasing both cardiolipin content and ROS production also stimulated energy wasting in non-phosphorylating condition since oxygen consumption dedicated to processes unrelated to ATP synthesis was increased ( $53 \pm 9\%$ ) (Fig. 3D) even if membrane potential was not different ( $183 \pm 2$  vs  $180 \pm 3$  mV in control and CL+ROS mitochondria, respectively; supplement Fig. S1D). As shown in Table 1, increase in energy wasting-related oxygen consumption induced by CL (Table 1, CL,  $+11 \pm 2\%$ ) is lower but additive to that induced by ROS (Table 1, ROS,  $+42 \pm 10\%$ ) since the sum of each effect is similar to that measured in cardiolipin-enriched mitochondria also treated for ROS production (Table 1, CL+ROS,  $+53 \pm 10\%$ ). The energy wasting induced by cancer cachexia (Table 1, cancer cachexia,  $+22 \pm 5\%$ ) was greater than energy wasting measured *in vitro* with increased cardiolipin content, but much lower than that measured *in vitro* with induced ROS production, with or without increased cardiolipin content.

### **Non-phosphorylating energy wasting induced by cardiolipin or by ROS is partly dependent on the nature of the respiratory chain substrate**

We evaluated the role played by adenine nucleotide translocase (ANT) in the non-phosphorylating energy wasting induced by cardiolipin or ROS. As shown in figure 4A, carboxyatractyloside (CAT, a specific inhibitor of ANT) partly reduced ( $-46 \pm 10\%$ ) the effect of cardiolipin on non-phosphorylating oxygen consumption while the non-phosphorylating oxygen consumption in control mitochondria was unchanged. There was no statistically significant effect of CAT on the non-phosphorylating energy wasting stimulated by ROS (Fig. 4B).

We also tested if the non-phosphorylating energy wasting induced by cardiolipin or ROS were dependent, or not, on the nature of the respiratory chain substrate. Non-phosphorylating oxygen consumption was measured with substrates for complex 1 (glutamate/malate), for complexes 1 + 2 (glutamate/malate + succinate) and for complex 4 (TMPD/ascorbate). We found that the energy wasting induced by cardiolipin was detectable for complex 1 ( $+36 \pm 10\%$ ) and complexes 1 + 2 ( $+21 \pm 2\%$ ) but not for complex 4 (Fig. 5A). The energy wasting-related oxygen consumption was increased by ROS for complex 1 ( $2.2 \pm 0.2$ -fold) and

complexes 1 + 2 ( $+38 \pm 8\%$ ) but not for complex 4 (Fig. 5B). Non-phosphorylating energy wasting induced by cardiolipin or ROS was therefore dependent of the mitochondrial respiratory chain substrate and was not present with substrate for complex 4 only.

## Discussion

The present study showed that bioenergetics alterations occurring in the liver of cancer-induced cachectic rats (10) were reproduced *in vitro* when liver mitochondria from healthy rats were either enriched with relevant quantities of exogenous cardiolipin or exposed to physiological level of exogenous ROS. This provides with new insight on the bioenergetic alterations occurring in liver mitochondria of cancer-induced cachectic rats (10).

The 84% enrichment in cardiolipin content resulted in both a decrease in the efficiency of oxidative phosphorylation and an increase in non-phosphorylating energy wasting, reinforcing previously published data (12). Comparable quantities of added phosphatidylethanolamine, sharing with cardiolipin a common conical shape, did not induce similar effect. This suggested that incorporated cardiolipin reduced oxidative phosphorylation in cancer cachexia by non-structural effect(s). The 55% *in vivo* enrichment in cardiolipin of cachectic rat liver mitochondria (10) was associated with a reduction of oxidative phosphorylation efficiency which was the double to that provoked by the 84% *in vitro* enrichment in exogenous cardiolipin. Furthermore, *in vitro* enrichment of cardiolipin greater than 84% did not result in further decrease in oxidative phosphorylation efficiency (data not shown). It should be stressed that 88% of the fatty acids composing the exogenously added cardiolipin were linoleic acid and that linoleic acid represented only 38% of the fatty acid of the cardiolipin extracted from liver mitochondria of cachectic rat (10). Since *in vitro* changes in the quality of fatty acids composing cardiolipin might also be correlated to changes in the efficiency of oxidative phosphorylation (10, 17), this suggested that the quality of cardiolipin's fatty acids would also impact liver mitochondrial respiration in cachectic rats.

Mitochondrial cardiolipin can modify the activity of numerous mitochondrial proteins such as complex I, complex III and adenine nucleotide translocase (ANT) (18). Consistent with this, we showed that ANT might be involved in the energy wasting induced by cardiolipin in liver mitochondria. We also found difference in energy wasting between the control and the cardiolipin group with substrates for complexes 1 or 2, but not with a substrate

for complex 4. This suggested that cardiolipin enrichment acted preferentially on the proton-pump efficiency ( $H^+/2e^-$  stoichiometry) at complexes 1 and 3 or only 3.

In the present study the efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria was decreased only for continuous and high exogenous ROS production. Although ROS increased the uncoupling protein-induced energy wasting in kidney and skeletal muscle mitochondria (13), this mechanism is absent from liver mitochondria (19). In the liver, a significant fraction of the inducible uncoupling protein-induced energy wasting (especially by fatty acids) was mediated by ANT (20-22). In the present study, the addition of saturating concentration of CAT had no effect, suggesting that the effects of ROS were independent of ANT. Part of the non-phosphorylating energy wasting stimulated by exogenous ROS was dependent on the nature of the respiratory chain substrate since the effect of ROS was detected only with substrates for complex 1 or 2. ROS appeared to induce energy wasting by affecting proton-pump efficiency ( $H^+/2e^-$  stoichiometry) of complexes 1 and 3 or only 3.

Although both exogenous ROS production and added cardiolipin reduced the efficiency of oxidative phosphorylation, additive effect were not detected when exogenous ROS production was increased in cardiolipin-enriched mitochondria. It has been shown that, in liver mitochondria from hypothyroid rats, peroxidized cardiolipin content and efficiency of oxidative phosphorylation were both increased (23-24). This suggested that, *in vitro*, ROS production might peroxidize cardiolipin which would increase oxidative phosphorylation efficiency and in turn, counteract the effect of the cardiolipin + ROS co-treatment. The consequence of such cardiolipin peroxidation would also be a release of cytochrome c, a key feature of apoptosis (25). This would explain the higher susceptibility to the opening of permeability transition pore observed in liver mitochondria from rats with cancer cachexia (supplement Fig. S3). Firstly, we found no sign of alteration of respiratory chain overall activity in our experiment since maximal oxygen consumption in phosphorylating condition was not different between control and CL+ROS condition. This suggested that cytochrome c was not released. Secondly, we stimulated ROS production in cardiolipin-enriched mitochondria just at the beginning of measurement of the oxidative phosphorylation efficiency. It is therefore unlikely that peroxidation of cardiolipin modified the efficiency of oxidative phosphorylation *in vitro*.

In non-phosphorylating condition, the effect of ROS production on energy wasting was predominant but additive to the effect induced by cardiolipin. It is therefore tempting to speculate that in non-phosphorylating condition, ROS and cardiolipin act synergistically while in phosphorylating condition one of the two effects prevails. However, this also could mean

that energy wasting processes induced by ROS and/or cardiolipin observed under non-phosphorylating cannot simply be extrapolated under phosphorylating conditions. Indeed, energy wasting during oxidative phosphorylation has also been shown to depend on the flux of ATP synthesis (26). Our data therefore suggest that energy wasting processes involved in the decreased efficiency of oxidative phosphorylation induced by cardiolipin or by ROS depend 1) on the flux of ATP synthesis and 2) on the nature of the respiratory chain substrate (in addition to the role played by ANT for cardiolipin). Indeed, the intensity of energy wasting was higher for respiratory chain complex 1 substrate namely carbohydrate than for complex 2 namely fatty acids. This difference of substrate has interesting implication since liver  $\beta$ -oxidation appeared to be reduced in cancer cachexia leading to the use complex 1-related substrate for ATP production (27).

In conclusion, our *in vitro* data showed that increase in cardiolipin content and ROS production reduced the efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria, reproducing most of the bioenergetics effects observed in the liver of cancer-induced cachectic rats. Taken together, cardiolipin and ROS represent two molecular mechanisms involved in the energy wasting leading to liver-specific increased energy expenditure associated to cancer cachexia. This provides us with new nutritional and pharmacological opportunities to counteract not only this syndrome but also other diseases for which liver mitochondrial dysfunction are critical.

## **Acknowledgements**

Authors thank all the staff of the animal facilities of Faculty of Medicine for their help with animal care, as well as Pr. Jacques Pothier for HPTLC-densitometry measurement.

## References

- 1 Nitenberg G, Raynard B. Nutritional support of the cancer patient: issues and dilemmas. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;34:137-168.
- 2 Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med* 1980;69:491-497.
- 3 Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002;2:862-871.
- 4 Rolfe DF, Brown GC. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997;77:731-758.
- 5 Lieffers JR, Mourtzakis M, Hall KD, McCargar LJ, Prado CM, Baracos VE. A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1173-1179.
- 6 Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Fandeur L, Bougnoux P, Servais S, et al. n-3 PUFA-enriched diet delays the occurrence of cancer cachexia in rat with peritoneal carcinosis. *Nutr Cancer* 2010;62:343-350.
- 7 Tsuburaya A, Blumberg D, Burt M, Brennan MF. Energy depletion in the liver and in isolated hepatocytes of tumor-bearing animals. *J Surg Res* 1995;59:421-427.
- 8 Hochwald SN, Harrison LE, Port JL, Blumberg D, Brennan MF, Burt M. Depletion of high energy phosphate compounds in the tumor-bearing state and reversal after tumor resection. *Surgery* 1996;120:534-541.
- 9 Perumal SS, Shanthi P, Sachdanandam P. Energy-modulating vitamins--a new combinatorial therapy prevents cancer cachexia in rat mammary carcinoma. *Br J Nutr* 2005;93:901-909.
- 10 Dumas JF, Goupille C, Julienne CM, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, et al. Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *J Hepatol* 2011;54:320-327.
- 11 Brand MD, Brindle KM, Buckingham JA, Harper JA, Rolfe DF, Stuart JA. The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23 Suppl 6:S4-11.
- 12 Bobyleva V, Bellei M, Paziienza TL, Muscatello U. Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria. *Biochem Mol Biol Int* 1997;41:469-480.
- 13 Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002;415:96-99.
- 14 Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, et al. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta* 2007;1767:1260-1267.
- 15 Piccotti L, Marchetti C, Migliorati G, Roberti R, Corazzi L. Exogenous phospholipids specifically affect transmembrane potential of brain mitochondria and cytochrome C release. *J Biol Chem* 2002;277:12075-12081.
- 16 Roussel D, Dumas JF, Augeraud A, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, et al. Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 2003;541:75-79.
- 17 Fontaine EM, Moussa M, Devin A, Garcia J, Ghisolfi J, Rigoulet M, et al. Effect of polyunsaturated fatty acids deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1996;1276:181-187.

- 18 Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C33-44.
- 19 Larrouy D, Laharrague P, Carrera G, Viguerie-Bascands N, Levi-Meyrueis C, Fleury C, et al. Kupffer cells are a dominant site of uncoupling protein 2 expression in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:760-764.
- 20 Brustovetsky NN, Amerkanov ZG, Yegorova ME, Mokhova EN, Skulachev VP. Carboxyatractylate-sensitive uncoupling in liver mitochondria from ground squirrels during hibernation and arousal. *FEBS Lett* 1990;272:190-192.
- 21 Brustovetsky NN, Dedukhova VI, Egorova MV, Mokhova EN, Skulachev VP. Inhibitors of the ATP/ADP antiporter suppress stimulation of mitochondrial respiration and H<sup>+</sup> permeability by palmitate and anionic detergents. *FEBS Lett* 1990;272:187-189.
- 22 Shabalina IG, Kramarova TV, Nedergaard J, Cannon B. Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively. *Biochem J* 2006;399:405-414.
- 23 Nogueira V, Walter L, Averet N, Fontaine E, Rigoulet M, Leverve XM. Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *J Bioenerg Biomembr* 2002;34:55-66.
- 24 Cavallo A, Gnoni A, Conte E, Siculella L, Zanotti F, Papa S, et al. 3,5-Diiodo-L-Thyronine increases F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase activity and cardiolipin level in liver mitochondria of hypothyroid rats. *J Bioenerg Biomembr* 2011;43:349-357.
- 25 Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, Kapralov O, Tyurina YY, Tyurin VA, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med* 2009;46:1439-1453.
- 26 Fontaine EM, Devin A, Rigoulet M, Leverve XM. The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;232:532-535.
- 27 Liu S, Wu HJ, Zhang ZQ, Chen Q, Liu B, Wu JP, et al. L-carnitine ameliorates cancer cachexia in mice by regulating the expression and activity of carnitine palmityl transferase. *Cancer Biol Ther* 2011;12:125-130.

**Table 1. Comparison of effect of cardiolipin enrichment (CL), ROS production, cardiolipin + ROS production (CL+ROS) *in vitro*, and cancer cachexia, on mitochondrial oxygen consumption.**

	CL	ROS	CL+ROS	cancer cachexia
phosphorylating oxygen consumption (% change) <sup>a</sup>	15 ± 6	13 ± 8	11 ± 7	25 ± 9
non-phosphorylating oxygen consumption (% change) <sup>b</sup>	11 ± 2	42 ± 10	53 ± 9	22 ± 5

<sup>a</sup>change (% in comparison to respective control condition) in phosphorylating oxygen consumption necessary to synthesize 50 nmoles ATP/min per mg of protein. This was obtained from figures 1C, 2B and 3C and from (10). Mean ± SEM (n≥4).

<sup>b</sup>change (% in comparison to respective control condition) in non-phosphorylating oxygen consumption. This was obtained from figures 1D, 2D and 3D and from (10).

## Figures

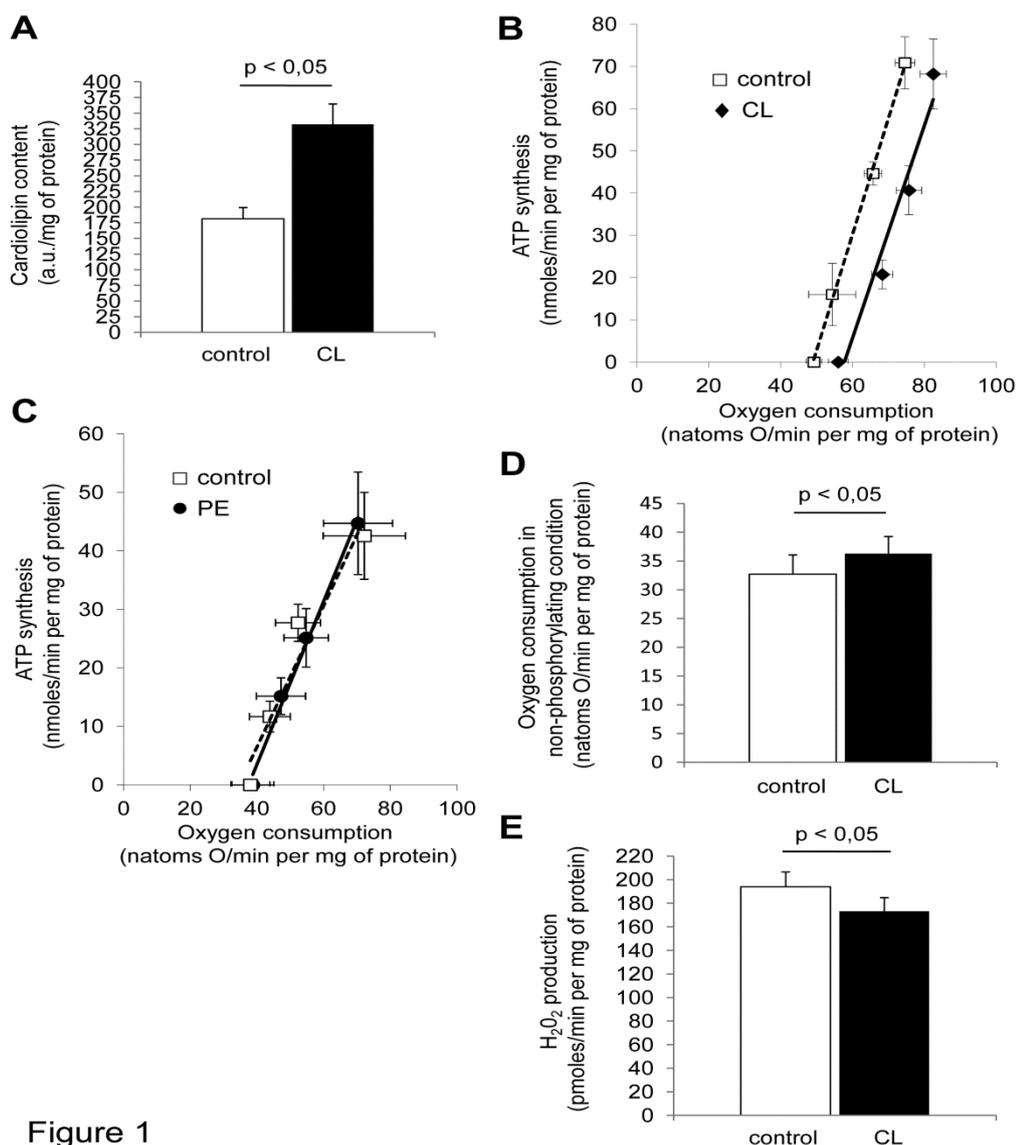


Figure 1

### Figure 1. Effects of cardiolipin enrichment on bioenergetic parameters in isolated rat liver mitochondria.

Measurements were conducted in isolated mitochondria enriched *in vitro* with cardiolipin (CL), phosphatidylethanolamine (PE) or not (control). (A) Cardiolipin content (Mean  $\pm$  SEM; n=9). (B) Relationship between the ATP synthesis rate and oxygen consumption rate for cardiolipin enrichment. ATP synthesis was stimulated by a sequential increase in hexokinase concentrations (n=9; control: white squares and CL: black diamonds). (C) Relationship between the ATP synthesis rate and oxygen consumption rate for phosphatidylethanolamine enrichment. ATP synthesis was stimulated by a sequential increase in hexokinase concentrations (n=7; control: white squares and PE: black circles). (D) Oxygen consumption rate in non-phosphorylating condition (n=7). (E) ROS production. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured by Amplex Red oxidation to resorufin (n=7).

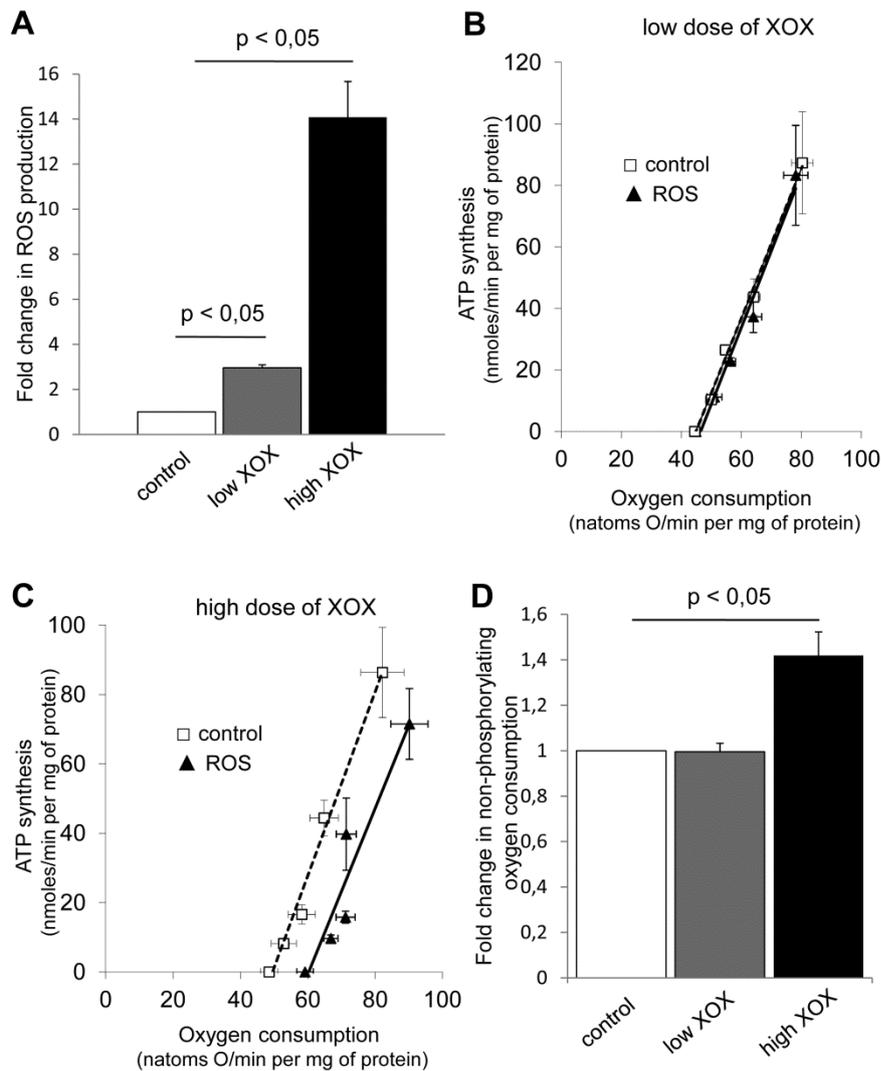


Figure 2

**Figure 2. Effect of ROS production on bioenergetic parameters in isolated rat liver mitochondria.**

Measurements were conducted in isolated mitochondria incubated *in vitro* at the beginning of each measurement with 125  $\mu$ M xanthine and xanthine oxidase (XOX; 0.0029 or 0.036 U for low and high dose of XOX, respectively) (ROS) or not (control). (A) Change in ROS production induced by XOX in comparison to the control condition (Mean  $\pm$  SEM,  $n \geq 6$ ). (B) Relationship between the ATP synthesis rate and oxygen consumption rate for low dose of XOX. ATP synthesis was stimulated by a sequential increase in hexokinase concentrations ( $n=6$ ; control: white squares and ROS: black triangles). (C) Relationship between the ATP synthesis rate and oxygen consumption rate for high dose of XOX. ATP synthesis was stimulated by a sequential increase in hexokinase concentrations ( $n=7$ ; control: white squares and ROS: black triangles). (D) Change in non-phosphorylating oxygen consumption rate induced by XOX compared to control condition ( $n \geq 6$ ).

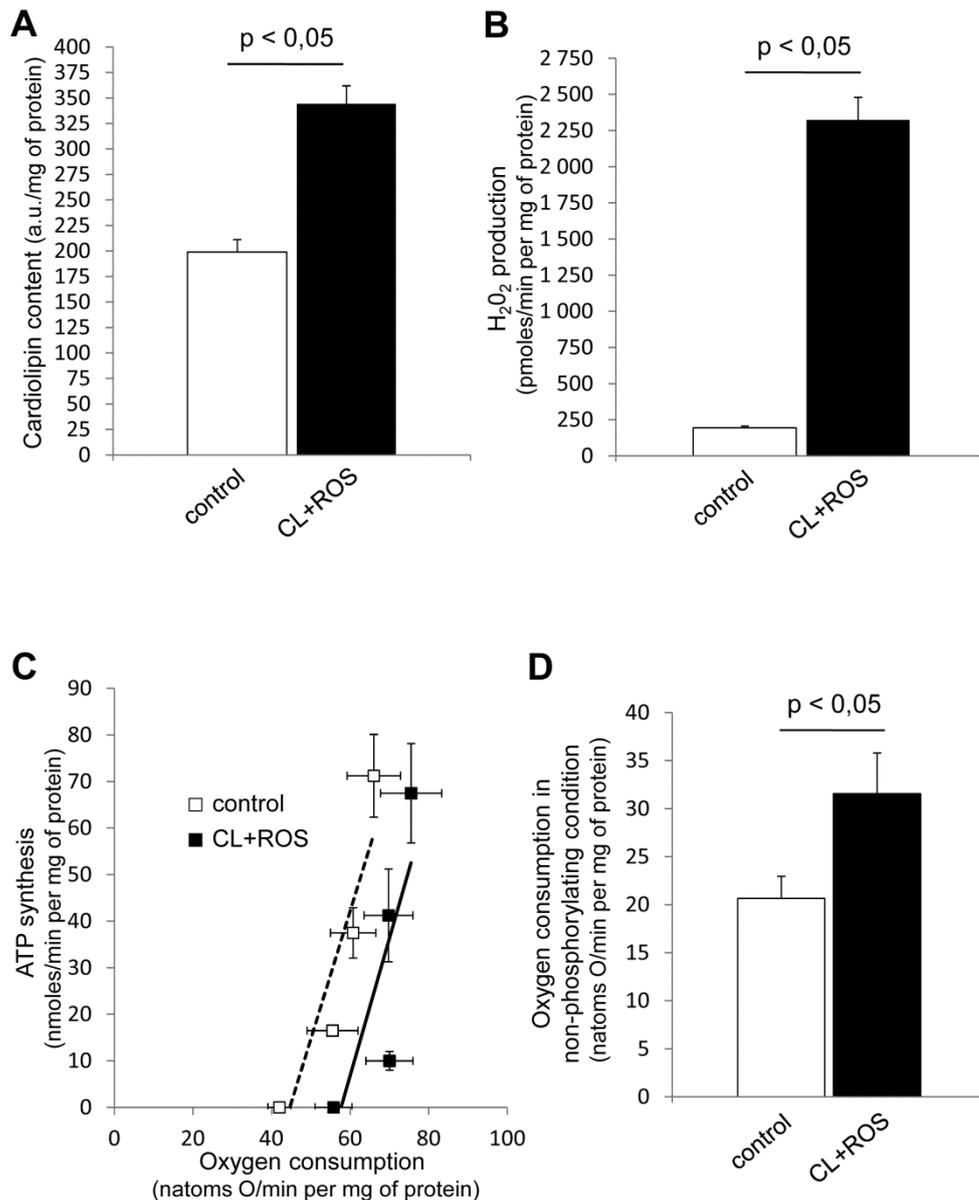
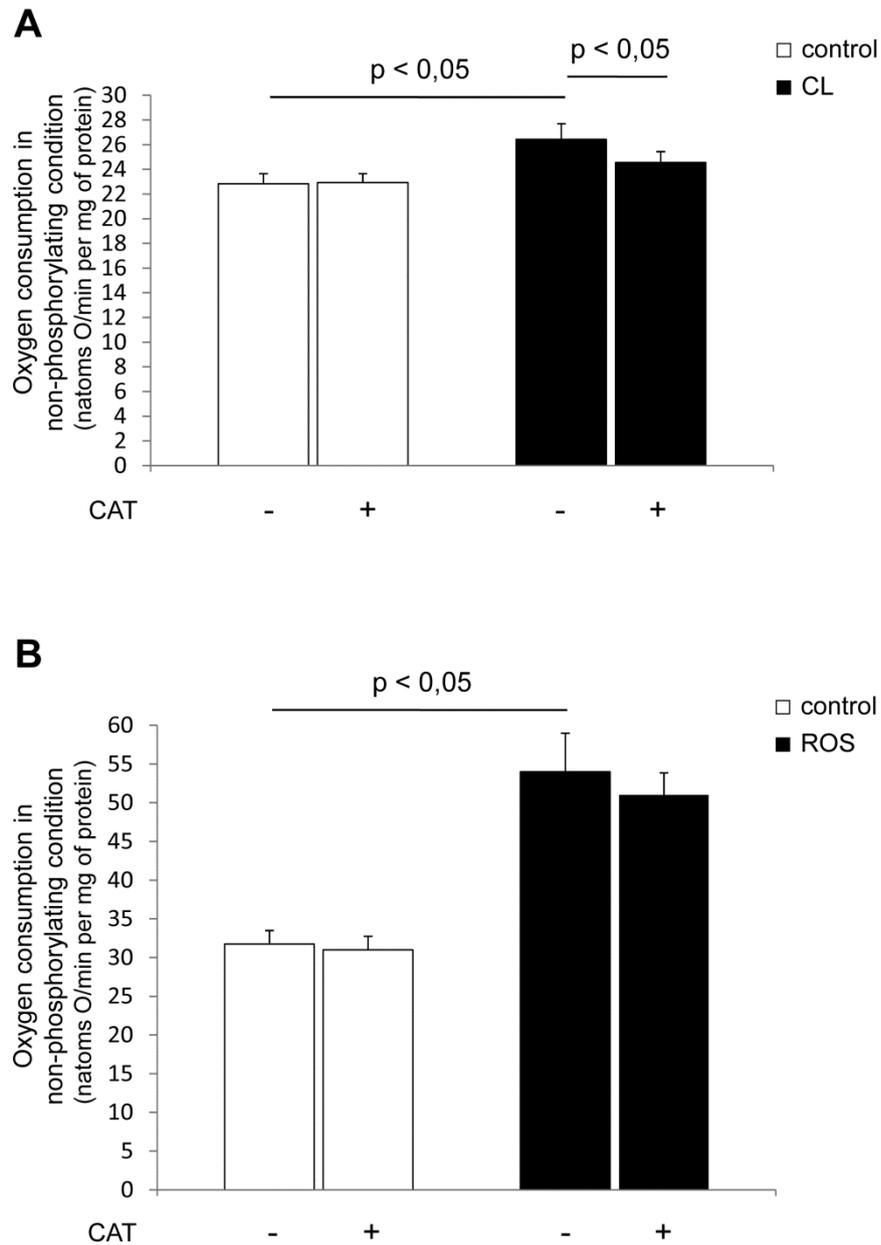


Figure 3

**Figure 3. Effect of both cardiolipin enrichment and ROS production on bioenergetic parameters in isolated rat liver mitochondria.**

Measurements were conducted in isolated mitochondria enriched *in vitro* with cardiolipin and incubated at the beginning of each measurement with 125  $\mu$ M xanthine and 0.036 U XOX (CL+ROS) or not (control). (A) Cardiolipin content (Mean  $\pm$  SEM; n=6). (B) ROS production. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was measured by Amplex Red oxidation to resorufin (n=6). (C) Relationship between the ATP synthesis rate and oxygen consumption rate. ATP synthesis was stimulated by a sequential increase in hexokinase concentrations (n=4; control: white squares and CL+ROS: black squares). (D) Oxygen consumption rate in non-phosphorylating condition (n=6).



**Figure 4**

**Figure 4. Role played for adenine nucleotide translocator on non-phosphorylating energy wasting induced by cardiolipin or ROS in isolated rat liver mitochondria.**

Measurements were conducted in isolated mitochondria enriched *in vitro* with cardiolipin (CL) or incubated at the beginning of each measurement with 125  $\mu$ M xanthine and 0.036 U XO<sub>2</sub> (ROS) or not (control) in the absence (-) or presence (+) of 2  $\mu$ M of carboxyatractyloside (CAT). (A) Effect of CAT on non-phosphorylating oxygen consumption in control and CL group (Mean  $\pm$  SEM; n=7). (B) Effect of CAT on non-phosphorylating oxygen consumption in control and ROS group (n=5).

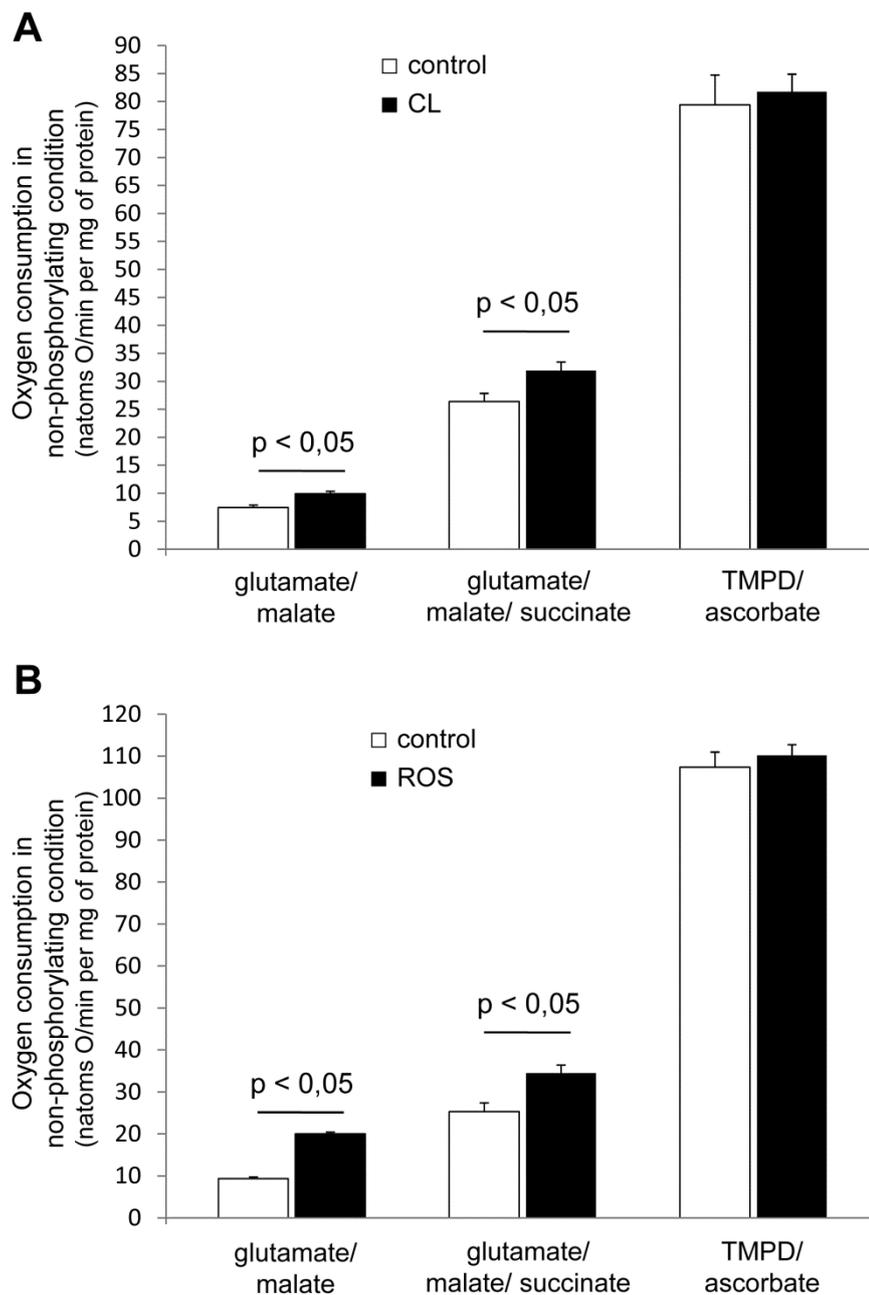


Figure 5

**Figure 5. Effect of the nature of the mitochondrial respiratory substrate on non-phosphorylating energy wasting induced by cardiolipin or ROS in isolated rat liver mitochondria.**

Measurements were conducted in isolated mitochondria enriched *in vitro* with cardiolipin (CL) or incubated at the beginning of each measurement with 125  $\mu$ M xanthine and 0.036 U XO (ROS) or not (control). (A) Non-phosphorylating oxygen consumption in control and CL group (Mean  $\pm$  SEM; n=6). (B) Non-phosphorylating oxygen consumption in control and ROS group (n=6).

## Supporting material and methods

### Animals and preparation of liver mitochondria

The study was performed in accordance with the French guiding principles in the care and use of animals and was approved by the Ethic Committee (“Comité d’Ethique en Expérimentation Animale”) of “Val de Loire” (#2010-34). *In vitro experiment*: Healthy Sprague-Dawley male rats were supplied by Charles River laboratories (France) at 8 weeks of age. *Cancer cachexia experiment*: Healthy immunocompetent Berlin-Druckrey IX (BDIX) male rats were supplied by Charles River laboratories (France) at 8 weeks of age. Rats were fed *ad libitum* and housed in a temperature-controlled room (22°C) with a 12h light/dark cycle. After euthanasia, livers were rapidly removed and mitochondria were isolated by differential centrifugation in an ice-cold isolation medium (250 mM sucrose, 1 mM EGTA and 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) (1). Protein concentration was determined using the Bicinchoninic acid Assay kit (Interchim, France).

### Experimental design

*In vitro experiment*: a batch of isolated mitochondria was separated into 5 groups: i) no treatment (control), treated with ii) cardiolipin (CL), iii) phosphatidylethanolamine (PE), iv) 125 µM xanthine and xanthine oxidase (XOX; 0.0029 or 0.036 U) in order to produce exogenous ROS (ROS) (2) and v) with both cardiolipin and 125 µM xanthine and 0.036 U XOX (CL+ROS). *Cancer cachexia experiment*: Rats were divided into 2 groups as previously described (1): i) one group (peritoneal carcinosis, PC; n=6) fed *ad libitum* that received a single intraperitoneal (IP) injection of  $10^6$  of PROb cells in 1 ml of culture medium and ii) one group (control, n=6) in which rats, weight-matched to PC rats, received an IP injection of 1 ml of culture medium without PROb cells. These rats were pair-fed (each rat from the control group was paired with a rat from the PC group) in order to discriminate between the effect of anorexia or peritoneal carcinosis on the parameters measured in this study. Body weight, food intake, behaviour and physical appearance were recorded every two days. When severe cancer cachexia was apparent (3) PC rats were euthanized and liver was rapidly removed.

### **Mitochondrial efficiency of oxidative phosphorylation**

The kinetic response of oxygen consumption to a variation in ATP synthesis was determined at 37°C in a respiratory reaction medium (120 mM KCl, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM Hepes (pH 7.4) (1). Experimental conditions: mitochondria (1 mg protein/ml), 0.3% (w/v) BSA-FAF, succinate (5 mM), rotenone (2.5 μM), glucose (20 mM) and ATP (125 μM). The rate of ATP synthesis was modulated and followed by glucose 6-phosphate accumulation using an ADP regenerating system based on hexokinase (0-0.5 U) plus glucose and ATP. Oxygen was concomitantly measured by oxygraphy (Hansatech, France).

### **Mitochondrial non-phosphorylating energy wasting**

The kinetic response of oxygen consumption in response to a variation in membrane potential in non-phosphorylating condition was determined at 37°C as we previously described (4). Experimental conditions: mitochondria (0.5 mg protein/ml), succinate (5 mM), rotenone (2.5 μM), oligomycin (2 μg/mg mitochondrial protein), 0.3% (w/v) BSA-FAF and nigericin (80 ng/ml). Experimental conditions: mitochondria (0.5 mg protein/ml), succinate (5 mM), rotenone (2.5 μM), oligomycin (2 μg/mg mitochondrial protein), 0.3% (w/v) BSA-FAF and nigericin (80 ng/ml).

To test the involvement of adenine nucleotide translocator on non-phosphorylating oxygen consumption, carboxyatractyloside (CAT; 2 μM) was used. To test the nature of the respiratory substrate on non-phosphorylating oxygen consumption, succinate (5 mM) and rotenone (2.5 μM) were replaced by glutamate (5 mM) and malate (2.5 mM), then succinate (5 mM) and antimycin A (2 μM) + ascorbate (5 mM) + TMPD (400 μM) were added sequentially.

### **Mitochondrial reactive oxygen species production**

ROS production was evaluated by measuring of hydrogen peroxide-induced fluorescence of 1 μM Amplex Red (Interchim, France) (ex-em: 560–584 nm) in the presence of horseradish peroxidase (10 U) at 37°C (1). Experimental conditions: mitochondria (0.5 mg protein/ml), 0.3% (w/v) BSA-FAF, succinate (5 mM), rotenone (2.5 μM) and oligomycin (2 μg/mg mitochondrial protein).

### **Phosphatidylethanolamine content**

Phosphatidylethanolamine (PE) content was determined by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)-densitometry. Total lipids were extracted according to the method of Blight and Dyer (5). PE was separated by preparative thin layer chromatography thickness (mobile phase: chloroform-acetone-acetic acid-methanol-water 6:8:2:2:1 (v,v)). A range was realised on every plate post-chromatographic and derivatization plates were then treated and immersed for revelation with a solution that contained orthophosphoric acid-distilled water-copper sulfate 40:460:0.90 (v,v,w). Spots were then obtained by carbonization (TLC Heater 3, Camag, Muttenz, Switzerland) and quantification was performed using a reprostar using WinCats software version 1.4 (Camag, Muttenz, Switzerland). After preliminary screening, the amount of compound in the sample was estimated and the standard concentrations were adjusted to be in the curve. The image of standards and samples were taken in Rt mode and transferred in Videoscan software version 1.2. (Camag, Muttenz, Switzerland).

### **MitoTEMPO experiment**

The mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO, a highly positively charged compound that is concentrated in the mitochondria matrix, was used (5  $\mu\text{M}$ ) in liver mitochondria after or before addition of 125  $\mu\text{M}$  xanthine + 0.036 U xanthine oxidase.

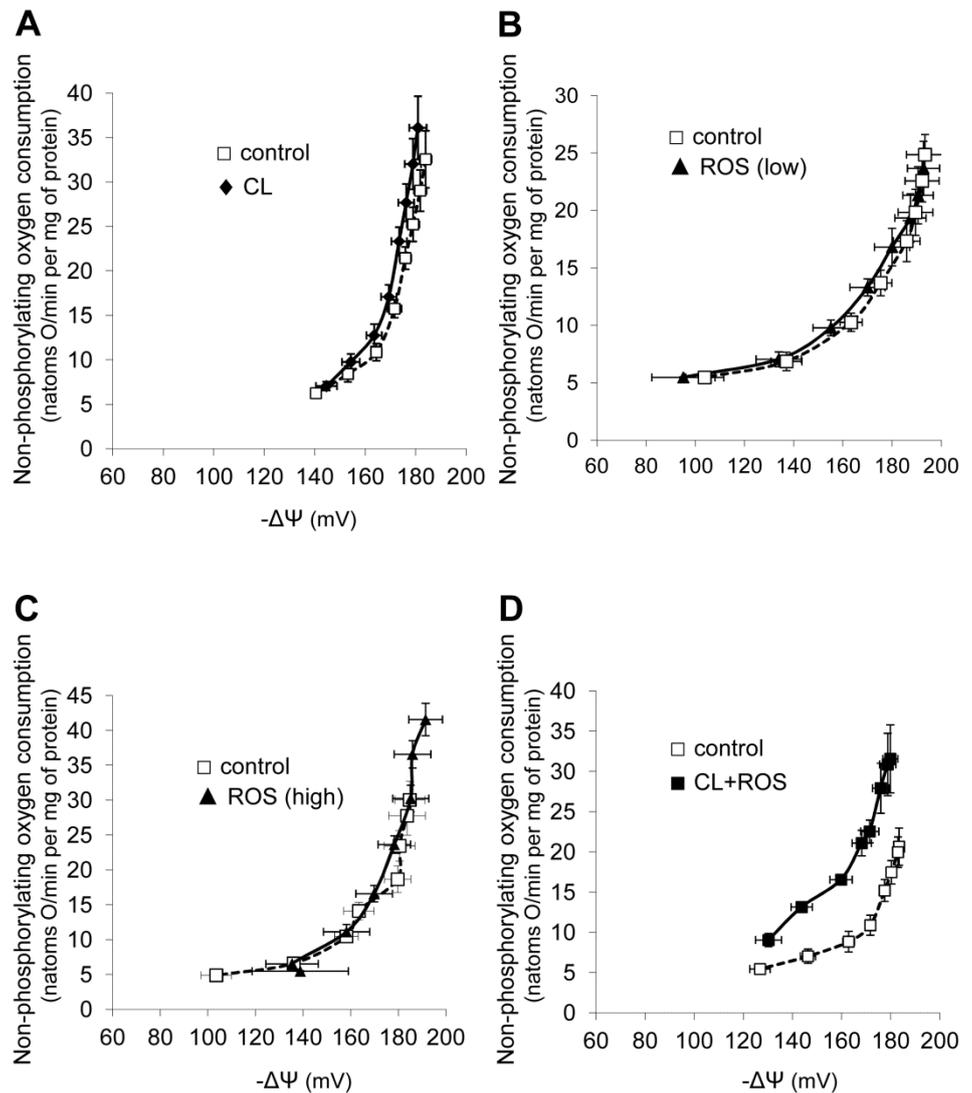
### **Calcium retention capacity**

Sensitivity of the permeability transition pore was evaluated as previously described (6) by determining calcium retention capacity of mitochondria incubated in 250 mM sucrose, 1 mM Pi, 10 mM MOPS and 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) at 37°C in the presence of 1  $\mu\text{M}$  Calcium Green-5N (ex-em: 506-532 nm), 5 mM succinate and 2.5  $\mu\text{M}$  rotenone. Pulses of 10  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  were added every minute until pore opening. Specificity of mitochondrial pore opening was assessed by adding 1  $\mu\text{M}$  cyclosporine A (CsA).

### Supporting references

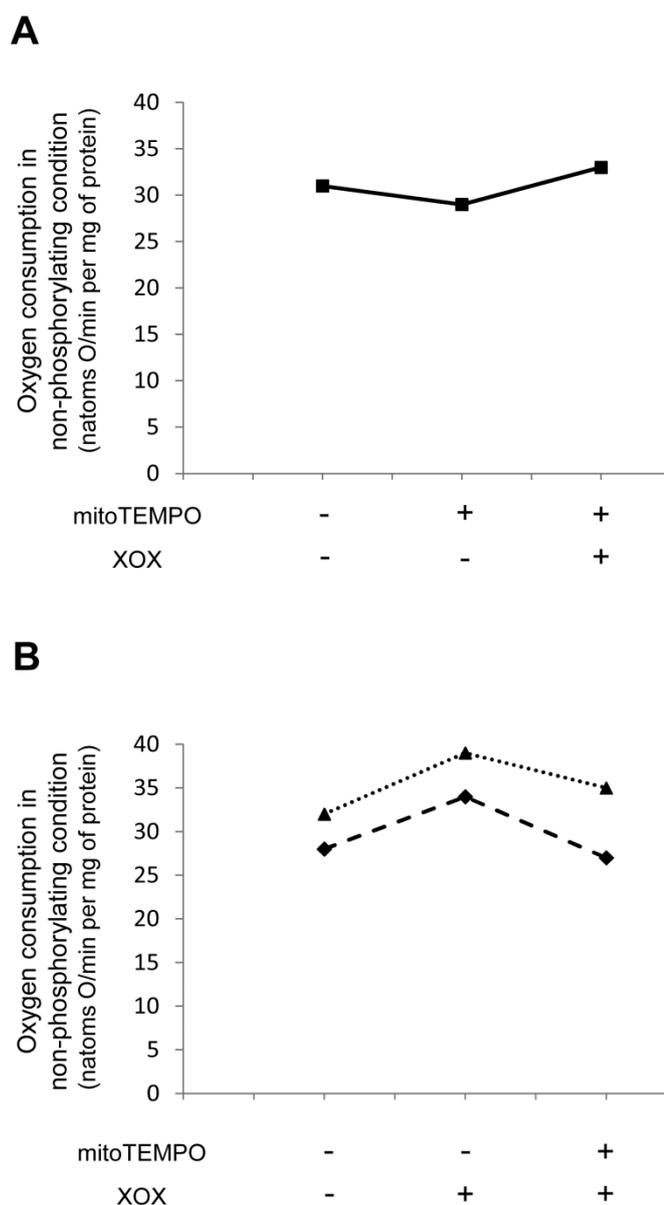
- 1 Dumas JF, Goupille C, Julienne CM, Pinault M, Chevalier S, Bougnoux P, et al. Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *J Hepatol* 2011;54:320-327.
- 2 Echtay KS, Roussel D, St-Pierre J, Jekabsons MB, Cadenas S, Stuart JA, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* 2002;415:96-99.
- 3 Dumas JF, Goupille C, Pinault M, Fandeur L, Bougnoux P, Servais S, et al. n-3 PUFA-enriched diet delays the occurrence of cancer cachexia in rat with peritoneal carcinosis. *Nutr Cancer* 2010;62:343-350.
- 4 Roussel D, Dumas JF, Augeraud A, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, et al. Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* 2003;541:75-79.
- 5 Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37:911-917.
- 6 Fontaine E, Ichas F, Bernardi P. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 1998;273:25734-25740.

**Supporting Figure:**



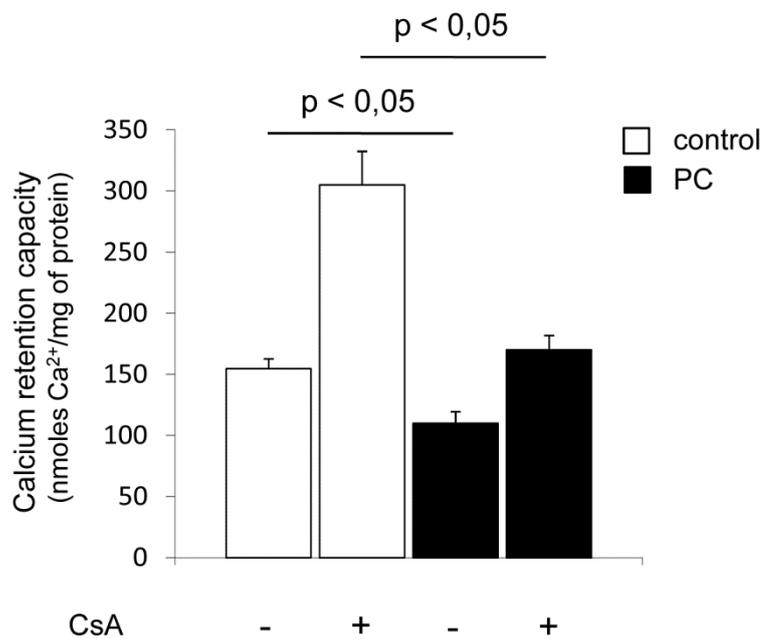
**Supporting Figure S1. Relationship between the oxygen consumption and membrane potential ( $\Delta\Psi$ ) in non-phosphorylating condition.**

Measurements were conducted in isolated liver mitochondria from healthy rats enriched in cardiolipin (CL), incubated at the beginning of each measurement with 125  $\mu\text{M}$  xanthine and xanthine oxidase (XOX; 0.0029 or 0.036 U for low and high dose of XOX, respectively) to produce exogenous reactive oxygen species (ROS), enriched in CL and incubated at the beginning of each measurement with 125  $\mu\text{M}$  xanthine and 0.036 U XOX (CL + ROS) or not (control). Titration was performed with malonate. (A) Effect of cardiolipin (Mean  $\pm$  SEM;  $n=5$ ; control: white squares and CL: black diamonds). (B) Effect of low dose of XOX ( $n=7$ ; control: white squares and ROS (low): black triangles). (C) Effect of high dose of XOX ( $n=6$ ; control: white squares and ROS (high): black triangles). (D) Effect of cardiolipin and ROS ( $n=6$ ; control: white squares and CL: black squares)



**Supporting Figure S2. Interaction between reactive oxygen species (ROS) and mitoTEMPO on energy wasting-related oxygen consumption in liver mitochondria.**

(A) Effect of mitoTEMPO on oxygen consumption rate in non-phosphorylating condition. As indicated, (-) absence or (+) presence of 5  $\mu$ M mitoTEMPO or 125  $\mu$ M xanthine + 0.036 U xanthine oxidase (XOX). Data-points are one experiment. (B) Effect of mitoTEMPO on ROS-stimulated oxygen consumption rate in non-phosphorylating condition. As indicated, (-) absence or (+) presence of 5  $\mu$ M mitoTEMPO or 125  $\mu$ M xanthine + 0.036 U XOX. Data-points are one experiment.



**Supporting Figure S3. Effect of cancer cachexia on the opening sensibility of the permeability transition pore in liver mitochondria.**

Calcium retention capacity was determined in isolated liver mitochondria from peritoneal carcinosis (PC) or control rats (Mean  $\pm$  SEM;  $n \geq 5$ ). As indicated, (-) absence or (+) presence of 1  $\mu$ M of cyclosporine A (CsA). Mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 5$ ).

# Altérations du métabolisme énergétique mitochondrial lors de la cachexie cancéreuse

## Résumé

La cachexie est un syndrome complexe caractérisé par une balance énergétique négative. Le rôle joué par le métabolisme énergétique mitochondrial dans ce syndrome est peu connu. Nos précédents travaux montraient une diminution de la synthèse de l'ATP dans les mitochondries hépatiques en stade de cachexie cancéreuse sévère. Dans ce travail, nous démontrons, *in vitro*, que l'augmentation de la production d'espèce réactive de l'oxygène et du contenu en cardiolipine dans des mitochondries hépatiques saines, mime partiellement les mécanismes observés lors d'un stade cachexie sévère. Nous observons cependant que l'altération du métabolisme mitochondrial hépatique apparaît à un stade tardif du développement de la cachexie. En stade sévère les mitochondries musculaires ne développent pas d'altération de leur efficacité de synthèse d'ATP mais une diminution des leurs capacités oxydatives.

Mots clés : cachexie cancéreuse, mitochondrie, synthèse d'ATP, cardiolipine, espèces réactives de l'oxygène

## Résumé en anglais

Cancer cachexia is a composite syndrome, characterized by a negative energetic balance. The role played by mitochondrial energetic metabolism in this syndrome is poor known. Our past work showed a decrease of ATP synthesis efficiency in hepatic mitochondria in severe state of cancer cachexia. In this work, we demonstrate, *in vitro*, that increase of reactive oxygen species and cardiolipine content, in healthy mitochondria, can partly mimic the mechanisms observed in severe state of cancer cachexia. We observe that alteration of hepatic mitochondrial metabolism appear last during the development of cancer cachexia. In sever state of cancer cachexia, skeletal muscle mitochondria don't develop this alteration but demonstrated a decrease of oxidative capacities.

Key words: cancer cachexia, mitochondria, ATP synthesis, cardiolipine, reactive oxygen species.