

**Faculté de pharmacie
et des sciences biomédicales**

Impact de l'inhibition de l'inflammation dans un modèle murin de cachexie cancéreuse

Mémoire réalisé par
Pelet Nathan

Promoteur(s)
Professeur Jean-Paul Thissen
Isabelle Massart

Lecteurs
Professeures Sonia Brichard et Laure Bindels

Année académique 2020-2021
Master en sciences biomédicales, finalité nutrition humaine

Remerciements

Je tiens à commencer ce travail en remerciant mon promoteur, le professeur Jean-Paul Thissen. D'une part pour son accueil chaleureux dans le laboratoire, sa bonne humeur et son optimisme, d'autre part pour son encadrement consciencieux, ses conseils avisés, son sens du détail, sa disponibilité et son esprit critique qui m'ont permis de mener ce travail à terme.

Je tiens également à remercier Isabelle Massart pour son implication tout au long de ce mémoire. Que ce soit pour son soutien lors de mes premiers pas en tant que chercheur, sa patience lors des premières expériences, ses contributions multiples lors de nos séances de brainstorming, jusqu'aux dernières relectures de ce présent mémoire et surtout ta jovialité.

Merci aussi à Pascale Lause, pour avoir su partager et m'inculquer ses connaissances techniques, mais aussi pour sa joie de vivre, nos nombreux fous rires et les délices sucrés qui m'ont tant de fois remonté le moral.

Je tiens finalement à remercier ma famille et mon amie Isaline, pour leur soutien indéfectible tout au long de cette année difficile.

Résumé

La cachexie cancéreuse (CC) constitue un syndrome multifactoriel associé au développement d'un cancer et caractérisé par une perte continue de la masse musculaire squelettique, avec ou sans perte de masse grasse, qui ne peut être totalement prévenue ou corrigée par un soutien nutritionnel conventionnel. Elle survient chez environ 80% des patients à un stade avancé de la maladie et constitue la cause du décès dans 20% des cas. Ses mécanismes restent mal connus et son traitement décevant. L'inflammation associée à l'immunité innée joue sans aucun doute un rôle dans le développement de la CC. Celle-ci est stimulée par des récepteurs de type TLR et NLR. Bien que le rôle de certains TLR soit partiellement investigué, le rôle des NLR, en particulier le NLRP3, reste inconnu. Plusieurs arguments suggèrent que l'inflammation, et notamment les voies activées par TLR-4 et NLRP3 pourraient contribuer à l'atrophie musculaire de la CC. En effet, l'inhibition de NLRP3 et de TLR-4 diminuent l'atrophie musculaire dans plusieurs pathologies inflammatoires (dystrophie musculaire, sepsis, vieillissement...). Leur inhibition représenterait donc une piste intéressante pour prévenir la perte de masse musculaire qui contribue au mauvais pronostic de la CC.

Afin d'évaluer le rôle de l'inflammation dans l'atrophie musculaire de la CC, nous avons testé l'effet de trois inhibiteurs de l'inflammation que sont le MCC950, le TAK-242 et l'AdipoRon. Premièrement, l'administration d'un inhibiteur spécifique de l'inflammasome NLRP3 (MCC950), dans un modèle d'inflammation aigüe, obtenue par l'injection IP de LPS, atténue l'élévation des taux circulants d'IL-1 β et l'activation de l'inflammasome dans le foie 2h30 après l'injection. Cependant, cette inhibition n'est pas retrouvée 24h après l'injection de LPS. En outre le MCC950 ne bloque pas l'induction musculaire des atrogènes (Atrogin-1, MurF-1), mais bloque l'induction musculaire de la *serpina3n*, un marqueur de la réponse inflammatoire. Dans un modèle de CC induite par l'implantation de cellules tumorales C26, le MCC950 n'inhibe ni l'élévation des taux circulants d'IL-1 β , ni l'induction des atrogènes, ni l'atrophie musculaire. De façon inattendue, le MCC950 exerce des effets délétères, en contribuant à un accroissement de la perte de tissu adipeux et de tissu musculaire. Ceci pourrait s'expliquer par une modification du phénotype tumoral. Le TAK-242, l'inhibiteur du TLR-4, en amont de l'activation de NLRP3, ne prévient pas l'atrophie musculaire de la CC, mais tend à réduire la splénomégalie. L'AdipoRon, un analogue de l'adiponectine, améliore l'état général des souris, atténue la perte de poids, principalement grâce à une préservation de masse grasse. Ces résultats démontrent que le MCC950 inhibe transitoirement l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par le LPS dans le foie, mais n'exerce aucun effet protecteur sur l'atrophie musculaire de la CC. Comme le MCC950 n'inhibe pas la production d'IL-1 β , nos données ne permettent pas de conclure sur le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'atrophie musculaire de la CC. L'inhibition de l'inflammation par l'AdipoRon semble être une piste prometteuse pour le traitement de la cachexie cancéreuse au vu de son effet sur la préservation du poids corporel.

Liste des Abréviations

ACTH : Adrénocorticotrophine
ADN : Acide désoxyribonucléique
AIM2 : *absents in melanoma 2-like*
Akt : protéine kinase B
AMPK : Protéine kinase AMP-dépendante
APR : *Acute Phase Reactants*
ApN : Adiponectine
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ASC : *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain*
ATGL : *Adipose triglyceride lipase*
ATP : Adénosine triphosphate
CC : Cachexie cancéreuse
CLP : Ligation/ponction caecale
CRH : Corticolibérine
CT : Contrôle
CXCL2 : *Chemokine (C-X-C motif) ligand 2*
DAMP : *Damage Associated Molecular Pattern*
DEPC : pyrocarbonate d'éthyle
DMEM : milieu Eagle modifié de Dulbecco
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
eIF2 : Facteur d'élongation 2
ELISA : *Enzyme-linked immunosorbent assay*
FoxO : facteurs de transcription de type Forkhead
GAPDH : D-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDF15 : *Growth differentiation factor 15*
Hp : Haptoglobine
HRP : *Horseradish peroxidase*
HSP : Protéine de choc thermique
IGF-I : *Insulin-like growth factor-I*
IKKi : *I κ B kinase i*
IL : Interleukine
IMC : Indice de masse corporelle
INF- γ : Interféron γ
IRAK1/4 : Kinase 1/4 associée au récepteur de l'interleukine 1
JAK-STAT3 : *Janus Kinase signal transducer 3*
KO : *Knock out*
LLC : *Lewis lung carcinoma*
LPS : Lipopolysaccharide
Mdx : Dystrophie musculaire de Duchennes
mtADN : ADN mitochondrial
mTOR : *Mammalian target of rapamycin*
mtROS : Espèces à oxygène réactives mitochondriales
MurF-1 : *Muscle RING-finger protein-1*
MSS : *Murine sepsis score*
MWS : Syndrome de Muckle-Wells

MyD88 : *myeloid differentiation primary response 88*
Myh2/7 : Chaîne lourde de myosine 2/7
MyoD : *Myoblast determination protein*
NACHT : *[NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), CIITA (MHC class II transcription activator), HET-E (incompatibility locus protein from *Podospira anserina*) and TP1 (telomerase-associated protein)] domain*
NF- κ B : *Nuclear factor-kappa B*
NLR : *NOD-like receptor*
NLRC4 : *NLR family CARD domain containing 4*
NLRP3 : *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*
NOD : *Nucleotide oligomerization domain*
PAMP : *Pathogen Associated Molecular Pattern*
PDAC : Adénocarcinome pancréatique ductal
PGC-1 α : Coactivateur 1-alpha du récepteur gamma
PBS : *Phosphate buffered saline*
PRR : *Pattern recognition receptor*
PTHrP : *Parathyroid-hormone-related peptide*
PYD : *Domaine pyrin*
RT-qPCR : *Reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction*
Rheb : *Ras homolog enriched in brain*
RLR : *(Retinoic acid-inducible gene)-I-like*
SAA1 : *Serum amyloid A1*
SCCF-VII : *carcinome squameux de la tête et du cou*
Serpina3n : *Serine protease inhibitor A3N*
Smad2/3 : *Mothers Against Decapentaplegic*
TAK-1 : *Transforming growth factor beta-activated kinase 1*
TBK1 : *TANK-binding kinase 1*
TGF- β : *Transforming growth factor beta*
TIR : *Toll-Interleukin receptor*
TIRAP : *toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein*
TLR : *Toll like receptor*
TMB : *tétraméthylbenzidine*
TNF- α : *Tumour necrosis factor- α*
TRAF6 : *TNF receptor-associated factor 6*
TRAM : *Trif Related Adaptor Molecule*
TRIF : *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*
UCP 1/3 : *Protéine de découplage mitochondrial 1/3*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
ZAG : *Zinc- α 2-glycoprotéine*

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION	1
1 Cachexie cancéreuse (CC)	1
1.1 Définition	1
1.2 Mécanismes.....	2
1.2.1 Balance énergétique négative	2
1.2.2 Atrophie musculaire	2
1.2.3 Rôle du tissu adipeux	3
1.2.4 Rôle de l'hypothalamus.....	3
1.3 Médiateurs	4
1.3.1 Cytokines	4
1.3.2 Glucocorticoïdes	4
1.4 Conséquences.....	5
1.4.1 Qualité de vie	5
1.4.2 Morbidité.....	5
1.4.3 Mortalité.....	5
1.4.4 Réponse au traitement.....	5
2 Arguments pour un rôle de l'inflammation dans l'atrophie musculaire de la CC	6
2.1 La CC est associée à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires	6
2.2 L'administration de cytokines pro-inflammatoires mime la CC	6
2.3 L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires atténue l'atrophie musculaire de la CC	6
2.4 Les marqueurs de l'inflammation sont élevés dans la CC	7
3 Mécanismes de l'inflammation dans la CC	7
3.1 Immunité innée vs adaptative.....	7
3.2 Rôle de l'immunité innée dans l'inflammation de la CC	7
3.3 Mécanismes de l'immunité innée	8
3.3.1 Les stimuli PAMPs et DAMPs	8
3.3.2 Les Pattern Recognition Receptors PRR	9
3.3.3 Les récepteurs NLR.....	9
3.3.3.1 Les inflammasomes.....	9
3.3.3.2 Un type particulier de NLR : l'inflammasome NLRP3	10
3.3.3.3 Rôle du NLRP3 dans l'atrophie musculaire de la CC	11
a. Dans le sepsis	11
b. Dans la sarcopénie.....	11
c. Dans les dystrophies musculaires.....	12
d. Dans la CC.....	12
3.3.3.4 L'inhibiteur de l'inflammasome MCC950.....	12
3.3.4 Les récepteurs TLR	13
3.3.4.1 Un type particulier de TLR : Le TLR-4.....	13
3.3.4.2 Rôle des TLR-4 dans l'atrophie musculaire.....	14
a. Dans le sepsis	14
b. Dans la dystrophie musculaire.....	14
c. Dans la CC.....	15
3.3.4.3 L'inhibiteur de TLR-4 : TAK 242.....	15
3.3.5 Adiponectine (ApN).....	15
3.3.5.1 Généralités	15
3.3.5.2 Actions biologiques de l'ApN sur le muscle squelettique.....	16
3.3.5.3 Rôle de l'ApN dans l'atrophie musculaire.....	17
a. Bénéfice de l'ApN dans le modèle de dystrophie musculaire mdx.....	17
b. Bénéfice de l'ApN dans l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes.....	17
3.3.5.4 Un agoniste synthétique de l'ApN : l'AdipoRon.....	17
4 Hypothèse générale du travail.....	17
II. BUT GENERAL DU PROJET.....	18
III. MATERIEL ET METHODES.....	19
1 Modèles animaux	19
1.1 Modèle de sepsis	19
1.1.1 Modèle animal.....	19
1.1.2 Protocole suivi	19

1.1.2.1 Animaux	19
1.1.2.2 Réactifs.....	19
1.1.2.3 Traitement.....	19
1.1.2.4 Sacrifice.....	20
1.2 Modèle de CC	21
1.2.1 Modèle animal.....	21
1.2.2 Protocole suivi	21
1.2.2.1 Culture cellulaire.....	21
1.2.2.2 Animaux	22
1.2.2.3 Réactifs.....	22
1.2.2.4 Traitement.....	22
1.2.2.5 Performance physique.....	23
1.2.2.6 Sacrifice.....	24
2 Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	24
2.1 Homogénéisation des tissus	25
2.2 Extraction de l'ARN	25
2.3 Quantification de l'ARN total.....	26
2.4 Transcription inverse	26
2.5 RT-qPCR	26
3 ELISA	28
4 Analyses Statistiques	30
IV. RESULTATS.....	31
1 Inhibition du NLRP3 par MCC950.....	31
1.1 Effet du MCC950 dans l'inflammation induite par le LPS (2h30).....	31
1.1.1 Le MCC950 bloque l'élévation des taux circulants d'IL-1 β induite par le LPS	31
1.1.2 Le MCC950 ne modifie pas le poids corporel et celui des principaux organes	31
1.1.3 Le MCC950 prévient le priming de l'inflammasome uniquement dans le foie	32
1.1.4 Le MCC950 prévient l'expression de la serpina3n uniquement dans le foie	33
1.1.5 Le LPS n'induit pas les atrogènes musculaires	33
1.1.6 Conclusion intermédiaire.....	33
1.2 Effet du MCC950 dans l'inflammation induite par le LPS (24h).....	34
1.2.1 Le MCC950 ne prévient ni la perte de poids, ni l'hépatosplénomégalie induite par le LPS	34
1.2.2 Le MCC950 ne prévient pas le priming de NLRP3 ni dans le foie, ni dans le muscle après injection de LPS	35
1.2.3 Le MCC950 prévient l'expression de serpina3n dans le muscle mais pas le foie	37
1.2.4 Le MCC950 ne prévient pas l'induction des atrogènes par le LPS.....	38
1.2.5 Conclusion intermédiaire.....	38
1.3 Effet du MCC950 dans l'inflammation induite par la tumeur C26	39
1.3.1 Le MCC950 aggrave l'anorexie, la perte de poids, l'atrophie du tissu adipeux/musculaire dans le modèle C26..	39
1.3.2 Le MCC950 exacerbe la perte de force et la dégradation de l'état général dans le modèle C26	41
1.3.3 Le MCC950 ne modifie pas les taux circulants d'IL-1 β dans le modèle C26	41
1.3.4 Le MCC950 n'inhibe pas le priming de l'inflammasome au niveau hépatique et musculaire	42
1.3.5 Le MCC950 ne prévient pas l'induction de la serpina3n dans le modèle C26	43
1.3.6 Le MCC950 exacerbe l'induction des atrogènes dans le modèle C26	44
1.3.7 Le MCC950 modifie le profil d'expression des cytokines de la tumeur	44
1.3.8 Conclusion intermédiaire.....	47
2 Inhibition du TLR-4 par TAK-242 & effets de l'AdipoRon	47
2.1.1 L'AdipoRon diminue l'anorexie, la perte de poids & préserve le tissu adipeux	47
2.1.2 L'AdipoRon améliore le comportement des souris cachectiques	50
2.1.3 Impact du TAK-242/AdipoRon sur l'expression musculaire de la serpina3n dans le modèle C26	50
2.1.4 Impact du TAK-242/AdipoRon sur l'expression des atrogènes dans le modèle C26	51
2.1.5 Le TAK-242/AdipoRon ne modifient pas le profil d'expression tumoral des cytokine pro-inflammatoire.....	52
2.1.6 Conclusion intermédiaire.....	53
V. DISCUSSION.....	54
1 Résultats	54
2 Limites des modèles animaux.....	57
3 Conclusion et perspectives	59
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	59

I. INTRODUCTION

1 Cachexie cancéreuse (CC)

1.1 Définition

La CC est définie comme un syndrome multifactoriel caractérisé par une perte continue de la masse musculaire squelettique, avec ou sans perte de masse grasse, qui ne peut être totalement prévenue ou corrigée par un soutien nutritionnel conventionnel et qui entraîne une déficience fonctionnelle progressive. La pathophysiologie implique un bilan protéique et énergétique négatif, dû à une combinaison variable de réduction de l'apport alimentaire et d'altérations métaboliques. Ces mécanismes sont enclenchés par le développement d'une tumeur maligne (Biswas and Acharyya 2020).

D'un point de vue plus clinique, il s'agit d'un continuum qui se divise en 3 stades : la pré-cachexie, la cachexie et la cachexie réfractaire (Fearon, Strasser et al. 2011).

La *pré-cachexie* est définie par la présence de signes cliniques (anorexie) et métaboliques (intolérance au glucose) précoces précédant une perte de poids involontaire ($\leq 5\%$ du poids corporel). La progression vers la cachexie dépend de facteurs tels que le type et le stade du cancer, la présence d'une inflammation systémique, d'une alimentation insuffisante et l'absence de réponse à la thérapie anti-cancéreuse (Fearon, Strasser et al. 2011).

La *cachexie* est définie soit par une perte de poids $> 5\%$ au cours des 6 derniers mois (en l'absence de simple privation alimentaire), soit par tout degré de perte de poids $> 2\%$ accompagné d'un IMC $< 20 \text{ kg/m}^2$ ou d'un indice de masse musculaire squelettique appendiculaire indicatif d'une sarcopénie (hommes $< 7,25 \text{ kg/m}^2$; femmes $< 5,45 \text{ kg/m}^2$) (Fearon, Strasser et al. 2011, Marshall 2016).

La *cachexie réfractaire* est le stade le plus avancé. Elle est associée à un catabolisme important et à la présence de facteurs qui stimulent la perte de poids de façon non contrôlée. La survie est souvent faible (< 3 mois). L'évolution vers la cachexie réfractaire est spécifique à certains types de tumeurs au stade terminal et est résistante à toutes manœuvres thérapeutiques (Fearon, Strasser et al. 2011).

La CC est une pathologie multi-systémique d'étiologie multiple. Elle est, encore à ce jour, assez mal caractérisée, bien que les perturbations de la balance énergétique, l'atrophie musculaire et la perte du tissu adipeux qui la caractérisent ont déjà fait l'objet de nombreuses investigations (Argiles, Busquets et al. 2014, Baracos, Martin et al. 2018).

1.2 Mécanismes

1.2.1 Balance énergétique négative

La CC se caractérise par une balance énergétique négative causée par une anorexie (cf. infra) conjointement à une élévation de la dépense énergétique. L'augmentation de la dépense énergétique prend place principalement dans le foie, dans le tissu adipeux et en partie dans le muscle. En effet, le foie est le siège d'une synthèse accrue des *acute phase reactants* (APR) et de glucose par la néoglucogenèse. Ces deux processus requièrent non seulement de l'énergie mais aussi des acides aminés libérés par la protéolyse du muscle squelettique (cf. infra). Le foie est également le siège d'un cycle futile consommateur d'énergie. Ce cycle tumeur/foie comprend la synthèse de glucose par le foie à partir d'acide lactique, produit par la tumeur, qui consomme surtout du glucose. Le tissu adipeux contribue aussi à cette dépense énergétique accrue, par une augmentation du tissu adipeux brun et un brunissement du tissu adipeux blanc (beige), en réponse à la présence de médiateurs inflammatoires (IL-6) ou de facteurs tumoraux (PTHrP et zinc- α 2-glycoprotéine (ZAG)). Dans ces deux cas, la consommation d'O₂ du tissu adipeux est augmentée par suite de l'induction d'une protéine de découplage mitochondriale (UCP1). Cette protéine de découplage permet une fuite de protons de l'espace intermembranaire mitochondrial vers la matrice, dissipant l'énergie emmagasinée sous forme de chaleur et responsable d'un déficit énergétique, par manque de synthèse d'ATP, le fuel énergétique cellulaire principal (Das and Hoefler 2013, Argiles, Lopez-Soriano et al. 2019). Le tissu musculaire (squelettique et cardiaque) est le siège d'une induction d'UCP3 responsable d'un accroissement de leur capacité oxydative et donc un accroissement de la dépense énergétique de repos (Argilés, Fontes-Oliveira et al. 2014).

1.2.2 Atrophie musculaire

La CC se caractérise aussi par une atrophie des muscles squelettiques, qui résulte d'un déséquilibre entre la synthèse et le catabolisme protéique. En effet, la synthèse protéique est le plus souvent réduite alors que la protéolyse est le plus souvent augmentée (Baracos, Martin et al. 2018). Ce déséquilibre résulte d'une diminution des facteurs anaboliques comme l'IGF-I et d'une augmentation des facteurs cataboliques comme les cytokines pro-inflammatoires et les glucocorticoïdes. L'altération de la voie de l'IGF-I est responsable d'une diminution d'activité de mTOR et d'une stimulation des facteurs de transcriptions FoxO. Ceux-ci sont responsables de la transcription de plusieurs atrogènes ou gènes responsables de l'atrophie musculaire, à savoir les E3 ubiquitine ligases MurF-1 et Atroguine-1 et les protéines de l'autophagie (beclin-

1), responsables de la dégradation des protéines myofibrillaires (notamment les chaînes lourdes de myosine), de protéines régulatrices de la synthèse protéique (comme MyoD et eIF2) et d'organelles (comme les mitochondries). Dans la CC, les taux circulants et musculaires d'IGF-I sont effondrés et la signalisation en aval de son récepteur est réduite, l'anabolisme protéique (par mTOR) est donc diminué et le catabolisme (par FoxO) accru (Argiles, Busquets et al. 2014, Baracos, Martin et al. 2018, Penna, Ballaro et al. 2019).

1.2.3 Rôle du tissu adipeux

La masse grasse est également réduite au cours de la CC. La perte du tissu adipeux est le résultat de trois mécanismes : un accroissement de la lipolyse, une diminution de la lipogenèse et une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase. L'accroissement de la lipolyse est expliqué par le relargage important de facteurs lipolytiques par les tumeurs (ZAG). Ceux-ci exercent un effet d'activation sur la lipolyse en sensibilisant les adipocytes aux stimuli lipolytiques (par exemple les catécholamines). La répression de la lipoprotéine lipase a pour effet une réduction de l'hydrolyse des triglycérides circulants responsable d'une diminution du transport des acides gras au niveau du tissu adipeux blanc (Argiles, Busquets et al. 2014, Baracos, Martin et al. 2018).

Le tissu adipeux pourrait également contribuer indirectement à la perte de masse musculaire. En effet, l'inhibition de la triglycéride lipase (ATGL) dans un modèle murin porteur de tumeur prévient non seulement la fonte du tissu adipeux mais aussi celle de la masse musculaire (Das and Hoefler 2013). Enfin, les tissus adipeux brun et beige contribuent à l'augmentation de la dépense énergétique (cf supra).

1.2.4 Rôle de l'hypothalamus

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent contribuer à la CC par une action au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral. Par une action sur le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (IL-1 β et TNF- α) ou sur le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral (GDF15), elles causent une anorexie, cruciale dans l'établissement d'une balance énergétique négative. Par une action sur le noyau parvocellulaire, elles (surtout IL-6) stimulent le relargage de CRH qui stimule la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse, celle-ci permettant le relargage de glucocorticoïdes par la glande surrénale, ce qui contribue à accentuer l'atrophie musculaire (Baracos, Martin et al. 2018).

Les mécanismes responsables de la CC sont nombreux et complexes, les éléments évoqués ci-dessus ne constituant qu'un aperçu sommaire.

1.3 Médiateurs

1.3.1 Cytokines

La CC est associée à une élévation des taux circulants de nombreuses cytokines pro-inflammatoires classiques (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ) produites à la fois par les cellules tumorales et les cellules immunitaires de l'hôte associée à une diminution des taux circulants des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, IL-12 et IL-15) (Peixoto da Silva, Santos et al. 2020). L'injection de ces cytokines est à même de mimer le tableau complet de la CC, notamment l'anorexie, la protéolyse musculaire, la synthèse hépatique des APR, la lipolyse du tissu adipeux, le brunissement du tissu adipeux blanc, ... (Onesti and Guttridge 2014, Miller, Laird et al. 2019, Peixoto da Silva, Santos et al. 2020). Alors que le TNF- α et l'IL-1 β agissent en activant le facteur de transcription NF- κ B, l'IL-6 agit en stimulant la voie JAK-STAT3. L'INF- γ exerce un effet synergique avec le TNF- α (Baracos, Martin et al. 2018, Peixoto da Silva, Santos et al. 2020).

A côté de ces cytokines classiques, d'autres cytokines ont été récemment identifiées comme contribuant au développement de la CC. Ces cytokines, telle que l'Activine A, appartiennent à la famille du TGF- β . Elles agissent au niveau musculaire en stimulant la voie des Smad2/3 qui inhibe la voie Akt, la principale voie anabolique, ce qui favorise l'atrophie musculaire. Ces cytokines peuvent être directement relarguées par la tumeur. Elles peuvent aussi influencer le métabolisme calcique au niveau du muscle squelettique, ce qui engendre des perturbations de la contractilité musculaire et par conséquent une diminution de la force (Baracos, Martin et al. 2018, Argiles, Lopez-Soriano et al. 2019). D'autres cytokines de cette famille, en particulier le GDF15, peuvent contribuer à l'anorexie observée dans la CC (Lerner, Tao et al. 2016).

L'inhibition de ces différentes cytokines atténue, voire prévient le développement de la CC, en particulier l'atrophie musculaire et l'anorexie, ce qui suggère qu'elles jouent bien un rôle actif dans le développement de la CC.

1.3.2 Glucocorticoïdes

La CC est associée à une élévation des taux circulants de glucocorticoïdes, probablement secondairement à la stimulation hypothalamique du CRH par l'IL-1 β et l'IL-6 (Baracos, Martin et al. 2018). Les glucocorticoïdes contribuent à l'atrophie musculaire en accroissant la protéolyse (par induction du système ubiquitine protéasome et de l'autophagie) au détriment de la synthèse protéique (par inhibition de la voie mTOR). La résultante est un catabolisme accru du muscle squelettique (Schakman, Kalista et al. 2013).

Comme pour plusieurs cytokines, l'inhibition de la sécrétion ou de l'action des glucocorticoïdes atténue, voire prévient, le développement de la CC, en particulier l'atrophie musculaire, ce qui suggère qu'ils jouent bien un rôle actif dans le développement de la CC (Braun and Marks 2015).

1.4 Conséquences

1.4.1 Qualité de vie

Une des conséquences principales de la CC est une diminution globale de la qualité de vie. Les patients cachectiques ont une force musculaire grandement diminuée qui génère une fatigue accélérée et une perte d'autonomie, d'où une dégradation de leur état général (Onesti and Guttridge 2014).

1.4.2 Morbidité

Les principales comorbidités associées à la CC comprennent une perte de poids importante (due à la fonte du tissu adipeux et musculaire), une stéatose hépatique, une perte de force par atteinte des muscles squelettiques, une fonction immunitaire altérée, une anémie secondaire à l'état inflammatoire, une dysfonction des muscles respiratoires et cardiaques avec insuffisance respiratoire et cardiaque à un stade avancé, une réduction de la réponse aux traitements chimiothérapeutiques ainsi qu'un accroissement des complications post-opératoires (Skipworth, Stewart et al. 2007, Faber, Vos et al. 2009, Onesti and Guttridge 2014).

1.4.3 Mortalité

La CC constitue la cause du décès dans 20% des cas de cancer (Argiles, Busquets et al. 2014). Le décès par CC résulte probablement d'un arrêt cardiaque ou d'une insuffisance respiratoire secondaire respectivement à l'atrophie du myocarde et du diaphragme (Rosa-Caldwell, Fix et al. 2020).

1.4.4 Réponse au traitement

La CC peut modifier la réponse au traitement chimiothérapeutique. D'une part, elle peut engendrer une diminution de la réponse au traitement en raison de l'état de faiblesse généralisé du patient. D'autre part, elle peut mener à une augmentation de la toxicité de certains traitements (Onesti and Guttridge 2014). En effet, comme les doses d'agents chimiothérapeutiques sont estimées sur base du poids corporel, elles sont souvent excessives chez des patients cachectiques chez qui la masse maigre est surestimée. Enfin, comme démontré dans des modèles animaux, la chimiothérapie peut contribuer à accentuer l'atrophie musculaire (Onesti and Guttridge 2014, Argiles, Lopez-Soriano et al. 2019, Rosa-Caldwell, Fix et al. 2020).

2 Arguments pour un rôle de l'inflammation dans l'atrophie musculaire de la CC

2.1 La CC est associée à une production accrue de cytokines pro-inflammatoires

La CC est associée à une élévation des taux circulants de nombreuses cytokines pro-inflammatoires classiques (IL-1 β , IL-6, TNF- α , INF- γ) et moins classiques (Activine A, GDF15, ...) produites à la fois par les cellules tumorales et les cellules immunitaires de l'hôte. Leur sécrétion accrue témoigne de l'existence d'un état inflammatoire au cours de la CC (Argiles 2017).

2.2 L'administration de cytokines pro-inflammatoires mime la CC

Ces cytokines pro-inflammatoires sont à même de mimer le tableau complet de la CC, notamment l'atrophie musculaire tant *in vitro* qu'*in vivo*. Cette atrophie résulte d'une inhibition de la myogenèse, d'une inhibition de la synthèse protéique et d'une augmentation de la protéolyse. Ainsi, chez la souris, l'administration de TNF- α ou d'IL-1 β peut provoquer une atrophie similaire à celle observée chez les patients cachectiques (Fong, Moldawer et al. 1989). De même, l'infusion d'Activine A est suffisante pour mimer le phénotype de la CC, en particulier la perte de masse maigre (Walton, Chen et al. 2019). Ces effets peuvent être directs ou indirects via la stimulation d'autres facteurs cataboliques, comme les GC (Braun and Marks 2015).

2.3 L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires atténue l'atrophie musculaire de la CC

L'inhibition des cytokines pro-inflammatoires peut atténuer voire bloquer l'atrophie musculaire observée dans des modèles murins de CC. Ainsi, l'injection intra-tumorale d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1 atténue la perte de poids et la déplétion des tissus musculaires et adipeux, sans effet apparent sur la masse tumorale (Strassmann, Masui et al. 1993). L'administration d'inhibiteurs de l'Activine A bloque la perte de poids corporel et restaure la masse musculaire chez des souris *Inhibin*^{-/-} caractérisées par des taux élevés d'Activine A ainsi que chez des souris porteuses d'une tumeur, sans modifier la masse tumorale (Zhou, Wang et al. 2010, Walton, Chen et al. 2019).

Les inhibiteurs de la voie de l'IL-1 tels que le Bermekimab (anticorps monoclonal anti-IL-1 α) préservent la masse maigre et diminuent l'anorexie, la douleur et la fatigue chez des patients respectivement atteints de cancer colorectal et de cancers gynécologiques. Chez des patients

souffrant de cancer du poumon à petite cellule (LLC), le Clazakizumab (anticorps monoclonal anti-IL-6) prévient la perte de masse maigre (Miller, Laird et al. 2019).

Cependant ces approches anti-cytokiniques, bien qu'elles soient prometteuses, restent difficiles à mettre en application, coûteuses (anticorps monoclonaux) et non testées au-delà de la phase 3, la majorité des essais cliniques n'obtenant que des résultats modestes à ce stade (Prado and Qian 2019).

2.4 Les marqueurs de l'inflammation sont élevés dans la CC

La protéine C-réactive (CRP) est le marqueur inflammatoire le mieux caractérisé. Elle est produite essentiellement par le foie en réponse à une augmentation des taux d'IL-6, d'IL-1 β et de TNF- α libérés par les macrophages activés. Des taux élevés de CRP sont associés à une perte de masse maigre et à un mauvais pronostic chez des patients cancéreux. Ainsi, le score de Glasgow qui est basé sur la CRP (élevée) et l'albumine (abaissée) est associé à un mauvais pronostic. Il a été testé chez plus de 60 000 patients cancéreux chez lesquels il s'est révélé posséder une valeur pronostique indépendante (Miller, Laird et al. 2019).

3 Mécanismes de l'inflammation dans la CC

3.1 Immunité innée vs adaptative

L'immunité innée représente la sentinelle spontanée et permanente de l'organisme. Elle agit comme la première ligne de défense contre les infections et participe à l'élimination des tissus morts et au processus de réparation/régénération. Elle est activée par un large répertoire de molécules pathogéniques qu'elles soient d'origine microbiennes ou du soi. Les cellules de l'immunité innée, essentiellement d'origine myéloïde, en particulier les macrophages, sont capables via leurs récepteurs de reconnaissance aux pathogènes ou PRR pour *Pattern Recognition Receptor*, de lier et de reconnaître des séquences conservées au niveau de ces molécules (Kumar, Kawai et al. 2009). En outre, les réponses du système immunitaire inné sont importantes non seulement pour éliminer les pathogènes mais aussi pour développer une immunité adaptative spécifique aux pathogènes, qui est médiée par les lymphocytes. L'immunité adaptative requiert la prolifération et différenciation de lymphocytes B et T, respectivement responsables de l'immunité humorale (production d'anticorps) et cellulaire. Ce type d'immunité est responsable de la mémoire immunologique (Kumar, Kawai et al. 2009).

3.2 Rôle de l'immunité innée dans l'inflammation de la CC

L'immunité innée est responsable de l'inflammation. Celle-ci se caractérise par une infiltration de cellules immunitaires activées sur le site d'agression et la production systémique de cytokines pro-inflammatoires et d'APR (Miller, Laird et al. 2019).

Dans le cas du cancer, la plupart des tumeurs présentent un infiltrat de différents types de cellules immunitaires (cellules dendritiques, cellules *Natural Killer*, macrophages, cellules lymphoïdes innées, mastocytes, ...) qui libèrent plusieurs cytokines typiques de l'immunité innée (notamment TNF- α , IL-6 & IL-1 β) à la fois dans le microenvironnement tumoral et dans la circulation. L'infiltrat contribue à la croissance de la tumeur et au remodelage de son microenvironnement (Argiles 2017, Miller, Laird et al. 2019). L'origine des cytokines au cours de la CC est variée. En effet, outre les cellules immunitaires infiltrant la tumeur, les cellules tumorales et d'autres cellules de l'hôte en sont responsables. Ainsi, une interaction complexe tumeur-hôte s'établit, favorisant un déséquilibre qui favorise le statut pro-inflammatoire plutôt qu'anti-inflammatoire.

La libération de ces cytokines dans la circulation induit un état inflammatoire systémique avec production d'APR notamment le complément C3, l'haptoglobine (Hp), la *serpina3n* et la *Serum Amyloid A1* (SAA1) par le foie (principalement) ainsi que d'autres tissus notamment le muscle squelettique (Massart, Paulissen et al. 2020). Comme déjà discuté, plusieurs de ces cytokines (notamment TNF- α , IL-6 & IL-1 β) exercent un effet pro-atrophiant sur le muscle squelettique (Shurin 2012, Miller, Laird et al. 2019). Le lien entre la production accrue des APR et le développement de l'atrophie musculaire dans la CC n'est pas clair, bien que ces phénomènes sont bien corrélés (Stephens, Skipworth et al. 2008).

Ces arguments suggèrent le rôle de l'immunité innée dans l'inflammation observée au cours de la CC.

3.3 Mécanismes de l'immunité innée

3.3.1 Les stimuli PAMPs et DAMPs

L'immunité innée est activée par des *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMPs) et des *Damage Associated Molecular Pattern* (DAMPs). Les signaux pathogéniques ou PAMPs sont des molécules (fragments de paroi bactérienne type lipopolysaccharide, ADN, lipoprotéines, etc...) dérivées des microorganismes qui sont responsables du déclenchement de l'inflammation dans des contextes d'infection (Bianchi 2007, Newton and Dixit 2012). Les signaux de dégâts ou DAMPs sont des molécules (HSP, ADN, ARN, ATP etc...) libérées par les cellules de l'hôte en souffrance lors d'une agression, notamment dans des contextes d'ischémie/hypoxie, de traumatisme physique ainsi que par les cellules tumorales. L'inflammation engendrée par les DAMPs n'étant pas d'origine infectieuse, elle est caractérisée comme stérile (Bianchi 2007, Newton and Dixit 2012).

3.3.2 Les Pattern Recognition Receptors PRR

L'activation de l'immunité innée par les DAMPs et PAMPs nécessite leur reconnaissance par différents récepteurs PRR présents au niveau des cellules immunitaires innées (macrophages, monocytes, cellules dendritiques et mastocytes) mais aussi d'autres types cellulaires (cellule épithéliales, fibroblastes).

Ces PRR, une centaine environ, sont capables de reconnaître une variété de formes moléculaires de PAMPs et de DAMPs, environ un millier. Un seul type de PRR est capable de reconnaître plusieurs PAMPs et DAMPs. À ce jour, plusieurs classes de PRR sont connues, notamment les récepteurs *Toll-like* (TLR), les récepteurs *NOD* (*Nucleotide-binding oligomerization domain*)-*like* (NLR), mais aussi les récepteurs *RIG* (*Retinoic acid-inducible gene*)-*I-like* (RLR) et les récepteurs *absents in melanoma 2-like* (AIM2). Les PRR se répartissent essentiellement en deux familles : les récepteurs *Toll-like* récepteurs ou TLR et les récepteurs *NOD-like* ou NLR (Kumar, Kawai et al. 2009, Mogensen 2009, Schaefer 2014).

3.3.3 Les récepteurs NLR

Les NLR sont des récepteurs cytosoliques qui forment des oligomères en réponse à leur ligand. Un type de NLR, le NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing-3*) ou cryopyrine est impliqué dans la formation d'un inflammasome (cf. infra) (He, Hara et al. 2016).

3.3.3.1 Les inflammasomes

L'inflammasome est un complexe de protéines cytosoliques qui médie la réponse immunitaire de l'hôte à une infection microbienne ou à des dégâts cellulaires. L'assemblage d'un inflammasome déclenche le clivage protéolytique de la procaspase-1 inactive en caspase-1 active, qui convertit les précurseurs de cytokines pro-IL-1 β et pro-IL-18 en IL-1 β et IL-18 matures et biologiquement actives. La caspase-1 induit également la pyroptose, une forme de mort cellulaire (Kolb, Liu et al. 2014, He, Hara et al. 2016, Su, Wang et al. 2020).

La formation d'un inflammasome nécessite l'interaction entre 3 partenaires : un senseur NLRP3 qui joue le rôle de PRR, un domaine adaptateur *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain* (ASC), et un effecteur, la caspase-1 (He, Hara et al. 2016).

Cinq NLR (NLRP1, NLRP3, NLRC4, Pyrin et AIM2) ont la capacité de former des inflammasomes (He, Hara et al. 2016).

3.3.3.2 Un type particulier de NLR : l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome le mieux caractérisé est l'inflammasome NLRP3. Son activation consiste en 2 étapes, une première étape transcriptionnelle (amorçage ou « priming ») et une seconde étape de formation du complexe (activation) (Fig. 1).

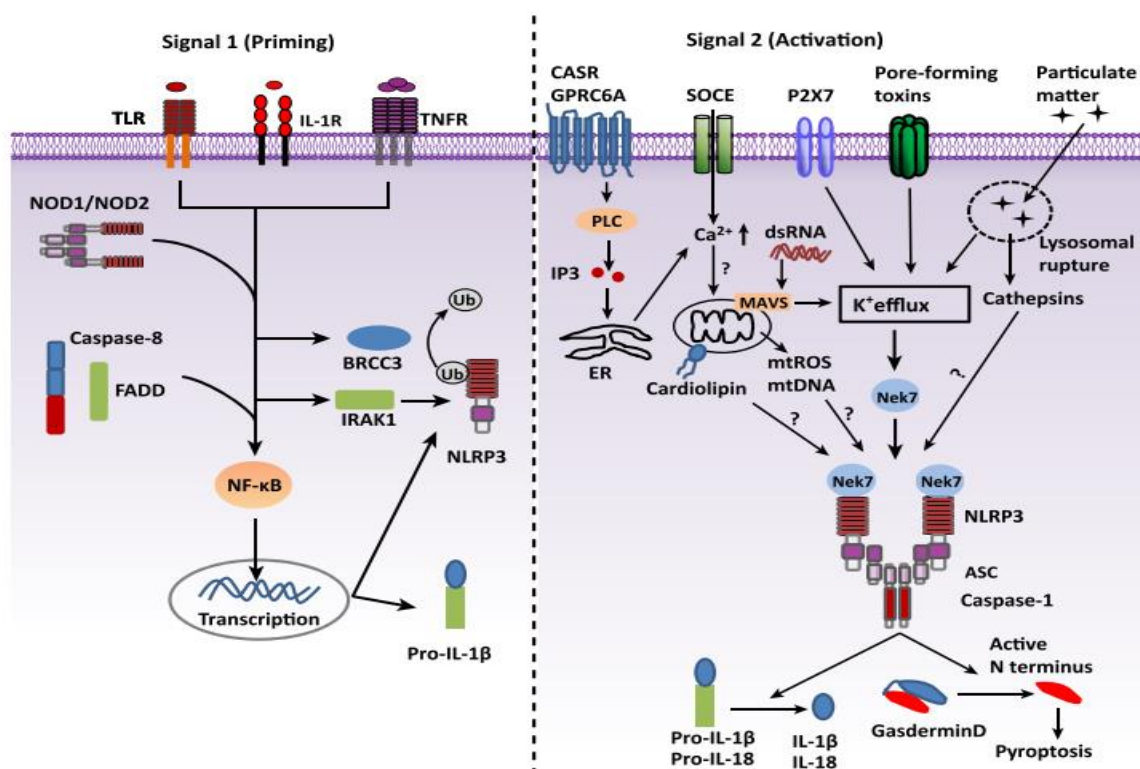


Figure 1. La voie de l'inflammasome NLRP3. Le signal 1 (amorçage, à gauche) est induit par des motifs microbiens ou des cytokines et conduit à la stimulation de la transcription de NLRP3 et de la pro-interleukine-1 beta (IL-1β) via l'activation du facteur de transcription NF-κB. Le signal 2 (activation, à droite) est induit par une pléthore de stimuli, tels que l'ATP, les toxines formatrices de pores, l'ARN viral et les particules, et active l'inflammasome NLRP3. La plupart des stimuli du NLRP3 induisent un efflux de K⁺, nécessaire et suffisant pour l'activation du NLRP3 (He, Hara et al. 2016).

La première étape consiste en la stimulation de la transcription du gène NLRP3 ainsi que celui des précurseurs pro-IL-1β et pro-IL-18. Plusieurs stimuli sont capables d'activer cette synthèse : certains DAMPs/PAMPs via les TLR (surtout TLR-2, -3 ou -4) (Fig. 3) et certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α) via leurs récepteurs spécifiques (Fig. 1). Cette étape est médiée par la voie NF-κB (Latz, Xiao et al. 2013, He, Hara et al. 2016, Su, Wang et al. 2020).

La seconde étape est l'activation. La protéine NLRP3 s'homomultimérise, recrute la protéine ASC qui elle-même recrute la procaspase-1 et l'active en caspase-1. La caspase-1 convertit les précurseurs IL-1β et IL-18 en leur forme active qui quittent la cellule via un pore créé par la gasdermine pour être relarguées dans la circulation. Cette étape est régie par plusieurs stimuli de natures différentes : mtADN, mtROS, ATP extracellulaire, particules intracellulaires (acide

urique) et la dérégulation de l'homéostasie calcique. Il semble cependant que l'efflux d'ion potassium semble être un des activateurs communs permettant l'assemblage et l'activation du complexe (Latz, Xiao et al. 2013, He, Hara et al. 2016, Su, Wang et al. 2020).

Des activations aberrantes de NLRP3 sont à l'origine de pathologies inflammatoires, par exemple les syndromes périodiques associés à la cryopyrine (MWS), dans laquelle NLRP3 est actif de manière constitutive. Son rôle est également suspecté dans d'autres affections comme la maladie d'Alzheimer, ainsi que le diabète de type 2 et l'athérosclérose (He, Hara et al. 2016).

3.3.3.3 Rôle du NLRP3 dans l'atrophie musculaire de la CC

Le rôle du NLR, en particulier de l'inflammasome NLRP3, n'a, à ce jour, encore jamais été investigué dans la CC, notamment dans l'atrophie musculaire. Néanmoins plusieurs arguments indiquent que cet inflammasome peut réguler la masse musculaire au cours de l'inflammation et pourrait donc contribuer à l'atrophie musculaire de la CC.

a. Dans le sepsis

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 a d'abord été étudié dans un modèle de sepsis induit par ligation et ponction caecale (CLP) chez des souris NLRP3 KO global. La délétion de NLRP3 a permis de réduire la perte de poids, de masse musculaire et l'atrophie des fibres musculaires (surtout rapides) induites par le sepsis. Cet effet protecteur était associé à une moindre élévation des taux musculaires et circulants d'IL-1 β , comme attendu. La stimulation de l'expression des principaux atrogènes MurF-1 et Atrogin-1 et la réduction de l'expression des chaînes lourdes de myosine *Myh2* et *Myh7* observées en réponse au sepsis étaient totalement prévenues en absence de NLRP3 (Huang, Kny et al. 2017). Ces résultats suggèrent donc que NLRP3 contribue à l'atrophie musculaire induite par le sepsis.

b. Dans la sarcopénie

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 a ensuite été étudié dans un modèle de sarcopénie liée à l'âge (18-22 mois) chez des souris NLRP3 KO global. La sarcopénie désigne une pathologie du vieillissement définie par une perte progressive de la masse et de la fonction musculaire. La délétion de NLRP3 a permis de réduire la perte de masse musculaire et l'atrophie des fibres musculaires (rapides) induites par le vieillissement tout en améliorant la fonction musculaire. L'augmentation de l'activité de la caspase-1 observée avec l'âge n'était pas observée chez la souris NLRP3 KO (McBride, Foley et al. 2017). Cependant, le taux circulant des cytokines pro-inflammatoires n'a pas été affecté par la délétion de NLRP3. Ces résultats suggèrent que la sarcopénie est indépendante de l'inflammation systémique, en particulier des cytokines circulantes, mais dépend de l'activation de NLRP3 (McBride, Foley et al. 2017).

c. Dans les dystrophies musculaires

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 a enfin été étudié dans un modèle murin *mdx*. Ce modèle est caractérisé par une activation de l'inflammasome NLRP3 au sein des fibres musculaires squelettiques. La délétion de NLRP3 dans ce modèle de dystrophie améliore différents paramètres de la fonction musculaire, associé à une diminution de l'activité de la caspase-1 et des taux musculaires d'IL-1 β , d'IL-18 et de TNF- α (Boursereau, Abou-Samra et al. 2018).

Ces trois expériences démontrent à quel point l'absence de NLRP3 a des effets majeurs sur la préservation de l'intégrité musculaire dans différents contextes inflammatoires. Il faut cependant noter qu'il s'agit de KO NLRP3 globaux et non muscle-spécifiques, ce qui ne permet pas de savoir si la préservation de la masse musculaire résulte d'un effet local ou systémique (Boursereau, Abou-Samra et al. 2018).

d. Dans la CC

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 n'a pas encore été étudié dans un modèle murin de CC. Notre laboratoire a montré cependant que l'expression musculaire de l'IL-1 β et de plusieurs composants de l'inflammasome NLRP3 (notamment les ARNm de la protéine NLRP3) est augmentée dans un modèle murin de CC induite par l'injection de cellules d'adénocarcinome de colon C26. Dès lors, ces observations jointes à celles de la littérature suggèrent l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans l'atrophie musculaire observée dans la CC. Cependant son rôle n'a jamais été établi.

3.3.3.4 L'inhibiteur de l'inflammasome MCC950

Le MCC950 est un inhibiteur spécifique et puissant de l'inflammasome NLRP3. Il bloque l'activation canonique, non canonique et alternative de cet inflammasome. Le MCC950 possède en plus des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques intéressantes. En effet, les propriétés pharmacodynamiques (IC₅₀ à l'encontre de NLRP3 < 10 nM) et pharmacocinétiques (biodisponibilité orale de 68%) favorables du MCC950 suggèrent qu'il représente une piste prometteuse pour le développement de médicaments (Coll, Robertson et al. 2015, Huang, Jiang et al. 2018, Coll, Hill et al. 2019, Krishnan, Ling et al. 2019, Tapia-Abellan, Angosto-Bazarra et al. 2019). L'interaction du MCC950 avec le motif Walker B du domaine NACHT de la protéine NLRP3 inhibe l'activité d'hydrolyse d'ATP du domaine NACHT, ce qui empêche l'appariement avec le domaine *pyrin* PYD, et donc la protéine NLRP3 reste dans sa conformation fermée (*Fig. 2*). Comme l'oligomérisation des protéines NLRP3 et leurs interactions avec l'ASC et la caspase-1 ne se font qu'avec la conformation ouverte, la constitution de l'inflammasome est donc inhibée (Coll, Hill et al. 2019, Tapia-Abellan,

Angosto-Bazarra et al. 2019). Le MCC950 en raison de son faible poids moléculaire (masse moléculaire de 426,46 Da) est capable de passer la barrière hémato-encéphalique et est notamment utilisé dans de modèles d'inflammation cérébrale. Sa capacité à inhiber spécifiquement le NLRP3 en fait un outil intéressant pour l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 dans un modèle de CC (Coll, Robertson et al. 2015).

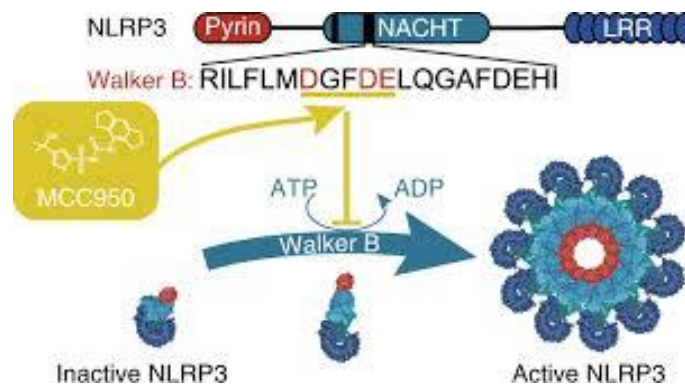


Figure 2. Schéma d'inactivation de NLRP3 par MCC950. L'inhibiteur du NLRP3 MCC950 agit au niveau du motif Walker B du domaine NACHT de la protéine NLRP3, ceci résulte en une inhibition de l'activité ATPase de ce domaine, l'activité ATPase étant nécessaire pour générer l'énergie nécessaire au changement de conformation par l'interaction du domaine PYD avec le domaine NACHT, permettant d'intégrer la conformation active et donc d'activer le complexe NLRP3 (Coll, Hill et al. 2019).

3.3.4 Les récepteurs TLR

Certains TLR sont présents sur la membrane externe (TLR-2, 4, 5, 6) alors que d'autres sont présents dans des endosomes intra-cellulaires (TLR-3, 7, 8, 9). Les TLR fonctionnent comme des dimères. Chaque dimère a une spécificité différente de ligand. La liaison entre un TLR et ses ligands induit le recrutement de protéines adaptatrices contenant un domaine TIR à savoir les protéines MyD88, TRIF, TIRAP et TRAM. Ces protéines adaptatrices activent en aval d'autres molécules au sein de la cellule par exemple certaines protéines kinases (IRAK1, IRAK4, TBK1 et IKKi) qui amplifient le signal tout en induisant des voies différentes (Newton and Dixit 2012).

3.3.4.1 Un type particulier de TLR : Le TLR-4

Le TLR-4, qui est un des récepteurs TLR les plus étudiés, reconnaît le lipopolysaccharide (LPS) ou endotoxine présente dans la paroi des bactéries gram négatif. Les signaux générés par le TLR-4 stimulent la transcription de cytokines pro-inflammatoires et de molécules d'adhésion via l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Fig. 3). Ceci conduit à l'induction ou la répression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Newton and Dixit 2012, O'Neill, Golenbock et al. 2013, Schaefer 2014).

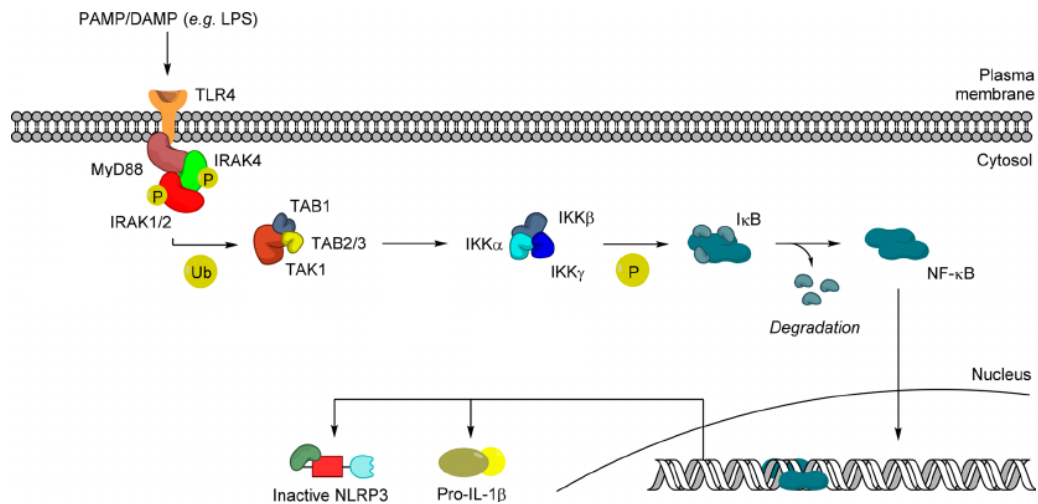


Figure 3. La voie du TLR-4. Les ligands du TLR-4 se fixent au niveau du récepteur et induisent un changement conformationnel du dimère, ce signal permet le recrutement de protéines adaptatrices notamment MyD88 qui se lie au récepteur via un domaine TIR. La protéine MyD88 recrutée active ensuite les kinases IRAK1 et 2 qui recrute ensuite TRAF6. TRAF6 ubiquitine les inhibiteurs (TAB1 & 2) de TAK1. L'activation de TAK1 conduit à l'activation de cascades IKK. La voie de signalisation d'IKK conduit à l'induction du facteur de transcription NF-κB. L'activation de NF-κB par TAK-1 est complexe et commence par l'assemblage d'un complexe protéique appelé signalosome. Le complexe protéique est constitué de deux kinases κB différentes, appelées IKKα et IKKβ. Cela provoque l'ajout d'une petite protéine régulatrice au signalosome appelée ubiquitine, qui déclenche la libération de la protéine NF-κB. NF-κB libéré transloque au noyau et active la transcription de la protéine NLRP3 inactive ainsi que de la pro IL-1β (Baldwin, Rivers-Auty et al. 2015)

3.3.4.2 Rôle des TLR-4 dans l'atrophie musculaire

Plusieurs groupes ont cherché à identifier le rôle du TLR4 et de ses ligands dans l'atrophie musculaire induite par l'inflammation.

a. Dans le sepsis

Chez la souris TLR-4 KO global ou MyD88 KO global, l'atrophie musculaire induite par le LPS est atténuée (Doyle, Zhang et al. 2011, Braun, Grossberg et al. 2013). Il en est de même si la souris est prétraitée par un antagoniste du TLR-4 (Ono, Maejima et al. 2020). En revanche, il n'est pas établi que l'effet du LPS soit médié par le TLR-4 musculaire, car le LPS conserve son effet atrophiant chez la souris MyD88 KO muscle-spécifique, l'atrophie musculaire induite par le LPS serait donc un processus indépendant du MyD88 musculaire (Braun, Grossberg et al. 2013).

b. Dans la dystrophie musculaire

Dans un modèle murin de la dystrophie de Duchenne (*mdx*), la délétion du TLR-4 a entraîné une augmentation significative de la force musculaire dans le muscle dystrophique du diaphragme, elle-même associée à des modifications histologiques bénéfiques, notamment une diminution de la fibrose, ainsi qu'une réduction de l'expression des gènes pro-inflammatoires et de l'infiltration des macrophages. L'ablation du TLR-4 chez les souris *mdx* a également modifié

le phénotype des macrophages musculaires en induisant un changement vers un profil plus anti-inflammatoire (Giordano, Mojumdar et al. 2015).

c. Dans la CC

Chez la souris TLR-4 KO global et porteuse d'un carcinome pulmonaire (LLC) ou d'un carcinome squameux de la tête et du cou (SCCF-VII), l'atrophie musculaire est prévenue (Cannon, Guttridge et al. 2007, Zhang, Liu et al. 2017). Les effets d'une délétion muscle-spécifique du TLR-4 n'ont jamais été investigués dans le contexte de la CC. Dans un modèle MyD88 KO global, l'atrophie musculaire induite par le développement d'un adénocarcinome ductal pancréatique (PDAC) ou d'un carcinome pulmonaire (LLC) est atténué (Zhu, Burfeind et al. 2019). Pour ce dernier modèle, l'effet protecteur persiste si la délétion de MyD88 est muscle spécifique (Bohnert, Goli et al. 2019). A noter que malgré les nombreux modèles de KO, l'inhibition pharmacologique de TLR-4 dans la CC n'a pas encore été évaluée.

Ces données indiquent donc que la voie TLR-4/MyD88 est impliquée non seulement dans l'atrophie musculaire induite par le LPS mais également dans celle observée au cours de la CC. Cependant, l'organe où cette stimulation a lieu n'est pas établi (muscle, macrophages, ...).

3.3.4.3 L'inhibiteur de TLR-4 : TAK-242

Le TAK-242 ou resatorvid a été identifié en 2006 par une équipe de chercheurs voulant identifier des inhibiteurs spécifiques de TLR-4 (Ii, Matsunaga et al. 2006). Cette petite molécule cible le domaine TIR intracellulaire de TLR-4 et empêche les interactions protéines/protéines en aval de celui-ci. Le TAK-242 possède également des propriétés pharmacodynamiques intéressantes (IC 50 à l'encontre de TLR-4 de 11 à 33 nM) et une demi-vie plasmatique > 12h chez la souris (Ii, Matsunaga et al. 2006, Hua, Tang et al. 2015). Il s'est avéré efficace à la fois *in vitro* ainsi que *in vivo*. Administré par voie intrapéritonéale dans un modèle de ligature-ponction caecale (CLP), il s'est avéré efficace pour inhiber la production de cytokines pro inflammatoires TNF- α et IL-6, l'activité de NF- κ B, l'expression d'Atrogine-1, et ainsi réduire l'atrophie musculaire (Ono, Maejima et al. 2020). En outre, il tend à diminuer la croissance, l'invasion et la capacité métastatique des cellules tumorales dans plusieurs modèles de cancer (Yu, Cheng et al. 2013, Zandi, Kashani et al. 2019).

3.3.5 Adiponectine

3.3.5.1 Généralités

L'Adiponectine ou ApN est une hormone de 244 acides aminés découverte en 2013 (Okada-Iwabu, Yamauchi et al. 2013) et sécrétée principalement par les adipocytes (adipokine) et accessoirement par le muscle squelettique (myokine). Les taux circulants très élevés (5 à 30

µg/mL) dérivent essentiellement du tissu adipeux. En cas d'inflammation, les taux circulants sont réduits, même si l'expression musculaire est souvent élevée (obésité, diabète sucré, exposition au LPS ou aux cytokines). L'action de l'ApN est médiée par deux récepteurs AdipoR1 (surtout exprimé au niveau du muscle) et AdipoR2 (surtout exprimé au niveau du foie). Sur le plan métabolique, l'ApN augmente le transport du glucose et l'oxydation des acides gras, des voies génératrices d'ATP, et inhibe parallèlement les voies consommatrices d'ATP, comme la synthèse protéique et la néoglucogenèse. Elle exerce aussi un effet anti-inflammatoire au niveau de différents organes, avec une conversion accrue des macrophages du phénotype M1 vers M2 et une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les souris KO ApN sont caractérisées par une insulino-résistance et une grande sensibilité du muscle aux stimuli inflammatoires (LPS, régime riche en graisses) avec un état pro-inflammatoire dans le muscle (production accrue de TNF- α et IL-1 β). A l'inverse, les souris transgéniques pour l'ApN sont protégées vis-à-vis de l'insulino-résistance et du diabète sucré induits par le régime riche en graisses et de l'inflammation du muscle en cas de dystrophie (*mdx*) (Abou-Samra, Selvais et al. 2020).

3.3.5.2 Actions biologiques de l'adiponectine sur le muscle squelettique

L'ApN exerce un effet *métabolique* en stimulant le transport du glucose via GLUT4, l'oxydation des acides gras et la biogenèse mitochondriale via la voie AMPK/PGC1- α (Abou-Samra, Selvais et al. 2020), des voies souvent inhibées dans la CC.

L'ApN exerce un effet *anti-inflammatoire* médié par une inhibition de la voie NF- κ B et de l'inflammasome NLRP3 ainsi que de la production musculaire de TNF- α et IL-1 β , des acteurs connus de l'atrophie musculaire (Abou-Samara M, 2020).

L'ApN exerce un effet *promyogénique* en stimulant la différenciation des myoblastes ((Fiaschi, Cirelli et al. 2009, Krause, Milne et al. 2019) et la régénération musculaire (Tanaka, Kita et al. 2019), des processus souvent altérés en cas de CC.

L'ApN *inhibe l'atrophie musculaire* causée par les GC ou les cytokines pro-inflammatoires en stimulant la voie AMPK/Akt (Singh, Shree et al. 2017). Le rôle de l'AMPK paraît essentiel, car cet effet de l'ApN est mimé par l'AICAR, un activateur de l'AMPK (Hall, Griss et al. 2018) qui bloque l'atrophie musculaire induite par les cytokines pro-inflammatoires *in vitro* et l'implantation de cellules tumorales C26.

L'ApN exerce un *effet anti-tumoral* qui peut indirectement protéger le muscle de l'atrophie (Pham, Raut et al. 2020).

Toutes ces actions de l'ApN sont susceptibles d'inhiber l'atrophie musculaire induite par l'inflammation associée à la CC.

3.3.5.3 Rôle de l'ApN dans l'atrophie musculaire

a. Bénéfice de l'ApN dans le modèle de dystrophie musculaire *mdx*

La surexpression constitutive d'ApN chez des souris *mdx* retarde la progression du déficit musculaire par une réduction de l'inflammation, des lésions musculaires et un accroissement de la myogenèse. A l'inverse, la délétion constitutive de l'Apn chez des souris *mdx* exacerbe les lésions musculaires, résultant en une diminution de leur force et de leur endurance. La surexpression musculaire de l'ApN améliore le phénotype dystrophique des souris *mdx* KO ApN. Son action est principalement médiée par l'AdipoR1 et la voie de signalisation de l'AMPK, qui conduit à une inhibition de l'activité de NF- κ B et une activation de PGC1- α (Abou-Samra, Selvais et al. 2020).

b. Bénéfice de l'ApN dans l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes

L'ApN s'est montrée capable de bloquer l'atrophie musculaire induite par les glucocorticoïdes tant *in vitro* qu'*in vivo* (Singh, Shree et al. 2017). *In vitro*, l'effet anti-atrophique est médié par le récepteur AdipoR1 et associé à une inhibition des atrogènes MurF-1 et Atrogin-1, ainsi qu'une stimulation de la voie AMPK/PGC1- α . *In vivo*, cet effet est associé à une inhibition des atrogènes et une stimulation de PGC1- α .

3.3.5.4 Un agoniste synthétique de l'ApN : l'AdipoRon

L'AdipoRon est une petite molécule synthétique agoniste des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2. Elle présente une cinétique d'élimination assez rapide (1/2 vie plasmatique de 2 heures) (Ng, Jian et al. 2020) et une IC50 de 3,5 μ M (Otvos 2019). Cette molécule présente des effets bénéfiques au niveau du muscle squelettique dystrophique à savoir une augmentation de la biogenèse mitochondriale et des performances d'endurance, mais aussi une diminution de l'inflammation et du stress oxydatif (Abou-Samra, Selvais et al. 2020).

4 Hypothèse générale du travail

Toutes des données suggèrent que l'inflammation médiée par TLR-4 & NLRP3 pourrait jouer un rôle dans l'atrophie musculaire de la CC. Comme ces voies pro-inflammatoires sont bloquées par l'ApN, il est possible que l'AdipoRon, un agoniste du récepteur AdipoR1, puisse également jouer un rôle bénéfique. Le but de ce travail sera donc de tester l'hypothèse que l'inhibition de l'inflammation prévienne l'atrophie musculaire dans la CC.

II. BUT GENERAL DU PROJET

Déterminer si l'inhibition pharmacologique du TLR-4 (par TAK-242) ou de l'inflammasome NLRP3 (par MCC950) ou l'utilisation de l'AdipoRon prévient l'atrophie musculaire associée à la CC. Pour ce faire, nous devons procéder par étapes :

1. Est-ce que l'inhibition de NLRP3 bloque l'élévation des taux circulants d'IL-1 β et l'induction du programme génique d'atrophie musculaire dans un modèle d'inflammation aiguë induite par l'injection de LPS ? ;
3. Est-ce que l'inhibition de NLRP3 bloque l'atrophie musculaire dans un modèle de CC induite par l'injection de cellules tumorales C26 ?
4. Est-ce que l'inhibition de TLR-4 ou l'AdipoRon bloquent l'atrophie musculaire dans un modèle de CC induite par l'injection de cellules tumorales C26

III. MATERIEL ET METHODES

1 Modèles animaux

1.1 *Modèle de sepsis*

1.1.1 *Modèle animal*

Le modèle LPS est un des modèles les mieux caractérisés pour évaluer les effets de la réponse inflammatoire aigüe. Il mime la première phase du sepsis. L'injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide (LPS) induit une inflammation aigüe en se fixant au récepteur TLR-4. Ceci conduit à la sécrétion de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et à l'activation d'un programme génique d'atrophie musculaire caractérisé par l'induction de plusieurs gènes, appartenant au système ubiquitine-protéasome et à l'autophagie (Dehoux, van Beneden et al. 2003). L'injection de LPS induit l'amorçage de l'inflammasome NLRP3. Cette stimulation passe par l'activation du TLR-4 et de la voie NF- κ B qui stimule la transcription du gène de la pro-IL-1 β et de la protéine NLRP3 inactive. Le LPS est également capable d'activer le complexe par la voie non canonique qui implique la caspase-11. Celle-ci clive un canal potassique, permettant ainsi l'efflux de potassium, nécessaire et suffisant pour activer l'inflammasome (He, Hara et al. 2016).

1.1.2 *Protocole suivi*

1.1.2.1 *Animaux*

L'expérience de sepsis a été réalisée sur des souris CD2F1 mâles (Charles River Laboratories) âgées de 8 semaines. Ces souris ont été hébergées dans l'animalerie pour une période d'habituation d'une semaine durant laquelle l'accès à l'alimentation n'était pas limité. Les souris ont été mises à jeun dès l'injection de LPS jusqu'au sacrifice. L'éclairage de la pièce alternait entre une phase de jour (7h à 19h) et une phase de nuit (19h à 7h).

1.1.2.2 *Réactifs*

Le MCC950 (Sigma #PZ0280) est dilué dans du PBS à la concentration de 6,25 mg/mL la veille de l'expérience et conservé à 4°C. La dose injectée en IP est de 50 mg/kg de poids corporel. Le LPS sérotype 0127:B8 (Sigma #L3129) est dilué dans du liquide physiologique à la concentration de 1 mg/mL. La dose injectée en IP est de 750 μ g par 100g de poids corporel.

1.1.2.3 *Traitement*

Après 1 semaine d'habituation, les souris ont été pesées et réparties en 3 (ou 4 selon l'expérience) cohortes de poids homogènes : 1) souris contrôles, 2) souris traitées au LPS, 3) souris prétraitées au MCC950 et 4) souris prétraitées au MCC950 puis traitées au LPS. Chaque

souris subit deux injections intra-péritonéales (IP) séparées d'une heure. Les souris contrôles reçoivent une première injection de PBS (160 μ L/20g de poids corporel), et une seconde de liquide physiologique (150 μ L/20g de poids corporel), les souris LPS reçoivent également une injection de PBS (160 μ L/20g de poids corporel) suivie de l'injection de LPS (150 μ L/20g de poids corporel). Les souris du dernier groupe subissent un prétraitement au MCC950 (160 μ L/20g de poids corporel) suivie d'une dose de LPS (150 μ L/20g de poids corporel).

1.1.2.4 Sacrifice

Les souris ont été sacrifiées par décapitation après asphyxie au CO₂, 2h30 (Fig. 4, n=4/groupe) ou 24h (Fig. 5, n=6/groupe) après l'injection de LPS/véhicule. Le sang a été récolté dans un tube au moyen d'une tige capillaire. Les tubes ont ensuite été déposés sur glace avant d'être centrifugés à 2000g (Eppendorf 5424 R) pendant 10min à 4°C. Le sérum (surnageant) a été récupéré et stocké à -80°C. Le foie, les muscles squelettiques tibialis anterior et gastrocnémiens, et la rate ont été collectés puis pesés avant d'être plongés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

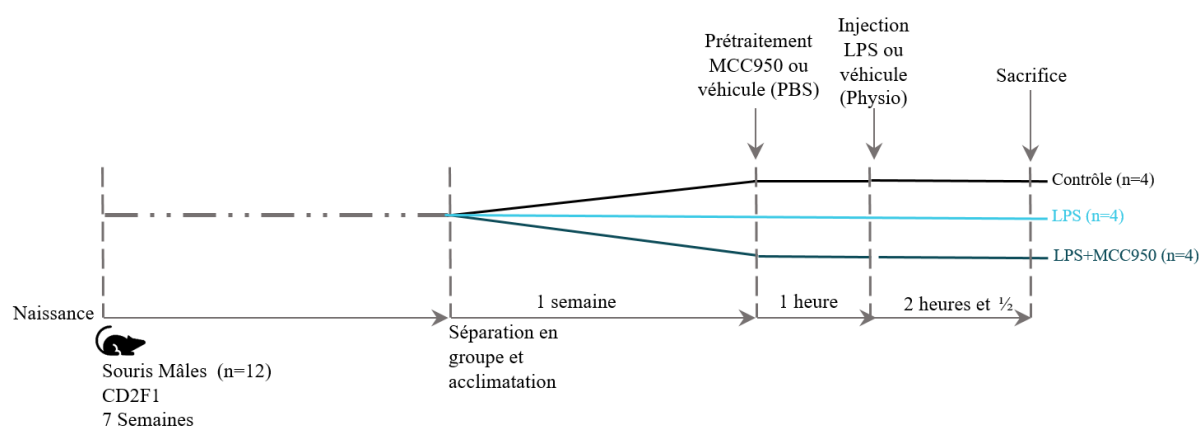


Figure 4. Représentation schématique du déroulement de l'expérience LPS 2h30

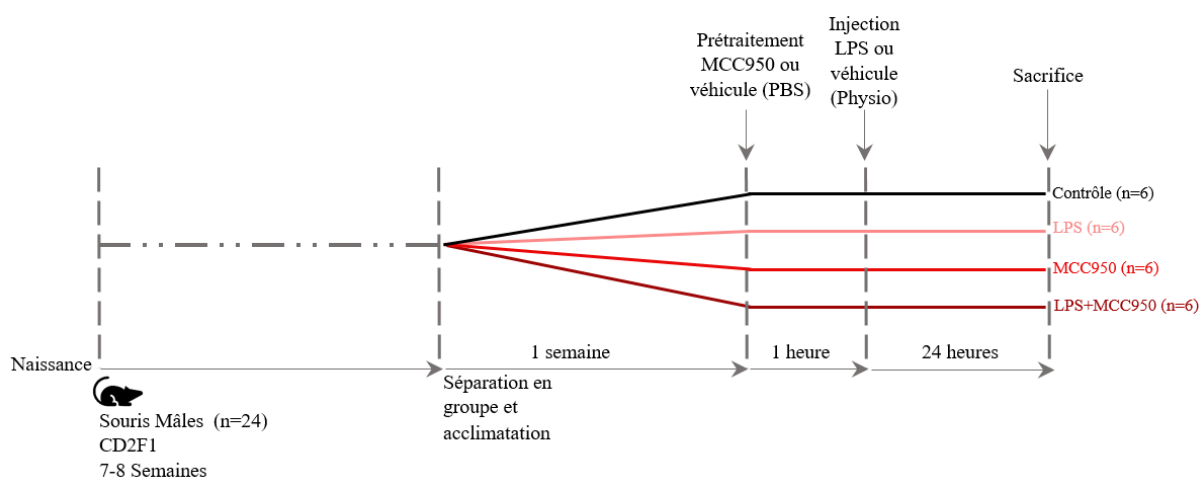


Figure 5. Représentation schématique du déroulement de l'expérience LPS 24h

1.2 *Modèle de CC*

1.2.1 *Modèle animal*

Le modèle de carcinome colique murin C26 a été choisi car c'est un des modèles les mieux caractérisés dans la littérature scientifique dans le domaine de la CC (Bonetto, Rupert et al. 2016). Le modèle de CC C26 est caractérisé par une diminution significative de la masse et de la force musculaire dès 7 jours post implantation des cellules tumorales sous la peau (Miller, Laird et al. 2019). Les mécanismes de l'atrophie de ce modèle sont multiples et comprennent une réduction de la synthèse protéique (diminution des hormones anaboliques notamment IGF-I) et de la myogenèse (réduction de la différenciation des cellules satellites) ainsi qu'une augmentation de la protéolyse (augmentation des protéines du système ubiquitine protéasome, de l'autophagie et de la caspase-3) (Yang, Huang et al. 2020).

1.2.2 *Protocole suivi*

1.2.2.1 *Culture cellulaire*

Ce modèle consiste en 2 étapes, la préparation des cellules tumorales C26 *in vitro* et leur injection *in vivo*. Les cellules de carcinome colique murin C26 (conservées dans de l'azote liquide en cryotubes individuels contenant 1×10^6 C26/mL) sont décongelées au bain-marie puis resuspendues dans 9 mL de milieu de culture (préalablement chauffé au bain-marie à 37°C). Ce milieu est élaboré à partir du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM, high glucose, GlutaMax, GIBCO 61965-026) à haute teneur (4,5 g/L) en glucose, complété par 10 % de sérum fœtal de bovin (GIBCO 10270-106), 100 µg/mL de streptomycine et 100 UI/mL de pénicilline (Thermo 15140-122). Après resuspension, la suspension cellulaire est centrifugée (2K364, HermLe) à 280g pendant 5 min. Le surnageant (contenant le DMSO) est éliminé et le culot resuspendu dans 1mL de milieu de culture. Cette suspension est ensuite ajoutée à une flasque T75 (Cellstar 658175, Greiner) et incubé à 37°C avec 5 % de CO₂. Une fois que la confluence est supérieure à 95%, les cellules sont passées une première fois. Le milieu de culture est éliminé et les cellules lavées 2x avec 5 mL de PBS pH 7,4 (GIBCO 20012019) à 37°C. Les cellules sont ensuite décollées avec 4 mL de trypsine-EDTA 0,25% (GIBCO 25300-054) et laissées à incuber pendant 5 min. La trypsine est neutralisée par l'ajout de 6 mL de milieu de culture. La solution est centrifugée pendant 5 min à 280g et le culot resuspendu dans 1mL de milieu. 50 µL sont pipetés et resuspendus dans 25 mL de milieu de culture. Celui-ci est ensuite transféré dans une flasque T75. Les cellules sont passées à 3 reprises (selon le même protocole) avant d'être injectées aux souris.

1.2.2.2 Animaux

23 souris CD2F1 mâles âgées de 7 semaines (Charles River Laboratories) ont été hébergées suivant le même protocole que ci-dessus à l'exception de la nourriture, qui est accessible *ad libitum* pour la durée de l'expérience.

1.2.2.3 Réactifs

Le MCC950 (Selleck #S7809) est dilué dans du PBS stérile à la concentration de 6,25 mg/mL le jour précédant le début de l'expérience et stocké à -20°C. La dose injectée en IP est de 25 mg/kg de poids corporel.

Le TAK-242 (MedChemExpress #HY-11109) et l'AdipoRon (AdipoGen #AG-CR1-0156-M010) sont dilués dans du DMSO pur (Sigma #D2650) au 1^{er} jour de l'expérience, aliquotés et stockés à -20°C. Ces solutions stocks sont diluées dans de l'huile de tournesol (Sigma #8001-21-6) extemporanément afin d'obtenir une solution 2,5% DMSO/Huile aux concentrations respectives de 1,25 mg/mL (TAK-242) et 6,25 mg/mL (AdipoRon). Les doses injectées en IP sont respectivement de 50 mg/kg pour l'AdipoRon et de 10 mg/kg pour le TAK-242.

1.2.2.4 Traitement

Les souris ont été pesées et réparties en cohortes de poids homogènes :

-Souris contrôle

-Souris porteuses de tumeurs C26

-Souris porteuses de tumeurs C26 traitées au MCC950 (50 mg/kg) (*Fig. 6*)

-Souris porteuses de tumeurs C26 traitées au TAK-242 (10 mg/kg) } (*Fig. 7*)

-Souris porteuses de tumeurs C26 traitées à l'AdipoRon (50 mg/kg) }

Au jour 0, les souris sélectionnées pour faire partie des groupes porteurs de tumeurs ont reçu une injection sous-cutanée de cellules C26 (dilution 1/20 dans 0,1 mL de liquide physiologique) dans la région inter scapulaire tandis que les souris contrôles reçoivent une injection de liquide physiologique (0,1 mL) après anesthésie par injection IP de 80 mg/kg de kétamine (Nimatek®, Dechra) et 8 mg/kg de xylazine (Rompun®, Bayer AG). Du jour 5 jusqu'au sacrifice, les groupes C26 et contrôles de l'expérience MCC950 subissent 2 injections quotidiennes IP (à 8h et 18h) de PBS (160µL/20g de poids corporel) tandis que les souris du groupe MCC950 reçoivent 2 injections de MCC950 (160µL/20g de poids corporel, à 8h et 18h). Les souris contrôles et C26 de l'expérience TAK-242/AdipoRon reçoivent une injection quotidienne de DMSO/huile 2,5% v/v (160µL/20g de poids corporel). Les souris des groupes TAK-242 et AdipoRon reçoivent une injection IP quotidienne de leur traitement respectif (160µL/20g de poids corporel).

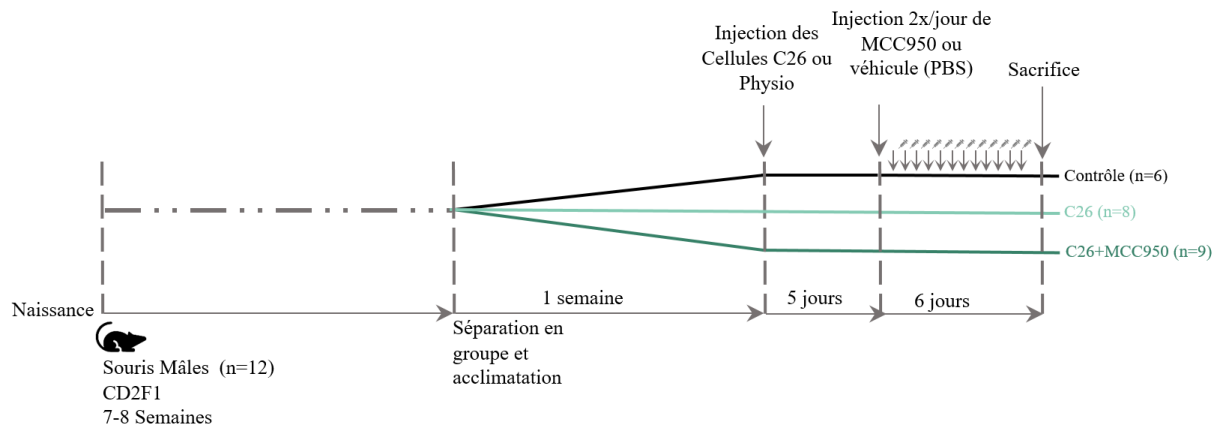


Figure 6. Représentation schématique du déroulement de l'expérience C26

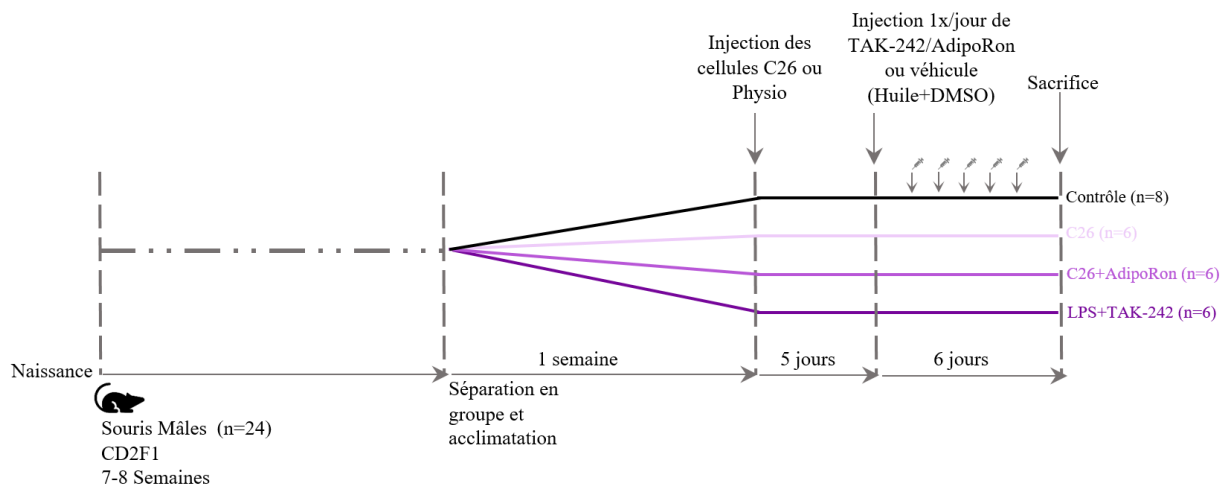


Figure 7. Représentation schématique du déroulement de l'expérience C26

1.2.2.5 Performance physique

Au jour 10, la force de préhension des souris est évaluée par un *grip test*. Le *grip test* permet d'évaluer la force maximale en mesurant soit la préhension des 2 membres antérieurs, soit la préhension des 4 membres (antérieurs & postérieurs, celle évaluée dans nos expériences). Pour ce test, la souris est placée sur une grille inclinée à 45 degrés et connectée à un dynamomètre (BIO-GS3, PanLab-Bioseb). Une fois agrippée par la queue, la souris est tirée par la queue vers l'arrière jusqu'à son décrochage de la grille. Ce test est effectué 3 fois d'affilée, la valeur de force maximale développée (mesurée en gramme force ou gF) est enregistrée. Deux séries de tests sont réalisés avec 30 minutes d'intervalle.

Au jour 11, l'état global des souris est apprécié par une évaluation comportementale. Ceci permet de déterminer leur état de santé en relation avec l'avancée de leur masse tumorale. Les différents critères évalués sont repris dans le manuel du *Murine sepsis score* (MSS). Ce tableau se base sur l'apparence de la fourrure, le niveau de conscience, l'activité, la réponse au stimulus, les yeux, la fréquence respiratoire et la qualité respiratoire (Mai, Sharma et al. 2018). Chacun

de ces critères est subdivisé en 4 scores, le score de 0 est la valeur de base assimilable à une souris contrôle, un score de 1 représente une réponse légère, un score de 2 une réponse modérée et un score de 3 une réponse forte. Les critères sont repris dans le tableau ci-dessous (*Fig. 8*). Le score MSS établi est la moyenne des scores de ces sept composantes, une valeur supérieure à 2 exprime une réponse forte et un mauvais pronostic.

Score	0	1	2	3
Apparence fourrure	Lisse	Légèrement ébouriffé	Majorité de la fourrure dorsale ébouriffée	Piloerection, bouffie
Niveau Activité	Active	Réduit (ne se nourrit, ni ne boit)	Seulement si provoqué	Absent même si provoqué
Yeux	Ouverts	Mi-clos mais s'ouvrent par stimulation	Mi-clos même si stimulation	Fermés/ quasi fermés
Niveau de conscience	Actif	Actif, évite de se tenir debout	Actif uniquement lorsque provoqué	Non-réponse, même en cas de provocation
Réponse au stimulus	Normale	Réponse ralentie aux stimuli auditifs ou tactiles	Pas de réaction à l'audition, réaction ralentie au toucher	Pas de réponse aux stimuli tactiles
Qualité de la respiration	Normale	Périodes de respiration laborieuse	Respiration constamment laborieuse	Respiration laborieuse avec halètements

Figure 8. Evaluation du comportement par le MSS. Ce tableau divise chacune des 7 composantes en 4 critères auquel une valeur score est attribuée (0-3)

1.2.2.6 Sacrifice

Les souris ont été sacrifiées par décapitation après asphyxie au CO₂ au J11. Le foie, la rate, les gastrocnémiens, le tibialis anterior droit, le tissu adipeux blanc et brun, la tumeur et le sang ont été collecté comme précédemment. Le tibialis anterior gauche ainsi qu'une moitié de la tumeur sont conservés dans le formol, pour analyse histologique ultérieure.

2 Mesure de l'expression des gènes par RT-qPCR

La RT-qPCR (Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction) est une technique d'analyse quantitative de l'abondance relative d'un ARNm spécifique dans un échantillon. Après extraction, les ARN sont transcrits en ADN complémentaire (ADNc) par une transcriptase inverse. Les ARN cibles sont amplifiés par réaction en chaîne par une polymérase générant des amplicons. Le principe de cette quantification repose sur la mesure de la fluorescence émise par le SYBR® Green, un agent s'intercalant entre les deux brins d'ADN de chaque amplicon. Un niveau de fluorescence est défini et le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre ce niveau est inversement proportionnel au nombre de copies d'ADNc et donc d'ARNm cible initial.

2.1 Homogénéisation des tissus

Afin de pouvoir extraire l'ARN des différents tissus, 2 étapes sont nécessaires : une première étape de broyage dans un mortier avec un pilon en porcelaine, puis une seconde étape d'homogénéisation à l'Ultraturax. Pour réaliser cette première étape, les tissus sont broyés dans le mortier continuellement refroidi à l'azote, ceci permettant un broyage à très basse température inhibant l'action des enzymes susceptibles de dégrader l'ARN. Une fois le tissu broyé sous forme de poudre, celle-ci est transférée dans le tube initial et conservée à -80°C.

2.2 Extraction de l'ARN

Pour commencer l'étape d'extraction d'ARN, 1 mL d'une solution de phénol et de thiocyanate de guanidine, le Tripure Isolation Reagent (Roche #11667165001) est ajouté directement aux tubes destinés à l'extraction d'ARN. Le thiocyanate de guanidium permet de lyser les cellules et de dénaturer les protéines dont les DNases et les RNases. La poudre congelée est ajoutée aux tubes sur la balance technique AB204 (Mettler Toledo), le poids de tissu à ajouter varie selon sa nature, en particulier de son contenu en ARN (Foie=30 mg/mL de Tripure, muscle=50 mg/mL de Tripure). La poudre est ensuite homogénéisée à l'Ultraturax T25 (Janke et Kunkel, Ika®-Labortechnik) sur glace 3x20 secondes à vitesse maximum (24 000 rpm). Le tissu homogénéisé est centrifugé 10 minutes à 13 000g (J6-MI, Beckman Coulter). Le surnageant (contenant l'ARN et l'ADN) est pipeté et transféré dans un autre tube tandis que le culot (contenant les débris cellulaires) est jeté. 200 µL de chloroforme (Merck #102445.2500) (ratio 200 µL/1 mL de Tripure) sont ajoutés au surnageant, la solution est ensuite mélangée puis laissée à incuber 10 minutes à température ambiante, puis centrifugée 15 minutes à 13 000g (Eppendorf 5424 R). La phase supérieure incolore est récupérée, tout en évitant de toucher la couche intermédiaire d'ADN, de protéines et la phase organique rose inférieure (phénol + chloroforme), et est transférée dans un nouveau tube. 500 µL d'isopropanol (VWR #20842.330) (ratio 500 µL/1 mL de Tripure) sont ajoutés et le tube est laissé 10 minutes à t° ambiante pour précipiter l'ARN. Cette étape est suivie d'une centrifugation de 10 minutes à 13 000g pour culoter les ARN. Le surnageant est éliminé, le culot d'ARN lavé avec 1mL d'éthanol 75% (VWR #20821.310) (ratio 1 mL/1mL de Tripure de départ). Les ARN sont ensuite vortexés jusqu'à voir le culot se détacher puis centrifugés 10 minutes à 13 000g. L'éthanol est éliminé et le tube est séché à l'aide d'un coton-tige, le surplus d'éthanol est séché une dizaine de minutes minimum sur table. Le culot est resuspendu dans le volume adéquat d'H₂O DEPC (VWR #E476) préalablement chauffée à 65°C. Ce volume dépend du type de tissu, ceux riches en

ARN ayant besoin d'un volume de dissolution plus grand puis. La suspension est laissée à reposer une nuit à 4°C pour favoriser la resuspension.

2.3 Quantification de l'ARN total

Les ARNs sont quantifiés au spectrophotomètre à microvolume (ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop Technologies). Celui-ci se base sur la loi de Lambert-Beer qui établit une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration d'acide nucléique d'un échantillon. Les ARNs sont réchauffés 10 minutes à 65°C, puis 2 µL sont disposés sur le socle de l'appareil et lus à 260 nm, la concentration est déduite par la formule 1 U = 40 µg ARN/mL.

2.4 Transcription inverse

Les échantillons sont chauffés au bain-marie à 65°C pendant 5 minutes afin de linéariser l'ARN. Un volume correspondant à 1 µg d'ARN est ensuite pipeté dans un tube PCR 0,2 mL et dilué dans un volume d'eau DEPC pour obtenir un volume total de 11,5 µL. A chaque échantillon est ajouté 8,5 µL d'un mix de réactifs (Thermo Fisher Scientific) pour transcriptase inverse composé de 4 µL de Tampon 5x (250 mM Tris-HCl, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µL de random hexamères (Random Hexamer Primer #SO142) 2 µL de dNTP 1mM (dNTP Mix #R0191), 0,5 µL de Ribolock (RiboLock RNase Inhibitor #EO0381) et 1 µL de transcriptase inverse (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase #EP0451). Le mix est ajouté par aller retours à la pipette dans le tube de PCR 0,2 mL. Finalement, les tubes sont ensuite incubés dans l'appareil de PCR (S1000TM Thermal Cycler, Bio-rad) avec le programme suivant : 25°C pendant 10 min, afin de permettre la liaison des amorces, 42°C pendant 1h, la température d'activité enzymatique optimale pour la transcriptase inverse, puis 70°C pendant 10 min, qui conduit à la dégradation de l'enzyme et à l'arrêt de la transcription. Les ADNc obtenus après cette étape sont dilués 15 fois dans de l'eau DEPC (10 µL d'échantillon dans 140 µL d'eau DEPC) puis conservés à -20°C.

2.5 RT-qPCR

Une fois les ARN transcrits en ADNc, ils sont amplifiés par une ADN polymérase. Chaque cycle d'amplification se subdivise en 3 étapes (*Fig. 9*)

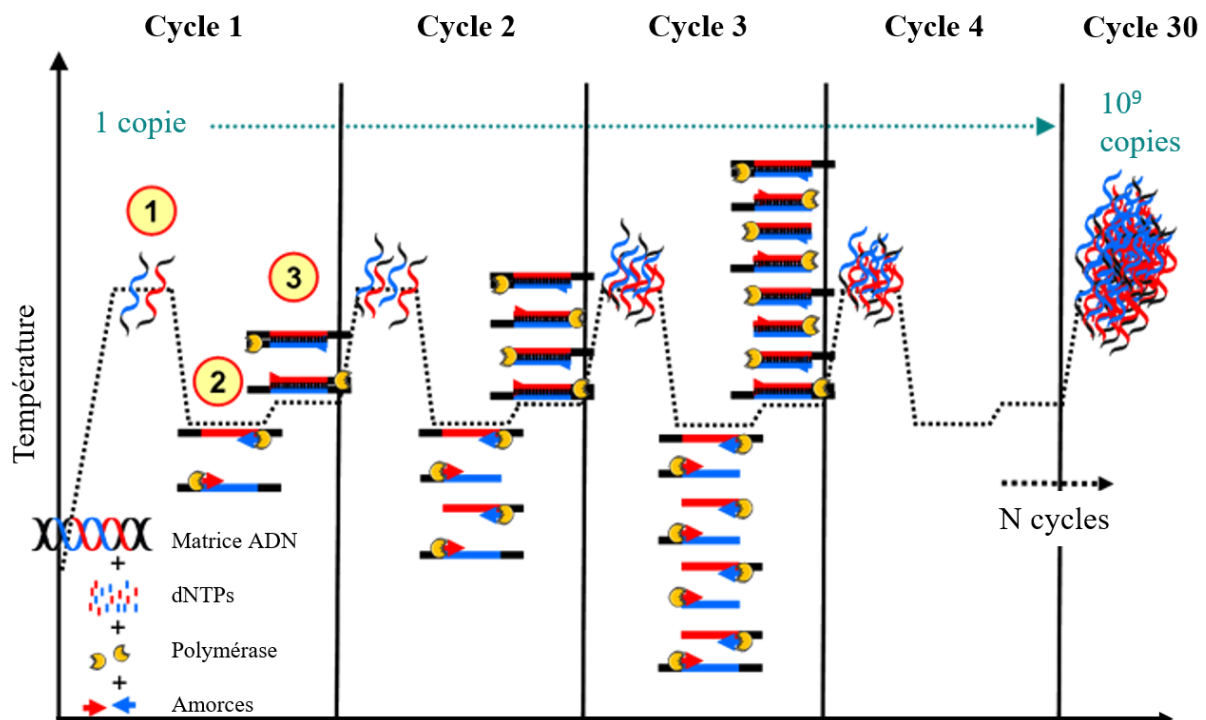


Figure 9. Principe de la RTqPCR. ① Etape de dénaturation : séparation des deux brins d'ADN ② Etape d'hybridation des amorces (primers) aux extrémités de la séquence ③ Etape d'élongation, la Taq Polymérase se fixe à l'amorce et synthétise un brin complémentaire à partir de dNTPs. Chaque cycle est répété au maximum 40 fois, un trop grand nombre de changements de température (cycles PCR) dégrade la polymérase, le risque d'erreur de celle-ci est alors augmenté. Les dNTPs agissent aussi comme facteur limitant. <https://ed414-openlab.unistra.fr/les-tp/adn-et-genetique-2009-2012/pour-preparer-le-tp/la-pcr-quest-ce-que-cest/>
Le profil d'une réaction PCR quantitative classique se décompose en 3 étapes (Fig. 10):

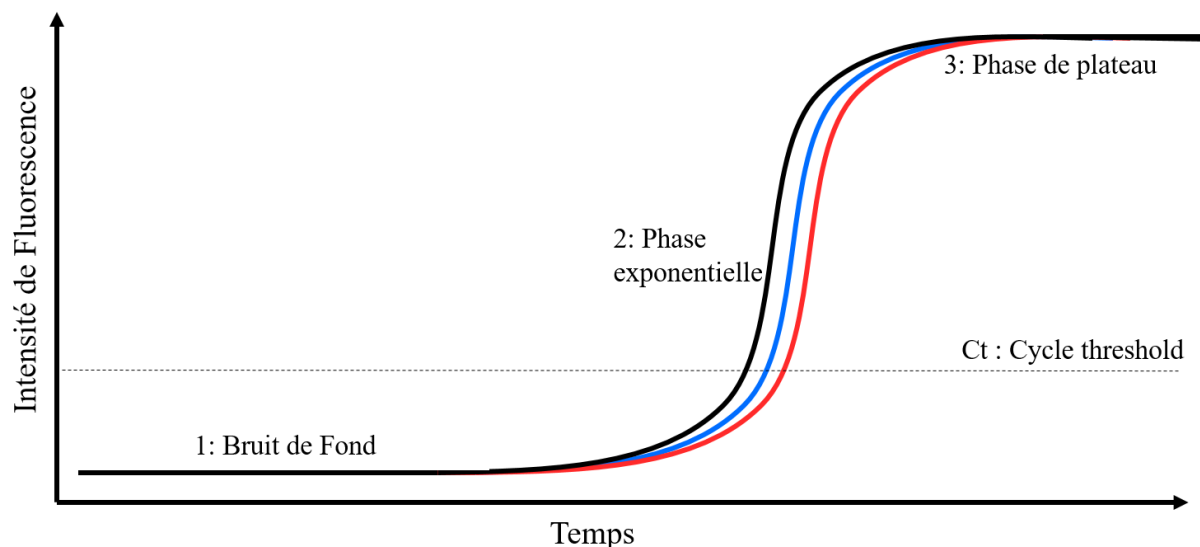


Figure 10. Profil de la RTqPCR. Un fluorophore (SYBR green) ayant la propriété de lier l'ADN double brin en phase d'élongation et d'émettre un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'amplicons générés permet de suivre l'amplification de la séquence d'intérêt. - ① « bruit de fond »: la quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond ② Phase exponentielle de croissance : cycle au cours duquel la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent statistiquement et significativement plus élevé que le seuil de détection de l'appareil (cycle threshold) ③ Phase de plateau: certains composants de la réaction (cités ci-haut) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle, l'amplification atteint un plateau.

Les ADNc sont utilisés comme matrices d'amplification. La RT-qPCR est réalisée sur une plaque PCR iQTM 96-puits (Bio-rad #2239441) grâce au master mix (Bio-rad #170-8882) qui contient une ADN polymérase (hot-start iTaq DNA polymerase), des désoxyribonucléotides (dNTPs), le SYBR® Green I dye, de la fluorescéine, des amplificateurs et stabilisateurs de la réaction.

Chaque puit de la plaque PCR est rempli avec une préparation de volume final de 25 µL. Pour chaque préparation, 4 µL d'ADNc d'échantillon dilué 15x sont ajoutés à 21 µL d'un mix composé de 12,5 µL de Master mix (Bio-Rad), 2 µL de chaque primer sens et anti-sens (à 5 pmol/L) et 4,5 µL d'H₂O DEPC. Chaque échantillon est mesuré en double. Pour s'assurer de la qualité des mesures, chaque plaque comprend un contrôle positif (pool de cDNA de foie de souris traitées au LPS) et négatif (eau DEPC) pour chaque paire de primers.

La plaque est ensuite scellée et centrifugée 1 min à 900g (J6-MI, Beckman Coulter). L'étape d'amplification (d'une durée de 40 cycles) est réalisée sur l'iCycler iQTM Real-Time PCR Detection System (Bio-rad). L'appareil commence par chauffer les échantillons à 95°C pendant 10 minutes afin d'activer l'ADN polymérase. Une fois l'enzyme activée, les cycles commencent. Chaque cycle comprend 2 étapes, une 1^{ère} de dénaturation de l'ADNc à 95°C pendant 15 secondes et une 2^{nde} d'hybridation des amorces/amplification des segments d'ADN à 60°C pendant 1 minute. A la fin de chaque cycle, la machine mesure la fluorescence émise par le SYBR® Green. Celle-ci est analysée par le programme Optical system software iQS (Bio-Rad).

Une valeur de fluorescence est choisie automatiquement ou par l'opérateur, fixée dans notre cas à 100 et appelée « threshold ». L'intersection entre ce « threshold » et la courbe d'amplification correspond au nombre de cycles ou Ct. Les Ct des gènes d'intérêt sont normalisés par les valeurs de Ct d'un gène de référence (Cyclophiline ou GAPDH) générées sur les mêmes échantillons ($\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}$). Le gène de référence doit être exprimé de manière identique entre les différentes conditions expérimentales. L'expression relative pour chaque échantillon est calculée par la formule suivante $2^{-\Delta Ct} \text{ groupe testé} / \text{Moyenne } (2^{-\Delta Ct}) \text{ du groupe contrôle}$.

3 ELISA

L'IL-1β est une puissante cytokine initiatrice de l'inflammation. Son dosage au niveau circulant permet d'investiguer l'état inflammatoire de souris injectées au LPS ou porteuses d'une tumeur C26 et les effets éventuels des traitements anti-inflammatoires.

Ce dosage de l'IL-1 β circulant est réalisé via la méthode immunoenzymatique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay) à l'aide du test Quantikine® ELISA Mouse IL-1 β /IL-1F2 Immunoassay (R&D Systems) dont le principe est décrit ci-dessous (Fig. 11).

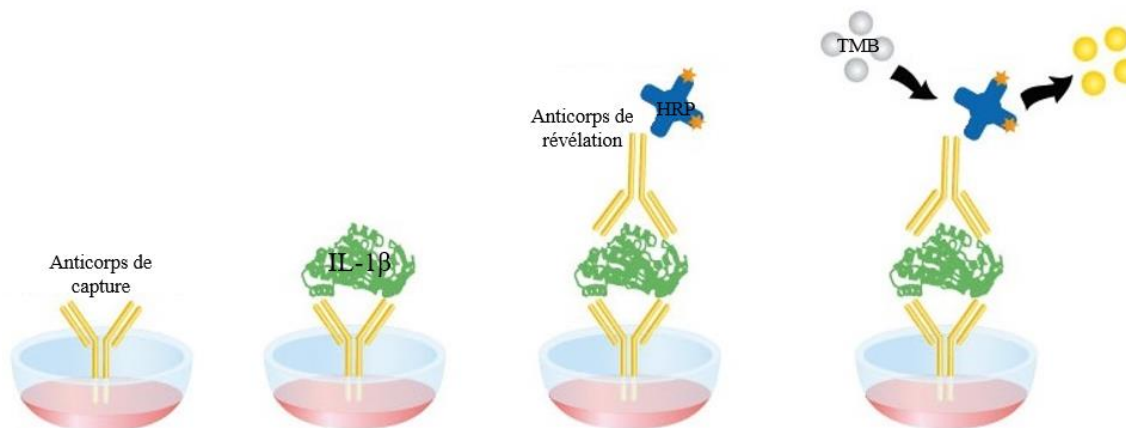


Figure 11. Principe de l'ELISA IL-1 β . L'antigène, dans notre cas l'IL-1 β est « pris en sandwich » entre un anticorps de capture, fixé au fond de chaque puits et un anticorps de révélation, couplé à un enzyme, qui métabolise son substrat en un produit coloré. La réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt acide, qui engendre un changement de couleur du milieu. L'absorbance est ensuite lue au spectrophotomètre, les valeurs obtenues sont comparées à une courbe de calibration effectuée grâce à des dilutions de standard d'IL-1 β , ce qui permet de déterminer les concentrations d'IL-1 β . <https://www.leinco.com/sandwich-elisa-protocol/>

Une courbe de calibration est réalisée en effectuant des dilutions en série (8x) à partir d'une solution standard (Standard IL-1 β Souris #893831), afin d'obtenir des concentrations d'IL-1 β allant de 12,5 à 800 pg/mL. Les puits de la plaque, déjà recouverts de l'anticorps de capture, sont ensuite remplis de 50 μ L de diluant (Diluant d'assay RD1N #895488) ainsi que 50 μ L de chacune des 9 dilutions de standard, du blanc et des échantillons. Chaque condition est évaluée en double. La plaque est ensuite scellée, mélangée et laissée à incuber pendant 2h à température ambiante. Cette étape permet la fixation de l'IL-1 β aux anticorps de la plaque. Le contenu des puits est ensuite éliminé et ceux-ci rincés 5x avec 300 μ L de tampon de lavage (Tampon de lavage concentré #895003), constitué d'un détergent dilué 25x dans de l'eau distillée. Une solution « conjuguée » (Conjugué IL-1 β Souris #893830) est ensuite ajoutée aux puits. Celle-ci contient des anticorps polyclonaux spécifiques à l'IL-1 β , couplée à l'enzyme horseradish peroxydase (HRP). Cette solution est laissée à incuber 2h à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés comme cité précédemment. 100 μ L du substrat de l'enzyme, le 3,3', 5,5' – tétraméthylbenzidine (TMB) (Réactif colorant A & B #895000 & #895001) sont ensuite ajoutés aux puits, gentiment homogénéisée puis laissée à incuber 30 min, à température ambiante, à l'abri de la lumière. Ce substrat est oxydé par l'action de la HRP en un produit de couleur bleu. L'intensité de cette coloration est directement proportionnelle à la quantité d'IL-1 β contenue

dans l'échantillon initial. La réaction est stoppée par l'ajout de 100 μ L de la solution STOP acide (Solution STOP #895174), qui fait virer la couleur de la solution du bleu au jaune. L'absorbance des puits est ensuite lue au spectrophotomètre (Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific) à 450 nm avec une correction fixée à 570 nm. La quantité d'IL-1 β est ensuite déterminée à partir de la courbe de calibration.

4 Analyses Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'aide du logiciel JMP Pro 14 (SAS Institute Inc.) et les graphiques à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc.). Les résultats sont présentés sous forme de moyennes ($\pm$ SEM). Le nombre d'individus testés (n) est indiqué dans les légendes des figures. Pour évaluer les différences significatives entre deux groupes, le test- t de Student bilatéral non apparié ou le test de Mann-Whitney-Wilcoxon bilatéral ont été utilisés en fonction de la distribution des variables quantitatives (normale ou non). Lors de la comparaison de plus de deux groupes, une ANOVA à une voie suivie de tests post hoc de Tukey ou de multiples t-tests bilatéraux de Student avec correction de Bonferroni (si paramétrique) ou le test global de Kruskal-Wallis suivi du test post hoc de Steel-Dwass (si non paramétrique) ont été utilisés en fonction de la distribution. Si nécessaire, les variables ont été transformées par les fonctions logarithme en base 2, racine carrée et carré avant les tests statistiques pour répondre à l'hypothèse de normalité. $p < 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif.

IV. RESULTATS

1 Inhibition du NLRP3 par MCC950

1.1 Effet du MCC950 dans l'inflammation induite par le LPS (2h30)

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'effet inhibiteur du MCC950 sur l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans un modèle murin de sepsis induit par le LPS.

1.1.1 Le MCC950 bloque l'élévation des taux circulants d'IL-1 β induite par le LPS

Afin de démontrer l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par le MCC950, nous avons mesuré par ELISA les taux circulants d'IL-1 β 2h30 après l'injection de LPS chez des animaux prétraités par le MCC950.

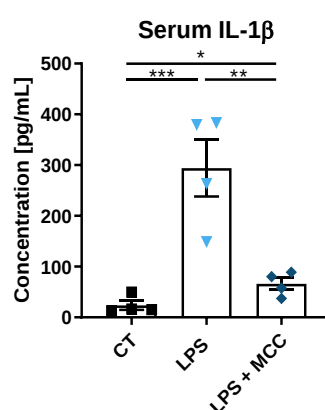


Figure 12. Effet de MCC950 sur les taux circulants d'IL-1 β des souris traitées au LPS. Concentration sérique d'IL-1 β de souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou volume équivalent de véhicule puis traitées par une injection en IP de LPS (750 μ g/100g P.C.) ou volume équivalent de véhicule. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur les données transformées par un LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=4). (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

Comme la figure ci-dessus le montre, en bloquant l'activation de l'inflammasome NLRP3, le MCC950 bloque la sécrétion subséquente de l'IL-1 β . L'élévation des taux circulants d'IL-1 β (Fig. 12) induite par l'injection de LPS (12,5x ; $P < 0,001$ vs CT) est nettement inhibée par le traitement au MCC950 (LPS+MCC950: 2,8x vs LPS: 12,5x; $P < 0,01$). Le MCC950 bloque efficacement l'augmentation des taux circulants d'IL-1 β induite par le traitement au LPS et donc l'activation de l'inflammasome NLRP3 par le LPS.

1.1.2 Le MCC950 ne modifie pas le poids corporel et celui des principaux organes

Afin d'évaluer l'effet du MCC950 sur les modifications des paramètres anthropométriques induites par le LPS, nous avons mesuré le poids des souris juste avant le sacrifice ainsi que le

poids du tibialis anterior, du gastrocnémien et du foie. Le poids des souris n'a pas été modifié, tout comme celui des organes (muscles squelettiques, foie), en réponse au LPS ou au MCC950. Le caractère aigu (2h30) de cette expérience pourrait expliquer l'absence de modification du poids des différents organes.

1.1.3 Le MCC950 prévient le priming de l'inflammasome uniquement dans le foie

Nous avons ensuite évalué l'expression génique des différents composants de l'inflammasome (*Nlrp3*, *IL-1 β*) dans le muscle et le foie. Le LPS induit l'expression d'*IL-1 β* de façon similaire (40x ; $P < 0,001$ vs CT) dans le foie (Fig. 13A) et le muscle (Fig. 13B). Cependant seule l'induction d'*IL-1 β* dans le foie est atténuée (-50%) par le MCC950 (LPS+MCC950: 21x vs LPS: 40x ; $P < 0,05$). L'expression de *Nlrp3* en réponse au LPS est équivalente (~ 13 x ; $P < 0,0001$ vs CT) dans le foie (Fig. 13C) et le muscle (Fig. 13D). A nouveau, seule l'induction dans le foie tend à s'atténuer (-40%) par le MCC950 (LPS+MCC950: 8x vs LPS: 13x; $P = \text{NS}$). Dès lors, l'inflammation aiguë induite par l'injection de LPS augmente l'expression d'*IL-1 β* et de

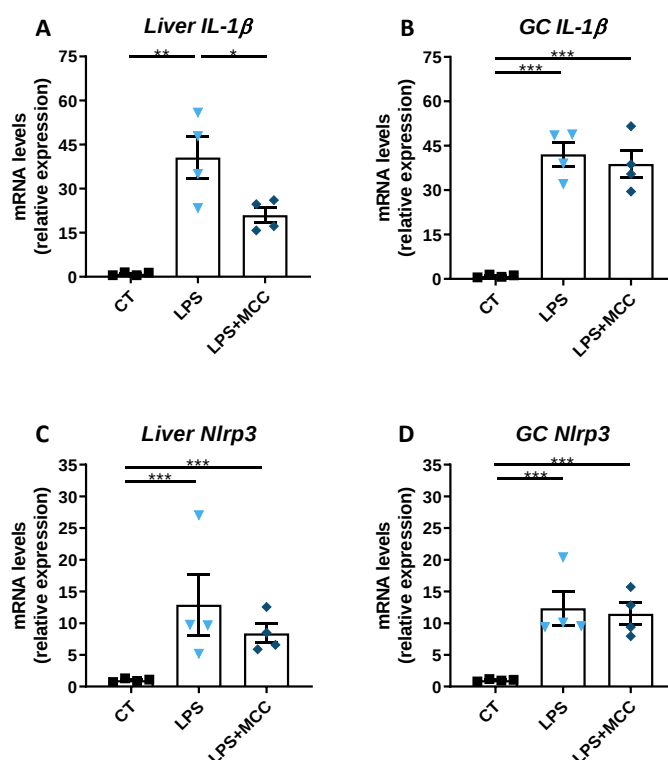


Figure 13. Effet du MCC950 sur l'expression hépatique et musculaire des acteurs de l'inflammasome (*IL-1 β* , *Nlrp3*) chez des souris traitées au LPS. Expression relative des ARNm d'*IL-1 β* et de *Nlrp3* au niveau hépatique (A, C) et musculaire au niveau du gastrocnémien (B, D) chez des souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou un volume équivalent de véhicule puis traitées par une injection IP de LPS (750 $\mu\text{g}/100\text{g}$ P.C.) ou un volume équivalent de véhicule. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur les données transformées par un LOG_2 pour (B) & (C), transformées par un $\sqrt{}$ pour (A) & par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Student avec correction de Bonferroni sur des données transformées par $\sqrt{}$ pour (D). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=4). (*) : $p < 0,05$, (**) : $p < 0,01$, (***) : $p < 0,001$

Nlrp3 non seulement dans le foie mais également dans le muscle squelettique. Par contre, le traitement au MCC950 ne tend à atténuer ces inductions que dans le foie.

1.1.4 Le MCC950 prévient l'expression de la *serpina3n* uniquement dans le foie

Afin d'évaluer l'état inflammatoire du foie et du muscle, nous avons mesuré l'expression d'une APR, la *serpina3n*. Celle-ci est augmentée en réponse au LPS dans les deux organes (Fig. 14). En effet, le traitement au LPS accroît significativement l'expression de *serpina3n* au niveau hépatique (Fig. 14A ; 8x ; $P < 0,001$ vs CT) et musculaire (Fig. 14B ; 7x ; $P < 0,001$ vs CT). Cependant, le MCC950 ne permet d'inhiber cette induction qu'au niveau hépatique (LPS+MCC950: 3x vs LPS: 8x ; $P < 0,01$). Dès lors, le traitement au MCC950 prévient l'expression de *serpina3n* dans le foie mais pas dans le muscle.

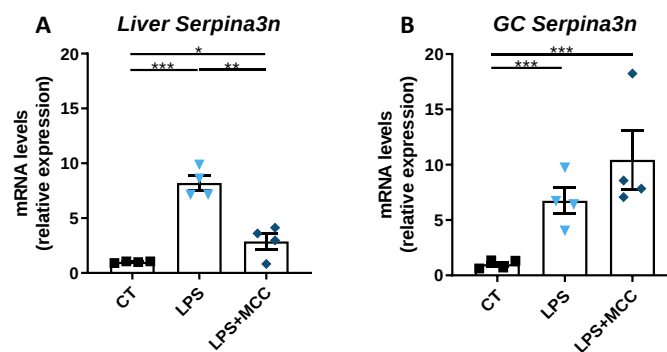


Figure 14. Effet du MCC950 sur l'expression hépatique et musculaire d'une APR, la *serpina3n* chez des souris traitées au LPS. Expression relative de l'ARNm de *serpina3n* hépatique (A) et musculaire au niveau du gastrocnémien (B) chez des souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou un volume équivalent de véhicule, puis traitées par une injection en IP de LPS (750 µg/100g P.C.) ou un volume équivalent de véhicule. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur les données transformées par un LOG_2 pour (A) et par $\sqrt{}$ pour (B). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=4). (***) : $p < 0.001$

1.1.5 Le LPS n'induit pas les atrogènes musculaires

Afin de déterminer si le MCC950 bloque l'induction du programme génique d'atrophie musculaire induite par le LPS, nous avons mesuré l'expression d'*Atrogine-1* au niveau du gastrocnémien. Aucune induction par le LPS ou inhibition par le MCC950 n'ont été mises en évidence. Ceci est explicable par le timing de l'analyse, les atrogènes n'étant exprimés en réponse au LPS qu'au minimum 12h après injection de celui-ci.

1.1.6 Conclusion intermédiaire

Ces résultats indiquent que le MCC950 inhibe partiellement l'activation de l'inflammasome et l'inflammation dans le foie mais pas dans le muscle. Comme le MCC950 bloque l'élévation des taux circulants d'IL-1 β , nous pouvons en déduire que le foie contribue plus que le muscle

à l'élévation des taux circulants d'IL-1 β en réponse au LPS, d'autant que l'IL-1 β est nettement plus exprimée dans le foie (Ct bruts : ~23) que dans le muscle (Ct bruts : ~25) après injection IP de LPS. Cependant nous n'avons mesuré l'expression qu'au niveau hépatique et musculaire, d'autres organes pourraient également contribuer aux taux circulants d'IL-1 β (rate, macrophages péritonéaux...).

1.2 Effet du MCC950 dans l'inflammation induite par le LPS (24h)

Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si l'inhibition de l'inflammasome par le MCC950 bloquait l'induction du programme génique responsable de l'atrophie musculaire induite par le LPS.

1.2.1 Le MCC950 ne prévient ni la perte de poids, ni l'hépatosplénomégalie induite par le LPS

Afin d'évaluer l'effet du MCC950 sur les modifications de poids des organes induites par l'injection de LPS, nous avons mesuré le poids des souris et des différents organes (tissu adipeux blanc, muscles squelettiques, rate, foie) 24h après l'injection de LPS.

Tous les groupes de souris ont perdu du poids (*Fig. 15*), étant donné que les souris ont été mises à jeun après l'injection de LPS/véhicule jusqu'au sacrifice (24h). Cependant, les souris traitées au LPS tendent à perdre davantage de poids que les souris CT (LPS: $-12 \pm 0,7$ % vs CT: $-9,6 \pm 0,5$ % ; $P=0,08$). Le prétraitement au MCC950 ne permet pas de prévenir cette perte de poids (LPS+MCC950: $-12,7 \pm 0,4$ % vs LPS: $-12 \pm 0,7$ % ; $P=NS$)

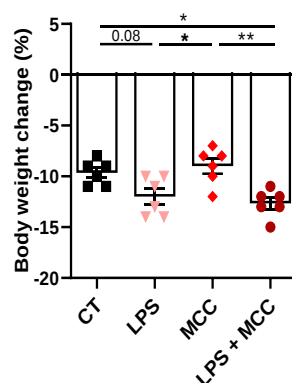


Figure 15. Effet de MCC950 sur la perte de poids corporel induite par le LPS. Changement de poids de souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou un volume équivalent de véhicule puis traitées par une injection IP de LPS (750 μ g/100g P.C.) ou un volume équivalent de véhicule. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6). (*) : $p < 0,05$, (**) : $p < 0,01$

L'injection de LPS tend à diminuer poids des muscles squelettiques gastrocnémien (Fig. 16A ; -6 ± 4 %, $P=NS$ vs CT) et tibialis anterior (Fig. 16B ; -9 ± 4 %, $P=NS$ vs CT). Par contre, le LPS provoque une augmentation du poids du foie (Fig. 16C ; $+24 \pm 2$ %, $P<0,01$ vs CT) et de la rate (Fig. 16D ; $+48 \pm 3$ %, $P<0,001$ vs CT). Le prétraitement au MCC950 ne permet de prévenir ni la tendance à la perte de masse musculaire, ni l'hépatosplénomégalie.

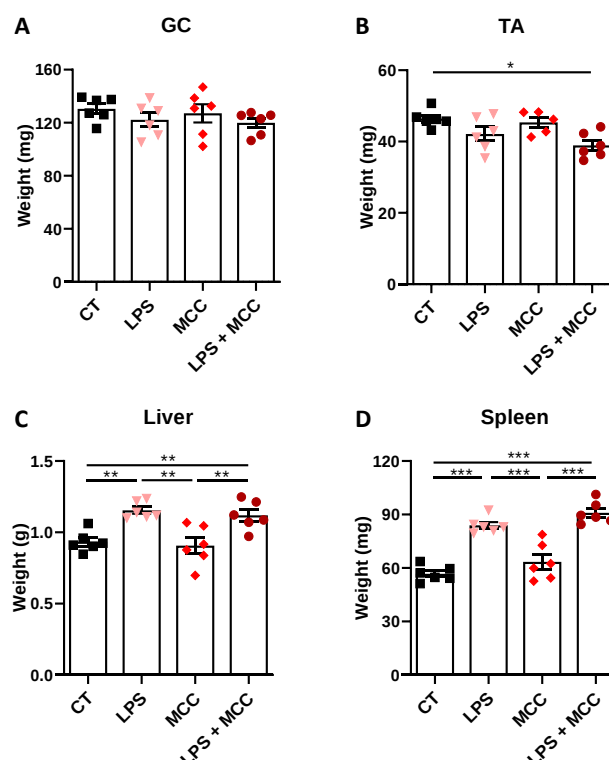


Figure 16. Effet du MCC950 sur le poids de différents organes chez des souris traitées au LPS. Poids des muscles gastrocnémien (A) et tibialis anterior (B), du foie (C) et de la rate (D) chez des souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou un volume équivalent de véhicule puis traitées par une injection IP de LPS (750 μ g/100g P.C.) ou un volume équivalent de véhicule. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6). (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

1.2.2 Le MCC950 ne prévient pas le priming de NLRP3 ni dans le foie, ni dans le muscle après injection de LPS

Afin d'évaluer si l'inhibition du priming de l'inflammasome NLRP3 par le MCC950 constatée 2h30 après injection au LPS (Fig. 13) persiste après 24h, nous avons évalué l'expression génique de ses différents composants (*Nlrp3*, *IL-1 β*) au niveau musculaire et hépatique.

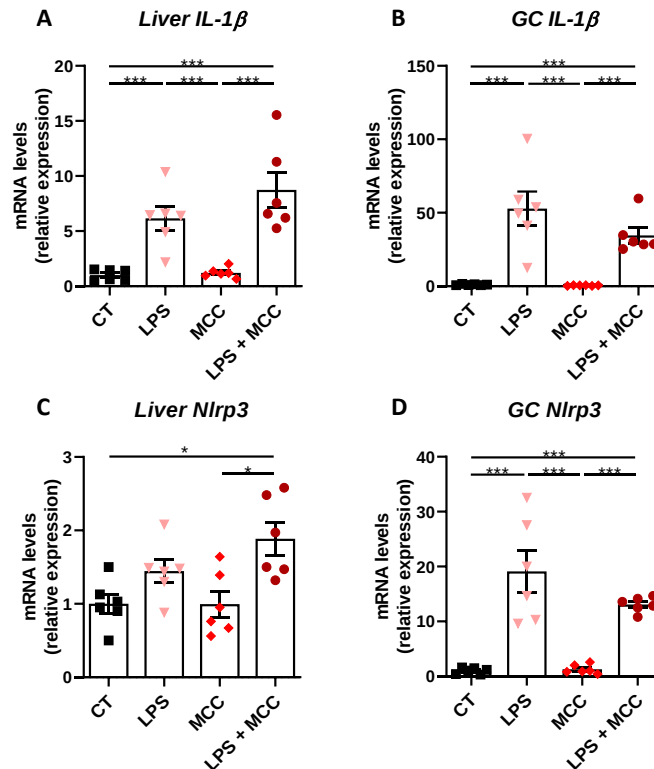


Figure 17. Effet du MCC950 sur l'expression hépatique et musculaire des acteurs de l'inflammasome (IL-1 β , Nlrp3) chez des souris traitées au LPS. Expression relative des ARNm d'IL-1 β et de Nlrp3 au niveau hépatique (A, C) et musculaire au niveau du gastrocnémien (B, D) chez des souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou un volume équivalent de véhicule puis traitées par une injection IP de LPS (750 μ g/100g P.C.) ou un volume équivalent de véhicule. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur les données transformées par un LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=4). (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

L'injection de LPS conduit à une augmentation significative de l'expression d'IL-1 β hépatique (Fig. 17A ; 6x, $P < 0,001$ vs CT) et musculaire (Fig. 17B ; 53x, $P < 0,001$ vs CT). Le pré-traitement au MCC950 tend cependant à accroître l'expression hépatique (LPS+MCC950: 9x vs LPS: 6x, $P = \text{NS}$) tout en diminuant l'expression musculaire (LPS+MCC950: 35x vs LPS: 53x, $P = \text{NS}$). L'expression du Nlrp3 en réponse au LPS tend à augmenter au niveau hépatique (Fig. 17C ; 1,5x, $P = \text{NS}$ vs CT) mais est significativement augmentée au niveau musculaire (Fig. 17D ; 19x, $P < 0,001$ vs CT). Le pré-traitement au MCC950 tend à accroître l'expression hépatique (LPS+MCC950: 2x vs LPS: 1,5x, $P = \text{NS}$) et à diminuer l'expression musculaire (LPS+MCC950: 13x vs LPS: 19x, $P = \text{NS}$). La comparaison des Ct bruts de ces différents gènes montre que en moyenne ~ 3 Ct de plus (en basal et après LPS) dans le gastrocnémien que dans le foie, ce qui indique que ces gènes sont 8 fois plus exprimés dans le foie que dans le muscle, même si l'induction est plus importante dans le muscle que dans le foie.

L'effet inhibiteur du MCC950 sur l'expression de Nlrp3 et IL-1 β , et donc sur le priming de l'inflammasome NLRP3, constaté pour le foie 2h30 après injection de LPS, n'est plus observé après 24h. Bien que non significative, la réponse au MCC950 se caractérise par une

exacerbation au niveau du foie et une atténuation au niveau du muscle de l'induction de ces gènes par le LPS.

1.2.3 Le MCC950 prévient l'expression de *serpina3n* dans le muscle mais pas le foie

La *serpina3n*, une APR produite par le foie et le muscle, est significativement plus exprimée au niveau hépatique (Fig. 18A ; 9 x, $P < 0,001$ vs CT) et surtout musculaire (Fig. 18B ; 111 x, $P < 0,001$ vs CT) après injection de LPS. Le prétraitement au MCC950 tend à diminuer l'expression de *serpina3n* dans le foie (LPS+MCC950: 7x vs LPS: 9x, $P = \text{NS}$) mais diminue significativement l'expression musculaire (LPS+MCC950: 49x vs LPS: 111x, $P < 0,05$). La tendance observée pour l'expression de *serpina3n* à 2h30 semble s'être inversée à 24h, l'inhibition hépatique ayant disparu au profit d'une inhibition musculaire.

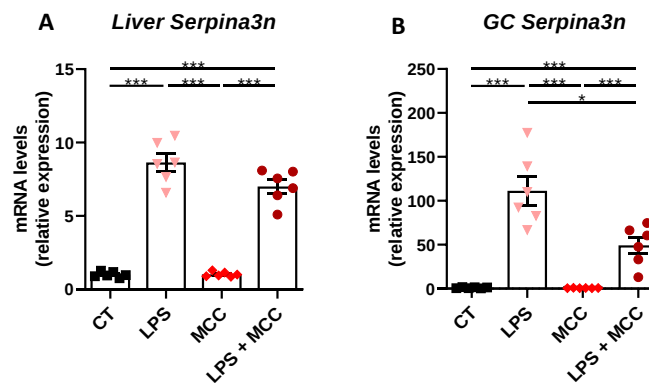


Figure 18. Effet du MCC950 sur l'expression hépatique et musculaire d'une APR, la *serpina3n* chez des souris traitées au LPS. Expression relative des ARNm de *serpina3n* hépatique (A) et musculaire au niveau du gastrocnémien (B) de souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou volume équivalent de véhicule puis traitées par une injection en IP de LPS (750 µg/100g P.C.) ou volume équivalent de véhicule. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur les données transformées par un LOG_2 . Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6). (*) : $p < 0,05$, (***) : $p < 0,001$

1.2.4 Le MCC950 ne prévient pas l'induction des atrogènes par le LPS

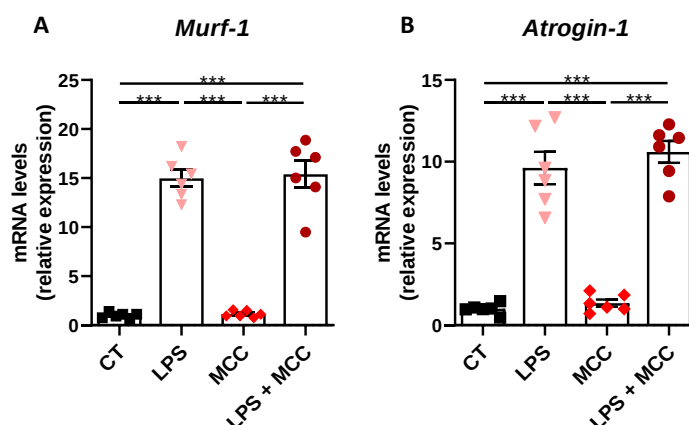


Figure 19. Effets du MCC950 sur l'induction du programme génétique d'atrophie musculaire induit par le LPS. Expression relative des ARNm de *Murf-1* (A) et *Atrogin-1* (B) des muscles gastrocnémiens chez des souris CD2F1 prétraitées avec du MCC950 (50 mg/kg en IP) ou un volume équivalent de véhicule puis traitées par une injection IP de LPS (750 µg/100g P.C.) ou un volume équivalent de véhicule. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur les données transformées par un LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM (n=6). (***) : p < 0.001

Afin d'évaluer si le MCC950 inhibe l'induction du programme génétique d'atrophie musculaire, nous avons mesuré l'expression des atrogènes *Atrogin-1* (Fig. 19B) et *Murf-1* (Fig. 19A) dans le muscle gastrocnémien. L'induction (15 x, P<0,001 vs CT) des atrogènes par le LPS n'est pas atténuée par le traitement au MCC950. Le MCC950 s'avère inefficace pour prévenir l'induction des atrogènes, bien qu'il réduise l'inflammation comme illustrée par la réduction de *serpina3n*.

1.2.5 Conclusion intermédiaire

Le MCC950 n'inhibe pas le priming de l'inflammasome dans le foie mais l'atténue peut-être dans le muscle 24h après LPS. Malgré l'inhibition de l'inflammation dans le muscle, illustrée par la réduction d'expression de *serpina3n*, le MCC950 n'inhibe pas l'induction des atrogènes, ni l'atrophie musculaire.

1.3 Effet du MCC950 dans l'inflammation induite par la tumeur C26

1.3.1 Le MCC950 aggrave l'anorexie, la perte de poids, l'atrophie du tissu adipeux/musculaire dans le modèle C26

Afin de caractériser la cachexie induite par l'injection des cellules tumorales C26, nous avons mesuré la prise alimentaire, le poids corporel, et le poids de différents organes au sacrifice (gastrocnémien, tibialis anterior, tissu adipeux épididymaire, tissu adipeux brun, foie, rate, tumeur) dans chacun des groupes (CT, C26, C26+MCC950).

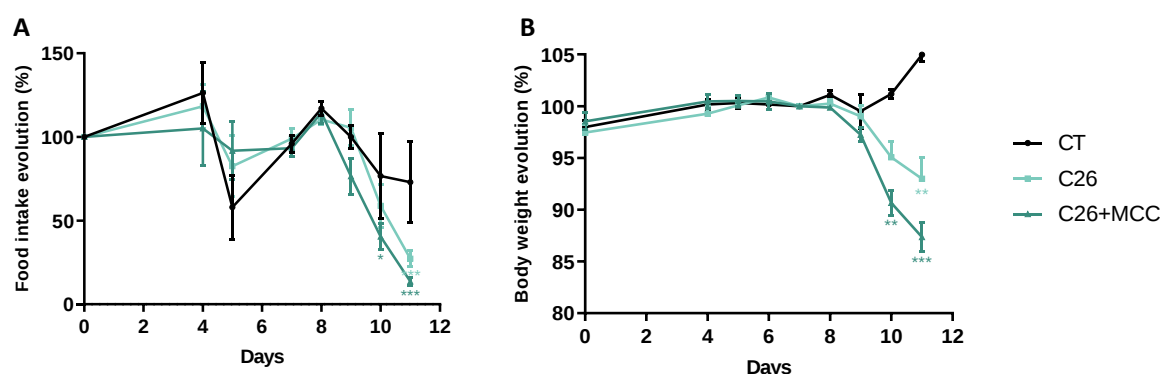


Figure 20. Effets du MCC950 sur l'évolution de la prise alimentaire et du poids corporel dans le modèle C26. Evolution du poids corporel (A) et de la prise alimentaire (B) sur 11 jours chez des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des cellules tumorales. L'analyse statistique a été réalisée pour chaque point du graphique par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6-9). (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

Les souris C26 présentent une anorexie marquée au 11^{ème} jour, leur prise alimentaire est fortement diminuée (Fig. 20A ; -73 ± 4 % par rapport à J0, $P < 0,001$ vs CT) et leur perte de poids significative (Fig. 20B ; -7 ± 2 % par rapport à J7, $P < 0,01$ vs CT). Le MCC950 tend à accentuer l'anorexie (C26+MCC950: -87 ± 6 % vs C26: -73 ± 4 % par rapport à J0, $P = \text{NS}$) et la perte de poids (C26+MCC950: $-13 \pm 1,5$ % vs C26: -7 ± 2 % par rapport à J7, $P = \text{NS}$). La diminution de la prise alimentaire notée au jour 5 est probablement à mettre sur le compte du stress induit par les injections de MCC950 (ou véhicule) qui ont commencé au J5. La réduction de l'apport alimentaire a été similaire cependant dans les 3 groupes. En résumé, les souris cancéreuses présentent, les 3 derniers jours de l'expérience, une perte de poids ainsi qu'une anorexie, qui tendent à s'exacerber suite au traitement par le MCC950.

Afin de rechercher les organes traduisant cette perte de poids, nous avons mesuré le poids des différents organes 11 jours après l'injection des cellules C26. Ces mesures montrent que les souris C26 présentent une atrophie des gastrocnémiens (Fig. 21A ; -10 ± 3 % ; $P < 0,05$ vs CT), une tendance à l'atrophie des tibialis (Fig. 21B ; -4 ± 2 % ; $P = \text{NS}$ vs CT), une fonte du tissu

adipeux blanc (Fig. 21C ; -44 ± 10 %, $P < 0,01$ vs CT) et brun (Fig. 21D ; -53 ± 3 %, $P < 0,001$ vs CT) et une splénomégalie (Fig. 21F ; $+140 \pm 8$ %, $P < 0,001$ vs CT). Le MCC950 tend à accentuer l'atrophie des gastrocnémiens (C26+MCC950: -11 ± 2 % vs C26: -10 ± 3 %, $P = \text{NS}$), des tibialis (C26+MCC950: -11 ± 2 % vs C26: -4 ± 2 %, $P = \text{NS}$), du tissu adipeux blanc (C26+MCC950: -59 ± 3 % vs C26: -44 ± 10 %, $P = \text{NS}$) et brun (C26+MCC950: -59 ± 2 % vs C26: -53 ± 3 %, $P = \text{NS}$), du foie (Fig. 21E ; C26+MCC950: $-10 \pm 1,6$ % vs C26: -5 ± 2 %, $P = \text{NS}$) et ne prévient pas la splénomégalie. Ces résultats montrent que la tumeur C26 induit une CC, mais que celle-ci n'est pas atténuée par le MCC950.

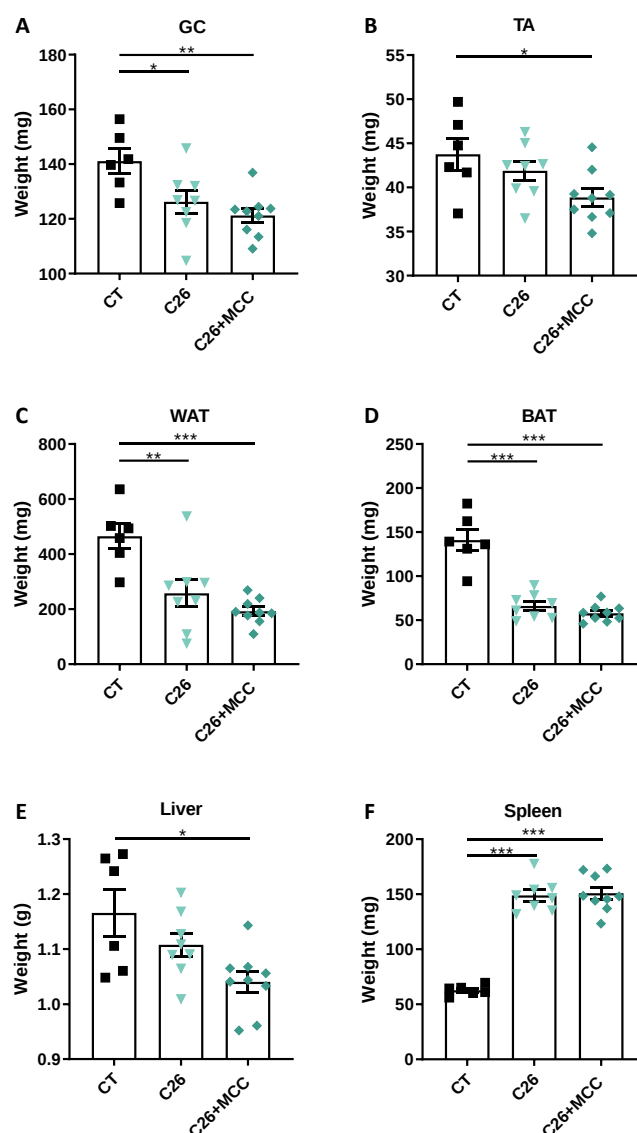


Figure 21. Effet de MCC950 sur le poids des organes dans le modèle C26. Poids des muscles gastrocnémien (A) et tibialis anterior (B), du tissu adipeux blanc (C) ainsi que brun (D) du foie (E) et de la rate (F) de souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6-9). (*) : $p < 0,05$, (**) : $p < 0,01$ et (***) : $p < 0,001$

1.3.2 Le MCC950 exacerbe la perte de force et la dégradation de l'état général dans le modèle C26

Nous avons effectué un test de préhension sur les membres antérieurs (Fig. 22A) pour évaluer la perte de force au cours de la CC. Ce test a été réalisé 10 jours après l'injection des tumeurs. Les souris C26 présentent une discrète tendance à la perte de force (-8 ± 4 %, $P=NS$ vs CT), et cette tendance est similaire chez les C26 traitées au MCC950 (C26+MCC950: -8 ± 4 % vs C26: -8 ± 4 %, $P=NS$). Nous avons également évalué le comportement général des souris C26 en utilisant le score MSS (Matériel & méthodes Fig. 8) afin de déterminer si le MCC950 pouvait prévenir la détérioration de l'état général des souris cachectiques C26 (Fig. 22B). Le comportement des souris C26 obtient un score global de 1.44 (vs CT: 0 ; $P<0,001$) alors que les souris cachectiques traitées au MCC950 présentent un score moyen de 1.96 (vs C26: 1,44 ; $P<0,05$). Le MCC950 aggrave donc la détérioration de l'état général des souris.

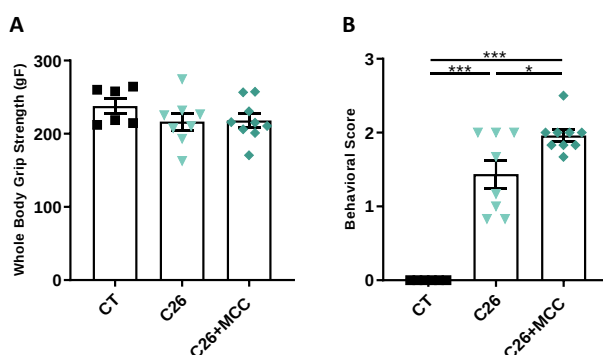


Figure 22. Effet de MCC950 sur la force de préhension des 4 membres et le comportement des souris dans le modèle C26. Force de préhension des 4 pattes et score comportemental des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6-9). (*) : $p < 0.05$ et (***) : $p < 0.001$

1.3.3 Le MCC950 ne modifie pas les taux circulants d'IL-1 β dans le modèle C26

L'implantation de la tumeur C26 provoque une élévation des taux circulants d'IL-1 β de façon comparable dans le groupe C26 et C26+MCC950 (Fig. 23 ; C26+MCC950: 8x vs C26: 8x, $P<0,01$ vs CT). Le MCC950 n'a donc pas permis de bloquer l'élévation des taux circulants d'IL-1 β dans le modèle C26.

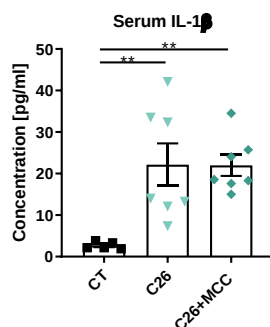


Figure 23. Effet de MCC950 sur les taux circulants d'IL-1 β des souris dans le modèle C26. Concentration sérique d'IL-1 β des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6-8). (**): $p < 0.01$

1.3.4 Le MCC950 n'inhibe pas le priming de l'inflammasome au niveau hépatique et musculaire

Dans le but d'explorer l'effet du MCC950 sur l'inflammation de la CC, nous avons étudié l'expression génique des acteurs de l'inflammasome (*Nlrp3*, *IL-1 β*) dans le foie et le muscle des souris C26.

Les tumeurs C26 induisent une élévation significative de l'expression d'IL-1 β hépatique (Fig. 24A ; 3 x, $P < 0,05$ vs CT) et musculaire (Fig. 24B ; 4 x, $P < 0,01$ vs CT) avec une tendance à l'augmentation du *Nlrp3* hépatique (Fig. 24C ; 1,4 x, $P = \text{NS}$ vs CT) et musculaire (Fig. 24D ; 1,6 x, $P = \text{NS}$ vs CT). Le MCC950 ne modifie pas l'expression d'IL-1 β et de *Nlrp3* dans le foie (C26+MCC950: 4x vs C26: 3x; $P = \text{NS}$) et (C26+MCC950: 1,6x vs C26: 1,4x; $P = \text{NS}$) comme dans le muscle.

Les tumeurs C26 induisent donc l'expression d'IL-1 β mais pas celle de *Nlrp3* dans le foie et le muscle, un phénomène non modifié significativement par le MCC950.

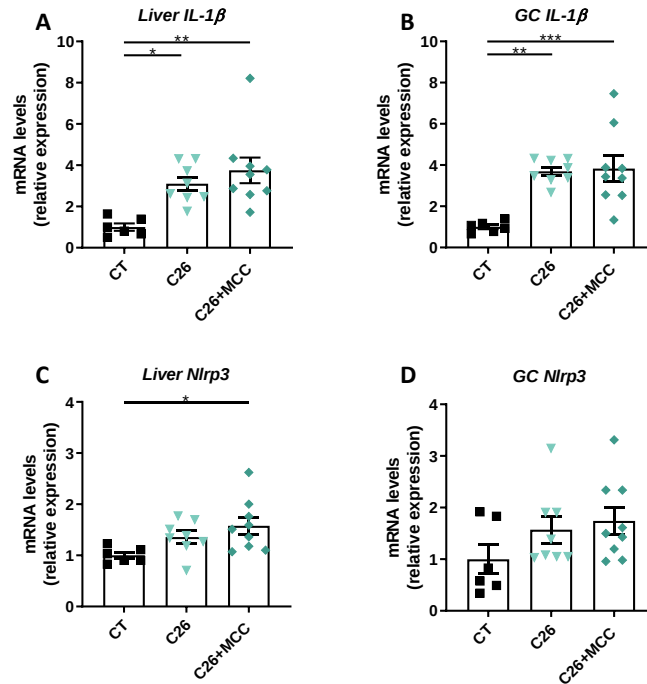


Figure 24. Effet du MCC950 sur l'expression hépatique et musculaire des acteurs de l'inflammasome (*IL-1β*, *Nlrp3*) dans le modèle C26. Expression relative des ARNm d'*IL-1β* et de *Nlrp3* au niveau du foie (A, C) et du muscle gastrocnémien (B, D) des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SEM (n=6-9). (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

1.3.5 Le MCC950 ne prévient pas l'induction de *serpina3n* dans le modèle C26

Nous avons également mesuré l'expression de l'APR *serpina3n* pour évaluer l'effet du MCC950 sur la réponse inflammatoire au cours de la CC. Les souris C26 présentent une expression élevée de *serpina3n* au niveau du foie (Fig. 25A ; 13 x, $P < 0,001$ vs CT) et du gastrocnémien (Fig. 25B ; 20 x, $P < 0,001$ vs CT). Le MCC950 tend à exacerber l'induction de *serpina3n* au niveau hépatique (C26+MCC950: 23x vs C26: 13x; $P = \text{NS}$) et musculaire (C26+MCC950: 26x vs C26: 20x; $P = \text{NS}$). Cependant la différence de Ct (~7) entre le foie et le muscle, ce qui signifie que le foie exprime 128x plus *serpina3n* que le muscle.

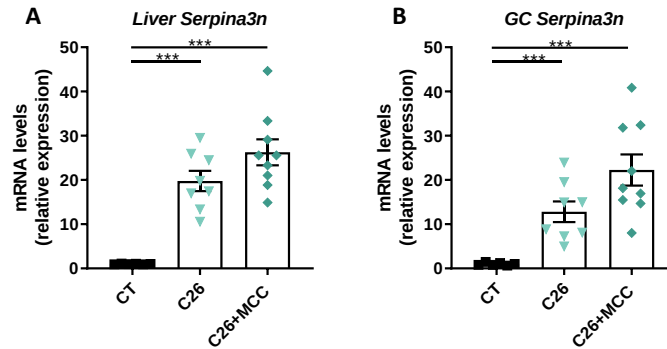


Figure 25. Effet du MCC950 sur l'expression hépatique et musculaire d'une APR, la *serpina3n*, dans le modèle C26. Expression relative des ARNm de *serpina3n* hépatique (A) et musculaire du muscle gastrocnémien (B) des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=6-9). (***) : $p < 0.001$

1.3.6 Le MCC950 exacerbe l'induction des atrogènes dans le modèle C26

Dans le but d'explorer l'effet du MCC950 sur l'atrophie musculaire de la CC, nous avons étudié, dans les muscles gastrocnémiens, l'expression d'*Atrogine-1* et de *Murf-1*. Les tumeurs C26 induisent l'expression d'*Atrogine-1* (Fig. 26A) et *Murf-1* (Fig. 26B) de manière analogue (7 x, $P < 0,001$ vs CT), mais leur expression tend à être davantage augmentée dans les groupes C26+MCC950 (C26+MCC950: *Atrogine-1* x10, *Murf-1* x13 vs C26: 7 x; $P = \text{NS}$).

Le MCC950 accentue donc l'induction des atrogènes, ce qui pourrait expliquer le degré plus important d'atrophie des muscles squelettiques noté chez les souris C26 traitées au MCC950.

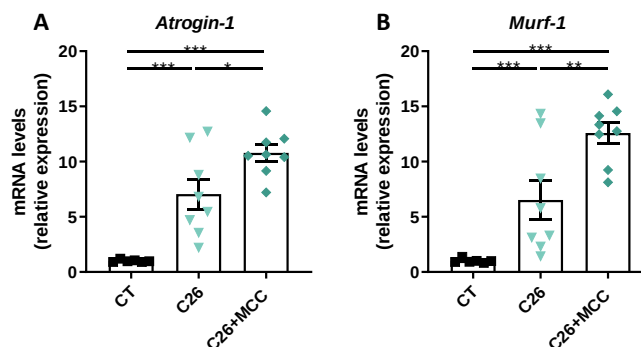


Figure 26. Effets de MCC950 sur l'induction du programme génétique d'atrophie musculaire, par l'expression d'ubiquitine ligases (*Atrogin-1*, *Murf-1*) au niveau du muscle gastrocnémien dans le modèle C26. Expression relative des ARNm de *Murf-1* (A) et *Atrogin-1* (B) de muscles gastrocnémien de souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. La signification statistique a été déterminée par un test de Welch suivi d'un T-test avec correction de Bonferroni sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=4). (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

1.3.1 Le MCC950 modifie le profil d'expression des cytokines de la tumeur

Au vu des résultats obtenus, nous avons voulu savoir si le MCC950 n'avait pas impacté la croissance tumorale et le profil d'expression des cytokines exprimées par la tumeur. Nous avons

d'abord constaté que le poids des tumeurs tend à être plus élevé dans le groupe C26+MCC950 (Fig. 27 ; $+12 \pm 9$ %, $P=NS$ vs C26).

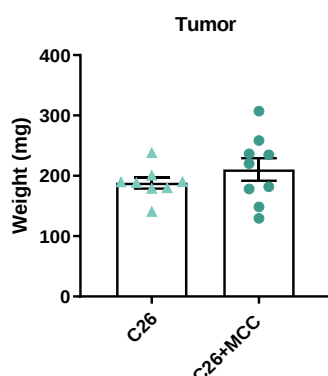


Figure 27. Effets du MCC950 sur le poids tumoral dans le modèle C26. Poids des tumeurs de souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Student. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8-9).

Vu le caractère anti-inflammatoire du MCC950, nous avons voulu mettre en évidence les modifications de l'état inflammatoire de la tumeur et de son microenvironnement. Un profil inflammatoire différent pourrait être à même d'expliquer la cachexie plus importante dans le groupe MCC950. Pour ce faire nous avons évalué l'expression des marqueurs pro inflammatoires typiques $TNF-\alpha$, $IL-6$, et $IL-1\beta$, des marqueurs de macrophages M1 (CD68) et spécifiques aux macrophages de type M2 (CD163) ainsi que de la chémokine CXCL2, du facteur de croissance endothéliale VEGF et du facteur pro-cachectisant Activine A. L'expression génique des cytokines pro-inflammatoires est respectivement non modifiée pour l' $IL-1\beta$ (Fig. 28A ; $0,9x$; $P=NS$ vs C26) et l' $IL-6$ (Fig. 28C ; $1,1x$; $P=NS$ vs C26) et diminuée pour le $TNF-\alpha$ (Fig. 28B ; $0,7x$; $P<0,01$ vs C26) par l'injection de MCC950. Sur base des Ct bruts, on a pu déterminer que l'expression d' $IL-1\beta$ est très importante au niveau tumoral, à savoir 128 fois plus que dans le muscle et 16 fois plus que le foie. L' $IL-1\beta$ mesurée dans la circulation pourrait dès lors être d'origine tumorale (cellules tumorales elles-mêmes ou leur microenvironnement).

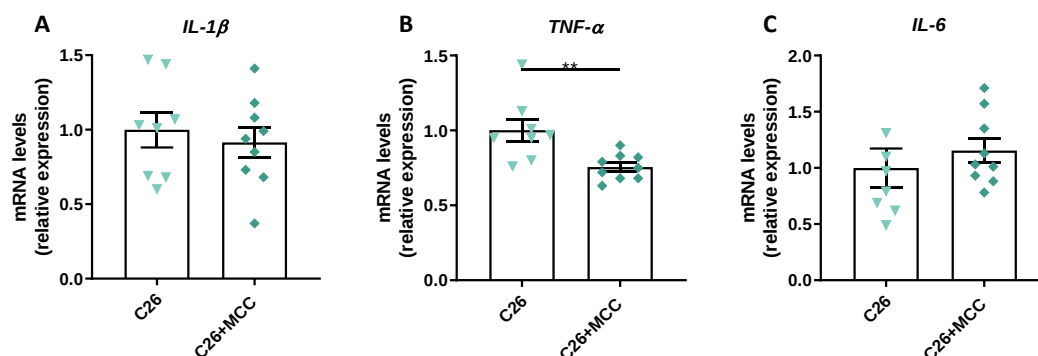


Figure 28. Effet de MCC950 sur l'expression tumorale des cytokines pro inflammatoires typique TNF- α , IL-1 β & IL-6 dans le modèle C26. Expression relative des ARNm d'IL-1 β (A) de TNF- α (B) et d'IL-6 (C) tumoraux des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Student sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8-9). (**): $p < 0.01$

L'expression des marqueurs des macrophages CD68 & CD163 (Fig. 29A-B) tend à être plus élevée en réponse au traitement MCC950 (respectivement 1,1x ; $P=NS$ et 1,5x ; $P=NS$ vs C26). Les Ct bruts très élevés (respectivement 22 & 24) reflètent une forte expression par les cellules tumorales ou leur microenvironnement.

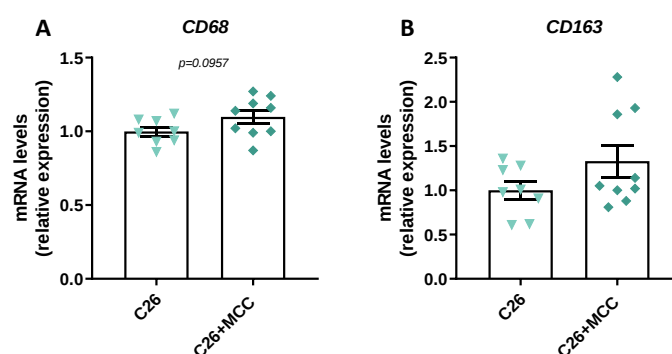


Figure 29. Effet de MCC950 sur l'expression tumorale des marqueurs de macrophages M1 (CD68) & M2 (CD163) dans le modèle C26. Expression relative des ARNm de CD68 (A) de CD163 (B) des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP ; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Student sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8-9).

Le MCC950 accroît significativement l'expression de *CXCL2* (Fig. 30A ; 2,6x, $P < 0,01$ vs C26) et l'Activine A (Fig. 30B ; 1,6x, $P < 0,01$ vs C26), les Ct bruts sont assez bas pour *CXCL2* (~30) mais très élevés pour l'Activine A (~20), son expression est donc très importante au niveau tumoral. On constate également une légère réduction de *VEGF* (Fig. 30C) (0,8x ; $P < 0,01$ vs C26).

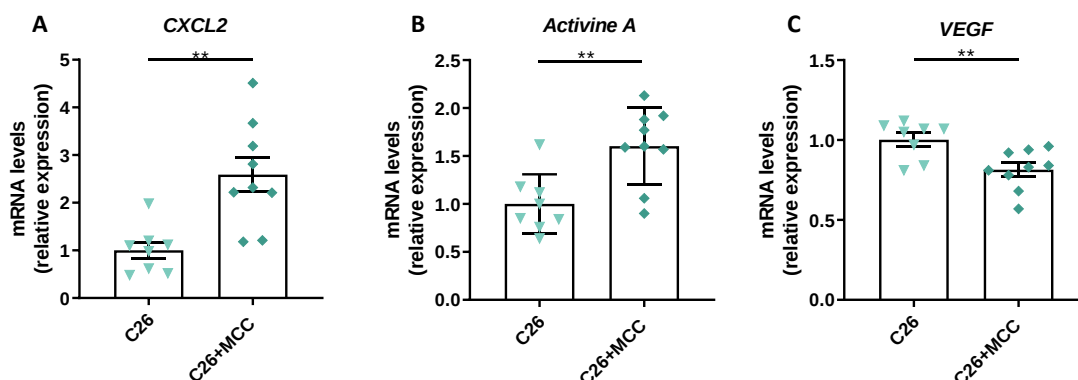


Figure 30. Effet de MCC950 sur l'expression tumorale de cytokines Activine A et CXCL2 ainsi que sur le facteur d'angiogenèse VEGF dans le modèle C26. Expression relative des ARNm d'Activine A (A) de CXCL2(B) et de VEGF (C) tumoraux de souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au MCC950 (25mg/kg en IP; 2x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des tumeurs. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Student. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n= 8-9). (**): $p < 0,01$.

1.3.2 Conclusion intermédiaire

Ces données indiquent que le MCC950 administré chez la souris C26 induit une modification de l'expression tumorale des cytokines pro-inflammatoires.

2 Inhibition du TLR-4 par TAK-242 & effets de l'AdipoRon

Comme explicité dans l'introduction, le TAK-242 et l'AdipoRon semblent prévenir l'atrophie musculaire dans certains modèles d'inflammation. Notre objectif principal a été de déterminer si ces traitements pouvaient prévenir l'atrophie musculaire observée dans le modèle C26 de CC.

2.1.1 L'AdipoRon diminue la perte de poids & atténue l'anorexie et la fonte du tissu adipeux

Comme lors de l'expérience précédente, nous avons mesuré la prise alimentaire, le poids corporel et le poids de différents organes au sacrifice (gastrocnémien, tibialis anterior, tissu adipeux épididymaire, tissu adipeux brun, rate, foie, tumeur) dans chacun des groupes (CT, C26, C26+TAK-242, C26+AdipoRon) pour évaluer l'effet potentiel des traitements TAK-242 & AdipoRon sur la CC induite par C26.

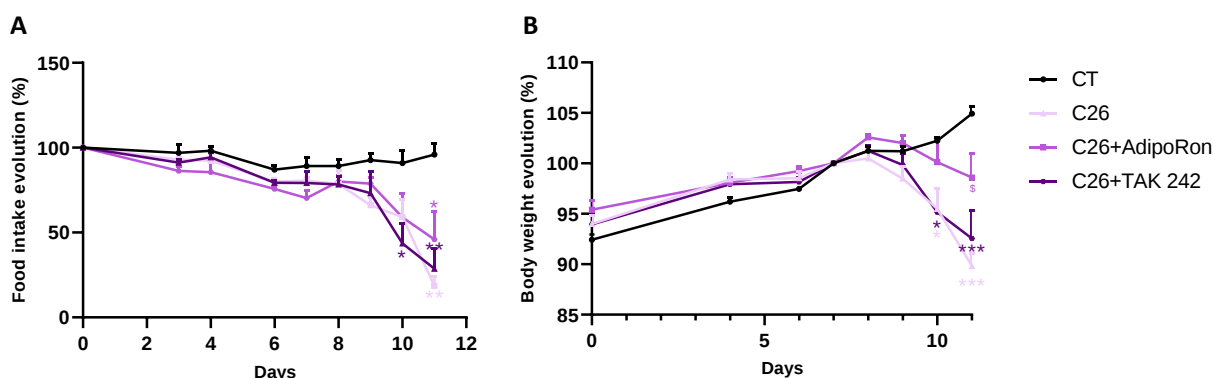


Figure 31. Effets du TAK-242 & de l'AdipoRon sur la prise alimentaire et le poids corporel dans le modèle C26. Evolution de la prise alimentaire (A) et du poids corporel (B) sur 11 jours chez des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au TAK-242 (10 mg/kg en IP ; 1x/jour), à l'AdipoRon (50 mg/kg en IP ; 1x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du 5^{ème} jour post injection des cellules tumorales. L'analyse statistique a été réalisée pour chaque point du graphique par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8). (*) vs CT ; (*) : $p < 0.05$ et (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$; (\$) vs C26 (\$) : $p < 0.05$

Les souris C26 présentent une anorexie marquée au 11^{ème} jour, leur prise alimentaire est fortement diminuée (Fig. 31A ; $-82 \pm 5\%$ par rapport à J0, $P < 0,01$ vs CT) et leur perte de poids significative (Fig. 31B ; $-10 \pm 2\%$ par rapport à J7, $P < 0,001$ vs CT). Le TAK-242 ne modifie pas l'anorexie (C26+TAK-242: $-71 \pm 11\%$ vs C26: $-82 \pm 5\%$ par rapport à J0, $P = \text{NS}$) mais tend à réduire quelque peu la perte de poids (C26+TAK-242: $-7 \pm 2\%$ vs C26: $-10 \pm 2\%$ par rapport à J7, $P = \text{NS}$). L'AdipoRon tend à réduire l'anorexie (C26+AdipoRon: $-55 \pm 16\%$ vs C26: $-82 \pm 5\%$ par rapport à J0, $P = \text{NS}$) mais réduit significativement la perte de poids (C26+AdipoRon: $-1,4 \pm 2\%$ vs C26: $-10 \pm 2\%$ par rapport à J7, $P < 0,05$). En résumé, les souris C26 présentent une anorexie et une perte de poids marquée au jour 11. Le TAK-242 n'atténue que très peu la perte de poids tandis que l'AdipoRon l'atténue significativement.

Les organes responsables de cette perte de poids ont été investigués. Nous avons mesuré le poids des différents organes 11 jours après l'injection des cellules C26. Ces mesures montrent que les souris C26 présentent une atrophie des gastrocnémiens (Fig. 32A ; $-12 \pm 1,5\%$; $P < 0,01$ vs CT), une atrophie des tibialis ((Fig. 32B ; $-11 \pm 2\%$; $P < 0,01$ vs CT), une fonte du tissu adipeux blanc (Fig. 32C ; $-47 \pm 10\%$, $P < 0,01$ vs CT) et brun (Fig. 32D ; $-45 \pm 4\%$, $P < 0,01$ vs CT), une diminution de leur masse hépatique (Fig. 32E ; $-18 \pm 3\%$, $P < 0,01$ vs CT) et une splénomégalie (Fig. 32F ; $+111 \pm 7\%$, $P < 0,001$ vs CT). Le TAK-242 n'exerce aucun effet significatif sur l'atrophie des gastrocnémiens (C26+TAK-242: $-10 \pm 2\%$ vs C26: $-12 \pm 1,5\%$, $P = \text{NS}$) et des tibialis (C26+TAK-242: $-11 \pm 2\%$ vs C26: $-11 \pm 2\%$, $P = \text{NS}$), sur la fonte du tissu adipeux blanc (C26+TAK-242: $-35 \pm 6\%$ vs C26: $-47 \pm 10\%$, $P = \text{NS}$) et brun (C26+TAK-242: $-36 \pm 8\%$ vs C26: $-45 \pm 4\%$, $P = \text{NS}$), sur la perte de masse du foie (C26+TAK-242: $-15 \pm 2\%$ vs C26: $-18 \pm 3\%$, $P = \text{NS}$) et la splénomégalie (C26+ TAK-242: $+84 \pm 8\%$ vs C26: $+111 \pm 7\%$,

P=NS), malgré une tendance à atténuer l'impact de la CC. L'Adiporon tend à diminuer l'atrophie des gastrocnémiens (C26+AdipoRon: -9 ± 2 % vs C26: $-12\pm 1,5$ %, P=NS) et des tibialis (C26+AdipoRon: -9 ± 2 % vs C26: -11 ± 2 %, P=NS), la fonte du tissu adipeux blanc (C26+AdipoRon: -23 ± 9 % vs C26: -47 ± 10 %, P=NS) et brun (C26+ AdipoRon: -21 ± 11 % vs C26: -45 ± 4 %, P=NS), la réduction de la masse du foie (C26+ AdipoRon: -13 ± 3 % vs C26: -18 ± 3 %, P=NS) et à prévenir la splénomégalie (C26+ AdipoRon: $+81\pm 14$ % vs C26: $+111\pm 7$

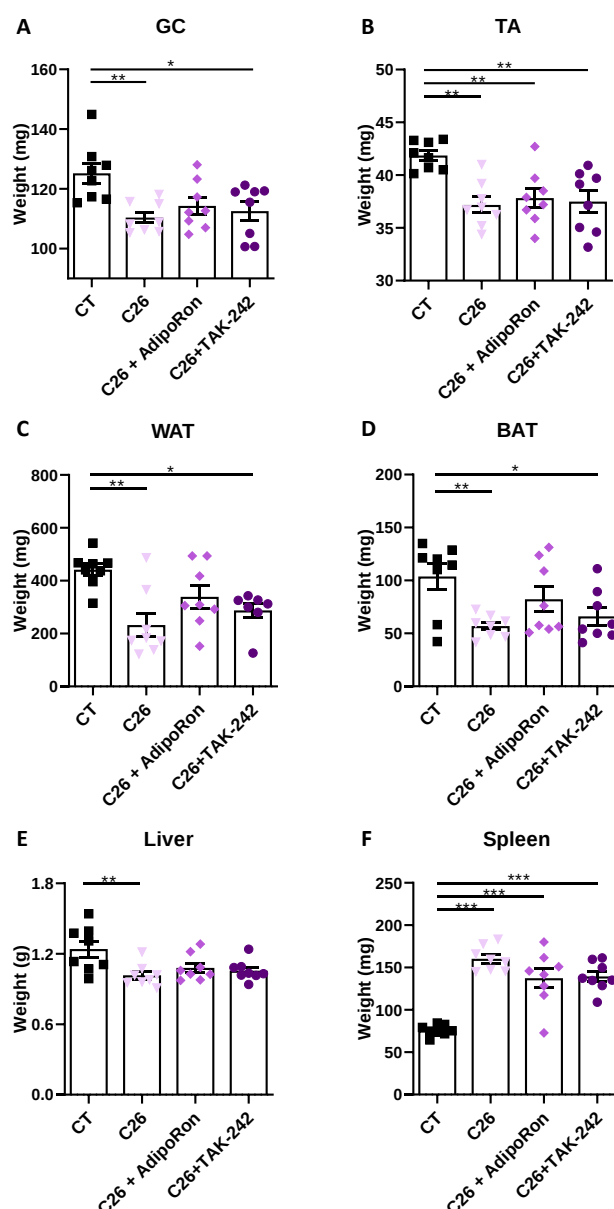


Figure 32. Effet du TAK-242 & de l'AdipoRon sur le poids des organes dans le modèle C26. Poids des muscles gastrocnémien (A) et tibialis anterior (B), du tissu adipeux blanc (C) ainsi que brun (D) du foie (E) et de la rate (F) de souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au TAK-242 (10 mg/kg en IP ; 1x/jour), à l'AdipoRon (50 mg/kg en IP ; 1x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du 5^{ème} jour après l'injection des cellules tumorales. La signification statistique a été déterminée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8). (*) : $p < 0.05$, (**) : $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

%, P=NS). Ces résultats montrent que la tumeur C26 induit une CC qui n'est pas atténuée par le TAK-242, mais qui tend à l'être par l'AdipoRon, notamment au niveau du tissu adipeux.

2.1.2 L'AdipoRon améliore le comportement des souris cachectiques

Nous avons effectué un test de préhension sur les quatre membres (Fig. 33A) pour évaluer si le TAK-242 ou l'AdipoRon pouvaient prévenir la perte de force au cours de la CC. Ce test a été réalisé 10 jours après l'injection des tumeurs. Les souris C26 présentent une tendance à la perte de force (-13 ± 8 %, P=NS vs CT). Cette tendance est quelque peu atténuée chez les C26 traitées à l'AdipoRon (C26+AdipoRon: -6 ± 6 % vs C26: -13 ± 8 %, P=NS) et dans une très faible mesure chez les souris cachectiques traitées au TAK-242 (C26+TAK-242: -10 ± 5 % vs C26: -13 ± 8 %, P=NS).

Nous avons ensuite évalué le comportement général des souris (Fig. 33B) en utilisant le score MSS (Matériel & méthodes Fig. 8) afin de déterminer si le TAK-242 ou l'AdipoRon pouvaient prévenir la détérioration de l'état général des souris cachectiques C26. Le comportement des souris C26 obtient un score global de 1,81 (vs CT: 0 ; P<0,001) alors que les souris cachectiques traitées à l'AdipoRon présentent un score moyen de 0,54 (vs C26: 1,81 ; P<0,001) et les souris cachectiques traitées au TAK-242 un score moyen de 1,46 (vs C26: 1,81 ; P=NS) et. L'AdipoRon préserve donc l'état général des souris.

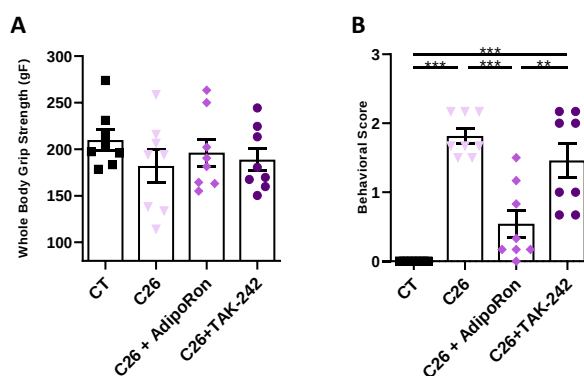


Figure 33. Effet de du TAK-242/AdipoRon sur la force de préhension des 4 membres et le comportement des souris dans le modèle C26. Force de préhension des 4 pattes et score comportemental des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26 traitées au TAK-242 (10mg/kg en IP; 1x/jour) à l'AdipoRon (50 mg/kg en IP; 1x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 après l'injection des cellules tumorales. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8). (**): $p < 0.01$ et (***) : $p < 0.001$

2.1.3 Impact du TAK-242/AdipoRon sur l'expression musculaire de la *serpina3n* dans le modèle C26

Afin d'établir l'effet du TAK-242 et de l'AdipoRon sur la réponse inflammatoire présente lors de la CC, nous mesurerons l'expression de l'APR *serpina3n* au niveau musculaire. Les résultats seront présentés lors de l'oral.

2.1.4 Impact du TAK-242/Adiporon sur l'expression des atrogènes dans le modèle C26

Afin d'établir un lien entre l'atrophie musculaire et l'induction du programme génétique de celle-ci, nous étudierons l'expression des atrogènes *Murf-1* et *Atrogine-1* au niveau musculaire. Les résultats seront présentés lors de l'oral.

2.1.5 Le TAK-242/AdipoRon ne modifie pas le profil d'expression tumoral des cytokines pro-inflammatoire

Au vu de l'action anti-inflammatoire du TAK-242 et de l'AdipoRon, nous avons ensuite voulu évaluer des éventuelles modifications de l'état inflammatoire de la tumeur. En effet, un profil inflammatoire différent pourrait être à même d'expliquer la diminution de la cachexie constatée dans le groupe C26+Adiporon.

Nous avons d'abord constaté que le poids des tumeurs est sensiblement identique dans les groupes C26 vs C26+TAK-242 (Fig. 34 ; $-0,3 \pm 9\%$, $P=NS$ vs C26) et C26 vs C26+AdipoRon ($-7 \pm 11\%$, $P=NS$ vs C26). Ensuite, nous avons évalué l'expression des marqueurs pro inflammatoires typiques TNF- α et IL-1 β , du marqueur de macrophage M1 (CD68) ainsi que du facteur de croissance endothéliale VEGF et du facteur pro-cachectisant Activine A.

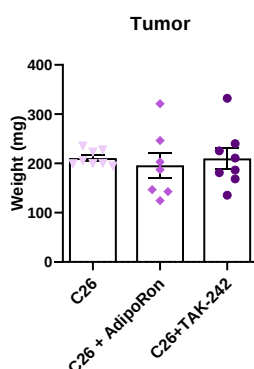


Figure 34. Effets du MCC950 sur le poids tumoral dans le modèle C26. Poids des tumeurs de souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au TAK-242 (10mg/kg en IP; 1x/jour) à l'AdipoRon (50 mg/kg en IP; 1x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des cellules tumorales. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8).

L'expression génique des cytokines pro-inflammatoires *TNF- α* (Fig. 35A) et *IL-1 β* (Fig. 35B) est sensiblement identique que ce soit dans le groupe AdipoRon (*TNF- α* : 1,1x ; *IL-1 β* : 0,9x ; P=NS vs C26) ou TAK-242 (*TNF- α* : 1,1x ; *IL-1 β* : 1,2x ; P=NS vs C26).

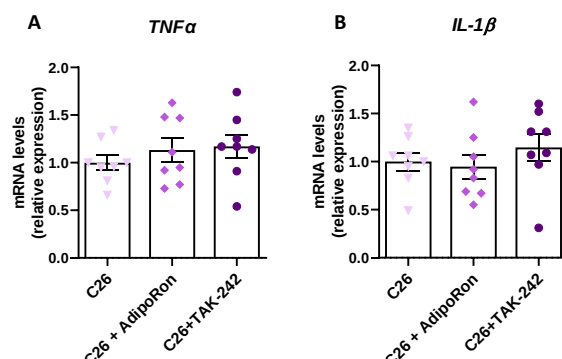


Figure 35. Effet du TAK-242/AdipoRon sur l'expression tumorale des cytokines pro inflammatoires typique *TNF- α* , *IL-1 β* & *IL-6* dans le modèle C26. Expression relative des ARNm de *TNF- α* (A) et d'*IL-1 β* (B) tumoraux des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au TAK-242 (10mg/kg en IP; 1x/jour) à l'AdipoRon (50 mg/kg en IP; 1x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des cellules tumorales. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8).

L'expression du marqueur des macrophages CD68 (Fig. 36) n'est pas modifiée ni par l'AdipoRon ni par le TAK-242 (respectivement 1,4x ; P=NS et 1,4x ; P=NS vs C26). Comme les Ct bruts sont élevés (~ 24), son expression tumorale est importante.

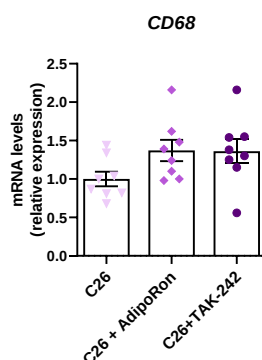


Figure 36. Effet du TAK-242/AdipoRon sur l'expression tumorale du marqueur de macrophages M1 (CD68) dans le modèle C26. Expression relative des ARNm de CD68 des souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au TAK-242 (10mg/kg en IP; 1x/jour) à l'AdipoRon (50 mg/kg en IP; 1x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des cellules tumorales. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8).

Le TAK-242 ne modifie guère l'expression d'Activine A (Fig. 37A ; 1,4 x, P=NS vs C26) et de VEGF (Fig. 37B ; 1,2x, P=NS vs C26), tout comme l'Adiporon d'ailleurs. Comme les Ct bruts sont élevés pour l'Activine A (~ 22), son expression est donc importante au niveau tumoral.

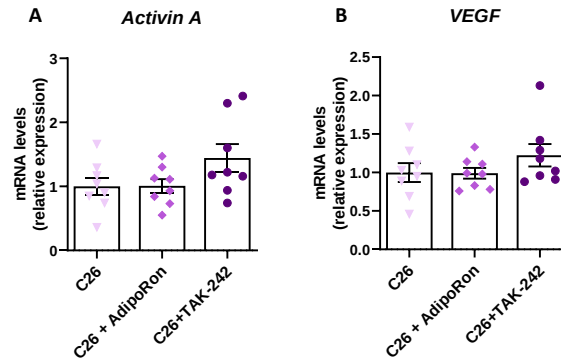


Figure 37. Effet du TAK-242/AdipoRon sur l'expression tumorale de la cytokine Activine A et le facteur d'angiogenèse VEGF dans le modèle C26. Expression relative des ARNm d'Activine A (A) et de VEGF (B) tumoraux de souris CD2F1 porteuses de tumeurs C26, traitées au TAK-242 (10mg/kg en IP; 1x/jour) à l'AdipoRon (50 mg/kg en IP; 1x/jour) ou un volume équivalent de véhicule à partir du jour 5 post injection des cellules tumorales. L'analyse statistique a été réalisée par un test ANOVA à 1 voie suivi d'un test de Tukey sur des données transformées par LOG₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne $\pm$ SEM (n=8).

2.1.6 Conclusion intermédiaire

Le TAK-242 et l'AdipoRon ne modifient pas significativement le profil d'expression tumoral des cytokines.

V. DISCUSSION

1 Résultats

MCC950

Nos données montrent que le MCC950 exerce un effet anti-inflammatoire dans un modèle d'inflammation aigüe induite par le LPS. En effet, il diminue les taux circulants d'IL-1 β , l'expression hépatique des composants de l'inflammasome *Nlrp3* et *IL-1 β* et de *serpina3n*, un marqueur de la réponse inflammatoire. Bien que cette inhibition de la réponse inflammatoire (*serpina3n*) soit retrouvée 24h après l'injection de LPS au niveau du muscle, elle ne s'accompagne pas d'une inhibition de l'atrophie musculaire et de l'induction des atrogènes. Contrairement à ce que nous observons 2h30 après l'injection de LPS, l'administration de MCC950 dans le modèle de CC n'exerce aucun effet sur les taux circulants d'IL-1 β . De façon inattendue, le MCC950 exacerbe même les paramètres de la CC, notamment l'anorexie, l'altération de l'état général, l'atrophie musculaire, la réponse inflammatoire et les atrogènes sans modification de l'expression des gènes de l'inflammasome.

Plusieurs pistes peuvent être explorées pour expliquer l'absence d'effet du MCC950 sur la CC. Le MCC950 administré par voie IP pourrait ne pas passer la barrière endothéliale tissulaire, notamment musculaire et tumorale. Néanmoins, les effets observés 24h après l'injection de LPS sur l'expression musculaire de *serpina3n* et les modifications d'expression de gènes de l'inflammation (*CXCL2*, Activine A, *TNF- α*) permettent d'exclure cette possibilité. Nous pourrions imaginer que la dose administrée ait été insuffisante. Cependant la dose injectée de MCC950 a été choisie sur base de la littérature comme étant la dose la plus souvent administrée pour exercer un effet biologique (Primiano, Lefker et al. 2016). Nous pourrions aussi imaginer que la cinétique rapide de la molécule ($T_{1/2}$: 3h30) dans la circulation pourrait avoir conduit à son élimination précoce. Cette possibilité nous paraît peu probable, car la fréquence d'injection (2x/jour) a été déterminée pour pouvoir garantir une concentration supérieure à l'IC50 avant l'injection suivante (Coll, Robertson et al. 2015, Primiano, Lefker et al. 2016). La voie d'administration en IP pourrait aussi s'avérer problématique. L'effet de premier passage hépatique et la courte demi vie du MCC950 pourraient mener à des concentrations plasmatiques insuffisantes pour inhiber le NLRP3 au niveau du muscle et de la tumeur. Néanmoins, cela paraît peu probable car les études de pharmacocinétiques et -dynamiques montrent des effets semblables que le MCC950 soit administré per os ou injecté IV (Coll, Robertson et al. 2015). Enfin, il est possible que l'inflammasome NLRP3 ne joue pas de rôle dans l'atrophie musculaire de la CC. En effet, notre modèle aigu induit par l'injection de LPS diffère clairement du modèle

chronique de CC. Le niveau d'induction de l'inflammasome est beaucoup plus élevés (x13 pour *Nlrp3* et x40 pour *IL-1 β* vs CT) dans le modèle de LPS que dans le modèle de CC (x2 pour *Nlrp3* et x4 pour *IL-1 β* vs CT). Il en est de même pour les taux circulants d'IL-1 β (300 pg/mL pour LPS contre 20 pg/mL pour CC). Néanmoins, le fait que les taux circulants d'IL-1 β ne soient pas affectés par le MCC950 dans le modèle de CC suggère que l'inflammasome NLRP3 ne joue pas de rôle dans la production d'IL-1 β au cours de la CC. La production d'IL-1 β pourrait dès lors résulter de l'activation d'autres inflammasomes. Si le LPS stimule la production d'IL-1 β via le récepteur TLR-4 et l'inflammasome NLRP3, les DAMPS produits par les tumeurs, qui sont nombreux (HSP70 et 90) et moins bien caractérisés, pourraient agir via différents inflammasomes (Zhang, Liu et al. 2017).

Pour expliquer l'aggravation de la CC par le MCC950, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Le MCC950 pourrait avoir exercé un effet toxique à la dose et à la fréquence utilisée. Cette explication ne peut être exclue, car malgré les études toxicologiques chez la souris démontrant son innocuité à ces doses (Primiano, Lefker et al. 2016), le fait d'injecter de façon répétée des doses élevées de MCC950 aurait pu induire des effets secondaires notamment anorexigènes qui, *in fine*, expliqueraient l'atrophie musculaire et la fonte du tissu adipeux plus importante. L'injection du MCC950 à des souris contrôles aurait pu répondre à cette question. L'aggravation de la CC pourrait résulter d'un effet protumoral du MCC950 lié à la diminution de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, même si la taille de la tumeur n'est pas significativement augmentée par le MCC950, le profil de cytokines exprimé par la tumeur est modifié par l'injection de cette molécule. Cependant, l'effet protumoral du MCC950 est controversé, car certaines études ont rapporté un effet anti-tumoral du MCC950 du moins quand celui-ci est injecté dans la tumeur (modèle HNSCC (Chen, Huang et al. 2018) et modèle de cancer du sein (Pham, Raut et al. 2020)).

Dès lors, même si l'inhibition de l'inflammasome par la délétion du NLRP3 prévient l'atrophie musculaire dans des modèles de sepsis et de sarcopénie et améliore le phénotype musculaire dans un modèle de dystrophie musculaire, il semble que ce mécanisme ne contribue pas de façon prépondérante dans l'atrophie musculaire de la CC, quand bien même l'expression musculaire des composants de l'inflammasome et l'IL-1 β circulantes sont augmentés dans plusieurs modèles de CC (Baf3, C26).

TAK-242

Le TAK-242 n'a pas permis d'atténuer la CC induite par la tumeur C26, que ce soit au niveau de l'atrophie musculaire, de l'anorexie et de l'altération de l'état général même si une diminution de la splénomégalie a été observée. Cette absence d'effet est inattendue. En effet, des expériences précédentes ont montré que le TAK-242 prévient l'atrophie musculaire dans un modèle de sepsis induit par le LPS (Ono, Maejima et al. 2020) et que la délétion du TLR-4 atténue l'atrophie musculaire induite par la tumeur LLC (Zhang, Liu et al. 2017).

Comme pour le MCC950, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'effet du TAK-242. Le TAK-242 pourrait ne pas passer certaines barrières notamment celle du muscle squelettique. Cette hypothèse est peu probable car une expérience préalable de sepsis a montré une diminution des atrogènes en réponse au traitement par le TAK-242. Afin de vérifier l'action du TAK-242, nous pourrions vérifier la phosphorylation de la sous-unité p65 du NF- κ B dans le muscle, en aval de la cascade de signalisation de TLR-4, pour démontrer que le TAK-242 a bien bloqué ce TLR. L'absence d'effet pourrait aussi être due à la cinétique du médicament, cependant sa demi vie est relativement longue (>12h). Les doses injectées ne sont pas non plus à mettre en doute car celles-ci sont plus élevées que celles de la littérature (Wu, Ding et al. 2017). L'effet toxique est également exclu car contrairement au traitement au MCC950, nous n'avons pas constaté d'effet défavorable du traitement par rapport au groupe C26 et les études précédentes ont montré que cette molécule est bien tolérée à forte dose sans effets secondaires (Fumihiro, Masaaki et al. 2011). La question du mode d'administration est également à considérer. En effet le mode d'administration en IP expose à l'effet de premier passage hépatique. De plus l'administration intra tumorale conduit à un effet anti-tumoral qui n'est pas constaté dans nos expériences (Yu, Cheng et al. 2013, Zandi, Kashani et al. 2019). L'hypothèse la plus probable est que le TLR-4 ne joue pas de rôle sur la CC induite par C26, contrairement à ce qui a été observé avec la délétion du TLR-4 dans le modèle de CC induit par la tumeur LLC.

AdipoRon

Contrairement au TAK-242, l'AdipoRon a permis de diminuer la perte de poids et d'atténuer certains signes de la CC, notamment l'altération de l'état général, la fonte du tissu adipeux et la splénomégalie.

L'effet le plus important est la prévention de la perte de poids, très probablement lié à l'atténuation de la perte de masse grasse. Une observation semblable a été faite dans un modèle

de sclérodémie systémique, une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation importante (Yamashita, Lakota et al. 2018). Cet effet protecteur pourrait être direct ou indirect et dans ce cas, résulter d'un apport alimentaire moins réduit et d'une moindre altération de l'état général. En effet, si l'état général est préservé, les souris s'alimentent plus facilement, ce qui rend moins nécessaire l'utilisation des réserves de calories stockées dans le tissu adipeux pour subvenir à leurs besoins énergétiques. L'évaluation de l'activité et de l'expression des enzymes de la lipogenèse et de la lipolyse permettraient de mieux expliquer ce phénotype.

La caractéristique essentielle de la CC est l'atrophie musculaire mais celle-ci n'a été atténuée que très légèrement par l'Adiporon. Plusieurs hypothèses sont à envisager. L'adiponectine conduit à changement de phénotype des fibres musculaires glycolytiques vers oxydatives alors que la CC induit surtout l'atrophie de fibres glycolytiques (IIx et IIb) (Ciciliot, Rossi et al. 2013). L'analyse du poids du muscle devrait être complétée par des analyses histologiques afin de caractériser le phénotype musculaire.

Nous pourrions comme pour les médicaments précédents imaginer des problèmes de cinétique, de dose et de voie d'administration. Néanmoins, dans le cas de l'Adiporon, nous avons pu montrer des effets clairs sur la composition corporelle suggérant que la dose et la méthode d'administration étaient correctes. Les doses utilisées sont celles le plus couramment utilisées dans la littérature (Abou-Samra, Selvais et al. 2020, Gu, Shi et al. 2020). En outre, malgré le fait que le médicament ait initialement été conçu pour être pris oralement, l'administration en IP n'a pas empêché d'observer des effets (Okada-Iwabu, Yamauchi et al. 2013). Nous pourrions néanmoins démontrer que l'Adiporon a bien agi au niveau du muscle squelettique en vérifiant la phosphorylation de l'acétyl-coA carboxylase, une cible de l'AMPK, le médiateur principal de l'action de l'AdipoRon.

2 Limites des modèles animaux

Modèle LPS

Nous nous sommes servis du modèle LPS pour évaluer la réponse inflammatoire aigue. Ce modèle présente plusieurs avantages, notamment une haute reproductibilité, des effets systémiques facilement identifiables et mesurables et une inflammation qui peut être obtenue de manière stérile sans passer par la chirurgie (CLP). De plus ce modèle récapitule assez bien les premières étapes du sepsis humain. Cependant l'injection de LPS ne reproduit pas exactement l'évolution de la septicémie humaine. Elle induit une réponse cytokinique puissante (ordre de magnitude plusieurs fois supérieur au sepsis humain) mais transitoire. Sa résolution

est spontanée alors que les autres modèles mènent, en absence de traitement, à la mort (Seemann, Zohles et al. 2017). Le but de nos expériences LPS a été d'évaluer les effets de l'inhibition du NLRP3 par le MCC950 sur la réponse immunitaire innée (précoce).

Modèle C26

La souris CD2F1 porteuse d'un carcinome colique murin C26 a servi de modèle pour nos expériences. Bien qu'il existe d'autres modèles animaux de cachexie cancéreuse, ce modèle présente l'avantage d'être l'un des plus utilisés et donc un des mieux caractérisés car il est facile à mettre en œuvre, reproductible et de courte durée (Tanaka, Eda et al. 1990, Rosa-Caldwell, Fix et al. 2020). De plus, comme ce modèle est très utilisé, les mécanismes de la cachexie et leurs effets sur l'appétit, la force musculaire et le comportement des souris sont relativement bien connus et facilement analysables (Bonetto, Rupert et al. 2016).

Cependant ce modèle présente plusieurs limites. D'abord, il induit une cachexie très rapide et brutale, ce qui est pratique dans un contexte de recherche mais reflète mal la réalité clinique où la CC humaine est un syndrome s'étalant sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois (Bonetto, Rupert et al. 2016, Rosa-Caldwell, Fix et al. 2020). Le modèle présente également des différences physiologiques avec la cachexie cancéreuse humaine. Les tumeurs C26 conduisent à une atrophie musculaire par induction massive du système ubiquitine protéasome, un mécanisme peu stimulé dans la CC humaine (Aulino, Berardi et al. 2010, Baracos 2018, Talbert, Cuitino et al. 2019). Les tumeurs sont aussi de volume très important par rapport au poids de la souris (200 milligramme pour une souris de 25 grammes) ce qui est également très rare dans le contexte clinique. Les tumeurs C26 ne produisent pas non plus de métastases, qui constituent cependant la cause principale de mortalité. La sévérité du cancer est rarement associée à la taille de la tumeur en elle-même, mais surtout à un pronostic plus grave de CC (Biswas 2020).

Test comportementaux

Le choix des tests comportementaux, le grip test et le MSS ont permis d'évaluer à la fois la réponse comportementale et la force de préhension de la souris à la présence de la tumeur C26 et l'impact des différents traitements (MCC950, TAK-242, AdipoRon). Ces tests ont été réalisés en fin de protocole pour évaluer la souris à un stade avancé de cachexie. Le SCORE de la CACHexie Animale (ACASCO) est un test permettant d'évaluer la sévérité de la cachexie chez l'animal. Ce score est basé sur la perte de poids corporel et musculaire, l'inflammation, les troubles métaboliques, la performance physique, l'anorexie, et la qualité de vie (mesurée à l'aide de symptômes de gêne et de tests comportementaux) (Betancourt, Busquets et al. 2019).

Toutefois, ce test évalue la qualité de vie uniquement sur la présence de symptômes, mais qui ne permet pas d'apprécier le degré de sévérité de ceux-ci, ce pourquoi dans nos expériences nous l'avons remplacé par un test qui le permet, le MSS.

3 Conclusion et perspectives

Il n'existe au jour d'aujourd'hui aucun traitement efficace contre la CC. Nos expériences, malgré l'absence de résultats évidents sur l'atrophie musculaire, nous permettent d'entrevoir plusieurs perspectives de recherche.

Nos expériences n'ont pas permis de mettre en évidence le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la CC. Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'atrophie musculaire de la CC pourrait être étudié par une approche génétique (KO NLRP3) et non pharmacologique. Ainsi, un KO NLRP3 dans tous les organes (sauf la tumeur) permettrait d'obtenir une inhibition complète de cet inflammasome. Cependant, un tel modèle animal est à ce jour inexistant dans la lignée CD2F1, qui peut recevoir les cellules tumorales C26 sans les rejeter. De plus un modèle de délétion NLRP3 résoudrait les problèmes évoqués ci-dessus au sujet des inhibiteurs pharmacologiques. La même démarche peut être appliquée pour le TLR-4 et résoudrait également les problèmes qu'implique l'utilisation d'un inhibiteur.

Ensuite, d'autres inflammasomes que le NLRP3 pourraient être à l'origine des taux circulants d'IL-1 β dans la CC. En partant du principe que cette cytokine joue un rôle prépondérant dans l'atrophie musculaire de la CC, inhiber sa production en ciblant la caspase-1 pourrait être efficace. En effet, cette enzyme qui réalise le clivage de l'IL-1 β sous sa forme mature, est commune aux différents inflammasomes. Son action pourrait être inhibée par voie médicamenteuse ou génétique, inhibant de la sorte toutes les voies productrices d'IL-1 β .

Concernant le modèle utilisé, à côté d'un modèle de CC assez brutal comme le modèle C26, il existe d'autres modèles animaux plus récemment développés qui miment mieux la situation humaine, notamment en termes de chronologie. Dans ces modèles à plus long terme (Apc^(Min/+) pour le cancer colique, KPC pour le cancer du pancréas...), nous pourrions tester l'AdipoRon, le TAK-242 et le MCC950 sur le développement de la CC.

Comme l'inhibition de l'inflammation par ces molécules pourrait affecter la croissance tumorale, il paraît important de vérifier que ces traitements n'ont pas d'impact sur le développement de la tumeur. Il serait intéressant le cas échéant de caractériser les populations cellulaires au sein de la tumeur par FACS afin de rechercher un effet sur le micro environnement tumoral.

De toutes les pistes étudiées, celle de l'ApN semble la plus intéressante. La tendance à la réduction de l'atrophie musculaire pourrait être expliquée par plusieurs mécanismes, notamment le maintien d'un cross-talk entre le tissu adipeux et le muscle squelettique ou une action directe sur le muscle squelettique en tant que tel. Dans ce contexte, la surexpression du gène de l'ApN par électroporation au niveau du muscle squelettique permettrait de démontrer un effet direct de l'ApN sur le muscle dans notre modèle de CC.

En conclusion, les traitements évalués dans le cadre de ce mémoire se sont avérés inefficaces pour prévenir l'atrophie musculaire de la CC. Cependant ces expériences nous ont permis d'entrevoir les possibilités thérapeutiques basées sur les cibles investiguées. Des recherches plus approfondies sont nécessaires pour déterminer leur intérêt dans le traitement de la CC.

VI. BIBLIOGRAPHIE

- Abou-Samra, M., C. M. Selvais, R. Boursereau, S. Lecompte, L. Noel and S. M. Brichard (2020). "AdipoRon, a new therapeutic prospect for Duchenne muscular dystrophy." *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **11**(2): 518-533.
- Abou-Samra, M., C. M. Selvais, N. Dubuisson and S. M. Brichard (2020). "Adiponectin and Its Mimics on Skeletal Muscle: Insulin Sensitizers, Fat Burners, Exercise Mimickers, Muscling Pills ... or Everything Together?" *Int J Mol Sci* **21**(7).
- Argiles, J. M. (2017). "The 2015 ESPEN Sir David Cuthbertson lecture: Inflammation as the driving force of muscle wasting in cancer." *Clin Nutr* **36**(3): 798-803.
- Argiles, J. M., S. Busquets, B. Stemmler and F. J. Lopez-Soriano (2014). "Cancer cachexia: understanding the molecular basis." *Nat Rev Cancer* **14**(11): 754-762.
- Argilés, J. M., C. C. Fontes-Oliveira, M. Toledo, F. J. López-Soriano and S. Busquets (2014). "Cachexia: a problem of energetic inefficiency." *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **5**(4): 279-286.
- Argiles, J. M., F. J. Lopez-Soriano and S. Busquets (2019). "Mediators of cachexia in cancer patients." *Nutrition* **66**: 11-15.
- Aulino, P., E. Berardi, V. M. Cardillo, E. Rizzuto, B. Perniconi, C. Ramina, F. Padula, E. P. Spugnini, A. Baldi, F. Faiola, S. Adamo and D. Coletti (2010). "Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse." *BMC Cancer* **10**(1): 363.
- Baldwin, A., J. Rivers-Auty, H. England, N. Luheshi, M. Daniels, S. Allan, S. Freeman and D. Brough (2015). *Inhibiting the Inflammasome: A Chemical Perspective*.
- Baracos, V. E. (2018). "Bridging the gap: are animal models consistent with clinical cancer cachexia?" *Nat Rev Clin Oncol* **15**(4): 197-198.
- Baracos, V. E., L. Martin, M. Korc, D. C. Guttridge and K. C. H. Fearon (2018). "Cancer-associated cachexia." *Nat Rev Dis Primers* **4**: 17105.
- Betancourt, A., S. Busquets, M. Ponce, M. Toledo, J. Guàrdia-Olmos, M. Peró-Cebollero, F. J. López-Soriano and J. M. Argilés (2019). "The animal cachexia score (ACASCO)." *Animal models and experimental medicine* **2**(3): 201-209.
- Bianchi, M. E. (2007). "DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger." *J Leukoc Biol* **81**(1): 1-5.
- Biswas, A. K. and S. Acharyya (2020). "Understanding cachexia in the context of metastatic progression." *Nat Rev Cancer* **20**(5): 274-284.
- Bohnert, K. R., P. Goli, A. Roy, A. K. Sharma, G. Xiong, Y. S. Gallot and A. Kumar (2019). "The Toll-Like Receptor/MyD88/XBP1 Signaling Axis Mediates Skeletal Muscle Wasting during Cancer Cachexia." *Mol Cell Biol* **39**(15).
- Bonetto, A., J. E. Rupert, R. Barreto and T. A. Zimmers (2016). "The Colon-26 Carcinoma Tumor-bearing Mouse as a Model for the Study of Cancer Cachexia." *Journal of visualized experiments : JoVE* (117): 54893.
- Boursereau, R., M. Abou-Samra, S. Lecompte, L. Noel and S. M. Brichard (2018). "Downregulation of the NLRP3 inflammasome by adiponectin rescues Duchenne muscular dystrophy." *BMC Biol* **16**(1): 33.
- Braun, T. P., A. J. Grossberg, S. M. Krasnow, P. R. Levasseur, M. Szumowski, X. X. Zhu, J. E. Maxson, J. G. Knoll, A. P. Barnes and D. L. Marks (2013). "Cancer- and endotoxin-induced cachexia require intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**(9): 3572-3582.
- Braun, T. P. and D. L. Marks (2015). "The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids." *Frontiers in physiology* **6**: 12-12.
- Cannon, T. Y., D. Guttridge, J. Dahlman, J. R. George, V. Lai, C. Shores, P. Buzkova and M. E. Couch (2007). "The effect of altered Toll-like receptor 4 signaling on cancer cachexia." *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **133**(12): 1263-1269.
- Chen, L., C. F. Huang, Y. C. Li, W. W. Deng, L. Mao, L. Wu, W. F. Zhang, L. Zhang and Z. J. Sun (2018). "Blockage of the NLRP3 inflammasome by MCC950 improves anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma." *Cell Mol Life Sci* **75**(11): 2045-2058.
- Ciciliot, S., A. C. Rossi, K. A. Dyar, B. Blaauw and S. Schiaffino (2013). "Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(10): 2191-2199.
- Coll, R. C., J. R. Hill, C. J. Day, A. Zamoshnikova, D. Boucher, N. L. Massey, J. L. Chitty, J. A. Fraser, M. P. Jennings, A. A. B. Robertson and K. Schroder (2019). "MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition." *Nat Chem Biol* **15**(6): 556-559.
- Coll, R. C., A. A. B. Robertson, J. J. Chae, S. C. Higgins, R. Muñoz-Planillo, M. C. Inserra, I. Vetter, L. S. Dungan, B. G. Monks, A. Stutz, D. E. Coker, M. S. Butler, M. Haneklaus, C. E. Sutton, G. Núñez, E. Latz, D. L. Kastner, K. H. G. Mills, S. L. Masters, K. Schroder, M. A. Cooper and L. A. J. O'Neill (2015). "A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases." *Nature medicine* **21**(3): 248-255.
- Das, S. K. and G. Hoefler (2013). "The role of triglyceride lipases in cancer associated cachexia." *Trends in molecular medicine* **19**(5): 292-301.
- Dehoux, M. J. M., R. P. van Beneden, L. Fernández-Celemin, P. L. Lause and J.-P. M. Thissen (2003). "Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection." *FEBS Letters* **544**(1-3): 214-217.
- Doyle, A., G. Zhang, E. A. Abdel Fattah, N. T. Eissa and Y.-P. Li (2011). "Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways." *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**(1): 99-110.
- Faber, J., A. P. Vos, D. Kegler, J. Argiles, A. Laviano, J. Garssen and A. Van Helvoort (2009). "Impaired immune function: an early marker for cancer cachexia." *Oncol Rep* **22**(6): 1403-1406.
- Fearon, K., F. Strasser, S. D. Anker, I. Bosaeus, E. Bruera, R. L. Fainsinger, A. Jatoi, C. Loprinzi, N. MacDonald, G. Mantovani, M. Davis, M. Muscaritoli, F. Ottery, L. Radbruch, P. Ravasco, D. Walsh, A. Wilcock, S. Kaasa and V. E. Baracos (2011). "Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus." *Lancet Oncol* **12**(5): 489-495.

Fiaschi, T., D. Cirelli, G. Comito, S. Gelmini, G. Ramponi, M. Serio and P. Chiarugi (2009). "Globular adiponectin induces differentiation and fusion of skeletal muscle cells." Cell Research **19**(5): 584-597.

Fong, Y., L. L. Moldawer, M. Marano, H. Wei, A. Barber, K. Manogue, K. J. Tracey, G. Kuo, D. A. Fischman, A. Cerami and a. et (1989). "Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **256**(3): R659-R665.

Fumihiko, J., K. Masaaki, T. Toshiyuki, T. Yoshihiko, K. Takahiro and A. Satoru (2011). "Investigation of the unique metabolic fate of ethyl (6R)-6-[N-(2-chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242) in rats and dogs using two types of 14C-labeled compounds having different labeled positions." Arzneimittelforschung **61**(08): 458-471.

Giordano, C., K. Mojumdar, F. Liang, C. Lemaire, T. Li, J. Richardson, M. Divangahi, S. Qureshi and B. J. Petrof (2015). "Toll-like receptor 4 ablation in mdx mice reveals innate immunity as a therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy." Hum Mol Genet **24**(8): 2147-2162.

Gu, D., Y. Shi, Z. Gong, T. Xia, H. Ren, D. He, J. Yang, Y. Han and C. Zeng (2020). "AdipoRon, an adiponectin receptor agonist, protects contrast-induced nephropathy by suppressing oxidative stress and inflammation via activation of the AMPK pathway." Clin Exp Nephrol **24**(11): 989-998.

Hall, D. T., T. Griss, J. F. Ma, B. J. Sanchez, J. Sadek, A. M. K. Tremblay, S. Mubaid, A. Omer, R. J. Ford, N. Bedard, A. Pa use, S. S. Wing, S. Di Marco, G. R. Steinberg, R. G. Jones and I. E. Gallouzi (2018). "The AMPK agonist 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR), but not metformin, prevents inflammation-associated cachectic muscle wasting." EMBO Mol Med **10**(7).

He, Y., H. Hara and G. Nunez (2016). "Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation." Trends Biochem Sci **41**(12): 1012-1021.

Hua, F., H. Tang, J. Wang, M. C. Prunty, X. Hua, I. Sayeed and D. G. Stein (2015). "TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice." J Cereb Blood Flow Metab **35**(4): 536-542.

Huang, N., M. Kny, F. Riediger, K. Busch, S. Schmidt, F. C. Luft, H. Slevogt and J. Fielitz (2017). "Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy." Intensive Care Med Exp **5**(1): 3.

Huang, Y., H. Jiang, Y. Chen, X. Wang, Y. Yang, J. Tao, X. Deng, G. Liang, H. Zhang, W. Jiang and R. Zhou (2018). "Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases." EMBO Mol Med **10**(4).

Ii, M., N. Matsunaga, K. Hazeki, K. Nakamura, K. Takashima, T. Seya, O. Hazeki, T. Kitazaki and Y. Iizawa (2006). "A novel cyclohexene derivative, ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling." Mol Pharmacol **69**(4): 1288-1295.

Kolb, R., G. H. Liu, A. M. Janowski, F. S. Sutterwala and W. Zhang (2014). "Inflammasomes in cancer: a double-edged sword." Protein Cell **5**(1): 12-20.

Krause, M. P., K. J. Milne and T. J. Hawke (2019). "Adiponectin-Consideration for its Role in Skeletal Muscle Health." Int J Mol Sci **20**(7).

Krishnan, S. M., Y. H. Ling, B. M. Huuskens, D. M. Ferens, N. Saini, C. T. Chan, H. Diep, M. M. Kett, C. S. Samuel, B. K. Kemp-Harper, A. A. B. Robertson, M. A. Cooper, K. Peter, E. Latz, A. S. Mansell, C. G. Sobey, G. R. Drummond and A. Vinh (2019). "Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome reduces blood pressure, renal damage, and dysfunction in salt-sensitive hypertension." Cardiovascular research **115**(4): 776-787.

Kumar, H., T. Kawai and S. Akira (2009). "Toll-like receptors and innate immunity." Biochem Biophys Res Commun **388**(4): 621-625.

Latz, E., T. S. Xiao and A. Stutz (2013). "Activation and regulation of the inflammasomes." Nat Rev Immunol **13**(6): 397-411.

Lerner, L., J. Tao, Q. Liu, R. Nicoletti, B. Feng, B. Krieger, E. Mazza, Z. Siddiquee, R. Wang, L. Huang, L. Shen, J. Lin, A. Viganò, M. I. Chiu, Z. Weng, W. Winston, S. Weiler and J. Gyuris (2016). "MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia." Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle **7**(4): 467-482.

Mai, S. H. C., N. Sharma, A. C. Kwong, D. J. Dwivedi, M. Khan, P. M. Grin, A. E. Fox-Robichaud and P. C. Liaw (2018). "Body temperature and mouse scoring systems as surrogate markers of death in cecal ligation and puncture sepsis." Intensive Care Med Exp **6**(1): 20.

Marshall, S. (2016). "Protein-energy malnutrition in the rehabilitation setting: Evidence to improve identification." Maturitas **86**: 77-85.

Massart, I. S., G. Paulissen, A. Loumaye, P. Lause, S. A. Pötgens, M. M. Thibaut, E. Balan, L. Deldicque, A. Atfi, E. Louis, D. Gruson, L. B. Bindels, M. A. Meuwis and J. P. Thissen (2020). "Marked Increased Production of Acute Phase Reactants by Skeletal Muscle during Cancer Cachexia." Cancers (Basel) **12**(11).

McBride, M. J., K. P. Foley, D. M. D'Souza, Y. E. Li, T. C. Lau, T. J. Hawke and J. D. Schertzer (2017). "The NLRP3 inflammasome contributes to sarcopenia and lower muscle glycolytic potential in old mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **313**(2): E222-E232.

Miller, M., B. J. A. Laird and R. J. E. Skipworth (2019). "The immunological regulation of cancer cachexia and its therapeutic implications." Journal of Cancer Metastasis and Treatment **2019**.

Mogensen, T. H. (2009). "Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses." Clin Microbiol Rev **22**(2): 240-273, Table of Contents.

Newton, K. and V. M. Dixit (2012). "Signaling in innate immunity and inflammation." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(3).

Ng, R. C., M. Jian, O. K. Ma, M. Bunting, J. S. Kwan, G. J. Zhou, K. Senthikumar, A. Iyaswamy, P. K. Chan, M. Li, K. M. Leung, S. S. Kumar Durairajan, K. S. Lam, L. W. Chu, R. Festenstein, S. K. Chung and K. H. Chan (2020). "Chronic oral administration

of adipoRon reverses cognitive impairments and ameliorates neuropathology in an Alzheimer's disease mouse model." *Mol Psychiatry*.

O'Neill, L. A. J., D. Golenbock and A. G. Bowie (2013). "The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity." *Nature Reviews Immunology* **13**(6): 453-460.

Okada-Iwabu, M., T. Yamauchi, M. Iwabu, T. Honma, K. Hamagami, K. Matsuda, M. Yamaguchi, H. Tanabe, T. Kimura - Someya, M. Shirouzu, H. Ogata, K. Tokuyama, K. Ueki, T. Nagano, A. Tanaka, S. Yokoyama and T. Kadowaki (2013). "A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity." *Nature* **503**(7477): 493-499.

Onesti, J. K. and D. C. Guttridge (2014). "Inflammation based regulation of cancer cachexia." *BioMed research international* **2014**: 168407-168407.

Ono, Y., Y. Maejima, M. Saito, K. Sakamoto, S. Horita, K. Shimomura, S. Inoue and J. Kotani (2020). "TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice." *Sci Rep* **10**(1): 694.

Otvos, L., Jr. (2019). "Potential Adiponectin Receptor Response Modifier Therapeutics." *Frontiers in endocrinology* **10**: 539-539.

Peixoto da Silva, S., J. M. O. Santos, E. S. M. P. Costa, R. M. Gil da Costa and R. Medeiros (2020). "Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia." *J Cachexia Sarcopenia Muscle*.

Penna, F., R. Ballaro, P. Martinez-Cristobal, D. Sala, D. Sebastian, S. Busquets, M. Muscaritoli, J. M. Argiles, P. Costelli and A. Zorzano (2019). "Autophagy Exacerbates Muscle Wasting in Cancer Cachexia and Impairs Mitochondrial Function." *J Mol Biol* **431**(15): 2674-2686.

Pham, D. V., P. K. Raut, M. Pandit, J. H. Chang, N. Katila, D. Y. Choi, J. H. Jeong and P. H. Park (2020). "Globular Adiponectin Inhibits Breast Cancer Cell Growth through Modulation of Inflammasome Activation: Critical Role of Sestrin2 and AMPK Signaling." *Cancers (Basel)* **12**(3).

Prado, B. L. and Y. Qian (2019). "Anti-cytokines in the treatment of cancer cachexia." *Ann Palliat Med* **8**(1): 67-79.

Primiano, M. J., B. A. Lefker, M. R. Bowman, A. G. Bree, C. Hubeau, P. D. Bonin, M. Mangan, K. Dower, B. G. Monks, L. Cushing, S. Wang, J. Guzova, A. Jiao, L. L. Lin, E. Latz, D. Hepworth and J. P. Hall (2016). "Efficacy and Pharmacology of the NLRP3 Inflammasome Inhibitor CP-456,773 (CRID3) in Murine Models of Dermal and Pulmonary Inflammation." *J Immunol* **197**(6): 2421-2433.

Rosa-Caldwell, M. E., D. K. Fix, T. A. Washington and N. P. Greene (2020). "Muscle alterations in the development and progression of cancer-induced muscle atrophy: a review." *J Appl Physiol (1985)* **128**(1): 25-41.

Schaefer, L. (2014). "Complexity of danger: the diverse nature of damage-associated molecular patterns." *J Biol Chem* **289**(51): 35237-35245.

Schakman, O., S. Kalista, C. Barbe, A. Loumaye and J. P. Thissen (2013). "Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy." *Int J Biochem Cell Biol* **45**(10): 2163-2172.

Seemann, S., F. Zohles and A. Lupp (2017). "Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation." *Journal of Biomedical Science* **24**(1): 60.

Shurin, M. R. (2012). "Cancer as an immune-mediated disease." *Immunotargets Ther* **1**: 1-6.

Singh, A. K., S. Shree, S. Chattopadhyay, S. Kumar, A. Gurjar, S. Kushwaha, H. Kumar, A. K. Trivedi, N. Chattopadhyay, R. Maurya, R. Ramachandran and S. Sanyal (2017). "Small molecule adiponectin receptor agonist GTDF protects against skeletal muscle atrophy." *Mol Cell Endocrinol* **439**: 273-285.

Skipworth, R. J., G. D. Stewart, C. H. Dejong, T. Preston and K. C. Fearon (2007). "Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumour interaction?" *Clin Nutr* **26**(6): 667-676.

Stephens, N. A., R. J. Skipworth and K. C. Fearon (2008). "Cachexia, survival and the acute phase response." *Curr Opin Support Palliat Care* **2**(4): 267-274.

Strassmann, G., Y. Masui, R. Chizzonite and M. Fong (1993). "Mechanisms of experimental cancer cachexia. Local involvement of IL-1 in colon-26 tumor." *The Journal of Immunology* **150**(6): 2341-2345.

Su, M., W. Wang, F. Liu and H. Li (2020). "Recent progress on the discovery of NLRP3 inhibitors and their therapeutic potential." *Curr Med Chem*.

Talbert, E. E., M. C. Cuitino, K. J. Ladner, P. V. Rajasekerea, M. Siebert, R. Shakya, G. W. Leone, M. C. Ostrowski, B. Paleo, N. Weisleder, P. J. Reiser, A. Webb, C. D. Timmers, D. S. Eiferman, D. C. Evans, M. E. Dillhoff, C. R. Schmidt and D. C. Guttridge (2019). "Modeling Human Cancer-induced Cachexia." *Cell Rep* **28**(6): 1612-1622 e1614.

Tanaka, Y., H. Eda, T. Tanaka, T. Udagawa, T. Ishikawa, I. Horii, H. Ishitsuka, T. Kataoka and T. Taguchi (1990). "Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice." *Cancer Res* **50**(8): 2290-2295.

Tanaka, Y., S. Kita, H. Nishizawa, S. Fukuda, Y. Fujishima, Y. Obata, H. Nagao, S. Masuda, Y. Nakamura, Y. Shimizu, R. Mineo, T. Natsukawa, T. Funahashi, B. Ranscht, S.-i. Fukada, N. Maeda and I. Shimomura (2019). "Adiponectin promotes muscle regeneration through binding to T-cadherin." *Scientific Reports* **9**(1): 16.

Tapia-Abellan, A., D. Angosto-Bazarra, H. Martinez-Banaclocha, C. de Torre-Mingueta, J. P. Ceron-Carrasco, H. Perez-Sanchez, J. I. Arostegui and P. Pelegrin (2019). "MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state." *Nat Chem Biol* **15**(6): 560-564.

Walton, K. L., J. L. Chen, Q. Arnold, E. Kelly, M. La, L. Lu, G. Lovrecz, A. Hagg, T. D. Colgan, H. Qian, P. Gregorevic and C. A. Harrison (2019). "Activin A-Induced Cachectic Wasting Is Attenuated by Systemic Delivery of Its Cognate Propeptide in Male Mice." *Endocrinology* **160**(10): 2417-2426.

Wu, C., X. Ding, C. Zhou, P. Ye, Y. Sun, J. Wu, A. Zhang, X. Huang, L. Ren, K. Wang, P. Deng, Z. Yue, J. Chen, S. Wang and J. Xia (2017). "Inhibition of intimal hyperplasia in murine aortic allografts by administration of a small-molecule TLR4 inhibitor TAK-242." Sci Rep **7**(1): 15799.

Yamashita, T., K. Lakota, T. Taniguchi, A. Yoshizaki, S. Sato, W. Hong, X. Zhou, S. Sodin-Semrl, F. Fang, Y. Asano and J. Varga (2018). "An orally-active adiponectin receptor agonist mitigates cutaneous fibrosis, inflammation and microvascular pathology in a murine model of systemic sclerosis." Scientific Reports **8**(1): 11843.

Yang, W., J. Huang, H. Wu, Y. Wang, Z. Du, Y. Ling, W. Wang, Q. Wu and W. Gao (2020). "Molecular mechanisms of cancer cachexia-induced muscle atrophy (Review)." Mol Med Rep **22**(6): 4967-4980.

Yu, P., X. Cheng, Y. Du, L. Huang and R. Dong (2013). "TAK-242 can be the potential agents for preventing invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma." Med Hypotheses **81**(4): 653-655.

Zandi, Z., B. Kashani, E. M. Poursani, D. Bashash, M. Kabuli, M. Momeny, S. H. Mousavi-Pak, F. Sheikhsaran, K. Alimoghaddam, S. A. Mousavi and S. H. Ghaffari (2019). "TLR4 blockade using TAK-242 suppresses ovarian and breast cancer cells invasion through the inhibition of extracellular matrix degradation and epithelial-mesenchymal transition." Eur J Pharmacol **853**: 256-263.

Zhang, G., Z. Liu, H. Ding, H. Miao, J. M. Garcia and Y. P. Li (2017). "Toll-like receptor 4 mediates Lewis lung carcinoma-induced muscle wasting via coordinate activation of protein degradation pathways." Sci Rep **7**(1): 2273.

Zhang, G., Z. Liu, H. Ding, Y. Zhou, H. A. Doan, K. W. T. Sin, Z. J. Zhu, R. Flores, Y. Wen, X. Gong, Q. Liu and Y. P. Li (2017). "Tumor induces muscle wasting in mice through releasing extracellular Hsp70 and Hsp90." Nat Commun **8**(1): 589.

Zhou, X., J. L. Wang, J. Lu, Y. Song, K. S. Kwak, Q. Jiao, R. Rosenfeld, Q. Chen, T. Boone, W. S. Simonet, D. L. Lacey, A. L. Goldberg and H. Q. Han (2010). "Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival." Cell **142**(4): 531-543.

Zhu, X., K. G. Burfeind, K. A. Michaelis, T. P. Braun, B. Olson, K. R. Pelz, T. K. Morgan and D. L. Marks (2019). "MyD88 signalling is critical in the development of pancreatic cancer cachexia." Journal of cachexia, sarcopenia and muscle **10**(2): 378-390.

Abstract

Cancer cachexia (CC) is a multifactorial syndrome associated with the development of cancer and characterized by a continuous loss of skeletal muscle mass, with or without fat loss, that cannot be completely prevented or corrected by conventional nutritional support. It occurs in approximately 80% of patients with advanced disease and is the cause of death in 20% of cases. Its mechanisms remain poorly understood and its treatment disappointing. Inflammation associated with innate immunity undoubtedly plays a role in the development of CC. It is stimulated by receptors of the TLR and NLR types. Although the role of some TLRs is partially investigated, the role of NLRs, in particular NLRP3, remains unknown. Several arguments suggest that inflammation, and in particular the TLR-4 and NLRP3 activated pathways, may contribute to the muscle atrophy of CC. Indeed, inhibition of NLRP3 and TLR-4 decreases muscle atrophy in several inflammatory pathologies (muscular dystrophy, sepsis, aging...). Their inhibition would therefore represent an interesting avenue to prevent the loss of muscle mass that contributes to the poor prognosis of CC.

In order to evaluate the role of inflammation in CC muscle atrophy, we tested the effect of three inflammation inhibitors: MCC950, TAK-242 and AdipoRon. Firstly, the administration of a specific inflammasome inhibitor NLRP3 (MCC950), in an acute inflammation model obtained by IP injection of LPS, attenuated the elevation of circulating IL-1 β levels and the activation of the inflammasome in the liver 2.5 hours after injection. However, this inhibition is not found 24 hours after LPS injection. In addition, MCC950 does not block the muscle induction of atrogens (Atrogin-1, MurF-1) but blocks the muscle induction of *serpina3n*, a marker of the inflammatory response. In a CC model induced by implantation of C26 tumor cells, MCC950 does not inhibit elevation of circulating levels of IL-1 β , atrogen induction or muscle atrophy. Unexpectedly, MCC950 has deleterious effects, contributing to increased fat and muscle tissue loss. This may be due to a change in tumor phenotype. TAK-242, the TLR-4 inhibitor, upstream of NLRP3 activation, does not prevent CC muscle atrophy but reduces splenomegaly. AdipoRon, an adiponectin analog, improves the general condition of mice, reduces weight loss, especially by attenuated fat loss in the CC model. These results demonstrate that MCC950 transiently inhibits LPS-induced activation of the NLRP3 inflammasome in the liver, but has no protective effect on CC muscle atrophy. Since MCC950 does not inhibit IL-1 β production, our data do not allow us to conclude on the role of NLRP3 inflammasome in CC muscle atrophy. Inhibition of inflammation by AdipoRon appears to be a promising avenue for the treatment of cancer cachexia in view of its effect on body weight preservation.