



**HAL**  
open science

# Mécanismes de l'atrophie musculaire au cours de l'insuffisance rénale

Julien Aniort

► **To cite this version:**

Julien Aniort. Mécanismes de l'atrophie musculaire au cours de l'insuffisance rénale. Urologie et Néphrologie. Université Clermont Auvergne [2017-2020], 2018. Français. NNT : 2018CLFAS024 . tel-02611745

**HAL Id: tel-02611745**

**<https://theses.hal.science/tel-02611745>**

Submitted on 18 May 2020

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

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

**UNIVERSITÉ CLERMONT-AUVERGNE**

Année : 2017-2018

N° d'ordre

*ÉCOLE DOCTORALE  
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

*Thèse*

Présentée à l'Université Clermont-Auvergne pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Biochimie et Biologie Cellulaire

Soutenue le 29 Novembre 2018

**Julien ANIORT**

---

**Mécanismes de l'Atrophie Musculaire  
au Cours de l'Insuffisance Rénale**

---

JURY

Président : Pr Christian COMBE

Membres : Dr Odile BURLET-SCHILTZ  
Pr Anne-Elisabeth HENG (Co-directrice de thèse)  
Dr Daniel TAILLANDIER (Directeur de thèse)

Rapporteurs : Pr Damien FREYSSINET  
Pr Fitsum GUEBRE-EGZIABHER

INRA/Université Clermont Auvergne UMR 1019,  
Unité de Nutrition Humaine, Equipe Improving  
Centre de Recherche INRA de Clermont-Ferrand/Theix  
63122 Saint Genès Champanelle

## REMERCIEMENTS

---

Je voudrais d'abord remercier les membres de mon jury :

- Le Pr Christian COMBE, je vous remercie d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse, je suis sûr que votre regard apportera beaucoup à ce travail.
- Le Pr Fitsum GUEBRE-EGZIABHER, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Vos conseils et votre aide ont été précieux
- Le Pr Anne Elisabeth HENG, vous avez été à l'origine de ce travail, je vous remercie de m'avoir fait confiance pour le mener à terme
- Le Dr Odile SCHILTZ, je vous remercie de votre participation à ce jury de thèse, pour vos conseils et votre contribution à la réalisation de ce travail
- Le Dr Daniel TAILLANDIER, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre équipe, de votre patience, de votre pédagogie et de votre optimisme à toute épreuve.
- Le Pr Damien FREYSSENET, je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, je ne doute pas que vos remarques me seront profitables

Merci à Carole et Anaïs, votre participation à ce travail a été essentielle, merci aussi pour votre soutien.

Un grand merci à Alexandre Stella, ton expertise dans l'analyse protéomique, mais aussi ta gentillesse et ta disponibilité.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe protéolyse qui m'ont accompagné lors de ces dernières années, Agnès, Cécile, Christiane, Didier et Lydie. Merci pour votre aide et vos conseils dans cette aventure.

Je voudrais remercier particulièrement le Pr Bertrand Souweine et le Dr Mohammed Hadj Abdelkader sans qui ce travail n'aurait pu aboutir.

Enfin je voudrais remercier ma famille, mes parents, Thomas et Valérie, ma tatie, mon grand-père, Sophie (te retrouver est la plus belle chose qui me soit arrivée), Jacques et Anne-Marie, Pierre et Andrée et sans oublier Boubou !

## SOMMAIRE

---

Remerciements .....	2
Sommaire .....	4
Liste des abréviations .....	7
Revue de bibliographie.....	9
1. Introduction .....	9
2. L'insuffisance rénale chronique .....	10
2.1. Définition .....	10
2.2. Epidémiologie .....	10
3. Le muscle strié squelettique et l'atrophie musculaire .....	11
3.1. Structure du muscle strié squelettique .....	11
3.1.1. Histologie.....	11
3.1.2. Principales cellules du muscle striée squelettique .....	11
3.1.2.1. La fibre musculaire striée squelettique .....	11
3.1.2.2. Les cellules satellites.....	12
3.1.3. Les myofibrilles .....	13
3.2. Fonctions du muscle strié squelettique .....	14
3.3. Hétérogénéité des fibres musculaires.....	15
3.4. Plasticité du muscle.....	15
4. Métabolisme musculaire .....	16
4.1. Métabolisme protidique .....	16

4.1.1.	Balance protéolyse/protéosynthèse.....	16
4.1.2.	Systèmes protéolytiques .....	17
4.1.2.1.	Le système ubiquitine-protéasome .....	17
4.1.2.1.1.	Fonctionnement .....	17
4.1.2.1.2.	Rôle de l'UPS au cours de l'atrophie musculaire .....	21
4.1.2.2.	Autophagie .....	24
4.1.2.2.1.	Fonctionnement .....	24
4.1.2.2.2.	Rôle de l'autophagie au cours de l'atrophie musculaire .....	28
4.1.	Métabolisme énergétique .....	29
4.1.1.	Dysfonction mitochondriale .....	30
4.1.2.	Le stress oxydant .....	31
4.1.3.	Glycolyse anaérobie .....	32
4.1.4.	Transition de phénotype .....	33
5.	Régulation de la masse musculaire .....	33
5.1.	Diminution des apports en nutriments .....	33
5.2.	Facteurs mécaniques .....	36
5.3.	Facteurs humoraux.....	37
5.3.1.	Insuline et IGF1 .....	37
5.3.2.	Acidose .....	40
5.3.3.	Inflammation .....	40
5.3.4.	Myostatine .....	43

6. Sensibilité des différents types de fibres à l'atrophie.....	45
Conclusions et Projet de thèse.....	47
1 <sup>er</sup> article : Upregulation of MuRF1 and MAFbx participates to muscle wasting upon gentamicin-induced acute kidney injury .....	49
2 <sup>e</sup> article : Muscle wasting in patients with end-stage renal disease or early-stage lung cancer: common mechanisms at work .....	66
Conclusions globales et perspectives .....	101
Références .....	104

## LISTE DES ABREVIATIONS

AMPK	AMP activated protein kinase
Atg	Autophagy related gene
ATP	Adénosine triphosphate
ARNm	ARN messenger
Bax	BCL2 associated X, apoptosis regulator
BECN1	Beclin-1
C12orf44/ATG101	Chromosome 12 open reading frame 44/Autophagy related gene 101
C-EBP $\beta$	CCAAT/enhancer binding protein-bêta
C-EBP $\delta$	CCAAT/enhancer binding protein-delta
CRP	C-Reactive Protein
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
DRP1	Dynamin related protein-1
FAK	Focal adhesion kinase
Fbxo30/MUSA1	F-box protein 30/muscle ubiquitin ligase of the SCF complex in atrophy-1
Fis1	Fission-1
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
HECT	Homologous to E6-AP C terminus
Hsc70	Heat shock cognate 71 kDa protein
Hsp90	Heat shock protein 90 kDa
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
IGF-1	Insulin like growth factor-1
Il	Interleukine
IRS1	Insulin receptor substrate-1
IRC	Insuffisance rénale chronique
JNK	c-jun N-terminal kinase
LAMP2a	Lysosomal associated membrane protein-2a
LC3	Microtubule associated protein 1 light chain 3
H/Mdm2	Human/Mouse double minute-2
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
MAPK	Mitogen associated protein kinase
Mfn1	Mitofusin-1
Mfn2	Mitofusin-2
miARN	Micro ARN
MHC	Myosin heavy chain
MLC	Myosin light chain
MRC	Maladie rénale chronique
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex-1
MuRF1	Muscle Ring Finger-1
Nedd4	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4

NFκB	Nuclear factor-kappa B
p62/SQSTM1	Sequestosome-1
PGC1α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
RAG	Ras-related GTP binding
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB1CC1/FIP200	RB1-inducible coiled-coil protein 1/FAK family-interacting protein of 200 kDa
RING	Really INtersting New Genes
ROS	radicaux libres oxygénés
SIRPα	Signal regulatory protein-alpha
SNAREs	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling-3
STAT3	Signal transducer and activator of transcription-3
TNFα	Tumor Necrosis Factor-alpha
TRAF6	TNF receptor associated factor-6
Trim32	Tripartite motif-containing protein 32
UBL	ubiquitin like protein
ULK1	Unc-51 like autophagy activating kinase-1
ULK2	Unc-51 like autophagy activating kinase-2
UPS	système ubiquitine-protéasome
UVRAG	UV radiation resistance-associated gene
ZFN16	Zinc Finger Protein 16

### 1. Introduction

L'organisme d'un adulte en bonne santé renferme 11 à 15 kg de protéines soit 17% du poids du corps. Ces protéines sont en constant renouvellement à hauteur de 3,5 à 4,5 g de protéines par kg et par jour. Le tissu musculaire est la principale réserve protéique de l'organisme. Sa masse est régulée par les processus cellulaires de protéolyse et de protéosynthèse. De nombreuses situations physiologiques ou pathologiques conduisent à une diminution de la masse musculaire. Cette atrophie musculaire s'accompagne d'une diminution de la force et de l'endurance de la contraction musculaire, principale fonction du muscle mais aussi d'autres perturbations telles que des altérations de l'homéostasie du métabolisme des acides gras et du glucose. L'atrophie musculaire survient lorsque le muscle n'est plus sollicité (immobilisation prolongée, dénervation, apesanteur), lors du vieillissement, du jeûne, ou de certaines situations pathologiques comme le cancer, le sepsis, le diabète, l'insuffisance respiratoire, cardiaque, hépatocellulaire ou rénale. L'activation de la protéolyse, parfois associée à une diminution de la protéosynthèse, constitue une adaptation métabolique de l'organisme. En effet, les protéines musculaires sont une source d'acides aminés libres qui seront dirigés vers la néoglucogenèse à des fins énergétiques, et lors de certaines pathologies vers la synthèse des protéines de la réaction inflammatoire et les synthèses protéiques obligatoires (cœur, cerveau...). Cependant, lorsque la balance protéique négative du muscle squelettique perdure, elle a des conséquences négatives en clinique. Au cours de l'insuffisance rénale par exemple, elle est associée à une diminution de la qualité de vie, d'une augmentation des hospitalisations, et de la mortalité des patients. La compréhension des mécanismes de l'atrophie musculaire est nécessaire pour envisager des stratégies thérapeutiques. L'analyse des étapes précoces de la dégénérescence musculaire et notamment des molécules impliquées dans la déstabilisation du sarcomère est nécessaire pour mettre en route des mesures préventives. La connaissance des principaux acteurs, les fonctions cellulaires altérées et les voies métaboliques impliquées dans le développement de l'atrophie est quant à elle, nécessaire pour envisager des thérapeutiques curatives bloquant en partie le processus de protéolyse et/ou pour le contrebalancer par une augmentation de la protéosynthèse musculaire. L'un des objectifs de mon travail était donc d'identifier les modifications métaboliques survenant au cours d'une atrophie musculaire engendrée par une insuffisance rénale, en me focalisant plus particulièrement sur le rôle de la protéolyse.

## 2. L'insuffisance rénale chronique

### 2.1. Définition

Les reins permettent le maintien de l'homéostasie du milieu intérieur essentiel à la survie des cellules de l'organisme. Ils assurent l'élimination des déchets produits par le métabolisme de l'azote (les toxines urémiques), ajustent les sorties d'eau et d'électrolytes de façon à maintenir la volémie et la composition du sérum constante et produisent des hormones intervenant dans le contrôle de l'hématopoïèse (érythropoïétine), du métabolisme minérale et osseux ( $1,25(\text{OH})_2$  Vitamine D3) ou de la pression artérielle (rénine). L'unité fonctionnelle des reins est le néphron. Il comprend un glomérule au sein duquel le sang est filtré aboutissant à l'urine primitive qui s'écoule dans le tubule. Les phénomènes de réabsorption et de sécrétion qui s'opèrent à ce niveau aboutissent à l'excrétion de l'urine définitive dans les voies urinaires. En pratique, la fonction globale des reins est appréciée par le niveau du débit de filtration glomérulaire (DFG). La maladie rénale chronique (MRC) désigne la présence de signes d'atteinte rénale (protéinurie, anomalies du sédiment urinaire, troubles hydroélectrolytiques témoignant d'une dysfonction tubulaire, lésion histologique ou anomalie à l'imagerie) plus ou moins associés à une réduction du DFG persistant pendant plus de 3 mois<sup>1</sup>. La MRC est classée en 5 stades de sévérité croissante en fonction du niveau de réduction du DFG. On parle d'insuffisance rénale chronique (IRC) à partir du stade 3 correspondant à un DFG inférieur à  $60 \text{ mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  estimé à l'aide de l'équation CKD EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration).

### 2.2. Epidémiologie

La MRC représente un problème majeur de santé publique<sup>2</sup>. On estime à 3 millions en France le nombre de patients ayant une MRC. L'augmentation de la prévalence du diabète, de l'hypertension artérielle et de l'obésité, l'allongement de l'espérance de vie et l'accumulation de comorbidités à risque d'insuffisance rénale aiguë avec l'âge (insuffisance cardiaque, artériopathie, cancer...) sont autant de facteurs expliquant l'augmentation observée et prévisible du nombre de personnes ayant une MRC. En France, la prévalence de la MRC nécessitant un traitement de suppléance (dialyse ou greffe rénale) augmente de 4% tous les ans (données du registre REIN). En dépit des progrès thérapeutiques, la MRC reste la cause d'une dégradation de la qualité de vie<sup>3</sup> et d'un risque de décès accru corrélé au degré de gravité de l'insuffisance rénale<sup>4</sup>. Outre les atteintes directes sur la fonction rénale, la MRC est responsable de la survenue d'une atrophie musculaire. Cette dernière est d'intensité modérée mais

persistante tout au long du développement de la maladie rénale et entraîne donc au final une atrophie délétère pour le patient. Il existe un ensemble de données concordantes révélant que l'existence d'une atrophie continue et la diminution de la masse musculaire constituent des facteurs de risque indépendants de mortalité chez les patients ayant une MRC<sup>5</sup>. La lutte contre l'atrophie musculaire apparaît donc comme une composante majeure pour améliorer le pronostic des patients ayant une MRC. Pour cela, la compréhension des mécanismes de l'atrophie musculaire au cours de la MRC est un préalable nécessaire à la mise au point de stratégies diagnostiques précoces et/ou de thérapeutiques efficaces.

### **3. Le muscle strié squelettique et l'atrophie musculaire**

#### 3.1. Structure du muscle strié squelettique

##### 3.1.1. Histologie

Le muscle strié squelettique est constitué de fibres musculaires, de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses<sup>6</sup>. La fibre musculaire représente l'unité cellulaire spécialisée du muscle. Elle confère les propriétés contractiles du muscle. Chaque fibre musculaire est entourée d'une membrane basale appelé endomysium. Les fibres musculaires se regroupent en faisceau musculaire recouvert par une trame conjonctive, le péri-mysium. Les faisceaux de fibres musculaires se réunissent à chaque extrémité du muscle en tendon qui s'accroche sur l'os. Le muscle est entouré d'une aponévrose ou épimysium<sup>7</sup> (figure 1A).

#### 3.1.2. Principales cellules du muscle squelettique

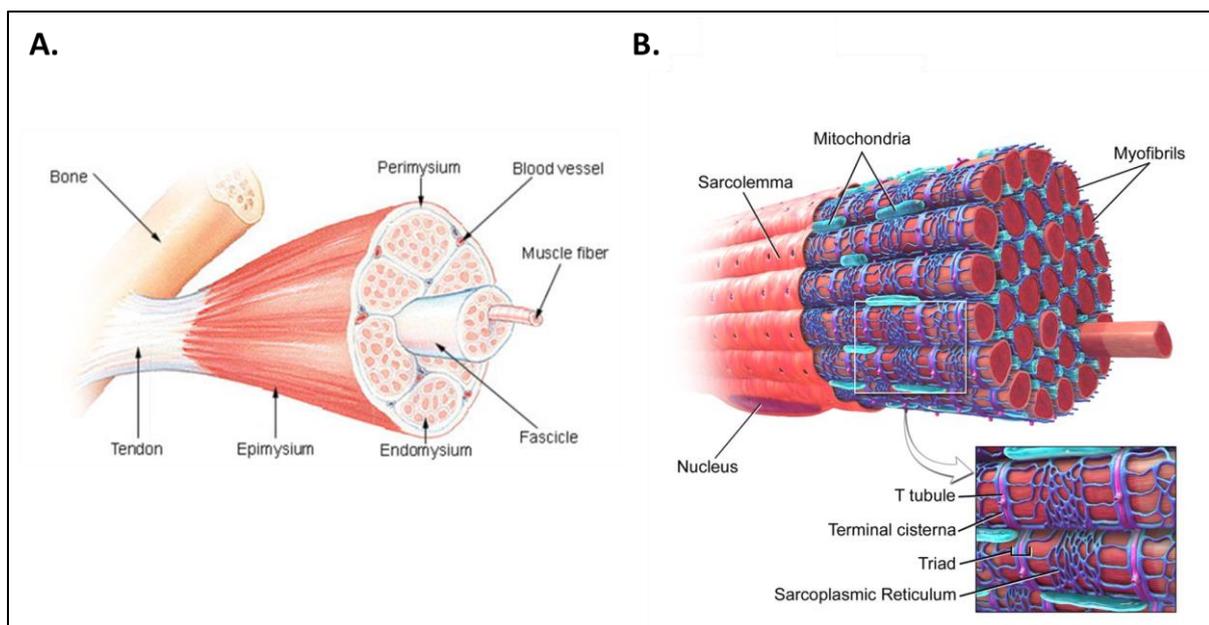
##### 3.1.2.1. La fibre musculaire squelettique

La fibre musculaire squelettique<sup>6</sup> est une cellule hautement spécialisée, douée de propriétés contractiles. Elle a un aspect en fuseau long (de quelques mm jusqu'à 30 cm chez l'homme) et fin (de 10 à 100  $\mu\text{m}$  de diamètre). La fibre musculaire squelettique est caractérisée par son aspect strié en microscopie dû à l'alternance de bandes claires (bande I ou isotrope en lumière polarisée) et sombres (bande A ou anisotrope). Au milieu des bandes I et A on trouve respectivement la strie Z et la ligne M. La fibre musculaire possède plusieurs noyaux qui sont situés en périphérie du cytoplasme (jusqu'à plusieurs centaines de noyaux). Chaque fibre musculaire est entourée par une membrane cytoplasmique, le sarcolemme. Le cytoplasme des fibres est appelé sarcoplasme. Il contient l'appareil contractile de la cellule ou myofibrilles, un

réticulum endoplasmique (réticulum sarcoplasmique), des vésicules, un appareil de Golgi, des mitochondries particulièrement abondantes et un pigment respiratoire la myoglobine. Le réticulum sarcoplasmique<sup>8</sup> constitue un réseau qui entoure les myofibrilles. Il présente à intervalles réguliers des manchons dilatés, les citernes terminales. Elles sont au contact d'invagination de la membrane plasmique, les tubules transverses (tubule T). Chaque tubule transverse se positionne entre deux citernes terminales, l'ensemble formant une triade (figure 1B). Les triades assurent la transmission de l'influx nerveux électrique jusqu'au réticulum sarcoplasmique, ce qui permet d'induire la libération d'ions calcium nécessaires à la contraction.

### 3.1.2.2. Les cellules satellites

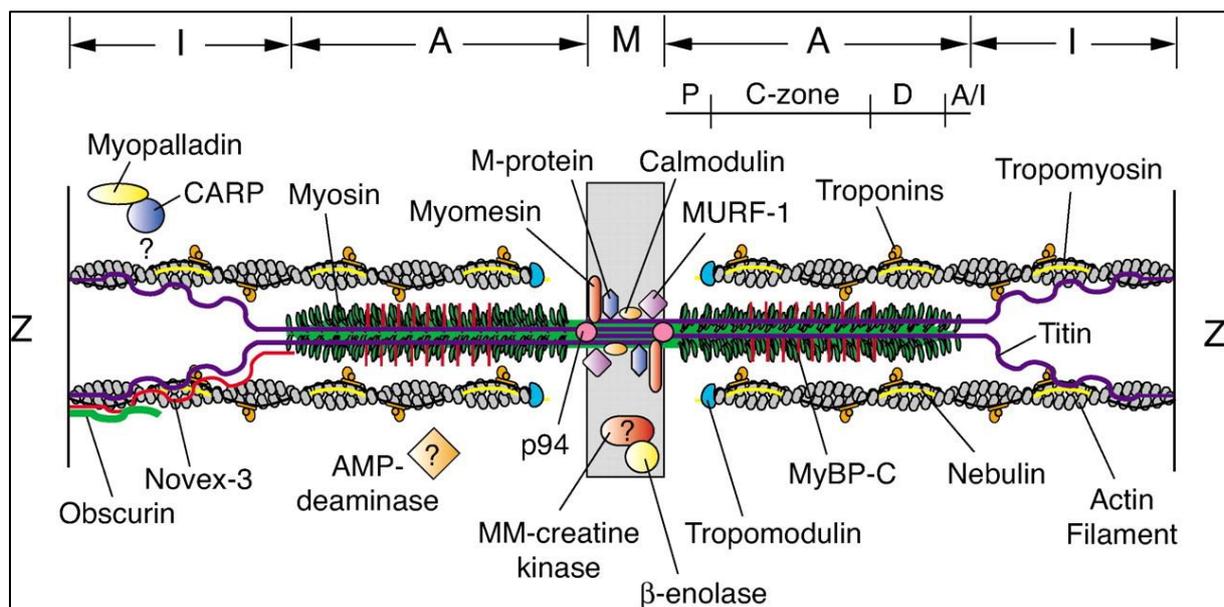
Les cellules satellites<sup>9</sup> sont des cellules mononucléées situées en périphérie des fibres musculaires, dans l'espace délimité par l'endomysium et le sarcolemme. Les cellules satellites sont des cellules souches bloquées à un stade précoce de la myogénèse et entrées en état de quiescence au cours du développement embryonnaire. Elles permettent la croissance et l'hypertrophie musculaire en maintenant le rapport entre les unités de transcription (noyaux ajoutés au fur et à mesure) et le volume des fibres. Leur second rôle est la régénération des fibres musculaire lésées. Les cellules satellites s'activent, prolifèrent, se différencient et fusionnent alors pour reconstituer de nouvelles fibres.



**Figure 1. Structure du muscle strié squelettique.** **A.** Le tissu musculaire est constitué par la juxtaposition de fibres musculaires entourées de tissu conjonctif. **B.** Une fibre musculaire est un assemblage de myofibrilles qui représentent l'appareil contractile, d'un système de transduction de l'influx nerveux jusqu'à la myofibrille - les triades - formées par 1 tubules en T et 2 citernes terminales du réticulum sarcoplasmique et de mitochondries fournissant l'ATP nécessaires à la contraction musculaire. D'après Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014"

### 3.1.3. Les myofibrilles

Les myofibrilles représentent l'appareil contractile de la fibre musculaire. Elles occupent la presque totalité du volume cellulaire. Elles sont constituées d'une succession d'unités structurales et contractiles, les sarcomères. Le sarcomère est la partie d'une myofibrille délimitée par deux stries Z. Il s'agit d'une structure très organisée, composée des protéines responsables de la contraction et de protéines responsables de la structure, de l'intégrité et de l'élasticité du système (Figure 2).



**Figure 2. Structure du sarcomère.** Les filaments fins d'actine s'ancrent au niveau des stries Z. Les filaments épais sont constitués par l'assemblage de molécule myosine et se fixent au niveau de la ligne M. Les filaments de titine, élastiques, s'étendent de la ligne M à la strie Z. d'après Annual Review of Cell and Developmental Biology Volume 18, 2002 Clark, pp 637-706

Quatre types de filaments constituent le sarcomère :

- Les filaments fins d' $\alpha$ -actine : accrochés aux stries Z, ils couvrent la bande I jusqu'à la bande A où ils se connectent aux filaments épais. Ils sont formés par l'assemblage d'un

monomère d'  $\alpha$ -actine. Ils portent des protéines associées impliquées dans la contraction musculaire (tropomyosine, troponine) ou la régulation de la stabilité du filament d'actine (CapZ, tropomoduline,  $\alpha$ -actinine)

- Les filaments épais de myosine : Ils constituent la bande A et sont fixés à la strie M, au milieu du sarcomère. Ils sont formés par l'assemblage de plusieurs molécules de myosine qui est constituée de chaînes lourdes (MHC) et légère (MLC). La tête de la MHC est le moteur de la contraction musculaire. En présence de calcium, libéré par le sarcoplasme, elle lie le filament d'actine au niveau de sites découverts par le déplacement de la tropomyosine sous l'action de la troponine et pivote lors de l'hydrolyse de l'ATP permettant le raccourcissement du sarcomère. La tête de la MHC porte les MLC qui régulent son activité ATPasique
- Les filaments de titine : La titine est une protéine géante dont le domaine N-terminal est relié à la strie Z et le domaine C-terminal à la strie M. Les molécules de titines jouent le rôle d'« amortisseurs » et d'« échafaudage » du sarcomère en permettant de maintenir les filaments épais de myosine au centre du sarcomère après sa contraction ou son étirement
- Les filaments de nébuline : Ils sont partiellement insérés dans les stries Z via leur domaine C-terminal et recouvrent le filament fin d'actine jusqu'au début de la bande A. La nébuline possède un large éventail de fonctions. En plus de déterminer la longueur des filaments fins d'actine et leur positionnement dans la strie Z en coopération avec la protéine Cap-Z, elle optimise également l'efficacité de la contraction musculaire

### 3.2. Fonctions du muscle strié squelettique

Le muscle strié squelettique assure une fonction motrice et métabolique. La contraction musculaire permet la mise en mouvement de l'appareil locomoteur et le maintien de la posture. Les muscles permettent aussi des fonctions vitales comme la respiration et la mastication. Le muscle squelettique joue aussi un important rôle dans le métabolisme de l'organisme. Il assure la dégradation oxydative de nutriments au cours de l'activité physique. Il constitue le principal réservoir d'acides aminés de l'organisme qu'il libère en situation catabolique. Enfin, il participe à la thermorégulation de l'organisme par la production de chaleur au cours des frissons.

### 3.3. Hétérogénéité des fibres musculaires

Les fibres musculaires ne sont pas identiques car elles sont constituées d'isoformes spécifiques qui confèrent des propriétés métaboliques et contractiles différentes<sup>10</sup>. Les fibres de type I, lentes oxydatives, sont caractérisées par une faible vitesse d'hydrolyse de l'ATP. Leurs myofibrilles contiennent des isoformes lents des chaînes lourdes (MHC-I) et légères de myosine. Elles produisent leur ATP principalement par phosphorylation oxydative. Elles sont recrutées dès les faibles efforts musculaires. Les fibres de type IIb, rapides glycolytiques, sont caractérisées par une vitesse rapide d'hydrolyse de l'ATP. Leurs myofibrilles contiennent des isoformes rapides des chaînes lourdes (MHC-IIb) et légère de myosine. Elles produisent leur ATP principalement par phosphorylation de l'ADP par les créatines phospho kinases à partir de la phospho-creatine et de la glycolyse anaérobie. Elles sont recrutées pour des efforts musculaires importants ou impulsifs. Elles sont exprimées chez les rongeurs mais ne sont pas exprimées chez l'homme. Les fibres de type IIA possèdent les caractéristiques mécaniques des fibres rapides (vitesse de contraction et de relaxation rapide) mais sont plus résistantes à la fatigue. Elles expriment l'isoforme Iia de la MHC. Les fibres de type Iix possèdent les caractéristiques mécaniques et une résistance à la fatigue intermédiaire entre les fibres IIA et IIB. Elles expriment l'isoforme Iix de la MHC. Les fibres lentes à métabolisme oxydatif (type I) sont prépondérantes dans les muscles de posture et le diaphragme et les fibres rapides à métabolisme glycolytique (type IIB ou IIX) sont majoritaires dans les muscles d'action.

### 3.4. Plasticité du muscle

Une autre particularité du muscle squelettique réside dans son extrême plasticité puisqu'il est capable de s'adapter aux besoins de l'organisme en s'atrophiant, par exemple au cours d'une immobilité prolongée, ou en s'hypertrophiant sous l'effet de l'exercice. De plus, le muscle squelettique modifie son type métabolique et contractile au cours de l'atrophie musculaire et c'est donc une partie importante du protéome qui est modifié aussi bien quantitativement que qualitativement. Ces modifications sont réalisées tout en maintenant l'activité contractile fonctionnelle, ce qui implique une parfaite coordination des processus d'atrophie ou d'hypertrophie.

L'atrophie musculaire est un phénomène adaptatif qui apparaît au cours de nombreuses situations pathologiques (cancer, sepsis, etc.) - elle prend alors le nom de cachexie - ou physiologiques (vieillesse, alitement, immobilisation, etc.) – elle prend alors le nom de

sarcopénie. Par exemple, l'atrophie musculaire va permettre de réduire les besoins énergétiques de l'organisme au cours d'une inactivité prolongée. Les protéines myofibrillaires du muscle constituent aussi une réserve mobilisable d'acides aminés. La protéolyse permet ainsi de fournir les acides aminés nécessaires à la néoglucogenèse, à la synthèse des protéines de l'inflammation par le foie ou à la synthèse des protéines constitutives des organes vitaux (cœur et cerveau).

Lorsque que la situation catabolique perdure, le phénomène adaptatif est dépassé et la perte de masse musculaire devient délétère<sup>11</sup>. En effet, la perte de muscle squelettique va être responsable d'une diminution de la force et de l'endurance, d'un insulino-résistance par défaut d'utilisation du glucose et d'une baisse des défenses immunitaires lorsque les réserves en acides aminés sont épuisées. La faiblesse musculaire fait partie intégrante du syndrome de fragilité<sup>12</sup> et s'associe sur un plan clinique une augmentation de la mortalité, de la morbidité (chute/fracture, accidents cardiovasculaires) indépendamment de la pathologie causale<sup>13</sup>. Elle contribue aussi à la perte d'autonomie et à la dépendance du patient et plus généralement à l'altération de sa qualité de vie<sup>14,15</sup>.

#### **4. Métabolisme musculaire**

##### 4.1. Métabolisme protidique

###### 4.1.1. Balance protéolyse/protéosynthèse

Dans les fibres musculaires, les protéines présentes dans le noyau, le cytosol et les organelles sont continuellement dégradées et remplacées par la synthèse de nouvelles protéines. De plus, la perte de protéine affecte de façon équivalente les différents compartiments cellulaires<sup>16</sup>. Le taux de renouvellement des protéines varie largement, de quelques minutes pour certaines enzymes ou protéines de signalisation à plusieurs jours pour certaines protéines de l'appareil contractile comme l' $\alpha$ -actine ou la MHC<sup>17</sup>. En cas d'atrophie musculaire il existe un déséquilibre de la balance entre la protéosynthèse et la protéolyse en faveur de cette dernière qui aboutit à une diminution du contenu en protéines de la fibre musculaire. L'insuffisance rénale induit une diminution de la protéosynthèse. La vitesse d'incorporation de phénylalanine du muscle *Tibialis anterior* est ainsi diminuée de 35 % chez des rats ayant subi une néphrectomie partielle, en comparaison aux rats contrôle<sup>18</sup>. L'étude de biopsies musculaires sérielles chez des patients perfusés par de la leucine marquée permet de retrouver une diminution de 27 % de la protéosynthèse globale. La diminution de la synthèse des protéines

concerne aussi bien les protéines cytosoliques, myofibrillaires et mitochondriales, et elle est d'autant plus importante que la fonction rénale est altérée<sup>19</sup>. Globalement, la protéosynthèse est fréquemment diminuée au cours de nombreuses situations cataboliques. Néanmoins, l'inhibition de la protéosynthèse ne permet pas d'expliquer la diminution rapide du contenu cellulaire en protéines myofibrillaires dont la vitesse de renouvellement est lente. De plus, cette diminution entraîne une perte d'influence de la synthèse sur l'homéostasie cellulaire<sup>20</sup>. En effet, si la protéosynthèse est diminuée ses variations n'auront que peu d'impact sur le contrôle de la masse musculaire. Il est donc admis que l'augmentation de la protéolyse musculaire a un rôle prépondérant au cours de l'atrophie musculaire et elle a été observée dans la quasi-totalité des situations cataboliques étudiées (cancer<sup>21</sup>, sepsis<sup>22</sup>, immobilisation<sup>23</sup>, bronchopneumopathie chronique obstructive<sup>24</sup>, etc). Concernant l'insuffisance rénale, chez des rats néphrectomisés, la vitesse de libération de tyrosine (un index de la protéolyse) par le muscle *Tibialis anterior* est augmentée de près de 60 % par rapport aux rats contrôles<sup>18</sup>. Chez l'homme, l'insuffisance rénale mais aussi son traitement par hémodialyse induisent une augmentation de la protéolyse musculaire qui peut être quantifiée par la vitesse de libération d'un acide aminé (leucine ou phenylalanine) calculée à partir de prélèvements de sang artériel et veineux<sup>25</sup>.

#### 4.1.2. Systèmes protéolytiques

Comme toute cellule, la fibre musculaire dispose de différents systèmes enzymatiques pour assurer la dégradation des protéines. Les systèmes ubiquitine-protéasome (UPS) et l'autophagie sont les plus importants au cours de l'atrophie musculaire

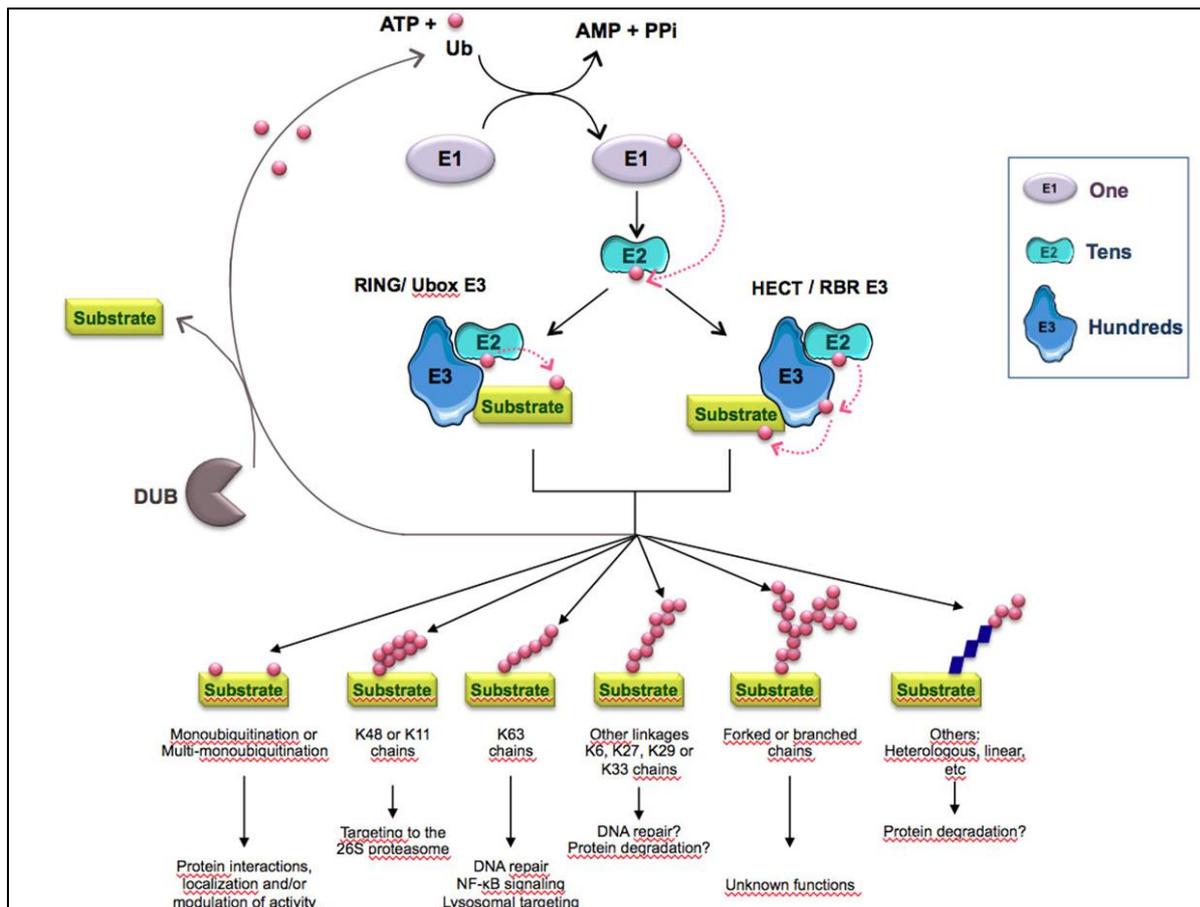
##### 4.1.2.1. Le système ubiquitine-protéasome (UPS)

###### 4.1.2.1.1. Fonctionnement

Dans le muscle squelettique, le système protéolytique UPS est nécessaire pour dégrader les protéines sarcomériques<sup>26</sup>. La dégradation des protéines par l'UPS comprend deux étapes : le marquage des substrats par ubiquitination et leur dégradation par le protéasome 26S.

L'ubiquitination des protéines (Figure 3) est réalisée par une cascade enzymatique : E1 (enzyme d'activation de l'ubiquitine, 2 isoformes), E2 (enzymes de conjugaison de l'ubiquitine, 40 chez l'homme) et E3 (improprement appelées ligases de l'ubiquitine, > 700)<sup>27</sup>. E1 catalyse la formation d'une liaison thioester entre le résidu glycine C terminal de l'ubiquitine et la

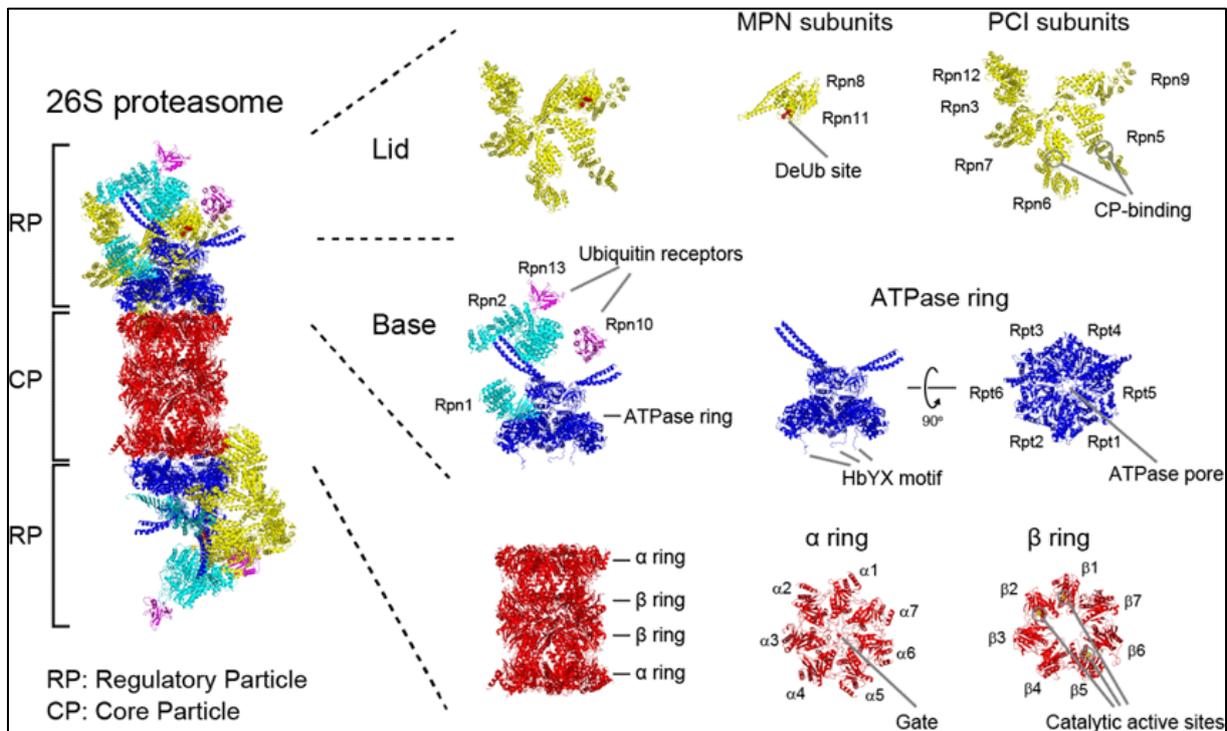
fonction thiol d'un de ses résidus cystéine en utilisant l'énergie de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP (adénosine triphosphate). L'ubiquitine activée est ensuite transacylée vers le résidu cystéine du site catalytique d'une enzyme E2. Certaines enzymes E2 peuvent fixer directement l'ubiquitine sur le substrat, généralement en coopération avec une enzyme E3. D'autres E2 transfèrent l'ubiquitine à une enzyme E3 qui la transfère ensuite sur le substrat. Il existe plusieurs centaines d'enzymes E3. Elles sont responsables de la spécificité de reconnaissance du substrat. Les E3 à domaine HECT (Homologous to E6-AP C terminus) possèdent un résidu cystéine sur lequel est transférée l'ubiquitine activée avant d'être fixée sur la protéine cible. Les E3 à domaines RING (Really INteresting New Genes) Finger sont les plus nombreuses et ne possèdent aucune activité catalytique. Elles sont subdivisées en 2 groupes : le groupe des RING Finger E3 monomériques et le groupe des RING Finger E3 multimériques. Elles lient simultanément en deux sites différents une enzyme E2 et la protéine à dégrader portant ainsi à proximité le site catalytique de l'E2 et le substrat. Il existe de nombreux mécanismes de contrôle posttranscriptionnel de l'activité des E3 comme la phosphorylation ou la liaison covalente de protéines de la famille UBL (ubiquitin like protein), la compétition entre substrats, la liaison de pseudo-substrats, de co-substrats ou d'activateurs allostériques<sup>28</sup>. Les protéines ubiquitinées peuvent être modifiées par la fixation soit d'une seule molécule d'ubiquitine (monoubiquitination) soit d'une chaîne de polyubiquitine dans laquelle plusieurs molécules d'ubiquitine sont reliées les unes aux autres par liaison isopeptidique entre un résidu lysine de l'ubiquitine déjà fixée à la protéine et le résidu glycine C terminal de l'ubiquitine suivante. En fonction du résidu lysine engagé dans la liaison on distingue plusieurs types de chaînes d'ubiquitine ayant chacune des rôles propres (Figure 3)<sup>29</sup>. Le ciblage des protéines en vue de leur dégradation par le protéasome 26S est principalement assuré par les chaînes de polyubiquitine reliées en lysine 48 (K48) et lysine 11 (K11). Certaines des protéines marquées par des chaînes reliées en lysine 63 (K63) seront destinées à être dégradées par le système lysosomal.



**Figure 3. Mécanismes de l'ubiquitination.** Trois enzymes (E1, E2 et E3) interviennent dans la fixation de molécules d'ubiquitine sur la protéine substrat. Le ciblage en vue de la dégradation par le protéasome 26S est assurée par la fixation d'une chaîne de polyubiquitine (au moins 4 ubiquitines reliées en Lysine 48 ou 11). D'après Polge C. et al, Nutr Metab Cardiovasc Dis, 23 Suppl 1:S1-5.2013.

Le protéasome 26S peut être subdivisé en une partie centrale siège de l'activité protéasique (protéasome 20S) portant à ces deux extrémités un complexe régulateur 19S<sup>30</sup> (Figure 4). Le protéasome 20S est un complexe multimérique en forme de cylindre formé par l'empilement de quatre anneaux : deux anneaux internes formés chacun de sept sous unités  $\beta$  différentes et deux anneaux externes formés chacun de sept sous unités  $\alpha$  différentes (structure  $\alpha 7\beta 7\beta 7\alpha 7$ ). Les quatre anneaux délimitent trois chambres communicantes, l'activité protéolytique siègeant exclusivement dans la chambre centrale. Les extrémités N-terminales des sous unités  $\alpha$  forment un pore dont l'ouverture ou la fermeture autorise ou prévient le passage des substrats du protéasome. Les sites catalytiques sont situés au niveau des résidus thréonine des extrémités N-terminales des sous unités  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 5$ . Chacune possède une activité protéolytique différente :  $\beta 1$  est responsable de l'activité *caspase-like*,  $\beta 2$  de l'activité *trypsin-like*,  $\beta 5$  de l'activité *chymotrypsin-like*. La dégradation des protéines par le protéasome aboutit à la formation

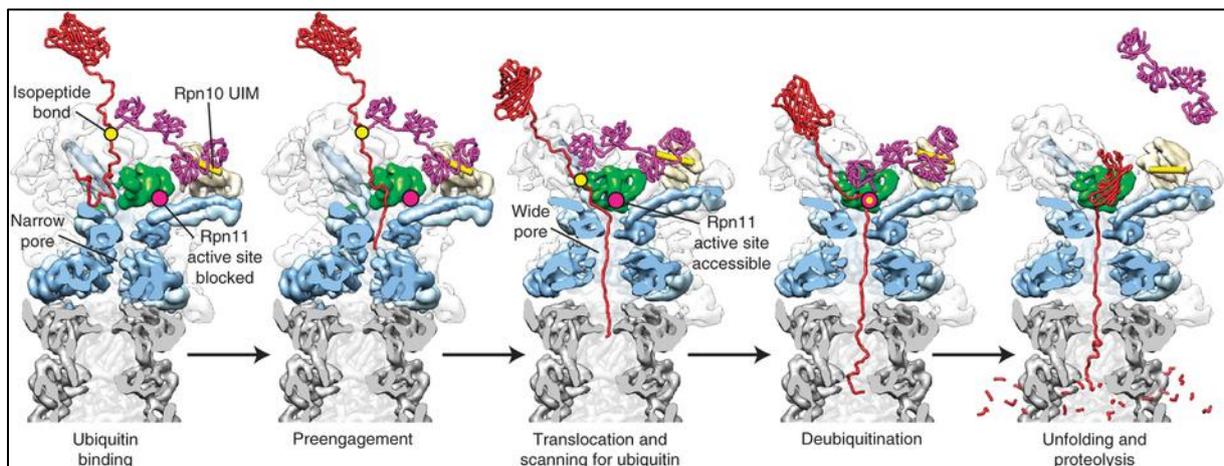
d'oligopeptides de 2 à 35 acides aminés libérés dans le cytoplasme où ils sont clivés en acides aminés par l'action successive de peptidases comme la tripeptidylpeptidase-2 et d'exopeptidases.



**Figure 4. Structure du protéasome 26S.** Le protéasome 26S est constitué d'une partie centrale, le protéasome 20S (*Core Particle*), siège de l'activité protéasique. Les extrémités du protéasome 20S sont recouvertes d'un complexe régulateur 19S (*Regulatory particle*) subdivisé en un couvercle (*Lid*), portant les récepteurs des chaînes de polyubiquitine et les déubiquitinases, et une base (*Base*) dont les ATPases contrôlent l'ouverture du pore et assurent le dépliement et la translocation du substrat dans le protéasome 20S. D'après <http://www.igakuken.or.jp/pro-meta/eng/research/index.html>.

Le complexe régulateur 19S est composé de dix-huit sous unités. Il se lie à l'une ou les deux extrémités du protéasome 20S. Il peut être divisé en deux sous-complexes la base et le couvercle. La base est composée de six sous unités ATPasiques et trois sous unités non ATPasiques. Le couvercle est relié à la base par l'intermédiaire de la sous unité Rpn10/PSMD4 (S5a dans la nomenclature de Dubiel et al<sup>31</sup>) et est composé de douze sous unités. Le complexe 19S assure la reconnaissance des substrats grâce aux sous unité Rpn10/PSMD4 et Rpn13/ADRM1. Trois déubiquitinases (Rpn11/PSMD14, Uch37 et USP14) sont associées au complexe 19S et permettent la déubiquitination des substrats du protéasome. La déubiquitination est nécessaire à l'introduction des substrats dans le protéasome 20S et permet le recyclage de l'ubiquitine. Les sous-unités ATPasiques sont impliquées dans l'association

avec le protéasome 20S, l'ouverture du pore, le dépliement des substrats et leur translocation dans le protéasome 20S (Figure 5).



**Figure 5. Fonctionnement du protéasome 26S.** La protéine substrat est captée par le protéasome 26S grâce à la liaison de sa chaîne de polyubiquitine sur ses récepteur Rpn10 et Rpn13 (non représenté ici). Il s'en suit une activation des ATPases de la base dont le changement de conformation déclenche l'ouverture du pore, le dépliement et la translocation de la protéine dans la chambre catalytique. La chaîne de polyubiquitine est clivée par la déubiquitineuse Rpn11 puis recyclée en monomères d'ubiquitine par les déubiquitineuses Uch37 et USP14. La protéine est alors clivée en peptides secondairement libérés avant d'être dégradés en acides aminés par des peptidases. D'après <http://mcb.berkeley.edu/labs/martin/research.php>

#### 4.1.2.1.2. Rôle de l'UPS au cours de l'atrophie musculaire

- UPS et protéolyse myofibrillaire

L'UPS représente le principal système protéolytique impliqué dans les situations d'atrophie musculaire. La déplétion en ATP (adénosine triphosphate) ou l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques du protéasome limitent l'augmentation de la protéolyse (et en particulier la protéolyse myofibrillaire) observée dans les modèles d'atrophie musculaire chez les rongeurs induite par l'insuffisance rénale<sup>32</sup>, le cancer<sup>33</sup>, le sepsis<sup>34,35</sup>, le diabète<sup>36</sup>, la dénervation<sup>35</sup> et l'hyperthyroïdie<sup>35</sup>. Chez l'homme, on retrouve une augmentation des activités *chymotrypsin* et *trypsin-like* au cours du cancer<sup>37</sup> et de la broncho-pneumopathie chronique obstructive<sup>38</sup>. Cependant, il faut préciser que du fait de sa taille (15 x 11 nm), le protéasome 26S ne peut pas accéder aux protéines polyubiquitinées faisant partie de complexes protéiques ou appartenant à des organelles cellulaires. C'est le cas notamment de la structure contractile du muscle squelettique où l'espace disponible est compris entre 10 et 50 nm. Le mécanisme permettant aux protéines contractiles d'être acheminées au protéasome est actuellement inconnu. Par

contre, au niveau du réticulum endoplasmique<sup>39</sup> et des mitochondries<sup>40</sup> la protéine p97/VCP (Valosin Containing Protein) assure l'extraction des protéines à dégrader<sup>41</sup> pour les rendre accessibles au protéasome 26S. La présence de cette protéine a été mise en évidence dans le sarcomère mais son rôle dans la dégradation des protéines myofibrillaires par le protéasome reste à démontrer. Une autre hypothèse défendue par plusieurs travaux de l'équipe du Pr Mitch (Baylor College of Medicine Houston) est qu'il existe une activation précoce de la caspase 3 qui amorcerait la dégradation de l' $\alpha$ -actine en petits fragments de 14 et 27 kDa<sup>42,43</sup>. La surexpression de la protéine XIAP un inhibiteur endogène de la caspase 3 protège partiellement de l'atrophie musculaire<sup>44</sup>. L'inflammation par le biais de l'Il6 et du facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription-3) permettrait d'expliquer en partie l'activation de la caspase 3<sup>45</sup>. On peut noter qu'il existe effectivement une augmentation de l'expression de la caspase 3 dans le muscle de patients hémodialysés<sup>46</sup>. Libérées dans le cytoplasme ces fragments seraient ensuite polyubiquitinés par MuRF1 puis dégradées par le protéasome 26S. Cependant il n'est pas clairement démontré que ce mécanisme soit présent dans l'ensemble des fibres musculaires au cours d'une atrophie ou s'il est seulement présent dans les fibres en apoptose dont le nombre augmente au cours de différentes situations d'atrophie musculaire<sup>47,48</sup>

- Surexpression des protéines de l'UPS dans l'atrophie musculaire

La plupart des études effectuées sont généralement limitées à la mesure de l'expression de différentes protéines de l'UPS, qu'elles soient catalytiques (protéasome) ou non (ubiquitine). Ces études ont permis d'établir le concept d'atrogènes (*atrophy related genes*), non limité à l'UPS, qui regroupe les gènes systématiquement surexprimés en cas d'atrophie musculaire<sup>49,50</sup>. Cette liste est bien sûr incrémentée au fur et mesure des données de la littérature et elle est sans doute largement incomplète. La principale difficulté pour établir un « atrogène » réside sans doute dans l'hétérogénéité des modèles étudiés et cela concerne en particulier l'intensité du stimulus catabolique, le « timing » des mesures effectuées et la résilience de l'atrogène au cours du processus d'atrophie.

- Ubiquitine

L'ubiquitine fait partie des gènes dont l'expression augmente en situation d'atrophie musculaire<sup>49</sup>. Chez l'homme, on observe également une élévation du taux d'ARNm de l'ubiquitine sur des biopsies réalisées chez des patient opérés d'un cancer<sup>51,52</sup> ou souffrant de

sepsis<sup>53</sup> et une accumulation de conjugués polyubiquitinés est retrouvé en cas d'alitement prolongé<sup>54</sup>.

- Enzymes E2

Pour ce qui est des enzymes E2, l'enzyme UBE2B est aussi considérée comme un atrogène car l'expression de ses ARNm est augmentée dans de nombreux modèles d'atrophie musculaire notamment au cours du cancer, du sepsis, de brûlure, de traitement aux glucocorticoïdes, ...<sup>55</sup>. Chez l'homme on retrouve l'élévation d'UBE2B dans les suites d'un traumatisme crânien grave<sup>56</sup> ou en cas de cancer avec perte de poids<sup>57</sup>. En revanche, pour d'autres enzymes E2 comme UBE2D3 et UBE2N, leur expression est diminuée en cas d'immobilisation prolongée<sup>58</sup>.

- Enzymes E3

Au début des années 2000, l'étude de l'expression différentielle des gènes chez des rongeurs soumis à un jeûne, une apesanteur simulée, un traitement glucocorticoïdes ou une immobilisation a permis d'identifier deux enzymes E3 spécifiques du muscle dont l'expression était fortement augmentée: MuRF1 (Muscle Ring Finger-1) et MAFbx (Muscle Atrophy F-box)<sup>59</sup>. Une augmentation des ARNm de MuRF1 et MAFbx a par la suite été confirmée dans de nombreux modèles d'atrophie musculaire chez des rongeurs (insuffisance rénale, cancer, sepsis, diabète, apesanteur simulée, administration de dexaméthasone et dénervation)<sup>49</sup>. L'atrophie musculaire induite par l'immobilisation est réduite chez les souris KO pour MAFbx ou MuRF1<sup>59</sup>. L'administration de curcumine dans un modèle de cancer colique chez la souris réduit l'expression de MAFbx et MuRF1 et la fonte musculaire<sup>60</sup>. Les études conduites chez l'homme sont plus rares et apportent des résultats discordant. Alors que certaines retrouvent une élévation des transcrits de MAFbx et MuRF1 (immobilisation<sup>61</sup>, broncho-pneumopathies chroniques obstructives<sup>62</sup> ou cancer<sup>63</sup>) d'autres (cancer<sup>64-67</sup>) ne retrouvent pas de différence. Les substrats/cibles de MAFbx et de MuRF1 sont partiellement connus. MuRF1 intervient directement dans la dégradation des protéines myofibrillaires en provoquant l'ubiquitination de l' $\alpha$ -actine<sup>63</sup>, des chaînes lourdes et légères de myosine<sup>68</sup>, de la troponine I<sup>69</sup> et de la téléthonine<sup>70</sup>. MuRF1 aurait également un rôle dans la régulation du métabolisme glucidique<sup>71</sup> et l'inhibition de la protéosynthèse<sup>72</sup>. MAFbx assure l'ubiquitination de facteurs de transcription impliqués dans le développement musculaire, myoD<sup>73</sup> et la myogénine<sup>74</sup> et du facteur d'initiation de la traduction eIF3-f<sup>75</sup>. Elle pourrait également cibler des protéines myofibrillaires comme la desmine et la vimentine<sup>76</sup>. Bien que moins décrites que MuRF1 et

MAFbx, d'autre E3, étudiées plus récemment, seraient également impliquées dans la survenue d'une atrophie musculaire : Fbxo30/MUSA1 (F-box protein 30/muscle ubiquitin ligase of the SCF complex in atrophy-1)<sup>77</sup>, TRAF6 (TNF receptor associated factor-6)<sup>78</sup>, M/Hdm2(Mouse/Human double minute-2)<sup>79</sup>, et Nedd4 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4)<sup>80</sup>. L'équipe du Pr Goldberg (Harvard Medical School) a supposé que l'E3 Trim32 (Tripartite motif-containing protein 32) pourrait être impliquée dans la survenue d'une atrophie musculaire<sup>81</sup>, mais selon d'autres travaux, elle serait plutôt impliquée dans les phénomènes de régénération<sup>82</sup>.

- Sous unités du protéasome 20S

L'activation de l'UPS s'accompagne aussi de la synthèse des sous-unités constitutives du protéasome. Dans plusieurs modèles d'atrophie musculaire chez les rongeurs on observe une augmentation des ARNm de sous unités du protéasome (insuffisance rénale<sup>83</sup>, cancer<sup>84</sup>, injection de dexaméthasone<sup>85</sup>, apesanteur simulée<sup>16</sup>, jeûne et dénervation<sup>86</sup>). Une augmentation des ARNm des sous unités du protéasome 20S est présente dans le muscle des patients atteints de cancer<sup>51,57</sup>, chez des patients victimes de traumatisme crânien grave<sup>56</sup> et au cours de sepsis<sup>53</sup>. Il faut noter que l'augmentation de l'expression des sous unités du protéasome en cas de cancer est corrélée à l'importance de la perte de poids précédant la biopsie musculaire<sup>37</sup>. Ainsi les études conduites en cas de perte de poids < 10 % ne retrouvent pas de variation d'expression des sous-unités du protéasome<sup>87</sup>. La difficulté à retrouver chez l'homme la surexpression de certains atrogenes pourrait d'ailleurs s'expliquer par le fait que chez l'homme les processus cataboliques sont généralement moins intenses et/ou se déroulent sur des périodes plus longues.

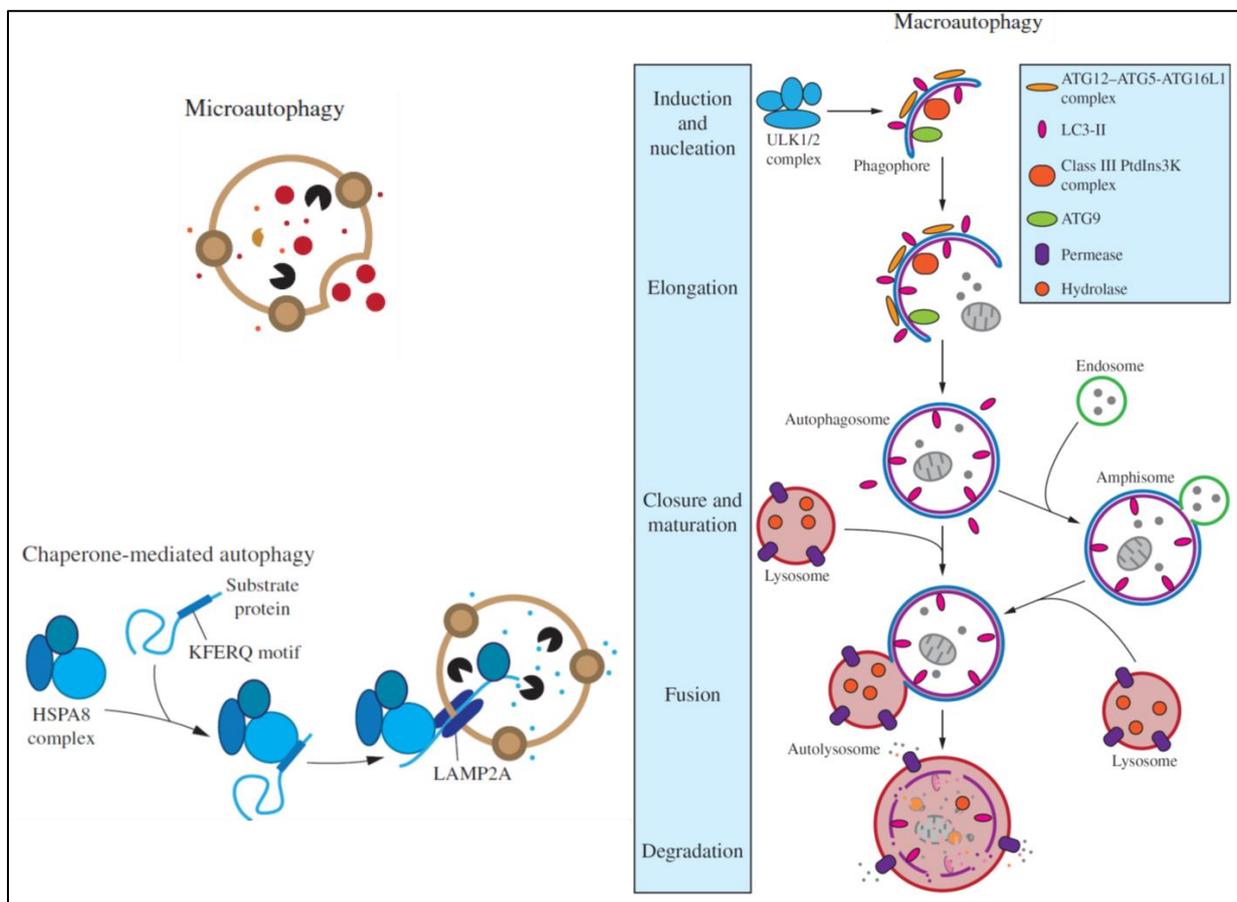
#### 4.1.2.2. Autophagie

##### 4.1.2.2.1. Fonctionnement

L'autophagie est un processus cellulaire de dégradation et de recyclage de macromolécules ou d'organites intracellulaires, utilisant des organelles, les lysosomes. Ces derniers sont des vésicules de 0.2 à 0.5 microns présentes dans le cytosol des cellules eucaryotes. Les lysosomes contiennent de nombreuses hydrolases acides. La protéolyse lysosomale est assurée par des protéases de type endopeptidase et exopeptidase. Deux types d'endopeptidase existent dans les lysosomes : les cystéines (cathepsines B, H et L) et les aspartyl-protéinases (cathepsine D). Elles sont actives dans l'environnement acide (pH 4-5) des lysosomes mais certaines conservent

une activité catalytique à pH neutre. Parmi les exopeptidases, on peut citer les cathepsines A et B (carboxypeptidases) et les cathepsines H et C (aminopeptidases).

Trois voies différentes ont été décrites chez les mammifères pour l'acheminement des substrats à dégrader par les lysosomes : la macroautophagie, la microautophagie, et l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (figure 6). La microautophagie résulte de l'invagination de la membrane du lysosome sur des portions de cytoplasme. Plusieurs types de mécanismes peuvent être mis en jeu au cours de la microautophagie<sup>88</sup>. Bien qu'il soit encore incertain si ce mode de dégradation a lieu dans le muscle squelettique, des données indiquent que la microphagie peut participer à l'internalisation du glycogène lorsque la macroautophagie est bloquée<sup>89</sup>.



**Figure 6. Les trois types d'autophagie.** La microautophagie implique la capture des substrats par invagination de la membrane lysosomale. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes repose sur la reconnaissance des protéines altérées par le complexe Hsc70/HSPA8. Il permet l'adressage au lysosome via son interaction à la protéine LAMP2a dont la polymérisation forme un canal permettant l'internalisation du substrat. La macroautophagie repose sur la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, qui vient englober les substrats à dégrader. La fusion de la membrane externe avec les lysosomes forment

un autophagolysosome dont le contenu est dégradé par les enzymes lysosomales. D'après Parzych K.R. et al *Antioxid Redox Signal*, 20(3):460-73, 2014.

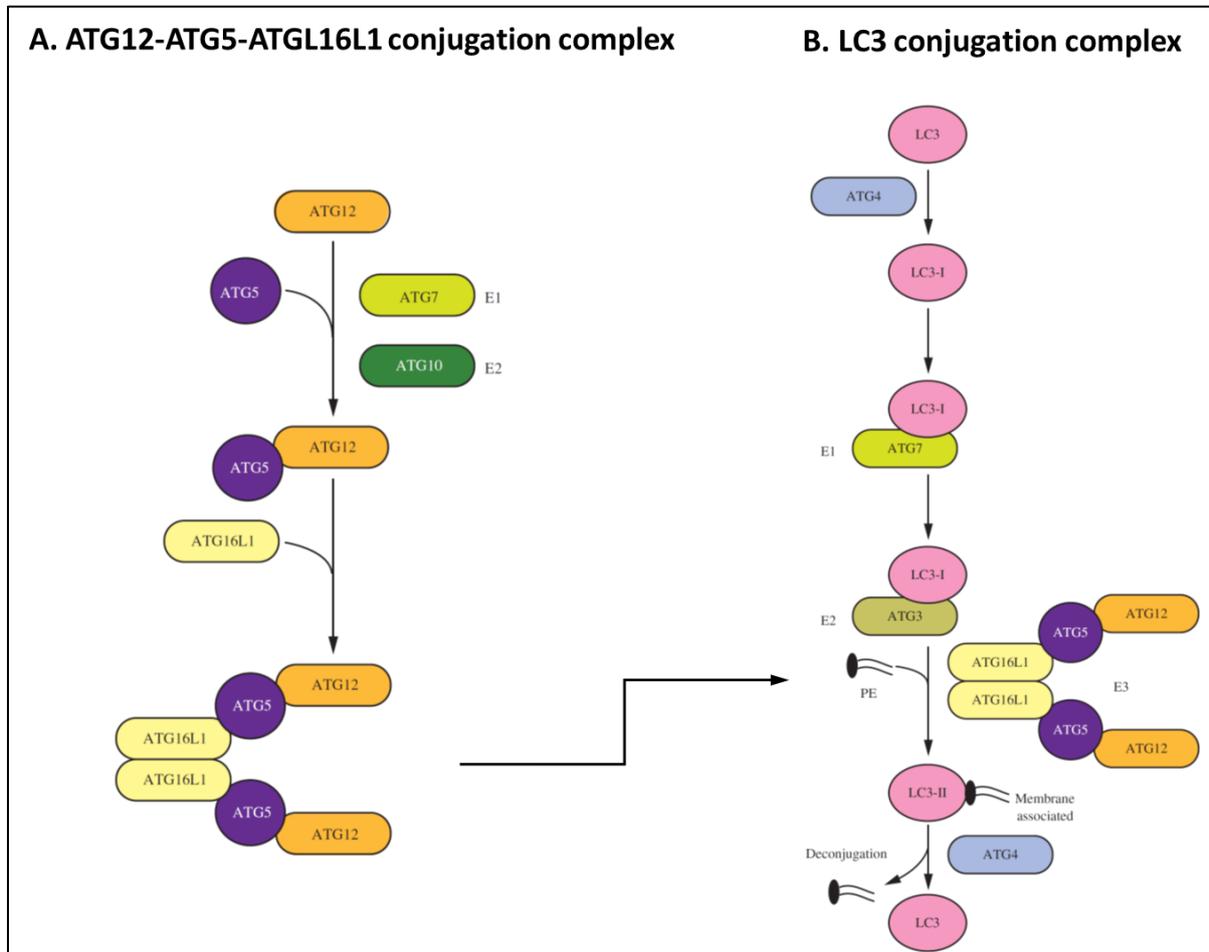
L'autophagie médiée par la protéine chaperonne Hsc70/HSPA8 permet l'élimination de protéines altérées par différents agents, tels les radicaux libres oxygénés (ROS), qui exposent alors une séquence spécifique d'acide aminé (le motif KFERQ)<sup>90</sup>. Cette séquence est reconnue par la protéine chaperonne Hsc70/HSPA8 associée à d'autres protéine cochaperonnes. Hsc70 assure alors l'acheminement de la protéine à dégrader vers le lysosome. Le stress du réticulum endoplasmique est capable d'activer l'autophagie médiée par les chaperonne via la voie p38/MAPK<sup>91</sup>.

La macroautophagie se distingue par la formation d'une vésicule appelée autophagosome qui englobe les substrats à dégrader et les délivre au lysosome par fusion membranaire<sup>92</sup>. Chez les mammifères l'initiation de la macroautophagie implique un complexe formé des protéines ULK1/2 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1 et 2) homologues de Atg1 (Autophagy related gene1) de la levure, ATG13 (homologue de Atg13), RB1CC1/FIP200 (RB1-inducible coiled-coil protein 1/FAK family-interacting protein of 200 kDa) homologue de Atg17 et C12orf44/ATG101 (Chromosome 12 open reading frame 44/Autophagy related gene 101)<sup>93</sup>. Ce complexe est à l'état basal désactivé par phosphorylation par le complexe mTORC1 (Mammalian target of rapamycin complex-1). En cas d'inactivation de mTORC1, (par exemple : déplétion en nutriments, en ATP, stress du réticulum endoplasmique, insulinoresistance...) le complexe est activé par déphosphorylation, entraînant ainsi une augmentation de la macroautophagie. A l'opposé, une hyperactivation de la voie Akt/mTOR observée dans certaines dystrophies congénitales entraîne une inhibition, également délétère de l'autophagie<sup>94</sup>. Des études récentes laissent aussi supposer une activation de la kinase inductrice de l'autophagie Ulk1 qui est directement phosphorylée par l'AMPK (AMP activated protein kinase)<sup>95</sup>. La kinase ULK1 peut alors phosphoryler et activer BECN1 (Beclin-1). BECN1 vient alors s'associer aux protéines ATG14, PI3C3 et PI3R4 pour former le complexe de la PI3 kinase ou complexe de nucléation qui génère du PIP3 (Phosphatidyl-inositol 1,4,5-triphosphate) au sein de structures membranaires du réticulum endoplasmique appelées omégasomes. Le PIP3 constitue un point d'ancrage pour des protéines ayant un domaine de liaison spécifique au PIP3. L'étape suivante est l'élongation de l'omégasome qui prend alors le nom de phagophore ou membrane d'élongation, elle aboutit à sa fermeture et le phagophore devient l'autophagosome. Cette élongation et la sélection de protéines à dégrader impliquent deux systèmes de

conjugaison des protéines dont le fonctionnement est comparable au système d'ubiquitination des protéines<sup>96</sup> et qui va aboutir à la conjugaison de la protéine LC3 à la phosphatidyl ethanolamine (figure 7). Le premier fait intervenir les protéines ATG12 (Ub-like), ATG5, ATG7 (E1 like), ATG10 (E2 like) et ATG16L1. Le second système de conjugaison fait intervenir les protéines LC3 (Microtubule associated protein 1 light chain 3), ATG4, ATG7, ATG3 et le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (E3 like). L'autophagosome va ensuite fusionner avec la membrane du lysosome à travers l'action de plusieurs protéines comprenant les protéines SNAREs (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) et UVRAG (UV radiation resistance-associated gene).

L'autophagie était supposée jusqu'à récemment dégrader les protéines de façon non spécifique. Cependant, le marquage de protéines par des chaînes d'ubiquitine reliées en K63, permet leur reconnaissance par la protéine d'adressage p62/SQSTM1 (Sequestosome-1)<sup>97</sup>, ce qui rend l'autophagie aussi spécifique que l'UPS. p62/SQSTM1 conduit alors les protéines à dégrader jusqu'au phagophore grâce à sa liaison à LC3. La protéine ZFN16 (Zinc Finger Protein 16) est un récepteur de chaîne d'ubiquitine de type K48 impliqué dans la reconnaissance des substrats à dégrader par le protéasome<sup>98</sup>. Il a été montré qu'il était capable également de se lier à p62/SQSTM1<sup>99</sup>. Il pourrait ainsi permettre une dégradation de protéines par l'autophagie mais cela reste à démontrer. En plus de la spécificité de sélection des substrats, il existe donc une véritable coopération entre les systèmes UPS et de l'autophagie. Un autre exemple de dégradation sélective par l'autophagie est donné par la mitophagie. La mitophagie est la dégradation des mitochondries par la macroautophagie. Chez les mammifères la protéine PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) recrute Parkin une E3 à la membrane de la mitochondrie en cas de dépolarisation de celle-ci, qui est caractéristique d'un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative. Parkin crée des chaînes d'ubiquitine reliées en K63 sur plusieurs protéines de la membrane externe mitochondriale. La reconnaissance de ces protéines par p62/SQSTM1 permet de recruter les mitochondries au niveau du phagophore<sup>100</sup>. Parmi les substrats de Parkin on trouve les protéines de fusion mitochondriale Mfn1 et 2 (Mitofusin-1 et 2) qui sont des protéines indispensables à la biogénèse du réseau mitochondrial<sup>101</sup>. Dans ce cas Mfn1 et 2 sont polyubiquitinées par des ubiquitines reliées en K48 ce qui permet leur reconnaissance par la protéine p97/VCP qui les achemine vers le protéasome 26S où elles seront dégradées<sup>40</sup>. Ce mécanisme permet une ségrégation des mitochondries altérées. La protéine Bnip3 (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting

protein 3) peut également lier la membrane d'une mitochondrie altérée et l'adresser au phagophore via son interaction avec LC3<sup>102</sup>.



**Figure 7. Les systèmes de conjugaison impliqués dans la formation du phagophore. A. Complexe de conjugaison d'ATG12-ATG5-ATGL16L1.** La protéine Ub-like ATG12 est conjuguée de façon irréversible sur ATG5 grâce à ATG7 et ATG10. Le complexe ATG5-ATG12 lie ATG16L1. ATG16L1 dimérise et permet l'association du complexe au phagophore et son élongation. **B. Complexe de conjugaison de LC3.** La protéine LC3 est clivée par ATG4 qui révèle un acide aminé glycine C-terminal (LC3-I). ATG7 (E1 like) active LC3 et le transfère sur ATG3 (E2 like). Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 pourrait participer comme une E3 à la conjugaison de LC3-I sur la phosphatidyl ethanolamine (PE) de la membrane formant LC3-II qui s'associe au phagophore dont il promeut l'élongation. LC3-II situé dans la membrane externe de l'autophagosome sera recyclé par l'action d'ATG4. D'après Parzych K.R. et al *Antioxid Redox Signal*, 20(3):460-73, 2014.

#### 4.1.2.2.2. Rôle de l'autophagie au cours de l'atrophie musculaire

Bien que l'autophagie ait été décrite de longue date, son implication dans la survenue d'une atrophie musculaire est restée longtemps négligée. En effet, les premières études basées sur l'inhibition « sélective » des différents systèmes protéolytiques cellulaires montraient que l'augmentation de la protéolyse au cours d'une atrophie musculaire était principalement le fait de l'activation de l'UPS<sup>103</sup>. Il apparaît désormais que l'autophagie (et plus particulièrement la mitophagie) est un processus crucial de l'homéostasie musculaire étroitement régulé en coopération et en coordination avec l'UPS.

La manipulation génétique de l'autophagie ou sa perturbation au cours de pathologies ou du vieillissement, que ce soit l'augmentation ou la diminution<sup>104-106</sup>, entraîne une atrophie musculaire. De plus, la cathepsine L est surexprimée dans de nombreuses situations cataboliques comme le sepsis<sup>107</sup> ou le cancer<sup>108</sup> et elle fait partie des atrogènes<sup>49</sup>. Le muscle squelettique est l'un des organes possédant le plus haut taux de formation d'autophagosomes, par exemple au sein des fibres musculaires rapides en cas de jeûne<sup>109</sup>. Une autre preuve de l'importance de l'autophagie dans l'atrophie musculaire est venue de la surexpression des protéines FoxO3a, Bnip3 ou Nix qui stimulent l'autophagie et entraînent une atrophie musculaire chez le rongeur<sup>110,111</sup>. De même, la surexpression de FoxO3a dans des cellules C2C12 induit une atrophie musculaire principalement médiée par une activation de l'autophagie<sup>112</sup>. Au contraire, l'inactivation de FoxO3a dans le muscle prévient l'augmentation de l'autophagie et protège de l'atrophie musculaire. Chez l'homme une augmentation de l'expression de LC3, p62/SQTM1 et des cathepsines a été retrouvée dans le muscle de patients développant une cachexie cancéreuse<sup>113,114</sup>.

Le rôle de l'autophagie dans la survenue d'une atrophie musculaire pourrait être secondaire à son effet sur la fonction mitochondriale. En effet l'autophagie est activée dans le muscle de souris néphrectomisées. Dans ce modèle, cette activation n'est pas responsable directement d'une dégradation des protéines myofibrillaires mais contribue à une diminution de la biogénèse mitochondriale, ce qui entraîne une atrophie musculaire<sup>115</sup>. L'autophagie possède donc un rôle crucial à la fois dans l'homéostasie protéique du muscle squelettique à l'état basal, mais aussi en cas d'atrophie au cours d'une situation catabolique. Il est cependant clair que c'est l'UPS qui dégrade la structure contractile (sarcomères) alors que l'autophagie est plutôt impliquée dans la dégradation de protéines altérées et le maintien de l'intégrité du réseau de mitochondrie.

#### 4.1.Métabolisme énergétique

#### 4.1.1. Dysfonction mitochondriale

Le métabolisme oxydatif joue un rôle central dans l'homéostasie du muscle squelettique. Une altération du métabolisme oxydatif peut être mise en évidence par une diminution du contenu en mitochondrie, de la capacité respiratoire mitochondriale ou de l'expression des enzymes mitochondriales intervenant dans le cycle de Krebs ou la chaîne respiratoire<sup>116</sup>. Environ 10% des gènes modifiés au cours du processus d'atrophie musculaire sont rattachés au métabolisme énergétique<sup>49</sup>. Une altération de la morphologie et de la fonction mitochondriale est retrouvée dans le muscle dans de nombreuses situations d'atrophie musculaire comme l'âge<sup>117</sup>, les états de faiblesse en unité de soin intensif, le cancer<sup>118</sup>, les pathologies neuromusculaires<sup>119</sup>, la broncho-pneumopathie chronique obstructive<sup>120</sup>, les traitements par corticoïdes<sup>121</sup>, l'insuffisance rénale<sup>115</sup>, etc. Ces altérations concernent aussi bien les muscles rapides glycolytiques que lents oxydatifs<sup>122</sup>. Le réseau mitochondrial est l'objet d'une régulation qui permet d'adapter le fonctionnement de la cellule à son environnement. Les mécanismes intervenant sont la biogénèse mitochondriale, la fission et la fusion mitochondriale et la mitophagie.

PGC1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) est un facteur de transcription majeur de la biogénèse mitochondriale. Il régule l'expression des gènes mitochondriaux du métabolisme oxydatif. Son expression est diminuée dans plusieurs situations cataboliques aussi bien chez le rongeur que chez l'homme<sup>123-125</sup>. L'induction de son expression protège de l'atrophie musculaire<sup>50,126</sup>. Cependant une étude menée à un stade précoce de cancer du poumon n'a pas retrouvé d'altération de l'expression de PGC1 $\alpha$  et de la capacité oxydative du muscle<sup>127</sup>. Des études complémentaires chez l'homme sont donc nécessaires pour confirmer les observations obtenues chez le rongeur.

La fission et la fusion mitochondriale participent également à la plasticité du réseau de mitochondrie. Une diminution de l'expression des protéines impliquées dans la fusion Mfn1 et 2 (Mitofusin-1 et 2) et une augmentation des protéines de fission (Fis1 (Fission-1) et DRP1 (Dynamin related protein-1)) est retrouvée dans le muscle de la patte postérieure dans un modèle de cancer colique chez la souris<sup>128</sup>.

Une accélération de la mitophagie peut contribuer, en diminuant le nombre de mitochondries, à l'altération des capacités du métabolisme oxydatif du muscle squelettique et ainsi entraîner une atrophie musculaire. Une augmentation de la mitophagie a été observée dans

des muscles de modèle de cachexie cancéreuse<sup>129</sup> et dans le muscle de patients atteints de cancer<sup>130</sup>. La dysfonction mitochondriale va avoir pour conséquence une diminution de la production d'ATP et donc des capacités contractiles musculaires mais aussi une activation de l'AMPK (AMP activated protein kinase) et une production accrue de ROS tous les deux intervenant dans la perte de masse musculaire<sup>131</sup>.

#### 4.1.2. Le stress oxydant

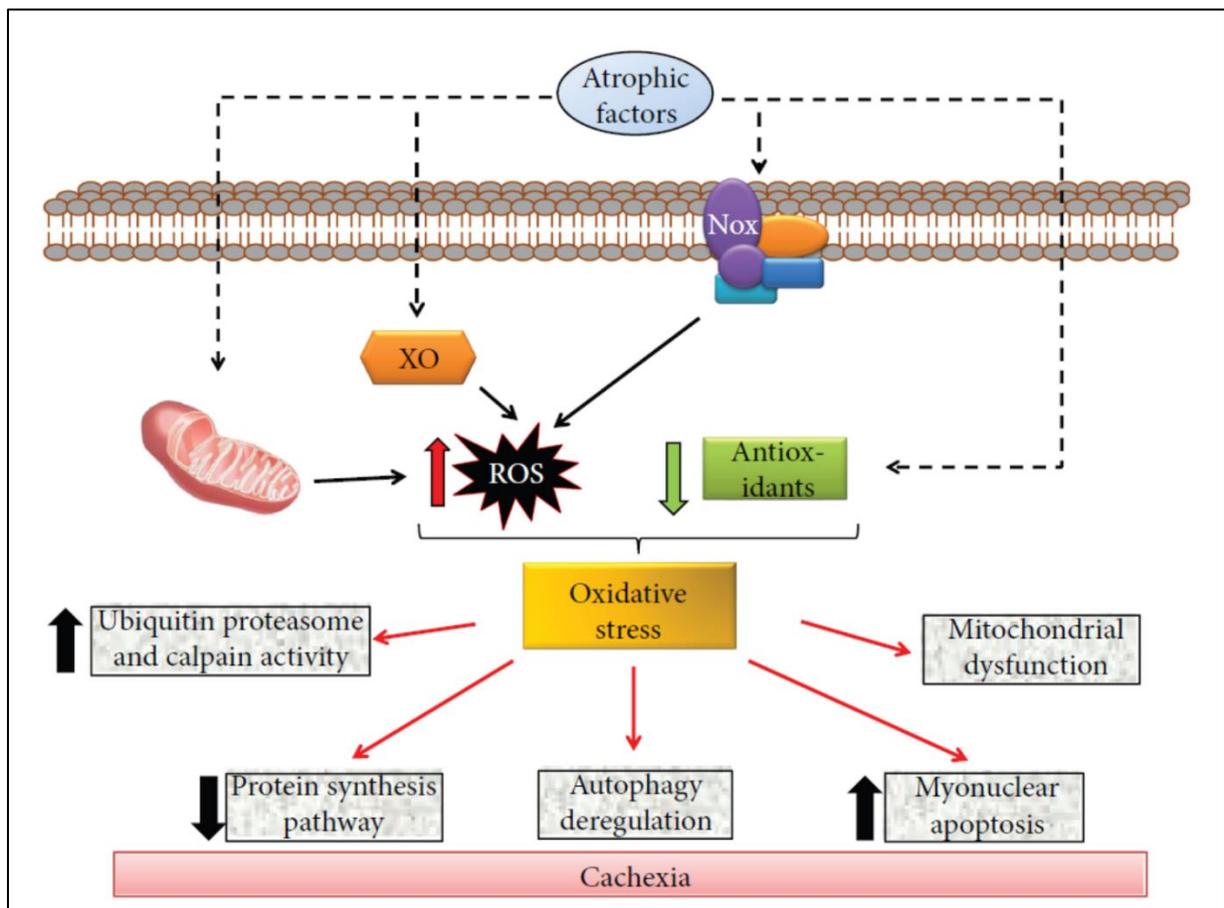
Au sein de la fibre musculaire les ROS ont 3 principales origines : la mitochondrie, la NADPH oxydase et la xanthine oxydase (Figure 8)<sup>132</sup>.

Nous avons vu précédemment que l'augmentation des ROS mitochondriaux est directement reliée à une augmentation de l'autophagie et au développement d'une atrophie musculaire. Aussi, une augmentation de la production mitochondriale de ROS a été par exemple mise en évidence dans le muscle de patients ayant une insuffisance respiratoire obstructive<sup>133</sup>. Le milieu de culture de cellules de carcinome pulmonaire induit une dysfonction mitochondriale et une augmentation de la production de ROS par des myotubes en culture<sup>134</sup>.

Dans un modèle de cachexie cancéreuse chez la souris une augmentation de la production de ROS par la NADPH oxydase a été décrite<sup>135</sup>. Les patients en insuffisance rénale ont une augmentation des taux circulants d'angiotensine 2<sup>136</sup>. Or, on sait que l'angiotensine 2 est capable d'induire une atrophie musculaire dépendante de la production de ROS via la transcription d'une sous unité de la NADPH oxydase<sup>137</sup>. L'indoxy-sulfate, une toxine urémique liée à l'albumine qui s'accumule en cas d'insuffisance rénale est capable d'induire une atrophie musculaire en induisant l'expression de myostatine et de l'E3 MAFbx secondaire à la production de ROS par la NADPH oxydase<sup>138</sup>. Les cytokines proinflammatoires comme le TNF $\alpha$  peuvent également augmenter la production de ROS par la mitochondrie et la NADPH oxydase<sup>139,140</sup>.

La xanthine oxydase participe à la production de ROS au cours de l'atrophie observée en cas d'inactivité musculaire<sup>141</sup>. Son rôle dans l'atrophie musculaire au cours du cancer ou de l'insuffisance rénale n'a pas encore été étudié. Les ROS vont agir sur de multiples voies métaboliques. Ils inhibent la protéosynthèse et augmentent l'activité de l'UPS, de l'autophagie et des calpaïnes<sup>142</sup>. Ils induisent des dommages au niveau des protéines et des lipides cellulaires

responsables notamment d'une dysfonction mitochondriale qui en retour augmente la production de ROS créant un véritable cercle vicieux<sup>132</sup>



**Figure 8. Influence du stress oxydant sur les mécanismes controlant la masse musculaire.** Les facteurs d'atrophie musculaire peuvent générer un stress oxydant par la production de radicaux libres de l'oxygène (ROS) issus de différentes sources telle les mitochondries, la xanthine oxydase (XO) ou la NADPH oxydase (Nox). Le stress oxydant est un activateur des systèmes protéolytiques (système ubiquitine-protéasome, autophagie, calpaïnes), inhibe la protéosynthèse et induit une dysfonction mitochondriale qui amplifie la production de ROS et peut conduire à terme à l'apoptose. D'après Abrigo J. et al, Oxyd Med Cell Longev, 2018

#### 4.1.3. Glycolyse anaérobie

Des études du protéome de la fraction cytoplasmique musculaire ont montré une augmentation d'expression de plusieurs enzymes glycolytiques. Ainsi, l'expression des enzymes phosphoglycérate kinase, enolase, aldolase, triosephosphate isomerase et lactate deshydrogénase est augmentée dans le *Soleus* de rat suspendus<sup>143</sup>. De même il existe une augmentation des niveaux d'enolase une semaine après dénervation dans le muscle *Gastrocnemius*<sup>144</sup>. En dehors d'une étude protéomique différentielle sur gel 2D conduite sur

des biopsies musculaires chez des patients ayant une broncho-pneumopathie chronique obstructive et qui n'a retrouvé qu'une augmentation de l'énolase, il n'existe pas d'étude des enzymes de la glycolyse au niveau musculaire en situation d'atrophie pathologique que ce soit chez l'animal ou chez l'homme<sup>145</sup>.

#### 4.1.4. Transition de phénotype

Les modifications du métabolisme énergétique des fibres musculaires font partie des changements observés lors de la transition de phénotype des fibres musculaires qui concerne également le changement d'expression d'isoformes des protéines contractiles notamment la myosine. Ainsi, lors de l'atrophie observée en cas d'inutilisation musculaire on observe classiquement une transition d'un phénotype des fibres de type lent oxydatif à celui de rapide glycolytique<sup>146</sup>. La transition phénotypique des fibres musculaires au cours des processus d'atrophie musculaire pathologique est moins étudiée. On notera au cours de l'insuffisance cardiaque ou de l'insuffisance respiratoire chronique une transition de fibres lente à rapide dans les muscles des membres. En parallèle la transition rapide à lent observée dans le diaphragme pourrait s'expliquer par d'avantage de sollicitation de ce muscle respiratoire du fait de la pathologie<sup>146</sup>. Au cours de l'atrophie induite par les glucocorticoïdes ou le diabète il existe une transition de phénotype rapide à lent qui laisse supposer des mécanismes différents<sup>146</sup>.

### 5. Régulation de la masse musculaire

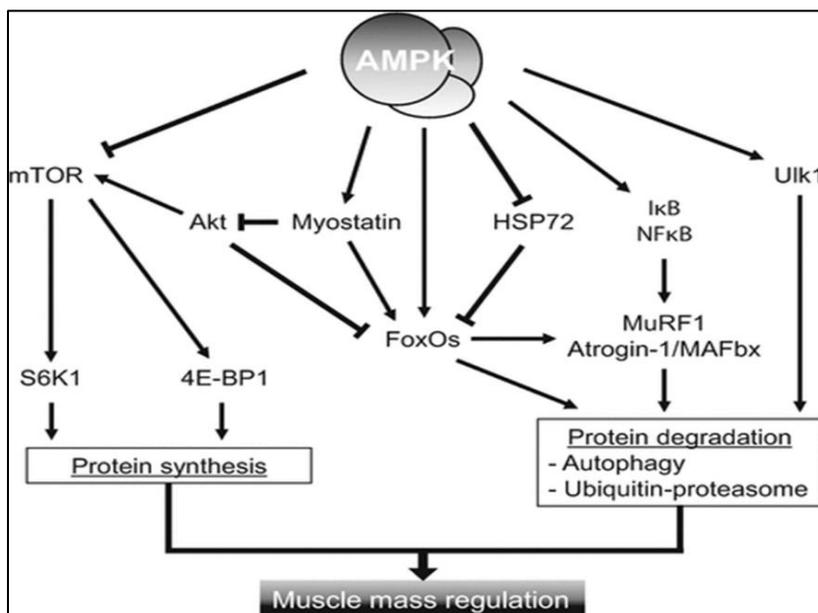
Trois types de facteurs interviennent dans le contrôle de la masse musculaire : la disponibilité en nutriments, la sollicitation mécanique et les facteurs humoraux (hormones et cytokines). Ces facteurs sont autant de leviers potentiels qui peuvent être manipulés afin de prévenir l'installation de l'atrophie musculaire. La modification des apports alimentaires (conseil diététique, prescription de compléments nutritionnels oraux, supplémentation en acide aminés), l'exercice physique et la lutte contre la sédentarité, les traitements médicamenteux (supplémentation en hormone de croissance ou androgène, prescription d'oméga3 à visée anti-inflammatoire...) font partie, en plus de la prise en charge de la pathologie causale, des thérapeutiques utilisées en pratique médicale courante ou faisant l'objet d'évaluations par études cliniques.

#### 5.1. Diminution des apports en nutriments

Il existe une réduction spontanée de l'apport énergétique et protéique au cours des pathologies responsables de la survenue d'une atrophie musculaire (insuffisance respiratoire, cardiaque, rénale, infection, cancer...). Elle s'explique par l'état inflammatoire, l'altération du goût, le ralentissement de la vidange gastrique, les régimes alimentaires (par exemple régime pauvre en protéines chez l'insuffisant rénal), les facteurs psychologiques (dépression) ou sociaux (pauvreté).

La leptine, un puissant inhibiteur de l'appétit produit par les adipocytes blancs, est fréquemment augmentée dans le sang dans ces situations<sup>147</sup> tandis que la ghréline un peptide orexigène est diminué<sup>148</sup>. Les antagonistes de la leptine<sup>149</sup> et l'administration de ghréline<sup>150</sup> sont capables de stimuler l'appétit, d'augmenter la prise alimentaire et de prévenir l'atrophie musculaire dans des modèles d'atrophie musculaire. Des études cliniques pilotes sont en cours chez l'homme mais le niveau de preuve sur l'efficacité et la sécurité de tels traitements est encore insuffisant pour recommander leur utilisation<sup>151</sup>.

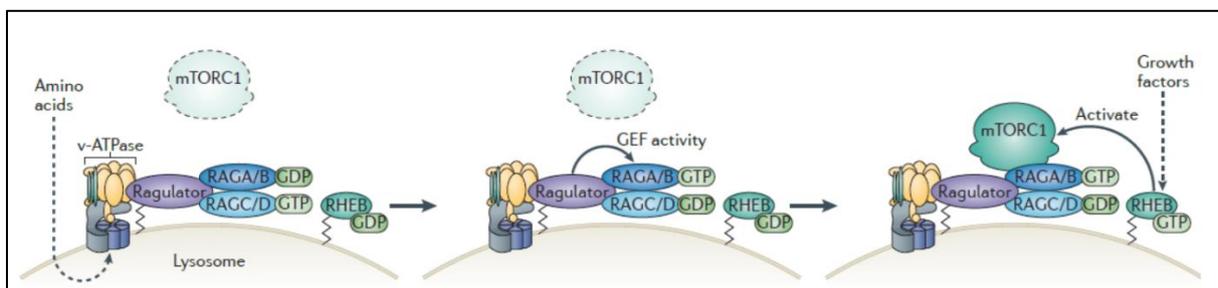
Une disponibilité insuffisante en substrats énergétiques (glucose et acides gras libres) pour couvrir les besoins de la fibre musculaires aboutit à une augmentation du rapport AMP/ATP. Elle a pour conséquence l'activation de l'AMPK. L'AMPK va alors diminuer la protéosynthèse par l'inhibition de mTORC1 et induit l'inhibition de la protéosynthèse via l'inhibition de mTORC1 et l'activation de l'autophagie<sup>152</sup> et de l'UPS<sup>153</sup> via FoxO3a (Figure 9).



**Figure 9. Voie de l'AMPK.** L'AMPK est activée par l'AMP et son activité est directement régulée par le rapport AMP/ATP de la cellule, ce qui en fait un senseur de l'état énergétique. Son activation a pour conséquence une inhibition de la protéosynthèse et une activation de la protéolyse conduisant à la perte de masse musculaire. D'après Egawa T. et al, The plasticity of skeletal muscle, Springer 2017

De même une diminution de la disponibilité en acides aminés est susceptible d'induire une inhibition de la protéosynthèse et une activation de la protéolyse au niveau du muscle squelettique. Le muscle a ainsi le rôle de réservoir d'acide aminé mobilisable en cas de carence pour couvrir les besoins de l'organisme (voir § 3.4). La réduction des apports alimentaires mais aussi l'augmentation du catabolisme des acides aminés branchés (valine, isoleucine, leucine) est responsable d'une telle carence. Le déficit en acides aminés va avoir pour conséquence une inhibition de la protéosynthèse et une activation de l'autophagie via l'inhibition de mTORC1 (*sensing* de la carence en acide aminés)<sup>154</sup>. Les voies impliquées sont multiples. L'une des mieux étudiée implique la petite protéine G RAG (Ras-related GTP binding) (Figure 10)<sup>155</sup>. La leucine interviendrait aussi directement dans l'activation de mTORC1 via la leucyl-tRNA synthétase<sup>156</sup>.

Chez l'homme plusieurs études cliniques ont testé l'efficacité d'une supplémentation en acides aminés sur la prévention ou le traitement de l'atrophie musculaire. Il apparaît qu'une supplémentation en acides aminés est capable de rétablir partiellement l'homéostasie protidique. Cependant, l'efficacité sur des critères cliniques (amélioration de la force musculaire, réduction de la mortalité) n'a pas été à ce jour démontrée<sup>157</sup>. La situation est encore plus complexe pour le patient en insuffisance rénale non dialysé. En effet un excès d'apport en protide (>1 g/kg/j) est un facteur de progression de l'IRC bien connu. De plus, et bien que cela reste un sujet de controverse<sup>158,159</sup>, une réduction des apports en protides (soit <0,8 g/kg/j = régime pauvre en protide soit 0.5g/kg/j avec une supplémentation en cétoanalogues = régime très pauvre en protides) serait préférable pour ralentir la progression de l'insuffisance rénale chronique.



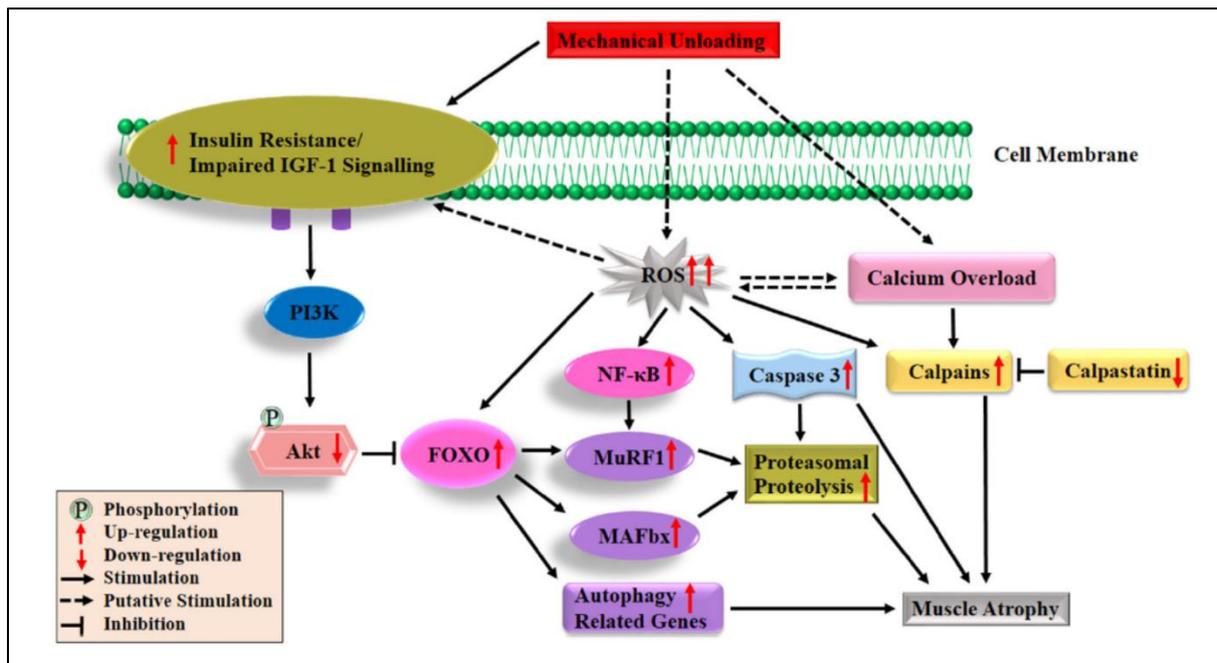
**Figure 10. Activation de mTORC1 par les acides aminés via la voie RAG.** On suppose qu'au cours d'un apport important de nutriments, les acides aminés s'accumulent dans les lysosomes. Les acides aminés agiraient sur la H<sup>+</sup>-ATPase (v-ATPase) lysosomale qui servirait de point d'ancrage pour la formation du complexe Ragulator-RAG GTPase. Ragulator induit l'échange des molécules de GTP et GDP portées respectivement par les sous unité RAGA/B et RAGC/D. Cela permet le recrutement de la petite protéine G RHEB et son activation par

l'échange du GDP pour du GTP. RHEB active alors mTORC1. D'après Jewell J.L. et al, Nat Rev Mol Cell Biol, 14(3):133-9, 2013.

## 5.2. Facteurs mécaniques

Des périodes prolongées d'inactivité musculaire (repos au lit<sup>160</sup>, apesanteur simulée ou immobilisation de membre<sup>161</sup>, vol en apesanteur<sup>162</sup>) conduisent à une perte importante de masse et de force musculaire. Ces phénomènes intéressent en premier lieu les muscles riches en fibres lentes et oxydatives. On observe d'ailleurs une transition de phénotype lent vers un phénotype rapide glycolytique<sup>163</sup>. L'atrophie musculaire induite par le défaut d'utilisation musculaire est également la conséquence d'un déséquilibre entre protéosynthèse et protéolyse au profit de cette dernière<sup>164</sup>. L'augmentation de la protéolyse est le fait d'une mise en jeu du système UPS et de l'autophagie<sup>16,165-168</sup>. En parallèle on observe généralement une réduction du nombre de cellules satellites en cas d'inutilisation du muscle squelettique mais la responsabilité de la diminution des cellules satellites dans la survenue d'une atrophie musculaire reste l'objet de controverses<sup>169</sup>.

Plusieurs mécanismes relient l'inactivité à l'atrophie musculaire au niveau de la fibre musculaire. La protéine FAK (Focal adhesion kinase) est une protéine tyrosine kinase présente au niveau des costamères. Elle joue le rôle de transduction des contraintes mécaniques exercées à ce niveau en activant la voie PI3K/AKT/mTORC1<sup>170</sup>. Le rôle des ROS a aussi été rapporté. Un défaut d'utilisation musculaire pourrait favoriser la production de ROS par les mitochondries<sup>171</sup>. Une élévation des concentrations en calcium libre a été mesurée dans le cytoplasme de fibre musculaire en cas de défaut d'utilisation musculaire<sup>172</sup>. Cette augmentation de calcium est capable d'activer d'une part des protéases, les calpaïnes<sup>173</sup> et d'autre part l'apoptose cellulaire via l'activation de Bax (BCL2 associated X, apoptosis regulator)<sup>174</sup> (Figure 13). Une hypothèse est qu'en l'absence de contrainte mécanique, la calpaïne 3<sup>175</sup> clive la titine qui pourrait libérer MuRF1 qu'elle séquestre par sa liaison à son domaine pseudo-kinase au niveau des bandes M. MuRF1 serait alors disponible à proximité de ses substrats ( $\alpha$ -actine notamment)<sup>176</sup>.



**Figure 11. Mécanismes conduisant à l’atrophie musculaire par manque de sollicitation musculaire.** Le défaut d’utilisation musculaire entraîne une inhibition de la voie PI3K/AKT une surcharge calcique du sarcoplasme et une accumulation de radicaux libres de l’oxygène aboutissant à une activation de la protéolyse et une inhibition de la protéosynthèse. D’après Gao Y. et al, Front Physiol, 9:235, 2018

L’existence d’une pathologie chronique telle le cancer ou l’insuffisance rénale s’accompagne d’une réduction des activités des patients<sup>177</sup>. Elle pourrait participer à l’induction d’une atrophie musculaire entretenant ainsi un cercle vicieux. La pratique d’exercices physiques a logiquement été proposée pour lutter contre l’atrophie musculaire. Des études cliniques, conduites dans des situations cataboliques variées, ont montré un bénéfice sur l’amélioration des capacités physiques<sup>178,179</sup>. Cet effet est synergique avec la supplémentation en acide aminés<sup>180</sup>. Cependant au cours des situations cataboliques pathologiques la correction des anomalies n’est que partielle et l’effet sur la masse musculaire n’est pas constant<sup>176,177</sup>. En effet comme nous allons le voir par la suite les mécanismes en cause ne se résument pas à un défaut d’apport en nutriments et de sollicitation musculaire.

### 5.3. Facteurs humoraux

#### 5.3.1. Insuline et IGF1

La principale voie impliquée dans le contrôle positif (croissance) de la masse musculaire est celle de l’insuline/IGF1/PI3K/Akt/mTORC1 (Figure 12)<sup>181</sup>. Cette voie est activée lorsque

l'insuline ou l'IGF1 (Insulin like growth factor-1) se lie à son récepteur membranaire, stimulant ainsi son activité tyrosine kinase. Des médiateurs intermédiaires comme l'IRS1 (Insulin receptor substrate-1) sont phosphorylés, ce qui conduit à l'activation de la PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase) qui produit du PIP3 (phosphatidyl inositol (1,4,5) triphosphate). Le PIP3 peut être déphosphorylé et recyclé par la phosphatase PTEN. Le PIP3 permet le recrutement à la membrane de la protéine kinase Akt/PKB qui est alors activée par phosphorylation par la protéine PDK1 (Phosphatidylinositol dependant kinase) et le complexe mTORC2. Akt/PKB est au carrefour de plusieurs voies de signalisation. L'activation de mTORC1 entraîne une augmentation de la synthèse des protéines via l'activation de la S6K qui promeut la biogénèse de ribosome et l'inhibition de 4EBP1 qui permet la levée d'inhibition du facteur d'initiation de la traduction eIF4E. mTORC1 inhibe directement les kinases ULK1 et 2 impliquées dans l'initiation de l'autophagie. La voie PI3K/AKT/mTORC1 contrôle en fait les deux pendants de l'homéostasie des protéines car elle influe aussi directement sur la protéolyse en inhibant cette dernière. En effet, la séquestration dans le cytoplasme de facteurs de transcription FoxO1 et FoxO3a phosphorylés par Akt/PKB réduit l'expression des E3 musculaires MuRF1 et MAFbx impliquées dans la protéolyse UPS-dépendante et de protéines Atg de l'autophagie<sup>112</sup>. Une résistance de la fibre musculaire à l'action de l'insuline et de l'IGF1 est observée en cas de cancer ou d'insuffisance rénale<sup>182</sup>. L'inflammation systémique commune à l'IRC et au cancer jouerait un rôle prépondérant dans l'apparition de l'insulinorésistance<sup>183,184</sup>.

Une supplémentation en hormone de croissance pourrait logiquement être proposée dans le traitement de l'atrophie musculaire. Malheureusement, elle favorise le développement de cancers et son utilisation est donc proscrite dans cette indication, a fortiori au cours de la cachexie cancéreuse. Les pistes thérapeutiques actuelles visent donc à réduire l'insulinorésistance. Ainsi des médicaments utilisés dans le diabète comme la metformine sont capables de prévenir partiellement l'atrophie musculaire dans un modèle de cachexie cancéreuse<sup>185</sup>. L'évaluation de la metformine pour prévenir la sarcopénie induite par le vieillissement fait l'objet d'une étude clinique en cours<sup>186</sup>. Enfin, pour améliorer la réponse à l'IGF1 et à l'insuline, la correction de l'inflammation par l'administration de substances anti-inflammatoires est également à l'étude (cf § 5.3.3.). L'action de l'IGF1 est médiée en partie par une activation de la voie de la calcineurine<sup>187</sup>. La calcineurine est une phosphatase qui active le facteur de transcription NFAT qui induit la transcription de PGC $\alpha$  stimulant ainsi la biogénèse mitochondriale et inhibant les systèmes UPS et de l'autophagie. L'action des



conduisant à l'inhibition de la protéolyse (système UPS et autophagie). D'après Jason S. et al Development 143: 3050-3060; 2016

### 5.3.2. Acidose

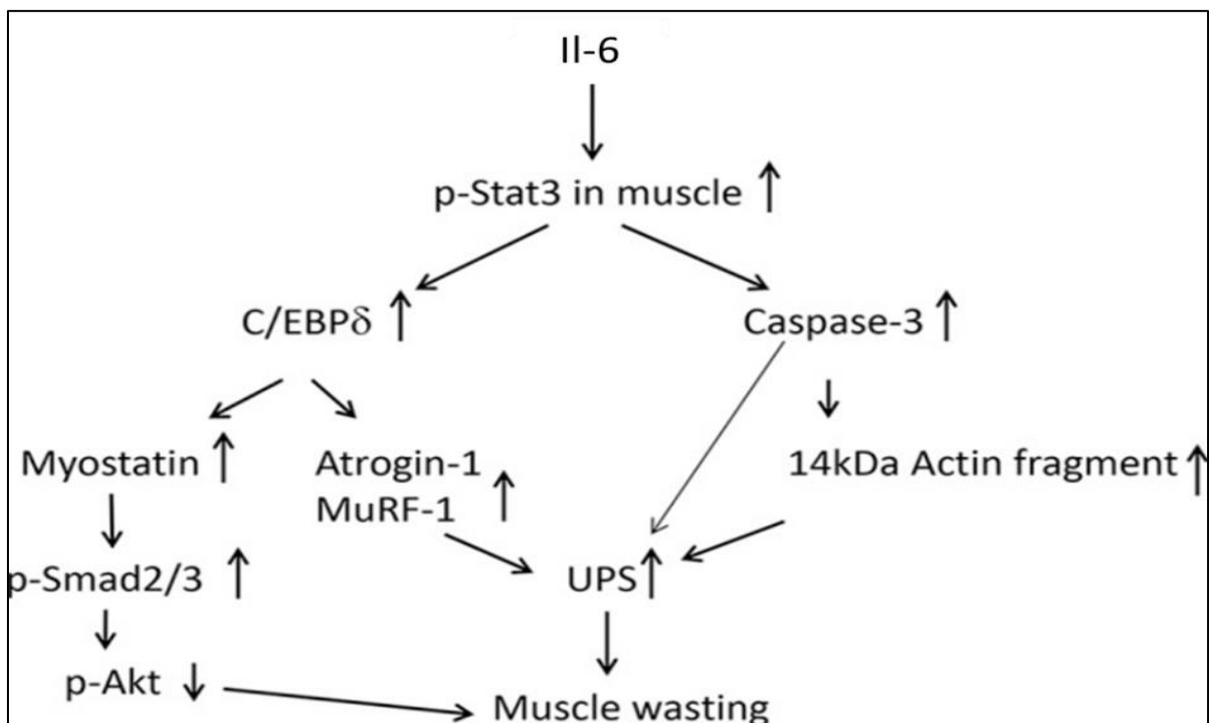
L'acidose métabolique est une complication classique rencontrée chez les patients en insuffisance rénale. L'acidose, quelle que soit sa cause, entraîne une atrophie musculaire avec une augmentation concomitante de l'activation de l'UPS et l'installation d'une insulino-résistance à la fois chez le rat et chez l'homme<sup>193</sup>. Chez le rat néphrectomisé, sa correction par l'apport de bicarbonate diminue la protéolyse<sup>32</sup>. De même, chez les patients en insuffisance rénale chronique, la correction de l'acidose métabolique permet l'amélioration partielle des paramètres du statut nutritionnel et de prévenir la déminéralisation osseuse (ostéomalacie)<sup>194</sup>. Par ailleurs, elle pourrait ralentir la progression de l'insuffisance rénale chronique<sup>195</sup>. Cependant, aucun effet bénéfique sur la mortalité n'a été démontré à ce jour. De plus, une correction de l'acidose pourrait également avoir des effets délétères. Sous forme de sel de sodium, les alcalins les plus fréquemment utilisés (bicarbonate ou citrate de sodium) constituent un apport non négligeable de sodium avec un risque de surcharge hydrosodée et d'hypertension artérielle. En pratique ce risque semble moins important que lors de l'apport de chlorure de sodium, en tout cas lorsque les reins sont fonctionnels<sup>194</sup>. Une solution pourrait être une alimentation riche en fruits à condition de limiter l'apport en potassium<sup>196</sup>. L'utilisation de concentrations élevées (>32 mmol/L) de bicarbonate dans le dialysat de patients traités par hémodialyse pour optimiser la correction de l'acidose métabolique a été retrouvé comme un facteur indépendant de mortalité dans une étude rétrospective conduite sur plus de 17000 patients. Du fait du caractère intermittent du traitement il existe dans ce cas une alcalose en fin de traitement qui peut théoriquement favoriser les troubles du rythme<sup>197</sup>, l'hypotension artérielle<sup>198</sup> et les calcifications vasculaires<sup>199</sup>. Cependant dans cette même étude c'est le risque d'infection qui est augmenté possiblement par un effet d'inhibition de l'alcalose sur les cellules dendritiques<sup>200</sup> ou sur la production de ROS par les phagocytes<sup>201</sup>.

### 5.3.3. Inflammation

Les patients en insuffisance rénale ou développant un cancer sont caractérisés par un état inflammatoire chronique évoluant à bas bruit comme en témoigne l'élévation de la CRP (C-Reactive Protein) et des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-alpha), IL1 et 6 (Interleukine-1 et 6) et IFN $\gamma$  (Interferon-gamma) dans le sérum<sup>202</sup>. L'inflammation est

multifactorielle : réponse immunitaire contre la tumeur en cas de cancer, réaction à l'accumulation de toxines urémiques et manque de biocompatibilité avec les matériels d'épuration extra-rénale en cas d'insuffisance rénale.

L'action de l'IL6 passerait au moins en partie par le facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription-3). STAT3 induit SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling-3), inhibiteur de l'IRS1 (Insulin receptor substrate-1), et C-EBP $\delta$  (CCAAT/enhancer binding protein-delta) qui induit l'expression de myostatine (cf § 5.3.4)<sup>45,203</sup>. Ceci entraîne l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTORC1 et donc une insulinoresistance (Figure 13). STAT3 contrôle également la régénération musculaire par les cellules satellites en inhibant leur prolifération et en induisant leur différenciation via MyoD<sup>204</sup>.



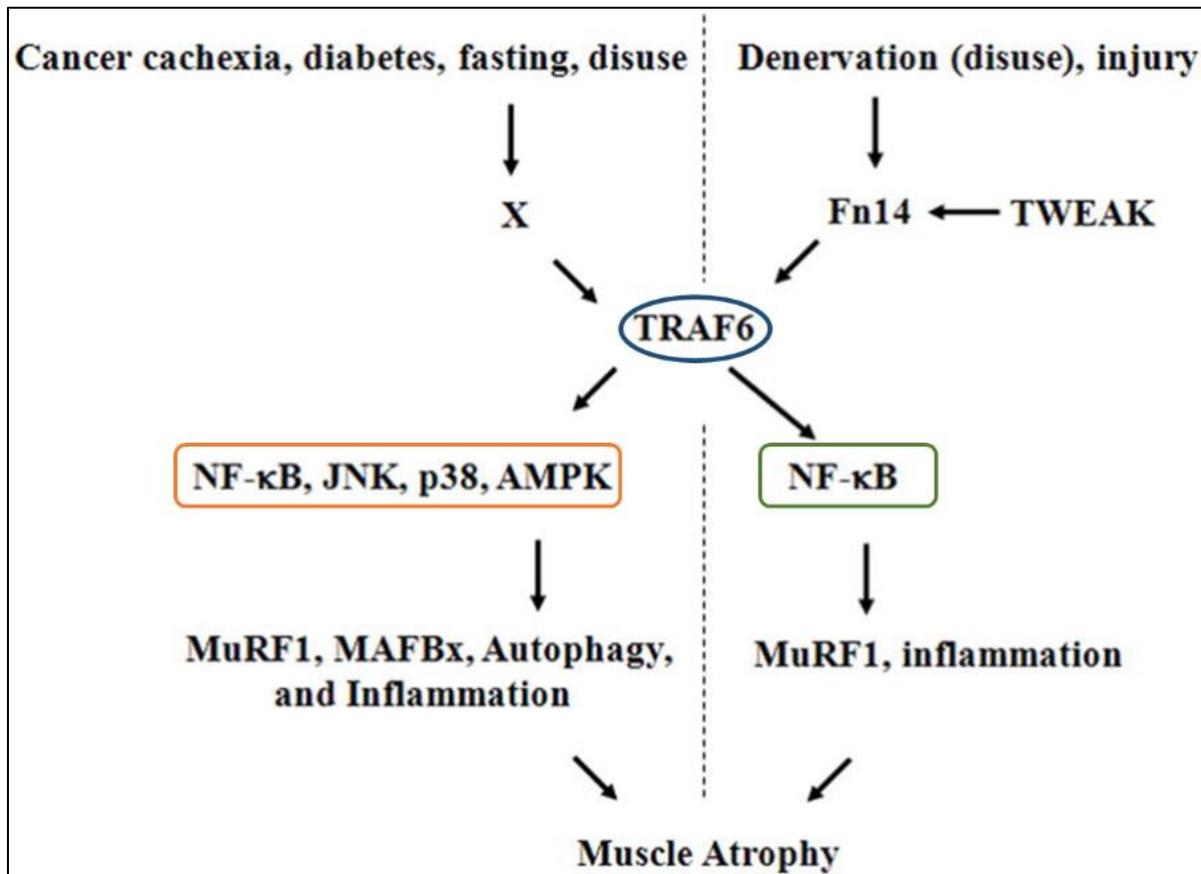
**Figure 13. Rôle de l'IL-6 et du facteur de transcription STAT3 dans l'atrophie musculaire.** La fixation de l'IL6 sur son récepteur induit la phosphorylation de STAT3. L'activation de STAT3 a pour conséquence l'induction de l'expression des E3 musculaires MAFbx/Atrogin1 et MuRF1, l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTORC1 via la synthèse de myostatine et possiblement une production de caspase 3 qui pourrait jouer un rôle dans la déstabilisation du sarcomère et permettrait l'action du protéasome au moins dans les cellules musculaires en apoptose. D'après Silva, K.A. et al, J Biol Chem, 290:11177-11187, 2015

TNF $\alpha$  et IL1 activent plusieurs voies via TRAF6 (TNF receptor associated factor-6) aboutissant à l'expression de gènes du système UPS et de l'autophagie (Figure 14)<sup>78</sup>. Ces cytokines pro-inflammatoires induisent l'activation de NF- $\kappa$ B (Nuclear factor-kappa B) qui

entraîne une inhibition de la voie PI3K/AKT/mTORC1 via l'expression de la protéine SIRP $\alpha$  (Signal regulatory protein-alpha)<sup>184</sup> et induit aussi directement la synthèse de MuRF1<sup>205</sup>. De façon similaire, le TNF $\alpha$  et l'IL-6 peuvent induire l'activation des MAPK (Mitogen associated protein kinase) p38 et JNK (c-jun N-terminal kinase) qui agissent via l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTORC1<sup>206,207</sup>. p38 est également capable d'induire l'expression de MAFbx/Atrogin-1 via la phosphorylation de C-EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer binding protein-bêta)<sup>208</sup>. Enfin, TRAF6 est capable d'activer l'AMPK et donc d'inhiber directement la synthèse des protéines.

La correction de l'état d'inflammation repose avant tout sur le traitement de la pathologie causale mais les anti-inflammatoires pourraient également avoir un intérêt. En dehors du traitement de maladie inflammatoire les corticoïdes ne doivent pas être utilisés car ils ont un effet catabolique direct sur la fibre musculaire<sup>209</sup>. L'utilisation d'anti-TNF $\alpha$  prévient l'atrophie musculaire dans les modèles animaux<sup>210</sup>. Chez l'homme les anti-TNF $\alpha$  ont donné des résultats décevants dans la prise en charge de la cachexie de l'insuffisance cardiaque<sup>211</sup> et du cancer<sup>212</sup>. Ils sont utilisés dans le traitement de la maladie de Crohn<sup>213,214</sup> et de la polyarthrite rhumatoïde<sup>215</sup> où ils donnent des résultats favorables sur la prévention de l'atrophie musculaire. Mais cela est, semble-t-il, plutôt lié à leur efficacité sur la maladie causale qu'à la prévention directe des effets délétères de l'inflammation sur le muscle<sup>216</sup>. Enfin, une augmentation du risque de cancers et d'infections sous anti-TNF $\alpha$  et leur coût prohibitif rendent illusoire leur utilisation pour prévenir l'atrophie musculaire. Le thalidomide (un immunomodulateur) et les anti-inflammatoires non stéroïdiens ont également été évalués dans des études hétérogènes en terme de caractéristiques de patients inclus et de modalité de traitement et elles ont été généralement conduites sur de petits effectifs. Les méta-analyses de ces études ne permettent pas de conclure sur l'efficacité ou pas de ces traitements<sup>217,218</sup>. Encore une fois, les effets indésirables constituent un frein (effets tératogène et prothrombotique du thalidomide, hypersensibilité, néphrotoxicité et ulcère gastrique ou duodéal avec les anti-inflammatoires non stéroïdiens). Enfin, les acides gras omega 3 sont pourvus de propriétés anti-inflammatoires et sans effets secondaires notables<sup>219</sup>. Malgré des résultats encourageants sur la prévention de l'atrophie musculaire chez l'animal<sup>220,221</sup>, un essai clinique récent n'a pas retrouvé d'effet significatif de la supplémentation en oméga 3 sur la protéolyse et la protéosynthèse globale de patients en hémodialyse<sup>222</sup>. Cependant il faut noter que dans une étude conduite chez des patients ayant un cancer c'est l'association de plusieurs mesures (omega3, thalidomide, L-carnitine et stéroïdes)

qui a montré un effet bénéfique sur la prévention de la perte de masse musculaire alors que l'utilisation de chaque molécule séparément n'avait que peu ou pas d'effet<sup>223</sup>. Cette approche multimodale fait actuellement l'objet d'un essai clinique chez des patients hémodialysés chroniques<sup>224</sup>.

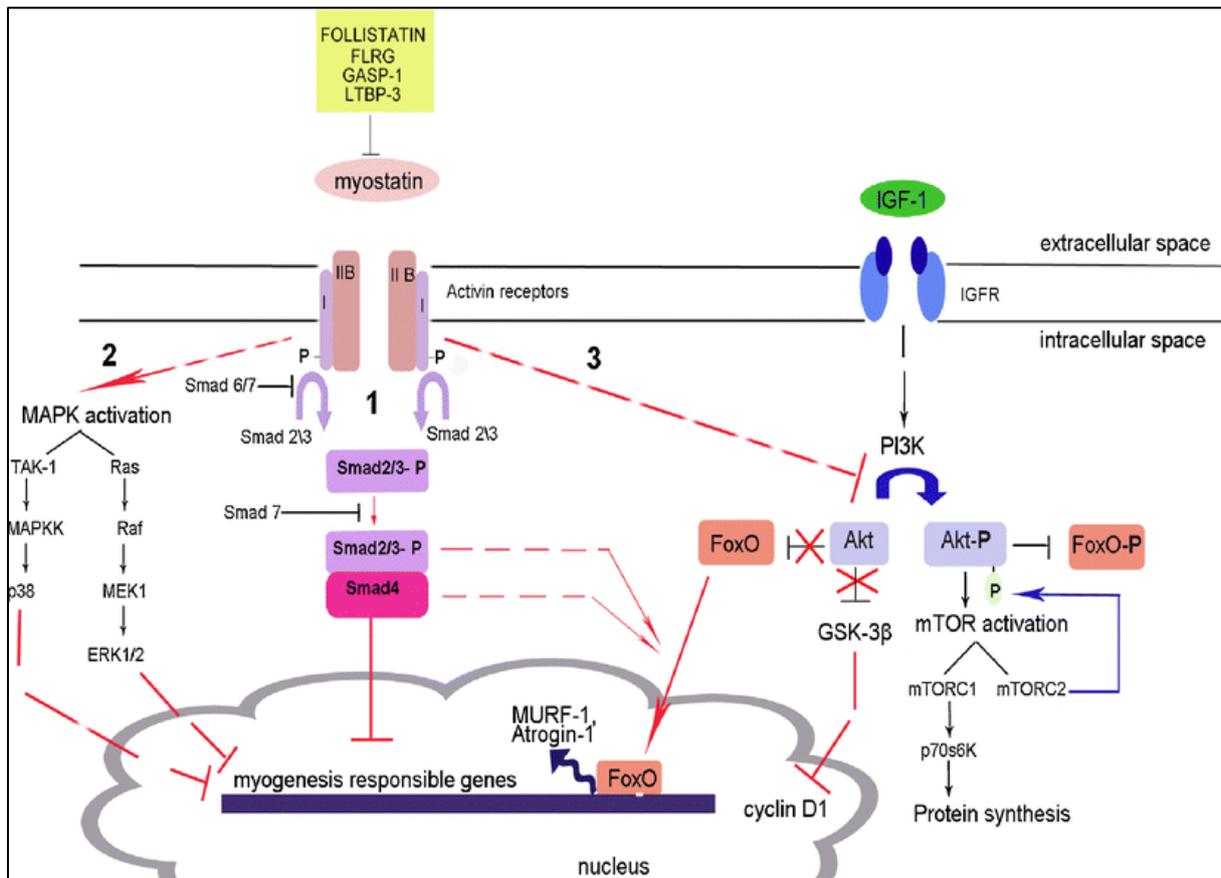


**Figure 14. Rôle de TNF $\alpha$ /IL1 et de l'E3 TRAF6 dans l'atrophie musculaire.** Les cytokines proinflammatoires TNF $\alpha$  et IL1 sont produites au cours pathologies responsables d'un état catabolique et conduisent à l'activation de l'E3 TRAF6. TRAF6 peut également être activée en cas de dénervation musculaire via TWEAK-Fn14. TRAF6 va alors stimuler plusieurs voies (NF- $\kappa$ B, JNK, p38 et AMPK) aboutissant à l'induction d'une atrophie musculaire. D'après Kumar A. et al, Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 15(3):233-9, 2012.

#### 5.3.4. Myostatine

La myostatine est une myokine sécrétée par le muscle qui régule négativement la masse musculaire. La myostatine exerce son action par l'intermédiaire de son récepteur (ActRIIb) du type récepteur aux activines, qui possède une activité protéine kinase. L'action de la myostatine est médiée par 3 voies différentes (Figure 14). La voie canonique passe par l'activation des facteurs de transcription Smad2/3 qui s'associent à Smad4 et dont la translocation dans le noyau

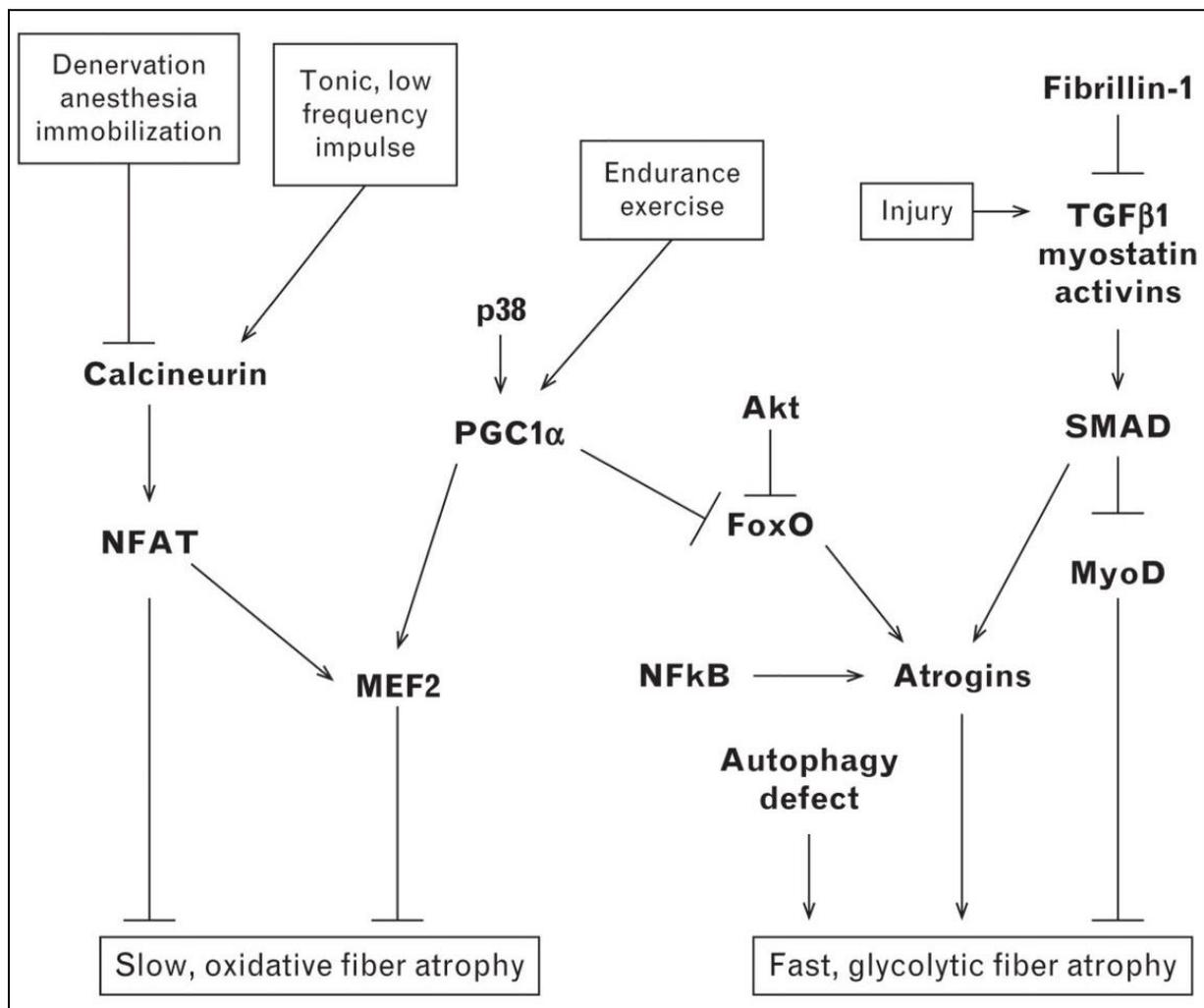
va inhiber la transcription de gènes impliqués dans la myogénèse, notamment myoD. La myostatine va également exercer son action via l'inhibition de la voie PI3K/Akt/mTORC1 et l'activation de la voie des MAPK<sup>225</sup>. Chez l'homme l'augmentation des taux de myostatine musculaire a été montrée au cours de l'IRC, sa synthèse étant stimulée par l'IL6, le TNF $\alpha$  et les glucocorticoïdes<sup>48</sup>. Son inhibition à l'aide d'anticorps monoclonaux chez des souris néphrectomisées réduit l'atrophie musculaire<sup>226</sup>.



**Figure 12. Différentes voies de signalisation de la myostatine.** → activation, -| inhibition, -- - présence d'étapes intermédiaires inconnues ou omises sur la figure. **1. Voie canonique de l'activation de Smad.** La myostatine se lie à ActRIIB et induit son assemblage avec le récepteur à l'activine de type I. La phosphorylation de Smad2/3 conduit à sa liaison avec Smad4 et à la translocation du complexe vers le noyau où il bloque la transcription des gènes responsables de la myogénèse. Smad6 et Smad7 sont en compétition pour la liaison avec le récepteur d'activine de type I. Smad7 peut également empêcher la formation du complexe Smad 2/3 et Smad4. **2. Activation des MAPK.** L'activation des MAPK utilise différentes voies: TAK-1 / MAPKK pour p38 ; MAPK ou Ras / Raf / MEK1 pour ERK1 / 2. Cela conduit au blocage des gènes responsables de la myogénèse. **3. Inhibition de la signalisation Akt.** Sous l'effet de la myostatine Akt déphosphorylé n'inhibe pas FoxO. Il conduit à l'accumulation de FoxO dans le noyau où il se lie à l'ADN et induit la transcription des E3 MURF-1 et Atrogin-1. Smad3 et Smad4 peuvent éventuellement participer à la signalisation FoxO dépendante. D'après Elkina Y. et al, J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2(3):143-151, 2011

## 6. Sensibilité des différents types de fibres à l'atrophie

Comme précisé précédemment, les muscles sont hétérogènes, que ce soit au niveau morphologique ou pour les constituants des fibres musculaires elles-mêmes. Au cours du processus d'atrophie, les différents types de fibres musculaires sont affectés de façon différente en fonction du stimulus d'atrophie. Les mécanismes en cause sont encore mal compris. Il pourrait s'agir d'une sensibilité différente des fibres à l'activation ou l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la masse musculaire<sup>146</sup>. Les fibres glycolytiques à contraction rapide sont plus vulnérables que les fibres oxydatives à contraction lente dans diverses situations pathologiques d'atrophie liées à l'activation des voies de transduction FoxO, NFκB et myostatine. Dans ces conditions, la résistance des fibres lentes oxydatives pourrait résulter de leur protection par l'expression du facteur de transcription PGC1α. En revanche les fibres lentes sont les premières touchées en cas d'inactivité physique. En effet dans cette situation les voies de la calcineurine et de PGC1α sont inhibées par l'absence de sollicitation mécanique (Figure 16)<sup>227</sup>.



**Figure 16. Voies de signalisation ciblant différemment les fibres en cas d'atrophie du muscle squelettique.** Les fibres musculaires rapides glycolytiques seraient plus sensibles aux stimuli cataboliques agissant par les voie FoxO, NFκB et la myostatine que les fibres lentes du fait d'une moindre expression basale de PGCα. Le défaut de stimulation de la voie des calcineurines et de PGCα rend, au contraire, les fibres musculaires lentes oxydatives particulièrement sensibles à l'atrophie induite par le défaut d'utilisation musculaire. D'après Wang et al, Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 16(3):243-50, 2013.

## CONCLUSIONS ET PROJET DE THESE

---

Une perte de masse musculaire complique de nombreuses situations pathologiques telles le sepsis, le cancer, l'insuffisance cardiaque et respiratoire mais aussi l'insuffisance rénale. Elle contribue au syndrome de fragilité et est associée à un risque de décès indépendant de la pathologie causale. La perte de masse musculaire est liée à un déséquilibre entre la protéosynthèse et la protéolyse musculaire. La protéolyse a un rôle prépondérant non seulement car elle est exacerbée au cours d'une atrophie musculaire mais aussi parce qu'elle contrôle l'inhibition de la synthèse. Son augmentation est retrouvée de façon constante en cas d'atrophie musculaire. Les systèmes protéolytiques UPS et de l'autophagie semblent être les principaux acteurs. Le système UPS assure la dégradation des protéines de l'appareil contractile. De plus il intervient dans le marquage de protéines ou d'organelles cellulaires (mitochondries) destinés à être dégradés par l'autophagie.

Jusqu'à présent les mécanismes conduisant à l'atrophie musculaire ont principalement été décrits sur des modèles cellulaires et animaux. Concernant l'insuffisance rénale, la plupart des études chez l'animal ont été conduites sur des rongeurs ayant subi une néphrectomie partielle. Elles ont montré le rôle important du système UPS dans l'augmentation de la protéolyse induite par l'insuffisance rénale, son activation par l'insulinorésistance, l'acidose et plus récemment la myostatine. Cependant, ces études, principalement mises en œuvre dans le laboratoire du Pr Mitch (Baylor College of Medicine, Houston), suggèrent un rôle initiateur du système protéolytique des caspases. Ceci reste à confirmer et le degré d'implication de l'UPS est encore insuffisamment étudié en particulier sur le long terme.

Les études conduites chez l'homme restent rares et parcellaires. On s'aperçoit en fait que certains traitements efficaces sur les modèles animaux s'avèrent finalement décevants chez l'homme. Ces différences pourraient s'expliquer par plusieurs hypothèses :

- La physiologie du rongeur, généralement utilisés jeunes et en croissance, est sans doute différente des patients adultes > 50 ans qui représentent la majorité des cas. Néanmoins les modèles rongeurs sont un passage obligé pour les études mécanistiques.
- Les modèles d'insuffisance rénale chez le rongeur sont généralement de courte voire très courtes (durée < 3 semaines vs plusieurs mois voire années chez l'homme)

- Les critères d'évaluation dans les modèles et chez l'homme ne sont pas toujours les mêmes. (par exemple masse musculaire mesurée directement chez l'animal et estimation par bioimpédancemétrie ou imagerie chez l'homme)
- Enfin la variabilité interindividuelle chez l'homme est plus importante que dans les modèles animaux ce qui diminue la puissance statistique des études conduites chez l'homme pour un même nombre d'individus étudiés

L'objectif de cette thèse était donc l'identification des mécanismes mis en jeu lors de l'installation d'une atrophie musculaire au cours d'une insuffisance rénale. Nous avons d'abord étudié un modèle d'insuffisance rénale induite par un néphrotoxique chez le rat. Nous nous sommes focalisés principalement sur le rôle de l'UPS dans le développement de l'atrophie musculaire. Ce modèle correspond à la mise en place d'une insuffisance rénale et à son impact à court terme sur la masse musculaire. Notre étude a ensuite portée sur des patients en insuffisance rénale terminale traités par hémodialyse, ce qui représente une situation catabolique prolongée, afin de déterminer les altérations de processus biologiques impliqués dans le programme d'atrophie musculaire au cours de l'insuffisance rénale. Il s'agit d'un préalable à la recherche de biomarqueurs diagnostiques d'un processus d'atrophie musculaire dans le sang.

# 1<sup>ER</sup> ARTICLE: UPREGULATION OF MURF1 AND MAFB PARTICIPATES TO MUSCLE WASTING UPON GENTAMICIN-INDUCED ACUTE KIDNEY INJURY

---

## Introduction

Dans un premier temps nous avons choisi d'étudier les mécanismes de l'atrophie musculaire dans un modèle d'insuffisance rénale chez le rat. Il s'agissait d'abord de confirmer l'implication du système UPS, de tester la possibilité de freiner la protéolyse musculaire en utilisant un inhibiteur du protéasome (le bortezomib) et d'identifier les substrats du protéasome comme cela avait été réalisé dans un modèle d'atrophie provoquée par l'apesanteur<sup>228</sup>. La plupart des travaux s'intéressant à l'atrophie musculaire au cours de l'insuffisance rénale (notamment ceux de l'équipe du Pr Mitch) ayant été réalisé sur un modèle de rat ayant subi une néphrectomie partielle (7/8<sup>e</sup>) c'est ce modèle qui a été initialement choisi<sup>32</sup>. Une première expérience a été préalablement réalisée par le Pr Heng sur des rats ayant subi une néphrectomie des 5/6<sup>e</sup> (laboratoire Charles River). Deux expérimentations ont été effectuées en utilisant scrupuleusement le protocole utilisé par le Pr Mitch<sup>32</sup>. Malheureusement, ces animaux n'ont développé qu'une insuffisance rénale légère insuffisante pour provoquer une acidose métabolique et une atrophie musculaire mesurable. Malgré plusieurs échanges avec le Pr Mitch nous n'avons pas pu déterminer la raison de l'absence d'acidose et d'atrophie musculaire. Nous nous sommes alors tournés vers un autre modèle reproduisant l'insuffisance rénale provoquée par l'administration répétée de fortes doses d'un antibiotique néphrotoxique : la gentamicine<sup>229</sup>. Les résultats obtenus avec la dose classiquement utilisée dans la littérature se sont avérés décevants. La posologie a donc été augmentée et a permis de provoquer une insuffisance rénale, une acidose et une atrophie musculaire. Dans ce premier travail nous avons étudié l'impact d'une insuffisance rénale sur l'expression de différentes E3 musculaires. En parallèle nous nous sommes intéressés à la voie de signalisation PI3K/Akt /mTORC1 et myostatine connues pour réguler l'expression de MuRF1 et MAFb



Contents lists available at ScienceDirect

# The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biocel](http://www.elsevier.com/locate/biocel)

## Upregulation of MuRF1 and MAFbx participates to muscle wasting upon gentamicin-induced acute kidney injury



Julien Aniort<sup>a,b,c</sup>, Cécile Polge<sup>a,b</sup>, Agnès Claustre<sup>a,b</sup>, Lydie Combaret<sup>a,b</sup>, Daniel Béchet<sup>a,b</sup>, Didier Attaix<sup>a,b</sup>, Anne-Elisabeth Heng<sup>a,b,c</sup>, Daniel Taillandier<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1019, Unité de Nutrition Humaine (UNH), Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CNRH) Auvergne, Clermont-Ferrand, France

<sup>b</sup> Clermont Université, Université d'Auvergne, UNH, BP 10448, Clermont-Ferrand, France

<sup>c</sup> Service de Néphrologie Réanimation Médicale, Pôle Respiratoire, Endocrinologie-Diabétologie, Urologie, Néphrologie-Dialyse, Nutrition Clinique, Infectiologie, Réanimation Médicale, Hygiène Hospitalière (REUNNIRH), Clermont-Ferrand, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 16 December 2015

Received in revised form 14 April 2016

Accepted 15 April 2016

Available online 19 April 2016

#### Keywords:

Muscle wasting

Acute kidney injury

Ubiquitin-proteasome system

MuRF1

MAFbx

### ABSTRACT

Acute Kidney Injury (AKI) is frequently encountered in hospitalized patients where it is associated with increased mortality and morbidity notably affecting muscle wasting. Increased protein degradation has been shown to be the main actor of AKI-induced muscle atrophy, but the proteolytic pathways involved are poorly known. The Ubiquitin Proteasome System (UPS) is almost systematically activated in various catabolic situations, and the E3 ligases MuRF1 and MAFbx are generally up regulated in atrophying muscles. We hypothesized that the UPS may be one of the main actors in catabolic skeletal muscles from AKI animals. We used gentamicin-induced acute kidney disease (G-AKI) in rats fed a high protein diet to promote acidosis. We first addressed the impact of G-AKI in the development of mild catabolic conditions. We found that both muscle atrophy and UPS activation were induced with the development of G-AKI. In addition, the phasic muscles were more sensitive to 7-days G-AKI (−11 to −17%,  $P < 0.05$ ) than the antigravity soleus muscle (−11%, NS), indicating a differential impact of AKI in the musculature. We observed an increased expression of the muscle-specific E3 ligases MuRF1 and MAFbx in phasic muscles that was highly correlated to the G-AKI severity ( $R^2 = 0.64$ ,  $P < 0.01$  and  $R^2 = 0.71$ ,  $P < 0.005$  respectively). Conversely, we observed no variation in the expression of three other E3 ligases (Nedd4, Trim32 and Fbxo30/MUSA1). Altogether, our data indicate that MuRF1 and MAFbx are sensitive markers and potential targets to prevent muscle atrophy during G-AKI.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mortality remains high in acute kidney injury failure (AKI) despite different support strategies. Even a moderate acute renal failure, which is the majority of medical cases, is associated with increased mortality (Chertow et al., 2005). This has recently led to the revised definition of AKI (Acute Kidney Injury Work Group,

2012). AKI patients exhibit negative nitrogen balance linked to an increased protein catabolism. Different factors are responsible for the development of a hyper catabolism in AKI patients, like insulin resistance, circulation of inflammatory cytokines, acidosis, increased secretion of catabolic hormones, and inadequate delivery of nutritional substrates. Nitrogen loss induces a marked decrease in lean body mass in AKI patients and is associated with impaired protein metabolism, gluconeogenesis and changes in amino acid metabolism, which complicates nutritional intervention (Lee et al., 2004; Druml, 2005).

In uremic rats, increased protein and branched chain amino acids degradation and little or no variation of protein synthesis have been observed (Clark and Mitch, 1983; Flugel-Link et al., 1983 and Price et al., 1998). However, these studies were carried out using nephrectomized rats, animals were used 30–48 h after surgery with both food and water being removed at least 4 h before experiments. Surgery-linked stress may have impacted the

*Abbreviations:* UPS, ubiquitin proteasome system; AKI, acute kidney injury; ATN, acute tubular necrosis; CKD, chronic kidney disease; MuRF1, muscle ring finger protein-1; MAFbx, muscle atrophy F-box protein; MUSA1, muscle ubiquitin ligase of the SCF complex in atrophy-1; Nedd4, neuronally expressed developmentally down-regulated 4 protein; Trim32, tripartite motif-containing protein 32; Ub, ubiquitin; EDL, extensor digitorum longus; TGF, transforming growth factor.

\* Corresponding author at: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche (UMR) 1019, Unité de Nutrition Humaine (UNH), Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CNRH) Auvergne, Clermont-Ferrand, France.

E-mail address: [daniel.taillandier@clermont.inra.fr](mailto:daniel.taillandier@clermont.inra.fr) (D. Taillandier).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.04.006>

1357-2725/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

conclusions, as protein degradation is sensitive to both stress and trauma (Baliga and Shah, 1991 and Lecker et al., 2006). By contrast, few studies addressed the mechanisms of muscle protein wasting upon AKI from acute tubular necrosis (ATN). In human, ATN from toxic exposure, notably of aminoglycosides such as gentamicin, is one of the most frequent causes of AKI. A single study used a treatment of gentamicin (7 days) to induce G-AKI in rats and showed that muscle protein degradation was increased upon G-AKI in incubated epitrochlearis muscle with no significant variation in protein synthesis (Baliga and Shah, 1991).

Upon 7/8 nephrectomy, the caspases and ubiquitin proteasome system (UPS) are the main proteolytic systems activated in rat skeletal muscles (Du et al., 2004; Workeneh et al., 2006). The relative importance of each pathway in renal failure-linked muscle wasting is not fully understood, but the UPS is known for being the main actor of skeletal muscle catabolism in most catabolic situations (Temparis et al., 1994; Taillandier et al., 1996a,b; Bodine et al., 2001; Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007; Heng et al., 2008; Polge et al., 2011). The UPS is a highly sophisticated pathway involving hundreds of proteins that controls most cellular pathway [see (Ciechanover and Stanhill, 2014) for a recent review]. The target proteins are labeled with a ubiquitin chain by an enzymatic cascade. The small protein ubiquitin is activated by an E1, transferred onto one of the 35 ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and covalently linked to the substrate recognized by one of the numerous E3 ligases (>600). The E2 and E3 enzymes define the specificity and allow the UPS to potentially target any cellular protein (Ravid and Hochstrasser, 2008 and Polge et al., 2015). Indeed, the muscle-specific E3 ligases MuRF1 and MAFbx were reported to be upregulated in tens multiple catabolic models (see Bodine and Baehr, 2014 for a review) but other E3 ligases like Nedd4 and fbxo30/MUSA1 are also important regulators of muscle atrophy in denervated muscles (Nagpal et al., 2012; Sartori et al., 2013). However, the ubiquitous upregulation of the latter in other catabolic situations still needs to be investigated. Amongst these E3 ligases, MuRF1 is the only one that targets the main contractile proteins actin, myosin and troponin I for subsequent degradation by the UPS (Kedar et al., 2004; Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007; Polge et al., 2011). We previously demonstrated that telethonin, a small sarcomeric protein implicated in sarcomere stability, is also an UPS substrate during severe atrophying situations and others found that it may interact with MuRF1 (Heng et al., 2008; Witt et al., 2008). This suggests that the UPS may be implicated in the degradation of most, if not all, sarcomeric proteins, with MuRF1 as a key player.

By contrast with renal failure caused by partial nephrectomy, the mechanism of skeletal muscle protein wasting has not been evaluated in an acute tubular necrosis model despite its high negative impact in patients. Thus, the goal of our study was to determine whether the UPS is activated during toxic G-AKI-linked muscle wasting. Using a rodent model of toxic acute tubular necrosis (G-AKI), we obtained a moderate catabolic situation in which we mainly focused on the potential activation of muscle atrophy-linked E3 ligases as they may represent early and sensitive markers of UPS activation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Antibody recognizing polyubiquitin (polyUb) chains was from Millipore (clone FK1, Millipore, Darmstadt, Germany). Anti-telethonin and anti-MuRF1 antibodies were from SantaCruz (SantaCruz Biotechnology, CA, USA) and anti-MAFbx was from ECMBiosciences (Versailles, KY, USA), anti-phospho AKT, anti-AKT, anti-phospho p70 S6 kinase, anti p70 S6 kinase, anti-phospho S6

**Table 1**

Muscle weight and biochemical data from control (CT) and gentamicin-induced kidney injury (G-AKI) animals.

	CT	G-AKI
Urea (mmol/l)	7.1 ± 3	58 ± 30*
Creatinin (μmol/l)	23 ± 3.4	135 ± 89*
Bicarbonate (mmol/l)	27 ± 4	20 ± 3*
Weight increase, D7-14 (g)	24 ± 10	6.5 ± 5*
Soleus		
Muscle mass, mg	87 ± 9	78 ± 11
Muscle wt per whole body wt, mg/100 g	43 ± 1.3	41 ± 1.6
EDL		
Muscle mass, mg	104 ± 8	89 ± 4*
Muscle wt per whole body wt, mg/100 g	48 ± 3	45 ± 1*
Tibialis anterior		
Muscle mass, mg	404 ± 35	364 ± 15*
Muscle wt per whole body wt, mg/100 g	188 ± 11	183 ± 10
Gastrocnemius		
Muscle mass, mg	1280 ± 94	1142 ± 57*
Muscle wt per whole body wt, mg/100 g	597 ± 26	574 ± 22

Weight increase of animals was determined between day 7 and 14 (D7-14), i.e. when saline (CT) or gentamicin (120 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) were injected; EDL, extensor digitorum longus; Values are means ± SE, n = 4-6; \*p < 0.05 vs. control (CT).

and anti-S6 were from Cell Signaling (Cell Signaling technology, MA, USA). Fluorescent secondary antibodies were from ScienceTec (ScienceTec, Courtaboeuf, France) and detection was performed using a Li-COR Odyssey Imager (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Membrane loading was determined using Blot-FastStain (G-Biosciences). Densitometric analysis of images was performed using ImageJ v. 1.47 software. Oligonucleotides for amplifying cDNAs encoding for MAFbx, MuRF1, Nedd4, Fbxo30/MUSA1 and Trim32, YWHAZ, HPRT1 and 36B4 were designed using Primer3 software and purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). (see Suppl. Table 1 for primers in the online version at DOI: 10.1016/j.biocel.2016.04.006).

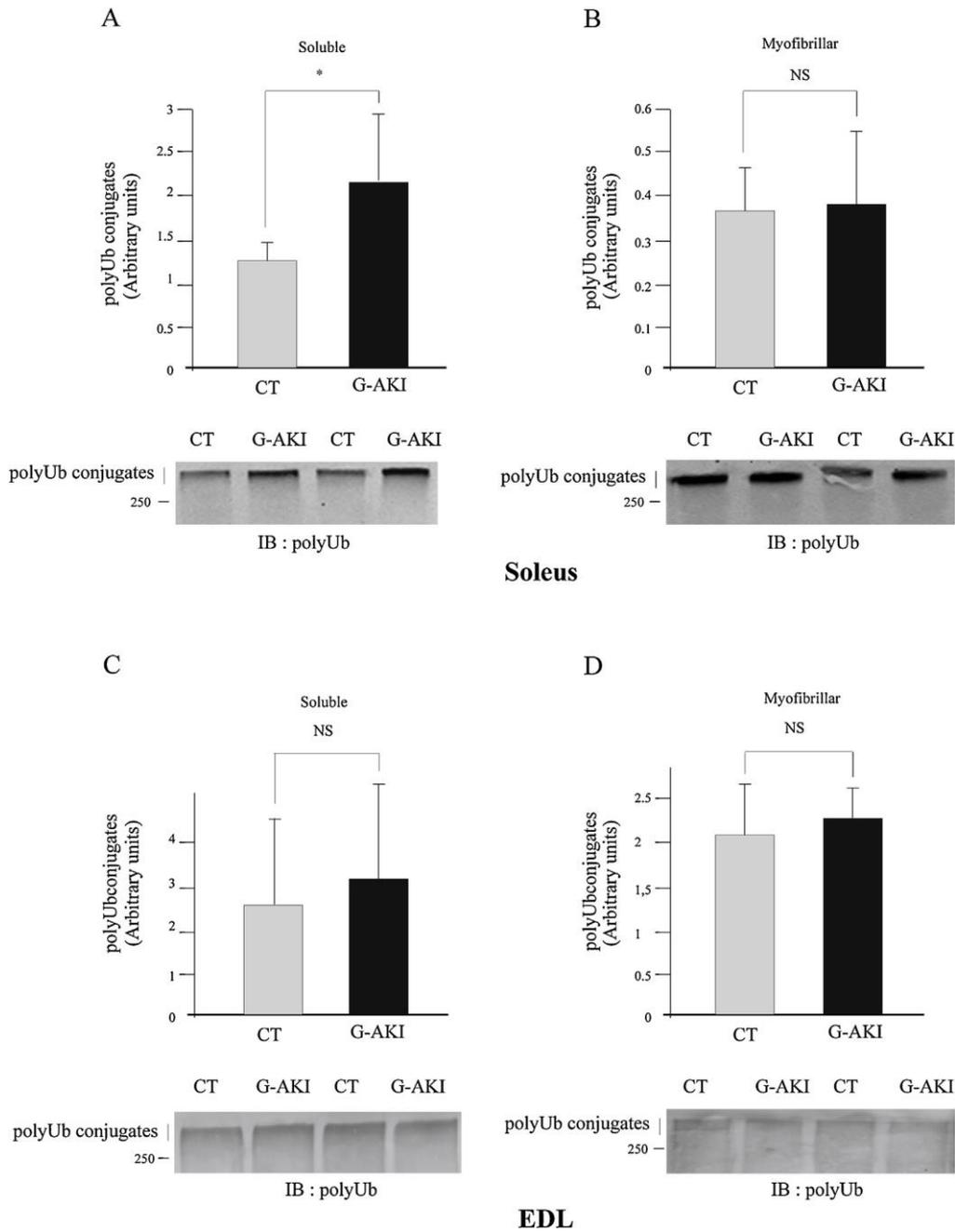
### 2.2. Animals

The experiments were conducted in accordance with the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All animals were maintained in a temperature-controlled room (22 ± 1°C) with a 12:12 h light:dark cycle. Acute tubular necrosis (ATN) was induced in rats by subcutaneous injection of gentamicin (aminoglycoside) at a dose of 120 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Baliga and Shah, 1991).

Six-week-old rats were acclimatized with a normal protein diet (NP diet) ad libitum for 7 days, and then with a high protein diet (HP diet) containing 46% protein for 7 more days. Animals were randomly separated into 2 groups (n = 6 per group). One group was injected subcutaneously daily with gentamicin for 7 days (concomitant to HP diet) to induce acute kidney injury (G-AKI group), while the control group (CT) received the same amount of 0.9% sodium chloride (normal saline). G-AKI animals were fed ad libitum and controls were pair-fed accordingly.

### 2.3. Muscle and sampling extraction

Rats were fasted the night before sacrifice to avoid the variability in protein metabolism that could end up with differential food absorption. Animals were anesthetized and venous blood was collected to determine serum urea, creatinine and bicarbonate. Skeletal muscles (Tibialis Anterior, Extensor Digitorum Longus [EDL], Gastrocnemius and Soleus) were removed and immediately frozen in liquid nitrogen and rats were sacrificed by exsanguination and cutting the diaphragm.



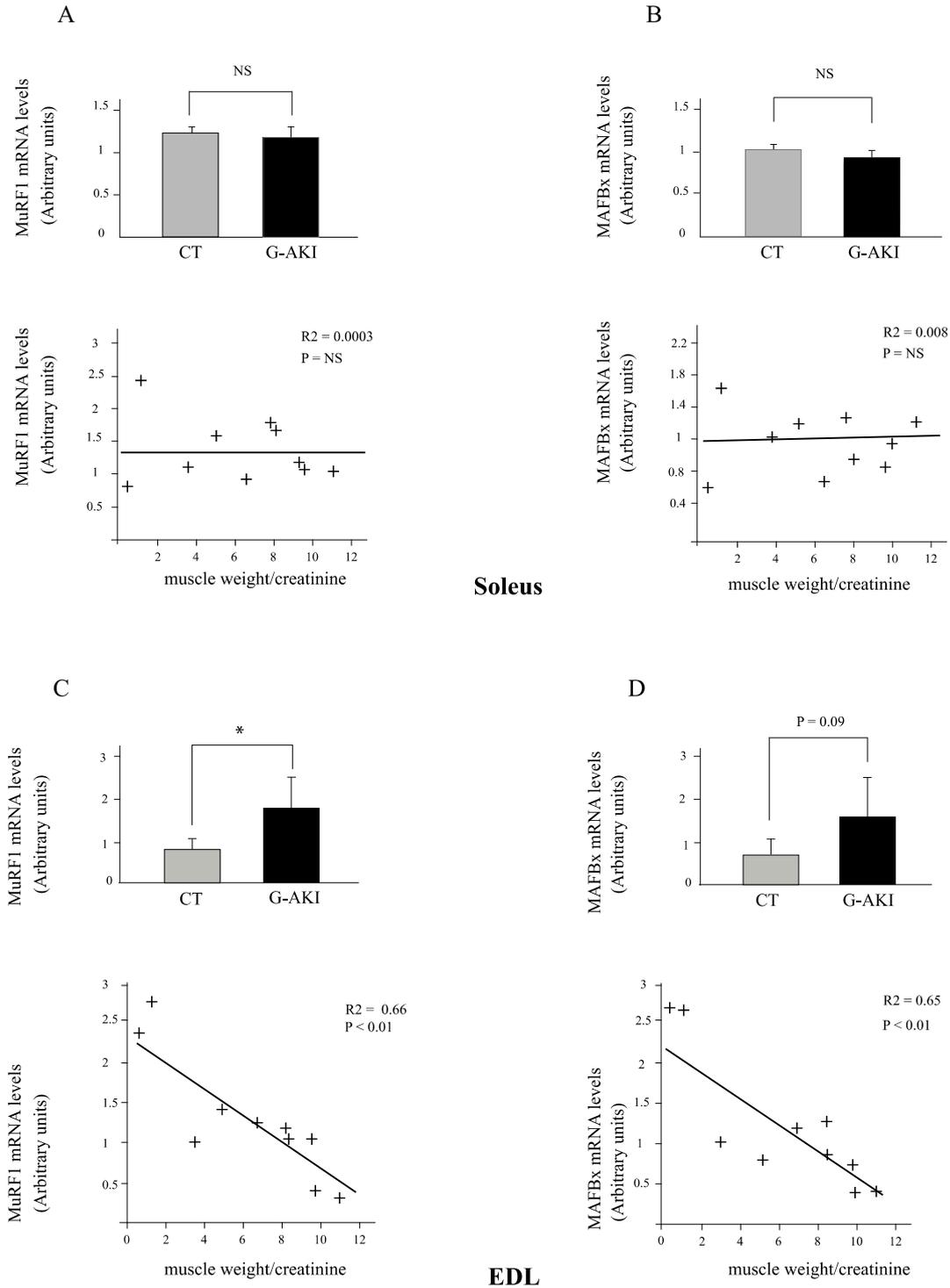
**Fig. 1.** PolyUb conjugates accumulate in the soleus muscle from G-AKI rats.

Muscles were homogenized in Lysis Buffer (see methods section). The soluble and the myofibrillar-enriched fractions were obtained by centrifugations and immunoblotting was performed using the anti-polyUb antibody (FK1). Soluble (A) and myofibrillar enriched fractions (B) of the soleus and the EDL (C and D) muscles were assayed and increased polyUb conjugates was detected in the soluble fraction of the soleus muscle. Data are expressed as means  $\pm$  SE for  $n = 5-6$  rats. \*Significantly different from control animals,  $P < 0.05$ .

#### 2.4. Immunoblotting

Skeletal muscles from the right leg were homogenized in 8 ml of lysis buffer [50 mM MOPS pH 7.5, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (10  $\mu$ l/ml of lysis buffer) (Sigma, St Louis, MO, USA), NEM 10 mM, Triton X100 1%] for 100 mg of

muscle. Muscle homogenates were centrifuged at 16,000g (4C, 10 min). The supernatant (soluble fraction) was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until used. The pellets (myofibrillar-enriched fraction) were resuspended in lysis buffer (4 ml/100 mg muscle) and homogenized by sonication. Protein concentration was measured by absorption



**Fig. 2.** mRNA levels from muscle specific E3 ligases increase in G-AKI rats.

Total mRNA from the Soleus (A,B) and EDL (C,D) muscles of control (CT) and acute kidney disease (G-AKI) animals were purified, and qRT-PCR was performed as described in the methods section for MAFBx (A,C upper panels) and MURF1 (B,D upper panels) E3 ligases. MAFBx and MuRF1 were overexpressed during G-AKI in the EDL (C, D) although it was only significant for MAFBx when correlated to creatinin levels. Expression levels of other E3 ligases potentially involved in the atrophy program were performed (E–J) using qRT-PCR. By contrast with MuRF1 and MAFBx, Nedd4, Fbxo30 ( $P = 0.07$ ) and Trim32 mRNA levels were depressed in the EDL muscle from G-AKI rats. No variation was detected in the soleus muscle for these E3 ligases. Data are expressed as means  $\pm$  SE for  $n = 5–6$  rats. Individual qRT-PCR values are also plotted against the muscle mass/creatinine ratio (A–D, lower panels), which showed a good correlation between renal function and E3 ligases mRNA levels. Linear regression was performed using the least square method and significance was tested using a 1 factor ANOVA (A, B, C, D lower panels). \*Significantly different from control animals,  $P < 0.05$ .

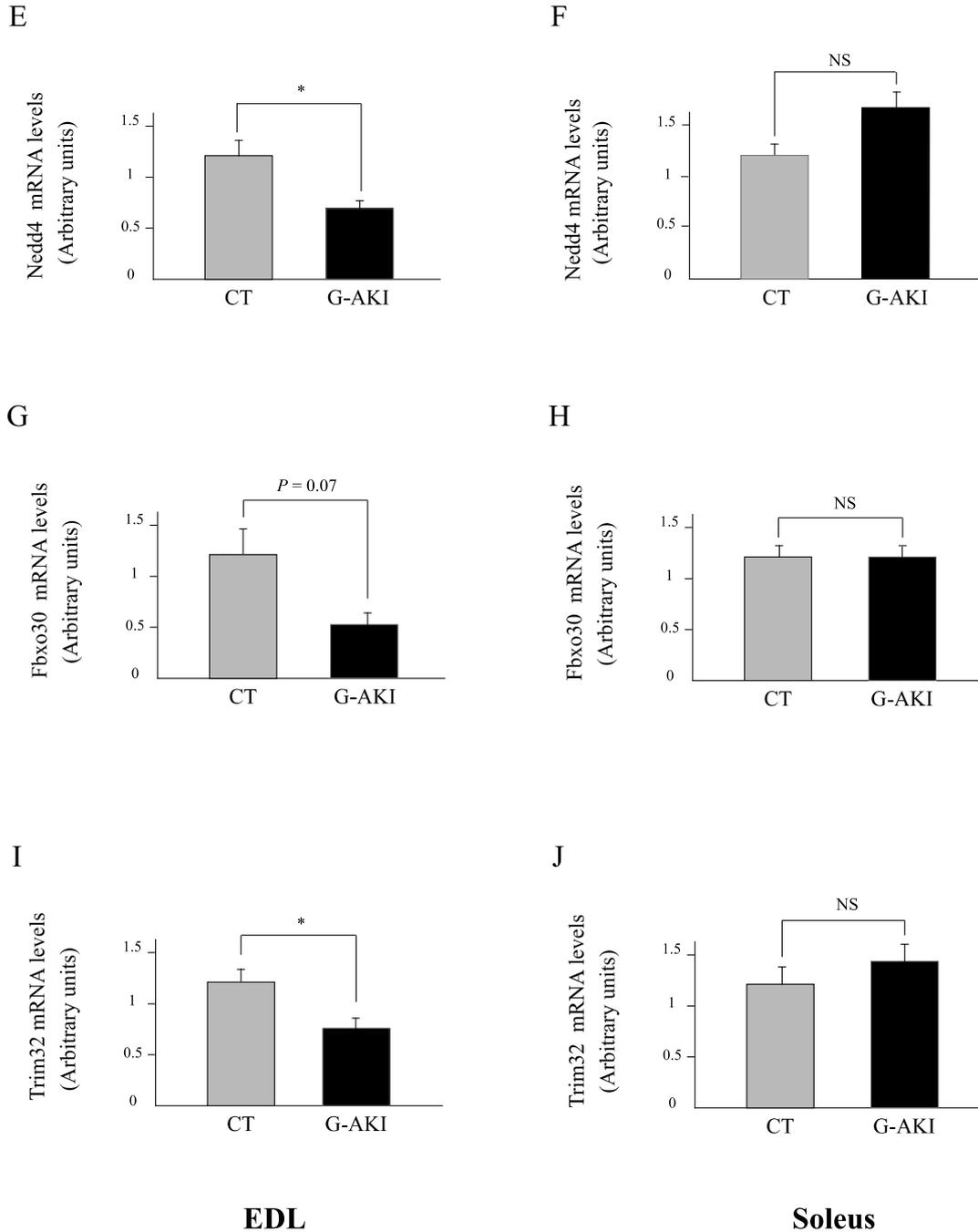
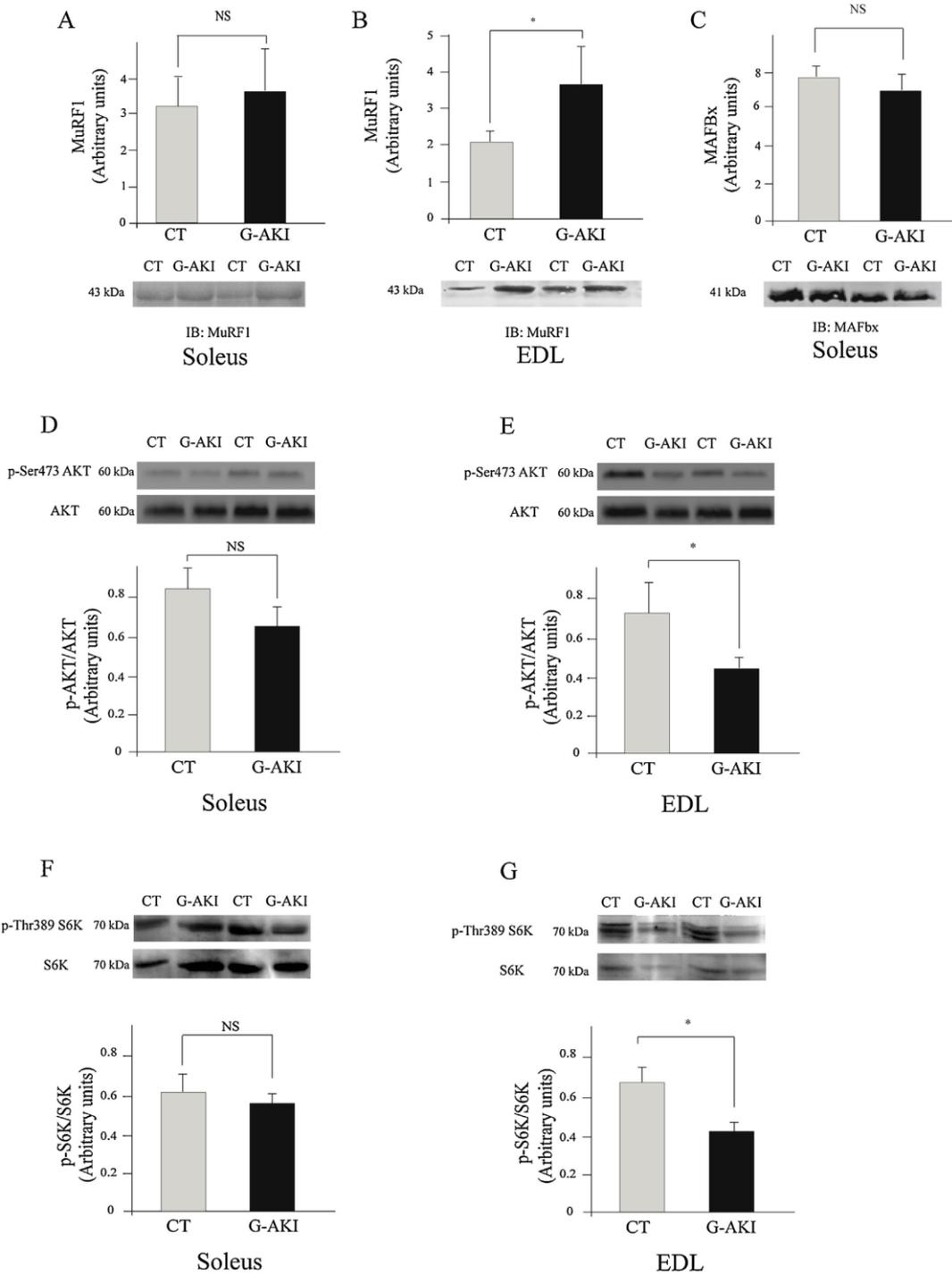


Fig. 2. (Continued)

spectrophotometry (OD 562 nm) using the BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA)

Proteins were separated on SDS-PAGE and then transferred onto a nitrocellulose membrane (ScienceTec, Courtaboeuf, France) using a liquid transfer system (BIORAD, Hercules, CA, USA). The transfer of free and polyubiquitin-conjugated telethonin was conducted in two steps. The nitrocellulose membrane was cut into

two pieces and transfer was performed first at low voltage (30 V), 4 h at 4 °C. The piece of membrane containing the low molecular weight proteins was removed and soaked in 1 × PBS buffer. SDS (0.05%) was then added to the transfer buffer and transfer was then continued at 400 mA overnight for the high molecular weight proteins. Immunoblotting was performed using fluorescent antibodies and signals were detected with a LI-COR® Odyssey®



**Fig. 3.** E3 ligases and the mTOR-Akt axis respond differentially at the protein level in the EDL and soleus muscles upon G-AKI. Muscles were homogenized in lysis buffer (see methods section) and immunoblotting was performed using anti MuRF1 (A, B) or anti MAFbx (C) anti p-Akt and anti Akt (D, E), anti p-S6K and S6K (F, G) and p-S6 and S6 (H, I) antibodies. Only MuRF1 was significantly over expressed in the EDL muscle. p-Akt/Akt and p-S6K/S6K were only decreased in EDL muscle of G-AKI rats. Data are expressed as means  $\pm$  SE for n = 5–6 rats. \*Significantly different from control animals,  $P < 0.05$ .

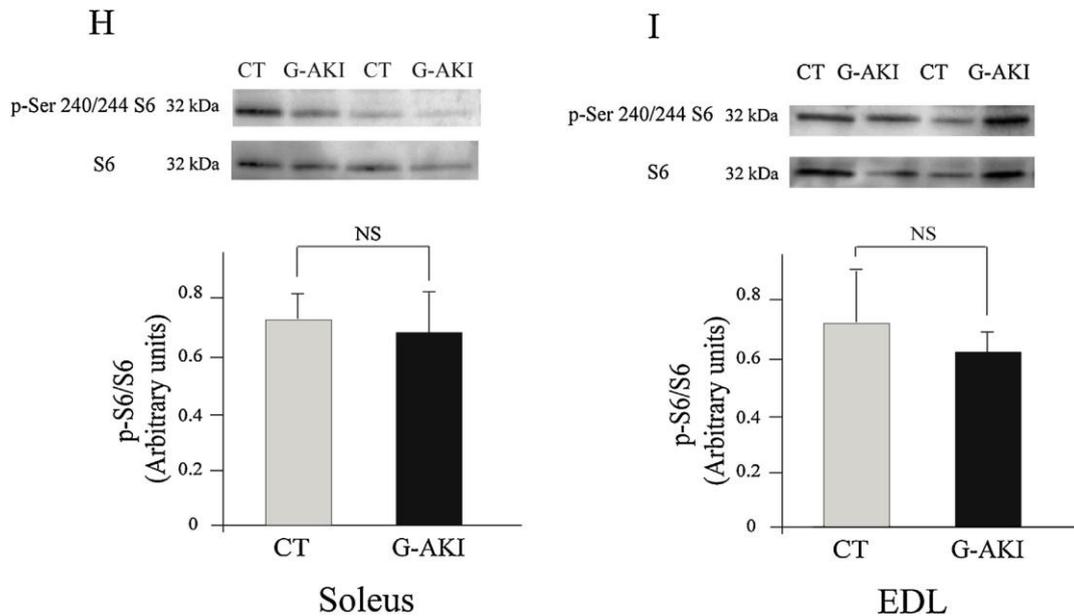


Fig. 3. (Continued)

Imager (ScienceTec, Courtaboeuf, France) following manufacturer's instructions. Normalization for correcting uneven loading was performed by densitometric analysis of stained blots using Blot-Faststain.

### 2.5. qRT-PCR

mRNA levels of muscle specific E3 ligases (MuRF1,MAFbx, Nedd4, Fbxo30/MUSA1 and Trim32) were determined by quantitative RT-PCR. Reverse transcription of total RNA into DNA was performed using the QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription kit (Qiagen<sup>®</sup>). qPCR was performed using the FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche), according to the manufacturer's instructions using a CFX96 thermocycler (BIORAD, Hercules, CA, USA). Calculations were made using the comparative  $\Delta$ Ct method with YWHAZ, HPRT1 and 3684 housekeeping genes

### 2.6. Statistical analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SE. Statistical analysis was performed using XLSTAT v9.1 software (Addinsoft<sup>®</sup>). Comparisons between the groups were performed using a two sided Student unpaired *t*-test or the Mann-Whitney test for quantitative parameters (homoscedasticity verified using Fisher-Snedecor test). A linear regression was performed for E3 ligases mRNA levels using the least squares method and statistical significance was calculated using a one-way ANOVA. Pearson correlation coefficient was used to assess linear dependence between the variable "muscle mass (creatinine)".

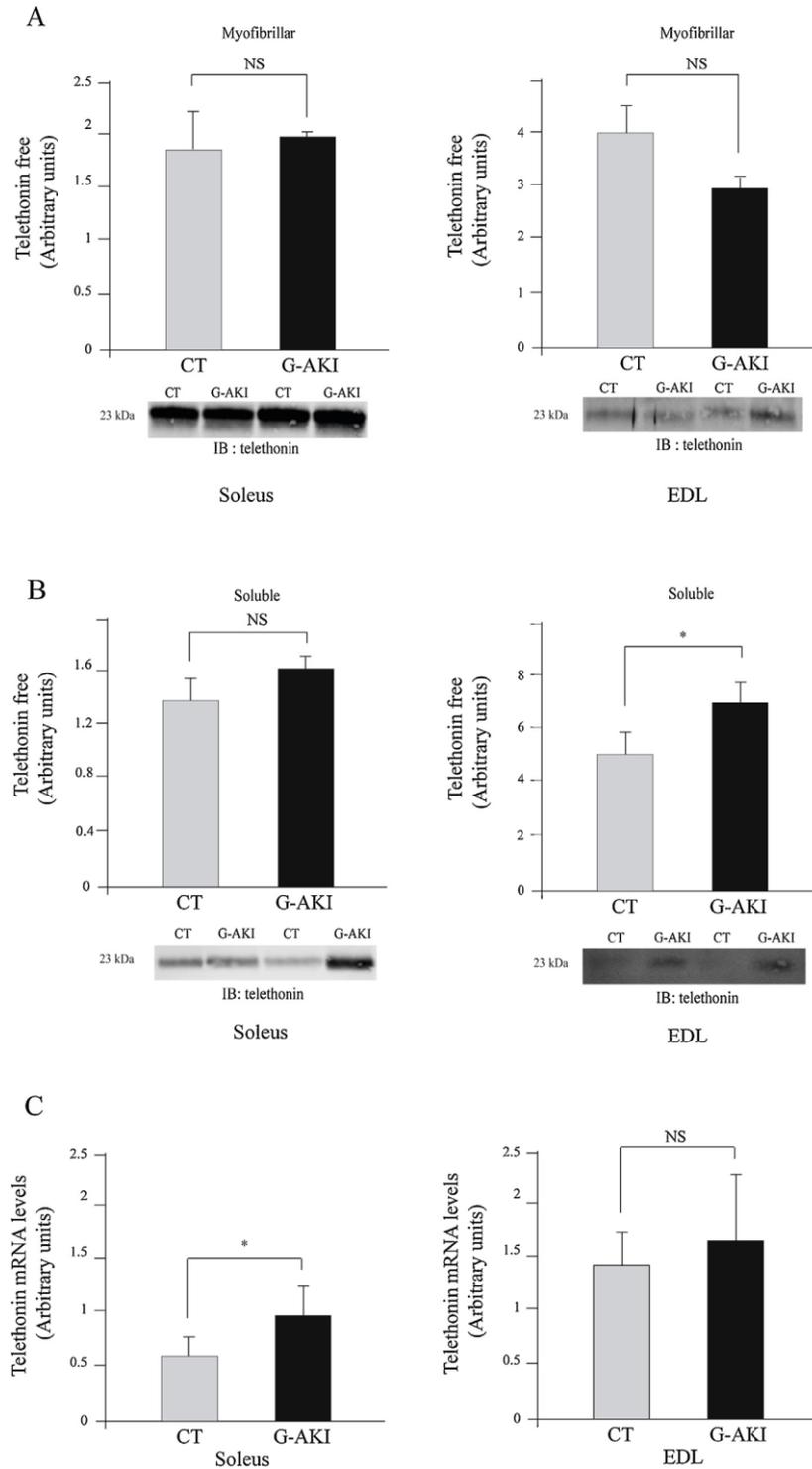
## 3. Results and discussion

Chronic kidney disease (CKD) and acute kidney injury (AKI) have in common the impairment of renal function and are thought to induce skeletal muscle wasting followed by increased morbidity and mortality. In humans, moderate AKI reflects the majority of the cases but it is nonetheless deleterious for health and the precise mechanisms involved are still poorly understood. Recent data

showed that AKI induced an increased protein degradation that was mainly explained by an activation of the UPS and the caspase proteolytic pathways (Wang et al., 2014). Thus, the main goal of our study was to determine the involvement of the UPS in rats submitted to moderate AKI in the development of muscle wasting.

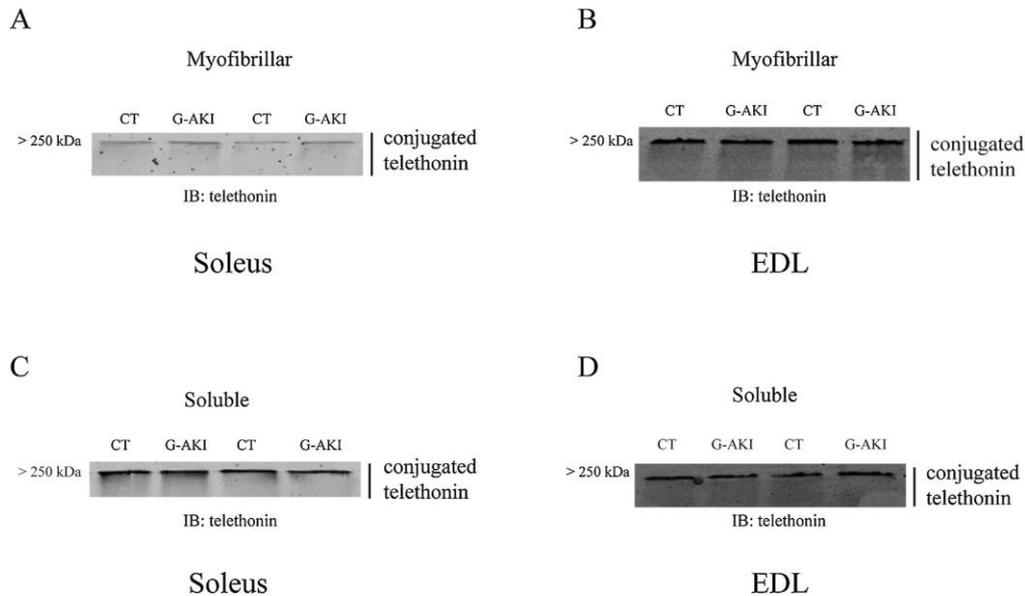
### 3.1. Induction of moderate AKI by gentamicin injection

We induced G-AKI in rats by injecting a dose of 120 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> of gentamicin known to cause acute tubular necrosis (ATN). As expected, we found a marked elevation of urea (about 8 times higher,  $P < 0.01$ ) compared to controls (CT) together with increased creatinine levels (>5 times) in gentamicin induced AKI animals (Table 1), but 2 times less than in a previously published report (Baliga and Shah, 1991). Therefore, our model induced an efficient, although moderate renal failure. We also observed a mild but significant metabolic acidosis witnessed by a 25% decrease ( $P < 0.05$ ) of serum bicarbonate levels in G-AKI animals when compared to CT (Table 1). While growth rate decreased ( $-63\%$ , Table 1), skeletal muscle weights of G-AKI rats were mildly impacted when compared to controls ( $-10$  to  $-15\%$ ,  $P < 0.05$  for phasic muscles). This is in agreement with a moderate and progressive developing atrophy close to what can be observed in human. G-AKI caused by ATN impacted more phasic muscles and the EDL exhibited a significant although mild atrophy as indicated by depressed muscle/whole body ratio (relative weight,  $-7\%$ ,  $P < 0.05$ ), which means this muscle was more sensitive to G-AKI (Table 1). Gentamicin-injected rats decreased spontaneously their food intake, but impaired growth rate and muscle loss were not due to lower food intake as control rats were pair-fed with G-AKI animals. Muscle protein concentration was not modified between G-AKI and control animals in either the soluble or the myofibrillar compartments, and actin and myosin levels, *i.e.* their relative abundance, were similar in both groups (not shown). This is in agreement with different catabolic states (unweighting, sepsis, cancer) in which protein losses from different compartments (soluble, myofibrillar) paralleled total muscle wasting (Taillandier et al., 1996a,b; Attaix et al., 2005 and unpublished data). In addition, differential actin and myosin losses are



**Fig. 4.** Telethonin is upregulated during G-AKI.

The UPS substrate telethonin was addressed at the protein. A, immunoblotting was performed in the myofibrillar fraction of the soleus and EDL muscles. B, telethonin is also present in the soluble fraction of the EDL but was below detection levels in the soleus muscle (not shown). In the EDL, telethonin present in the soluble fraction was increased at the protein level. Data are expressed as means  $\pm$  SE for n = 5–6 rats. \*Significantly different from control animals, P < 0.05. C, telethonin mRNA levels were determined by qRT-PCR as described in the methods section. Telethonin mRNA levels were increased in the soleus muscle.



**Fig. 5.** Poly-Ub telethonin levels are similar in control and G-AKI rats. Immunoblotting was performed with the anti-telethonin antibody using the myofibrillar (A, B) and the soluble (C, D) fractions of the soleus and EDL muscles. High molecular weight poly-Ub telethonin was detected as a smear in the very high molecular weight region; short-term exposure is shown (see (Heng et al., 2008) for detailed methodology). No variation was observed upon G-AKI treatment.

only detectable in strong catabolic situations in cultured myotubes and in skeletal muscle (Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007; Polge et al., 2011).

Altogether, our model induced a mild acidosis and a moderate muscle loss, which is suitable for identifying sensitive markers of muscle atrophy and is also more representative of human pathology.

### 3.2. Activation of the UPS system

We chose a short-term (7 days) experiment for investigating early events that induce muscle protein breakdown upon G-AKI. In this work, we did not address proteasome activity as (i) this does not discern between contractile and global activity of degradation and (ii) proteasome activities (trypsin and chymotrypsin-like) do not correlate with ubiquitin-protein ligation rate activity in cells and organs (Patel and Majetschak, 2007; Besche et al., 2014).

#### 3.2.1. Accumulation of UPS substrates

The UPS is the main actor of muscle loss during several catabolic situations but this remains to be established in G-AKI (Fukasawa, 2012). Skeletal muscle protein wasting in nephrectomised rats is mainly due to an activation of the UPS and includes accumulation of proteasome substrates (polyUb conjugates), increased expression of muscle-specific E3 ligases (MAFbx and MuRF1) and proteasome subunits (Lecker et al., 2004; Lee et al., 2004). We thus addressed its implication in our model starting by the proteasome targets, i.e. the polyUb conjugates. We used both the soleus and the EDL for all subsequent determinations as they behaved differentially upon G-AKI and they represent antigravity and action muscles respectively. We determined polyUb conjugates levels in both the soluble and the myofibrillar-enriched fraction as they represent different pools of muscular proteins. PolyUb conjugates appeared as a smear in the high molecular weight region (>250 kDa) of the membranes, in agreement with previous data (Ventadour et al., 2007). It should be noticed that lower molecular weights Ub conjugates (<200 kDa)

are mainly monoUb conjugates (not detected with our antibody) and are not proteasome substrates. In this study, no accumulation of polyUb conjugates was observed in the myofibrillar compartments of both the soleus and the EDL muscle from G-AKI animals (Fig. 1B–D), which is in agreement with the mild impact of G-AKI in the whole musculature. Surprisingly, an accumulation of polyUb conjugates occurred in the soluble fraction of the soleus muscle (Fig. 1A), i.e. the only muscle not impacted by G-AKI. The soleus muscle is sensitive to nutritional status and some atrophying stimuli (e.g. unloading) that can deeply modify the enzymatic profile of this muscle (Taillandier et al., 1993; Taillandier et al., 1996a,b). This suggests that this peculiar muscle type (antigravity/postural muscle) underwent metabolic modifications upon G-AKI without any detectable impact on protein content.

#### 3.2.2. Up regulation of MuRF1 and MAFbx E3 ligases

As polyUb conjugates accumulate only when the proteasome is overloaded, we anticipated that a mild catabolic situation like moderate acidosis-linked G-AKI would have tenuous effects on proteasome substrates accumulation. We thus hypothesized that enzymes responsible for substrates targeting might be more sensitive markers. The E3 ligases are key components of the UPS that recognize the proteins to be degraded. The muscle-specific E3 ligases MuRF1 and MAFbx are particularly responsive to catabolic situations at the mRNA and/or protein levels (Bodine et al., 2001; Kedar et al., 2004; Lecker et al., 2004; Heng et al., 2008; Polge et al., 2011) and they are up regulated in nearly all the catabolic models tested (Bodine and Baehr, 2014). MAFbx mainly controls transcription and translation factors such as MyoD and eIF3-f and participates to the atrophying program by controlling negatively protein synthesis (Lagrand-Cantaloube et al., 2008, 2009). By contrast, MuRF1 is known for its targeting activity against sarcomeric proteins such as actin, myosins and troponin I (Kedar et al., 2004; Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007; Polge et al., 2011). In the soleus muscle, both MAFbx and MuRF1 transcripts levels were not modified in G-AKI animals compared to CT (Fig. 2A and B,

upper panels). As expected for a muscle losing weight, we observed increased MAFbx and MuRF1 mRNA levels in the EDL muscle from AKI animals. However, it did not reach significance for MAFbx ( $P=0.09$ ) and was barely significant for MuRF1 ( $+90\%$ ,  $p<0.05$ ). We found substantial variability for different parameters (urea, creatinine, see Table 1) that indicates different G-AKI severities between animals in response to the injection of gentamicin. We thus hypothesized that G-AKI might be considered as a continuous variable when appreciating the induction of the UPS in G-AKI animals. In humans, the severity of AKI is estimated by the increase in serum creatinine levels over basal value (Acute Kidney Injury Work Group, 2012). Assuming that basal creatinine was similar for all the rats, we used serum creatinine levels after 7 day of experiment for assessing the severity of G-AKI. As creatinine concentration is also affected by muscle production, creatinine levels were adjusted using muscle mass. For calculations, we used the masses of the four skeletal muscles studied that reflected whole body musculature. No correlation was observed for the soleus muscle when MAFbx and MuRF1 mRNA levels were expressed as a linear function of muscle mass/creatinine ratio, i.e. a witness of G-AKI severity (Fig. 2A and B lower panels). By contrast with the soleus muscle, a good correlation was observed between the severity of G-AKI and MuRF1 and MAFbx mRNA levels in the EDL (Fig. 2C and D, lower panels,  $P<0.01$ ). This suggests that the expression of these E3 ligases was correlated to the severity of G-AKI.

In accordance with the lack of effect of G-AKI on MuRF1 transcripts, we observed no variation of MuRF1 protein levels in the soleus muscle (Fig. 3A). Similarly, MuRF1 protein levels were consistent with mRNA levels in the EDL as we observed a 68% increase ( $P<0.05$ ) in G-AKI rats (Fig. 3B). By contrast, it was less clear for MAFbx as protein levels were similar in AKI and CT animals in the soleus muscle and were below detection limits in the EDL (Fig. 3C and not shown). Thus, we did not detect any correlation between MAFbx protein levels and the corresponding mRNA upon G-AKI.

Upon G-AKI, MuRF1 and MAFbx were up regulated in the atrophying EDL and mRNA levels were well correlated with renal function (Table 1, Figs. 2 and 3). This strongly suggests that MuRF1 and MAFbx participate to G-AKI-linked muscle wasting in phasic muscles from rats.

### 3.2.3. Potential implication of other E3 ligases linked to muscle atrophy

Other E3 ligases (Nedd4, Trim32, Fbxo30/MUSA1) are up regulated in some catabolic situations (Cohen et al., 2012; Kudryashova et al., 2012; Nagpal et al., 2012; Sartori et al., 2013). However, in the soleus muscle, Nedd4, Trim32 and MUSA1/Fbxo30 transcript levels were not modified (Fig. 2E,G,I). Surprisingly, we even observed a decrease in mRNA levels for these three enzymes in the EDL muscle from G-AKI animals, although not significant for Fbxo30/MUSA1 32 (Fig. 2F,H,J). By contrast with MuRF1 and MAFbx, no correlation was observed when renal function was considered as a continuous variable (data not shown). Nedd4 is a mediator of skeletal muscle atrophy exclusively associated with muscle inactivity like denervation or unloading, which is in accordance with our data (Koncarevic et al., 2007). Previous work suggested that Trim32 could be implicated in the occurrence of muscular atrophy during fasting through thin filament (actin, troponins, tropomyosin) targeting (Cohen et al., 2012). However, other studies clearly showed that Trim32 was dispensable for atrophying skeletal muscles upon either nutrient deprivation or hindlimb unloading but rather played a major role in muscle regrowth after atrophy (Kudryashova et al., 2012). In addition, we demonstrated that actin is mainly targeted by MuRF1 in catabolic situations (Polge et al., 2011). Fbxo30/MUSA1 is a muscle E3 ligase whose role has been recently described in denervated muscle atrophy but MUSA1 targets remain to be discovered, together with its role in other situations of skeletal muscle atrophy

(Sartori et al., 2013). These 3 E3 ligases were only studied within a limited number of atrophying conditions and they may be linked to specific pathways but not in the overall atrophying program. Thus, our results confirmed that MuRF1 and MAFbx are still the best biomarkers for muscle wasting to date.

Altogether, we found that only MuRF1 and MAFbx were highly sensitive markers of skeletal muscle wasting in G-AKI rats, probably because their targets are localized downstream in the atrophying program and are thus common to any catabolic situation.

### 3.3. The IGF1/insulin-mTOR-Akt pathway is inhibited in AKI animals

Insulin resistance complicates renal failure in patients with kidney disease (Kobayashi et al., 2005). In addition, renal failure impairs excretion of uremic toxins and induces metabolic acidosis and an increase in angiotensin II, thus promoting inflammatory cytokines production such as IL6 (Zhang et al., 2009). In nephrectomized mice, cytokine release causes insulin resistance through an activation of the NF- $\kappa$ B pathway and an induction of the signal regulatory protein  $\alpha$  that blocks insulin receptor (Thomas et al., 2013; Thomas, 2016). This leads to a decrease in p-Akt/Akt levels, Akt being a kinase at the crossroad of protein synthesis and degradation (Sandri, 2013; Sandri et al., 2004). p-Akt phosphorylates FoxO transcription factors and promotes their sequestration in the cytoplasm, thus impeding the transcription of MAFbx and MuRF1. In accordance with MuRF1 and MAFbx levels, we observed a decrease in p-Akt/Akt levels in the EDL muscle of G-AKI animals while no variation of p-Akt/Akt was found in the soleus (Fig. 3D–E). This suggests that the drop of p-Akt/Akt ratio caused the observed up regulation of MuRF1 and MAFbx in the EDL muscle.

p-AKT also promotes protein synthesis through the upregulation of the mTOR-raptor-rheb complex (mTORC1). The effect of mTORC1 on protein translation is mediated by the phosphorylation of the ribosomal protein S6 kinase (S6K) and of 4E-BP1 a repressor of the cap binding protein eIF4E (Hay and Sonenberg, 2004). Accordingly, we observed decreased p-S6K/S6K levels in the EDL muscle of G-AKI rat (Fig. 3G). However, there was no significant decrease in the phosphorylation of its substrate the S6 protein (Fig. 3I). As expected, we observed no variation in p-S6K/S6K and p-S6/S6 in the soleus muscle of G-AKI rats (Fig. 3F and H). This indicates that both protein breakdown and synthesis were unaffected by G-AKI in this muscle or that modifications were moderate and/or restricted to specific compartments.

Altogether, we showed that a down regulation of the Akt-mTOR pathway was coordinated with the upregulation of the two E3 ligases MuRF1 and MAFbx in the atrophying EDL muscle upon G-AKI.

### 3.4. Impact of UPS activation on specific targets

We and others demonstrated that the UPS targets contractile proteins in the skeletal muscle for their subsequent degradation by the 26S proteasome, namely actin, myosin and telethonin (Kedar et al., 2004; Clarke et al., 2007; Fielitz et al., 2007; Heng et al., 2008; Polge et al., 2011). In our conditions, moderate G-AKI did not induce any detectable variation in actin and MHCI levels, neither in the myofibrillar nor in the soluble fraction (not shown) indicating that protein loss was similar and concomitant in the different protein compartments. We previously showed that telethonin, another sarcomeric protein, is polyubiquitinated during catabolic situations and might be a *bona fide* UPS substrate in skeletal muscle during hindlimb suspension muscle atrophy (Heng et al., 2008). Telethonin main function in skeletal muscles is to stabilize titin dimers and to lock sarcomeric structure at the Z-disc, in accordance with the appearance of muscular dystrophy in skeletal muscles with mutated telethonin (Bertz et al., 2009; Sadikot et al., 2010;

Paim et al., 2013). We therefore examined the impact of renal impairment on telethonin in skeletal muscle. Telethonin levels were maintained in the soleus muscle upon G-AKI (Fig. 4A, left panel). As previously described for atrophying muscles (Heng et al., 2008), telethonin tended to decrease at the protein level in the myofibrillar fraction of the EDL muscle, although it did not reach significance (Fig. 4A, P=0.06). However, we found no variation on polyUb-telethonin levels (Fig. 5). This suggests that the mild catabolic situation observed upon G-AKI induced little differential variations of sarcomeric proteins. However, and surprisingly, telethonin was increased in the soluble fraction of EDL in G-AKI animals (Fig. 4B), which may be related to Z-disc independent roles of telethonin. Indeed, some lines of evidence showed that telethonin is not only linked to titin in Z-disc but is also present in other cellular compartments. Telethonin binds and regulates myostatin levels in skeletal muscle cells (Nicholas et al., 2002). Myostatin is a member of the TGF-beta family and is a negative regulator of muscle growth. Thus, we checked myostatin levels in the EDL of G-AKI rats, but none of the antibodies (4 different tested) were able to detect myostatin, impeding co-localization and/or immunoprecipitation assays with telethonin. More work is clearly needed for elucidating the mechanisms involved in G-AKI-induced muscle atrophy, like clarifying the potential regulatory role of free telethonin.

#### 4. Conclusion

We demonstrated that critical components of the UPS were activated during G-AKI and that skeletal muscle atrophy paralleled an increased expression of MAFbx and MuRF1 muscle-specific E3 ligases. Accordingly, we observed a concomitant repression of the Akt-mTOR axis, which suggests repressed global protein synthesis. Interestingly, there was a clear difference between phasic (EDL) and postural (soleus) muscles, the former undergoing to G-AKI-induced muscle atrophy. Moreover, MuRF1 and MAFbx expression was tightly correlated to the residual renal function in the EDL, which strongly suggests that these E3 ligases depended on the G-AKI-mediated atrophy program.

#### Acknowledgements

The authors thank C. Deval for helpful technical assistance during the review process. This work was supported by grants to D. T., C. P. and D. A. from the Institut National de la Recherche Agronomique.

#### References

- Acute Kidney Injury Work Group, 2012. *Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury*. *Kidney Int. (Suppl. (2))*, 1–138.
- Attaix, D., Ventadour, S., Codran, A., Bechet, D., Taillandier, D., Combaret, L., 2005. The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem.* 41, 173–186. *The Ubiquitin-Proteasome System*.
- Baliga, R., Shah, S.V., 1991. Effects of dietary protein intake on muscle protein synthesis and degradation in rats with gentamicin-induced acute renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1, 1230–1235.
- Bertz, M., Wilmanns, M., Rief, M., 2009. The titin-telethonin complex is a directed: superstable molecular bond in the muscle Z-disk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13307–13310.
- Besche, H.C., Sha, Z., Kukulshkin, N.V., Peth, A., Hock, E.M., Kim, W., et al., 2014. Autoubiquitination of the 26S proteasome on Rpn13 regulates breakdown of ubiquitin conjugates. *EMBO J.* 33, 1159–1176.
- Bodine, S.C., Baehr, L.M., 2014. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 307, E469–E484.
- Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., et al., 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294, 1704–1708.
- Chertow, G.M., Burdick, E., Honour, M., Bonventre, J.V., Bates, D.W., 2005. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16, 3365–3370.
- Ciechanover, A., Stanhill, A., 2014. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 86–96.
- Clark, A.S., Mitch, W.E., 1983. Muscle protein turnover and glucose uptake in acutely uremic rats. Effects of insulin and the duration of renal insufficiency. *J. Clin. Invest.* 72, 836–845.
- Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., et al., 2007. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* 6, 376–385.
- Cohen, S., Zhai, B., Gygi, S.P., Goldberg, A.L., 2012. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J. Cell Biol.* 198, 575–589.
- Druml, W., 2005. Nutritional management of acute renal failure. *J. Ren. Nutr.* 15, 63–70.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J.L., Debigare, R., Zheng, B., et al., 2004. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J. Clin. Invest.* 113, 115–123.
- Fielitz, J., Kim, M.S., Shelton, J.M., Latif, S., Spencer, J.A., Glass, D.J., et al., 2007. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle ring finger 1 and 3. *J. Clin. Invest.* 117, 2486–2495.
- Flugel-Link, R.M., Salusky, L.B., Jones, M.R., Kopple, J.D., 1983. Protein and amino acid metabolism in posterior hemipelvis of acutely uremic rats. *Am. J. Physiol.* 244, E615–E623.
- Fukasawa, H., 2012. The role of the ubiquitin-proteasome system in kidney diseases. *Clin. Exp. Nephrol.* 16, 507–517.
- Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Gene Dev.* 18, 1926–1945.
- Heng, A.E., Ventadour, S., Jarzaguet, M., Pouch-Pelissier, M.N., Guezennec, C.Y., Bigard, X., et al., 2008. Coordinate expression of the 19S regulatory complex and evidence for ubiquitin-dependent telethonin degradation in the unloaded soleus muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2544–2552.
- Kedar, V., McDonough, H., Arya, R., Li, H.H., Rockman, H.A., Patterson, C., 2004. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 18135–18140.
- Kobayashi, S., Maesato, K., Moriya, H., Ohtake, T., Ikeda, T., 2005. Insulin resistance in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.* 45, 275–280.
- Koncarevic, A., Jackman, R.W., Kandarian, S.C., 2007. The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. *FASEB J.* 21, 427–437.
- Kudryashova, E., Kramerova, I., Spencer, M.J., 2012. Satellite cell senescence underlies myopathy in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy 2H. *J. Clin. Invest.* 122, 1764–1776.
- Lagrand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M.P., Battonnet-Pichon, S., Tintignac, L.A., et al., 2008. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogenin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J.* 27, 1266–1276.
- Lagrand-Cantaloube, J., Cornille, K., Csibi, A., Battonnet-Pichon, S., Leibovitch, M.P., Leibovitch, S.A., 2009. Inhibition of atrogenin-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS One* 4, e4973.
- Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., et al., 2004. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 18, 39–51.
- Lecker, S.H., Goldberg, A.L., Mitch, W.E., 2006. Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1807–1819.
- Lee, S.W., Dai, G., Hu, Z., Wang, X., Du, J., Mitch, W.E., 2004. Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 1537–1545.
- Nagpal, P., Plant, P.J., Correa, J., Bain, A., Takeda, M., Kawabe, H., et al., 2012. The ubiquitin ligase Nedd4-1 participates in denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *PLoS One* 7, e46427.
- Nicholas, G., Thomas, M., Langley, B., Somers, W., Patel, K., Kemp, C.F., et al., 2002. Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J. Cell. Physiol.* 193, 120–131.
- Paim, J.F., Cotta, A., Vargas, A.P., Navarro, M.M., Valicek, J., Carvalho, E., et al., 2013. Muscle phenotypic variability in limb girdle muscular dystrophy 2G. *J. Mol. Neurosci.* 50, 339–344.
- Patel, M.B., Majetschak, M., 2007. Distribution and interrelationship of ubiquitin proteasome pathway component activities and ubiquitin pools in various porcine tissues. *Physiol. Res.* 56, 341–350.
- Polge, C., Heng, A.E., Jarzaguet, M., Ventadour, S., Claustre, A., Combaret, L., et al., 2011. Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J.* 25, 3790–3802.
- Polge, C., Attaix, D., Taillandier, D., 2015. Role of E2-Ub-conjugating enzymes during skeletal muscle atrophy. *Front. Physiol.*, <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.00059>.
- Price, S.R., Reaich, D., Marinovic, A.C., England, B.K., Bailey, J.L., Caban, R., et al., 1998. Mechanisms contributing to muscle-wasting in acute uremia: activation of amino acid catabolism. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 439–443.
- Ravid, T., Hochstrasser, M., 2008. Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 679–690, <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2468>.
- Sadikot, T., Hammond, C.R., Ferrari, M.B., 2010. Distinct roles for telethonin N-versus C-terminus in sarcomere assembly and maintenance. *Dev. Dyn.* 239, 1124–1135.
- Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurc, C., Calabria, E., Picard, A., et al., 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogenin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 30, 399–412.

- Sandri, M., 2013. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.023>.
- Sartori, R., Schirwis, E., Blaauw, B., Bortolanza, S., Zhao, J., Enzo, E., et al., 2013. BMP signaling controls muscle mass. *Nat. Genet.* 45, 1309–1318.
- Taillandier, D., Bigard, X., Desplanches, D., Attaix, D., Guezennec, C.Y., Arnal, M., 1993. Role of protein intake on protein synthesis and fiber distribution in the unweighted soleus muscle. *J. Appl. Physiol.* 75, 1226–1232.
- Taillandier, D., Arousseau, E., Meynial-Denis, D., Bechet, D., Ferrara, M., Cottin, P., et al., 1996a. Coordinate activation of lysosomal: Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem. J.* 316, 65–72.
- Taillandier, D., Guezennec, C.Y., Patureau Mirand, P., Bigard, X., Arnal, M., Attaix, D., 1996b. A high protein diet does not improve protein synthesis in the unweighted rat tibialis anterior muscle. *J. Nutr.* 126, 266–272.
- Temparis, S., Asensi, M., Taillandier, D., Arousseau, E., Larbaud, D., Obled, A., et al., 1994. Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res.* 54, 5568–5573.
- Thomas, S.S., Dong, Y., Zhang, L., Mitch, W.E., 2013. Signal regulatory protein- $\alpha$  interacts with the insulin receptor contributing to muscle wasting in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 84, 308–316.
- Thomas, S.S., Dong, Y., Zhang, L., Mitch, W.E., 2013. Signal regulatory protein- $\alpha$  interacts with the insulin receptor contributing to muscle wasting in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 84, 308–316.
- Ventadour, S., Jarzaguet, M., Wing, S.S., Chambon, C., Combaret, L., Bechet, D., Attaix, D., Taillandier, D., 2007. A new method of purification of proteasome substrates reveals polyubiquitination of 20S proteasome subunits. *J. Biol. Chem.* 282, 5302–5309.
- Wang, D.T., Lu, L., Shi, Y., Geng, Z.B., Yin, Y., Wang, M., et al., 2014. Supplementation of ketoacids contributes to the up-regulation of the Wnt7a/Akt/p70S6K pathway and the down-regulation of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems in the muscle of 5/6 nephrectomised rats. *Br. J. Nutr.* 111, 1536–1548. <http://dx.doi.org/10.1017/S0007114513004091>.
- Witt, C.C., Witt, S.H., Lerche, S., Labeit, D., Back, W., Labeit, S., 2008. Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2. *EMBO J.* 27, 350–360.
- Workeneh, B.T., Rondon-Berrios, H., Zhang, L., Hu, Z., Ayehu, G., Ferrando, A., et al., 2006. Development of a diagnostic method for detecting increased muscle protein degradation in patients with catabolic conditions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 3233–3239.
- Zhang, L., Du, J., Hu, Z., Han, G., Delafontaine, P., Garcia, G., et al., 2009. IL-6 and serum amyloid A synergy mediates angiotensin II-induced muscle wasting. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 604–612.

## Conclusions et perspectives

Les résultats de ces premiers travaux ont donc permis d'établir l'existence d'une activation du système UPS au cours d'une insuffisance rénale aiguë (nécrose tubulaire aiguë de cause toxique). Malgré une atrophie musculaire peu marquée, car étudiée à un temps précoce, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des enzymes E3 musculaires MuRF1 et MAFbx. Cela pourrait représenter un test sensible de l'établissement d'une atrophie musculaire au cours de l'insuffisance rénale aiguë. Cette atrophie n'est détectable que dans le muscle rapide comme l'EDL alors qu'aucune variation n'est détectée dans le muscle lent *Soleus*. Ces résultats sont conformes avec ceux observés dans d'autres situations d'atrophie musculaire d'origine pathologique<sup>146</sup>. Les muscles rapides sont donc également plus sensibles aux stimuli cataboliques au cours de l'insuffisance rénale. De façon intéressante, nous avons démontré l'existence d'une corrélation entre la sévérité de l'insuffisance rénale et le niveau d'expression de MuRF1 et MAFbx. Cela est un argument en faveur du rôle propre de l'insuffisance rénale dans l'induction du programme d'atrophie musculaire.

De façon surprenante, l'expression d'autres enzymes E3 musculaires (FbxO30/MUSA1, Trim32 et Nedd4) décrites comme potentiellement impliquées dans le processus d'atrophie musculaire n'a pas été modifiée. Une diminution de leur expression a même été mesurée dans le muscle EDL. L'hypothèse la plus simple est que l'expression de ces E3 dépend du stimulus catabolique. Comme, Nedd4 et FbxO30/MUSA1 sont surexprimées dans les modèles d'atrophie musculaire induite par le jeûne<sup>230</sup>, l'apesanteur simulée<sup>79</sup>, la dénervation<sup>77,80,231</sup> ou l'ischémie cérébrale<sup>232</sup>, il est possible que ces enzymes soient spécifiques des situations d'atrophie musculaire induite par un défaut d'utilisation musculaire et non pas des atrophies pathologiques. Il est aussi possible qu'elles interviennent plus tardivement dans le développement de l'atrophie. Concernant Trim32, son rôle était déjà controversé au début de mes travaux car elle était décrite soit comme étant cruciale pour l'atrophie musculaire soit pour sa récupération. Selon les travaux de l'équipe du Pr Goldberg (Harvard Medical School), Trim32 serait impliquée au cours du jeûne, dans la dégradation de protéines des filaments fins (actine, desmine, tropomyosine et chaîne légère de myosine)<sup>81</sup>. Cependant, ces données sont basées sur des techniques inappropriées (coloration au bleu de Coomassie au lieu de Western blot) ou sur des techniques *in vitro* (ubiquitination *in vitro*). Seule la desmine préalablement phosphorylée semble être un substrat polyubiquitiné par Trim32. Le laboratoire du Pr Spencer (Duchenne Muscular Dystrophy Research Center, University of California) a démontré que

Trim 32 était seulement capable de monoubiquitiner l'actine ce qui n'est pas un signal de dégradation<sup>233</sup>. Contrairement à d'autre enzyme E3 (comme MuRF1 et Nedd4) il n'y a pas d'augmentation de l'expression de Trim32 en cas de dénervation<sup>234</sup>. Trim32 n'aurait donc qu'un rôle permissif et n'interviendrait pas dans la régulation de l'atrophie musculaire. Aussi, d'autres travaux ont montré que Trim32 n'est pas nécessaire à l'induction d'une atrophie musculaire en cas de jeûne ou d'apesanteur simulée. Trim32 aurait plutôt un rôle essentiel dans la régénération musculaire<sup>82</sup>. Cela permettrait d'expliquer pourquoi l'absence de Trim32 fonctionnelle est la cause de la dystrophie musculaire des ceintures de type 2H une maladie héréditaire de transmission autosomique récessive.

En parallèle des surexpressions de MuRF1 et MAFbx nous avons observé une répression de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTORC1 dans le muscle EDL. Cela laisse supposer que les variations d'expression des E3 musculaires observées dans notre modèle sont en rapport avec le développement d'une insulinoresistance causées par l'insuffisance rénale. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui montrent le développement de l'insulinoresistance au cours de l'insuffisance rénale et son rôle dans l'apparition d'une atrophie musculaire<sup>235</sup>. L'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTORC1 aboutit à l'induction de l'expression de MuRF1 et MAFbx via FoxO et à l'inhibition de la protéosynthèse globale<sup>236</sup>.

Depuis la publication de nos résultats, d'autres études ont été conduites sur le développement d'une atrophie musculaire au cours d'une insuffisance rénale. Elles ont utilisé le modèle d'atrophie musculaire induite par une néphrectomie des 5/6<sup>e</sup>. Ces nouveaux travaux ont mis en évidence le rôle direct des toxines urémique dans l'apparition d'une atrophie musculaire<sup>138</sup>. Parallèlement à l'activation du système UPS et de façon similaire à ce qui a pu être observé dans d'autres modèles d'atrophie musculaire, une activation de l'autophagie a également été retrouvée dans le muscle de souris<sup>237</sup>. La dysfonction mitochondriale jouerait aussi un rôle important dans l'atrophie musculaire induite par l'insuffisance rénale et pourrait passer en partie par une activation de l'autophagie<sup>115</sup>. De façon intéressante l'administration de chélateur digestif de toxine urémique ou de traitement pharmacologique restaurant la fonction mitochondriale prévient en partie l'installation de l'atrophie musculaire dans ces modèles animaux<sup>238</sup>. Cependant, avant d'envisager l'utilisation de telles stratégies thérapeutiques chez l'homme il est nécessaire de confirmer si un programme d'atrophie musculaire similaire à celui du rongeur est activé.

Il apparait également évident que plus l'intervention pour prévenir l'atrophie musculaire est précoce et plus celle-ci est efficace. Les E3 MuRF1 et MAFbx pourraient théoriquement constituer des biomarqueurs précoces et sensibles d'atrophie musculaire. Cependant, leur quantification chez les patients nécessiterait la réalisation d'une biopsie musculaire, ce qui les rend inutilisables en pratique clinique courante. Une étude récente a retrouvé une augmentation de formes ubiquitinées de MAFbx et MuRF1 dans le sérum d'un modèle de cachexie cancéreuse chez la souris<sup>239</sup>. Néanmoins, il s'agit ici de données préliminaires obtenues sur un modèle de catabolisme intense et malheureusement la protéolyse musculaire ou l'expression musculaire de MuRF1 et MAFbx n'ont pas été mesurées simultanément pour établir une éventuelle corrélation. Par ailleurs la quantification des différentes formes des E3 musculaires dans le sérum repose sur une analyse par Western blot qui ne permet qu'une estimation semi-quantitative des protéines étudiées. Il serait plus intéressant de disposer de biomarqueurs sanguins corrélés aux niveaux d'expression de MuRF1 et MAFbx dans le muscle.

Outre les ARN des cellules sanguines, il existe un pool d'ARN circulant dans le sang notamment au sein de structures d'origine cellulaire, les exosomes. Ces ARNs sont de types variés : micro ARN (miARN), ARN messenger (ARNm), etc. Les miARN sont de petits ARN non codant capable de se lier spécifiquement à un ARNm et d'en provoquer la dégradation. Depuis leur découverte en 1993 près de 2000 miARN différents ont été identifiés. Suite à la découverte de leur rôle au début des années 2000, il est apparu que les miARN régulaient plus de 70% des gènes et étaient impliqués dans la régulation des fonctions cellulaires en situation normale ou pathologique. Au niveau du muscle squelettique les miARN contrôlent les phases de la myogénèse mais aussi la survenue d'une atrophie et la régénération musculaire. L'expression de 12 miARN est modifiée dans le muscle de souris nephrectomisées. La diminution de miR-29 est responsable d'une levée d'inhibition sur la traduction de l'ARNm de la protéine Ying Yang, un inhibiteur de la myogénèse. miR-23a et miR-27, également diminués en cas d'atrophie liée à l'insuffisance rénale, sont particulièrement intéressants. Leur surexpression mime l'effet de l'exercice physique et protège de l'atrophie musculaire<sup>240</sup>. Ainsi miR-23a est capable d'inhiber la traduction de PTEN inhibiteur de la voie Insuline/IGF1/AKT/mTOR et inhibe la traduction des protéines de signalisation de la voie TGFβ/myostatine : smad2/3<sup>240</sup>. Surtout il inhibe directement la traduction des 2 E3 MuRF1 et MAFbx<sup>241</sup>. miR-27 est un inhibiteur de FoxO mais aussi de la voie TGFβ/myostatine<sup>240</sup>. Une étude récente a montré de façon intéressante une augmentation des miR-23a, miR-206 et miR-

499 dans le sérum de volontaires sains âgés pendant 45 jours. L'élévation de ces miARN était corrélée avec la perte de masse musculaire. Ces données sont concordantes avec l'observation que des cellules C2C12 en voie d'atrophie sous l'effet de dexaméthasone libèrent des exosomes enrichis en miR-23a<sup>242</sup>.

A la suite des résultats obtenus sur les modèles de rongeurs, on peut donc se demander si le même programme d'atrophie musculaire (les atrogènes) est mis en jeu chez l'homme et persiste sur des périodes plus longues. Une deuxième question est de savoir s'il est possible de prédire l'activation du programme d'atrophie musculaire à partir d'une simple prise de sang. C'est dans cette optique qu'a été élaboré le protocole d'étude Prométhé.

## 2<sup>E</sup> ARTICLE: MUSCLE WASTING IN PATIENTS WITH END-STAGE RENAL DISEASE OR EARLY-STAGE LUNG CANCER: COMMON MECHANISMS AT WORK

---

### Introduction

L'étude Prométhé a été mise en place pour répondre à deux objectifs : i) identifier des mécanismes du processus d'atrophie musculaire chez l'homme. Il s'agit d'un prérequis au développement et/ou à l'évaluation de traitements ciblés. ii) identifier des biomarqueurs non invasifs permettant de diagnostiquer facilement et précocement l'existence d'un processus d'atrophie musculaire quel que soit la pathologie causale.

Si l'on veut pouvoir prévenir et/ou traiter efficacement l'atrophie musculaire, il est nécessaire d'identifier les mécanismes mis en jeu quel que soit le stade de l'atrophie et confirmer (ou non) les données obtenues chez l'animal. En effet, la physiologie animale n'est pas strictement transposable à celle de l'homme et les conditions expérimentales auxquelles sont exposés des animaux jeunes sur de courtes durées ne reflètent pas forcément les situations rencontrées chez l'homme. Un point important de notre étude était d'identifier des processus métaboliques altérés au cours de l'atrophie musculaire indépendamment de la pathologie causale. En effet de tels processus seraient des cibles privilégiées pour un potentiel traitement universel de l'atrophie musculaire. Il était donc indispensable de comparer au moins deux pathologies différentes entraînant une atrophie musculaire.

Notre étude a porté sur des patients en IRC terminale traités par hémodialyse depuis au moins 6 mois. Dans ce cas le processus catabolique est *a priori* ancien et progressif. Le cancer est l'une des causes d'atrophie musculaire les mieux étudiées et responsable d'un état catabolique agressif. Une activation de l'UPS a été observée dans des biopsies musculaires de patients atteints de cancer<sup>106</sup>. Nous avons donc choisi de comparer les patients hémodialysés chroniques à des patients atteints d'un cancer bronchique. Ceux-ci ont été inclus à un stade précoce de leur maladie (perte de poids < 10% les 6 derniers mois et cancer localisé bénéficiant d'une chirurgie d'exérèse) avant toute intervention thérapeutique (chimio et/ou radiothérapie). Les données de ces patients ont été comparées à celle de volontaires ne présentant aucune pathologie détectable.

Le premier objectif du projet Prométhé reposait sur l'étude transcriptomique et protéomique des biopsies musculaires. Elle a fait l'objet du 2<sup>e</sup> article de ma thèse. Les résultats attendus étaient :

- Vérifier si les atrogènes identifiés chez l'animal sont utilisables chez l'homme.
- Identifier des processus biologiques modifiés au cours l'atrophie musculaire. En effet des enzymes clefs de ces processus pourraient constituer des cibles thérapeutiques de choix.

Le second objectif était d'identifier des marqueurs sanguins (ARNm ou miARN) reflétant l'activation des mécanismes d'atrophie musculaire observée dans le muscle. Ces travaux sont actuellement en cours

## **Title page**

### **Muscle wasting in patients with end-stage renal disease or early-stage lung cancer: common mechanisms at work**

#### **Authors**

Aniort J.<sup>1,2</sup>, Stella A.<sup>3</sup>, Philipponnet C.<sup>1,2</sup>, Poyet A.<sup>1,4</sup>, Polge C.<sup>1</sup>, Claustre A.<sup>1</sup>, Combaret L.<sup>1</sup>, Béchet D.<sup>1</sup>, Attaix D.<sup>1</sup>, Boigard S.<sup>5</sup>, Filaire M.<sup>5</sup>, Rosset E.<sup>7</sup>, Schiltz O.<sup>3</sup>, Heng A.E.<sup>1,2</sup>, Taillandier D.<sup>1</sup>

1, INRA/Université Clermont Auvergne, UMR 1019, Human Nutrition Unit (UNH), CNRH Auvergne (Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne), Clermont-Ferrand, France.

2, Nephrology, dialysis and transplantation department, Gabriel Montpied University Hospital, University Hospital of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.

3, Institute of Pharmacology and Structural Biology, Toulouse, France

4, Nephrology department, Hospital of Roanne, Roanne, France

5, Orthopedic surgery department, Gabriel Montpied University Hospital, University Hospital of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.

6, Thoracic surgery department, Gabriel Montpied University Hospital, University Hospital of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.

7, Vascular surgery department, Gabriel Montpied University Hospital, University Hospital of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France.

#### **Corresponding author**

Daniel Taillandier

INRA, Centre Clermont-Ferrand-Theix

France

e-mail : daniel.taillandier@inra.fr

Tel : +33 4 73 62 48 44

Fax : +33 4 73 62 47 55

## **Abstract**

### *Background*

Loss of muscle mass worsens many diseases such as cancer and renal failure, contributes to the frailty syndrome and is associated with an increased risk of death. Studies conducted on animal models have revealed the preponderant role of muscle proteolysis and in particular the activation of the ubiquitin proteasome system (UPS). However, studies conducted in humans remain scarce, especially within renal deficiency. In addition, whether a shared atrophying program exists independently of the nature of the disease remains to be established. The aim of this work was therefore to identify common modifications at the transcriptomic or the proteomic levels in atrophying skeletal muscles from cancer and renal failure patients.

### *Patients and methods*

Muscle biopsies were performed during scheduled interventions in early stage (no treatment, no detectable muscle loss) lung cancer (LC), chronic hemodialysis (HD) or healthy (CT) patients (n = 7 per group). Gene expression of members of the UPS, autophagy and apoptotic systems was measured by qRT-PCR. A global analysis of the soluble muscle proteome was conducted by shotgun proteomics for investigating the processes altered.

### *Results*

We found an increased expression of several UPS and autophagy-related enzymes in both LC and HD patients. Mass spectrometry identified more than 1700 proteins and principal component analysis (PCA) revealed 3 differential proteomes that matched to the 3 groups of patients. Orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA) created a model, which distinguished the muscles of diseased patients (LC or HD) from those of healthy subjects. Proteins that most contributed to the model were selected. Finally, functional analysis revealed up to 9 metabolic processes (including proteolysis and muscle contraction) involved in and/or altered by the atrophying program in both LC and HD patients. This was confirmed by a co-expression network analysis.

### *Conclusions*

We were able to identify highly similar modifications of several metabolic pathways in patients exhibiting diseases with different etiologies (early-stage lung cancer vs. long term renal failure).

This strongly suggests that a common atrophying program exists independently of the disease in human.

**Keywords**

Proteomics, skeletal muscle, proteasome, autophagy, renal failure, cancer

## **Introduction**

Loss of muscle mass worsens many diseases (e.g. diabetes, cancer, heart failure, respiratory failure, renal failure and sepsis), which is known as cachexia[1]. Cachexia contributes to the frailty syndrome and is associated with impaired quality of life and increased risk of death whatever the causal disease[2].

Cachexia is the consequence of profound changes in the metabolism of skeletal muscle fibers [3-5]. The decrease in muscle mass is due to an imbalance in protein synthesis and proteolysis in favor of the latter. Activation of proteolysis appeared to play a major role in the occurrence of muscle atrophy for rapid degradation of myofibrillar proteins in numerous catabolic models. The ubiquitin proteasome system (UPS) and autophagy are the predominant proteolytic systems involved[6-10]. The UPS is crucial for the atrophying process as it controls both the degradation of contractile proteins and the repression of protein synthesis[8,9]. The UPS targets the proteins to be degraded by linking covalently a ubiquitin (Ub) chain to the substrates to be degraded, which enables the 26S proteasome to recognize and degrade the targets[11]. The Ub chain is catalyzed thanks to an enzymatic cascade (E1, E2, E3), with E3s that recognize the substrates and E2s that generally bring the catalytic activity. In rodent atrophying muscles, several genes (Ub, 26S Proteasome subunits, E2s, E3s, etc.) are up regulated in most catabolic situations including two muscle-specific E3 ligases, muscle atrophy F-box (MAFbx or atrogin1) and muscle ring finger-1 (MuRF1). Although data are scarce in humans, MAFbx and MuRF1 up regulation was observed in some catabolic conditions[6].

The mechanisms involved in the control of muscle mass during cachexia can be grouped into three categories: nutrition imbalance, mechanical stress and neuro-hormonal mediators. Indeed, a spontaneous reduction of food intake[12,13] and a reduction in physical activity[14,15] are frequently encountered in many cases of cachexia, and starvation or muscle inactivity are sufficient to induce muscle proteolysis and atrophy[16,17]. However, this only partly explains muscle loss as increased food intake or physical activity are insufficient to prevent the occurrence of cachexia in the absence of the treatment of the causal pathology[18]. Several experiments have shed light on the role of hormonal mediator in different rodent models of cachexia. Indeed, increased levels of proinflammatory cytokines (interleukin-1 and 6 or tumor necrosis factor alpha)[19-21], resistance to insulin-like growth factor-1 and insulin[22,23] or increased myostatin levels[24,25] were often observed. Studies on the mechanisms of muscle wasting conducted in humans remain rare, especially during failure, but

some abnormalities described in animal models have been confirmed. For example, increased levels of myostatin have been found in the *rectus abdominis muscles* of patients with chronic renal failure[26]. However, it still remains to establish whether the modifications observed are directly linked to the atrophying program or whether they are specific of the disease itself. In addition, animal models mostly use young growing rodents and muscle wasting is generally studied within 1-2 weeks after catabolic stimuli. This is very different from human diseases where it is generally detected within longer periods and in adults. Moreover, the physiology of rodents is not strictly comparable to that of humans. Proteomic studies coupled with bioinformatics analysis makes it possible to detect proteins that potentially interact and are involved in a common biological process during muscle cachexia. Yet, few have been conducted in human[27].

It is thus crucial to identify i) the cellular processes modified in human atrophying skeletal muscles and ii) whether common proteome modifications characterize muscle atrophy independently of the disease in both early and late stages. In this study, we used muscles from early-stage lung cancer or late-stage chronic hemodialysis patients for investigating the role of proteolytic systems and for identifying the metabolic processes modified either at the transcriptomic or the proteomic level.

## **Material and methods**

### *Population*

This study was performed at the University Hospital of Clermont-Ferrand (France) on muscle biopsies from 3 groups of patients: early-stage lung cancer (LC), chronic hemodialysis (HD) and healthy volunteers (CT). Patients included were over 18 years old, with either newly diagnosed lung cancer (for whom surgical resection was programmed by thoracotomy) or patients with end-stage renal failure treated for at least 6 months by hemodialysis and necessitating femoral bypass revascularization. The control group patients required hip replacement for osteoarthritis. Exclusion criteria were acute or chronic infections, diabetes mellitus, corticosteroid or hormone therapy or pregnancy. Glomerular filtration rate of LC and CT patients was estimated by the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) equation and had to be  $> 90 \text{ mL/min/1.73m}^2$ . Patients in the HD and CT groups did not exhibit active neoplasia for at least 1 year after muscle biopsy. A C-reactive protein (CRP)  $> 3 \text{ mg}$ , which was measured in serum using an automated hospital-based technique (Abbot TDX), was an exclusion criteria for CT patients. All patients gave written informed consent prior to

study entry. The study (DGS-2008-A00479-46) was approved by the Sud Est VI Research Ethic Committee and was conform to the standards set by the Declaration of Helsinki.

#### *Muscles biopsies*

Surgical muscle biopsies were taken at the beginning of the intervention, using a cold scalpel, in the *latissimus dorsi* (LC group) or the *vastus lateralis* (HD and CT group). Biopsies were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

#### *qRT-PCR*

Using a small fraction ( $\approx 100$  mg) of the biopsies, total RNA was extracted as described by Chomczynski and Sacchi[28]. mRNA levels of E3 ligases (MuRF1, MAFbx, Nedd4, Fbxo30/MUSA1, Trim32, Hdm2, Ozz, E4B), E2 Ub-conjugating enzymes (UBE2A, UBE2B, UBE2D, UBE2E1, UBE2G1, UBE2J1, UBE2J2, UBE2L3, UBE2V1, UBE2V2, UBE2N), proteasome subunits (PSMA1, PSMA3, PSMB1, PSMC1, PSMD2, PSMD4, PSMD7, PSMD13), markers of apoptosis (Csp3, Csp9, Bax, Bcl2), autophagy (CTPL, SQSTM1) and ATF4 pathway (4EBP1, ATF4, CHOP), were determined by quantitative RT-PCR. Reverse transcription of total RNA was performed using the QuantiTect® Reverse Transcription kit (Qiagen®). qPCR was performed using the FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche), according to the manufacturer's instructions using a CFX96 thermocycler (BIORAD, Hercules, CA, USA). Calculations were made using the comparative  $\Delta C_t$  method with YWHAZ, HPRT1 and 36B4 housekeeping genes. List of primers used is provided in table S1.

#### *Protein extraction*

A portion ( $\approx 400$  mg) of the muscle biopsies was homogenized using a Polytron® (Kinematica, Littau-Luzern, Switzeland) in 8 ml of lysis buffer [50 mM MOPS pH 7.5, 5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (10  $\mu$ l/ml of lysis buffer) (Sigma, St Louis, MO, USA), NEM 10 mM, Triton X100 1%]. Muscle homogenates were centrifuged at 16,000 g (4 °C, 10 min) and the supernatant containing the cytoplasmic fraction were aliquoted and frozen at -80°C until use. Protein concentration was measured by absorption spectrophotometry (OD 562 nm) using the BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA) with BSA as a standard.

#### *SDS-PAGE loading and Nano-LC-MS/MS analysis of proteins*

After reduction and alkylation, 50  $\mu$ g of proteins were loaded on a 12% acrylamide SDS-PAGE gel. Proteins were visualized by Coomassie Blue staining. Each band was cut into a

single slice that was washed in 100 mM ammonium bicarbonate for 15 min, followed by a second wash in 100 mM ammonium bicarbonate, acetonitrile (1:1) for 15 min. Both washes were performed at 37°C. Second cycle of washes in ammonium bicarbonate and ammonium bicarbonate/acetonitrile was then performed. Proteins were digested by incubating each gel slice with 1 µg of modified sequencing grade trypsin in 50 mM ammonium bicarbonate overnight at 37°C. The resulting peptides were extracted from the gel in three steps: a first incubation in 50 mM ammonium bicarbonate for 15 min at 37°C and two incubations in 10% formic acid, acetonitrile (1:1) for 15 min at 37°C. The three collected extracts were pooled with the initial digestion supernatant, dried in a Speed- Vac, and resuspended with 50 µL of 5% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid (TFA). The peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS using an UltiMate 3000 RSLCnano system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to an OrbiTrap Fusion mass spectrometer (ThermoScientific, Bremen, Germany). Five microliters of each sample were loaded onto a C18 pre- column (300 µm id, 5 mm; Dionex), at 20 µL/min, in 5% acetonitrile, 0.05W% TFA. After 5 min of desalting, the pre- column was switched on line with the analytical C18 column (75 µm id x 15 cm C18 column; packed in- house with Reprosil C18- AQ Pur 3 µm resin, Dr. Maisch; Proxeon Biosystems), equilibrated in 95% solvent A (5 acetonitrile, 0.2 formic acid) and 5% solvent B (80 acetonitrile, 0.2 formic acid). Peptides were eluted using a 5–50% gradient of solvent B over 130 min and at a flow rate of 300 nL/min.

The OrbiTrap Fusion was operated in DDA mode to automatically switch between full scan MS and MS/MS acquisition using Xcalibur software. Survey scan MS was acquired in the Orbitrap over the m/z 300–2000 range, with the resolution set to a value of 120 000 (m/z 400). The most intense ions per survey scan were selected for HCD fragmentation (Time between Master scans : 3s) and the resulting fragments were analyzed in the linear trap (LTQ). Dynamic exclusion was employed within 60 seconds to prevent repetitive selection of the same peptide.

#### *Bioinformatics analysis of MS raw files*

MS raw files were analyzed using the Proline software version 1.6. MS/MS spectra were searched in the Mascot search engine against the forward and reverse Human SwissProt database combined with a commonly observed contaminants list. The digestion enzyme was set to trypsin/ with up to two missed cleavages. Methionine oxidation, and N- terminal acetylation were search as variable modifications and carbamidomethyl of cysteine as fixed modification. Parent peptide masses and fragment masses were searched with maximal mass

deviation of 10 ppm. A first level of False Discovery Rate (FDR) filtration was done on the peptide- spectrum match level, and this was followed by a second level of FDR control on the protein level. Both filtrations were performed at a 1% FDR. These filtrations were done using a standard target-decoy database approach. Missing data were implemented using the Imp4p-package (CRAN) working in Prostar.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed with XLSTAT v2018.1 software (Addinsoft®). The tests were two-sided, with a Type I error set at  $\alpha = 0.05$ . Variables were presented as mean  $\pm$ standard-deviation or median [interquartile range] according to statistical distribution (assumption of normality assessed by the Shapiro–Wilk test). For demographic data and qRT-PCR results, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare values within the 3 groups, followed by post-hoc Tukey test for pairwise comparison. For mass spectrometry results analysis, a two-way ANOVA (group and replicate) was used to compare values in the 3 groups followed by Benjamini-Hochberg (BH) correction. Principal component analysis (PCA) was implemented on differentially expressed proteins. To focus on the proteins whose expression best characterized atrophying muscles independently of the disease (HD or LC vs CT), we performed orthogonal partial least square discriminant analysis (O-PLS-DA). Proteins were classified according to their variable importance in projection (VIP). A  $VIP > 1$  was considered for selecting the proteins[29]. Proteins whose VIP was above 1 and significantly increased or decreased in both LC and HD patients were then evaluated using unsupervised hierarchical clustering (k-means classification and hierarchical ascending classification centered on Euclidean distances).

### *Bioinformatic analysis of protein expression data*

Bioinformatic analysis was performed using Cytoscape software v3.6.0[30]. Proteins whose VIP was above 1 and concomitantly increased or decreased in LC and HD patient when compared to CT patient were considered as common markers of muscle atrophy process. Identification of the functions of these proteins was implemented with ClueGO v2.5.0[31]. A network of GO biological process was created allowing to group the redundant term in functional cluster. Enrichment analysis was then performed for each cluster. GO levels 5 to 15 were considered. The Kappa-statistics score threshold to create edge between nodes was set to 0.56. A two sided (Enrichment/Depletion) hypergeometric test followed by BH correction was used to perform enrichment analysis. Group fusion option was used to diminish the redundancy

of the terms shared by similar associated proteins, which allows to maintain the most representative parent or child GO term. Then, a gene network analysis was implemented with CluePedia v1.5.0[32] using the String protein interaction database (January 2018) in order to identify potential activated or repressed pathways. In order to validate our results a protein co-expression network was created based on the Spearman rank correlation at a threshold of 0.6. Then, clustering was made using ClusterOne[33]. Finally, for each cluster, identification of the most enriched functions/pathways was performed using GeneMANIA v3.4.1 and default settings[34].

## **Results**

### *Patients characteristics*

Characteristics of the 21 patients included in this study (n = 7 per group) are shown in Table 1. The three groups differed neither in age nor in sex ratio with a majority of men included. The BMI of patients in the LC and HD groups was not significantly different compared to patients in the CT group and it remained within the normal range. Systemic inflammation assessed by the CRP measurement was greater in the LC and HD groups than in the CT group. Glomerular filtration rate estimated by the CKD-EPI equation was similar in the CT and LC groups and within the normal range considering the age of the patients.

### *The UPS and autophagy proteolytic systems are activated in the muscle of LC and HD patients*

Studies conducted on cells or animal models have identified several genes whose expression is modified during muscle atrophy. These genes, called atrogenes, are markers of muscle wasting. Notably, they belong to cellular proteolytic systems such as the UPS and autophagy. In order to address the activation of atrophy in LC and HD patients, qRT-PCR was performed to quantify in muscles biopsies the expression of several genes belonging to several proteolytic systems. Atrogenes include several E3 ligases of the UPS, which are often good markers of atrophy. We thus addressed different E3 ligases that have been described for their implication in muscle homeostasis. MuRF1, MAFbx, Hdm2, Fbxo30/MUSA1 E3 ligases were up-regulated at the mRNA levels in the muscle of LC and HD patients when compared to the CT group (Figure 1A). By contrast, Nedd4, E4b and Trim32 transcripts were only up-regulated in patients from the HD group, while no variation was observed for Ozz (Figure 1A). E3 ligases work in couple with E2 ubiquitin conjugating enzymes to ensure the ubiquitination of their substrate. We therefore quantified the expression of several E2s already described for being up regulated

in several catabolic situations in rodents (Figure 1B). However, only UBE2E1 and UBE2V2 transcripts were increased in LC patients and UBE2A and UBE2J1 in HD patients. We then addressed 26S proteasome subunits but, surprisingly, no significant variation was found for the 20S complex subunits (Figure 1C). For the 19S regulatory complex (19S RC), only an increase in PSMD13 mRNA levels was found in both LC and HD patients, while PSMD2 and PSMD4 were up regulated only in HD patients (Figure 1D). We selected CTPL and p62/SQSTM1 as markers of the autophagy proteolytic system. Increased mRNA levels of both CTPL and p62/SQSTM1 were found in both LC and HD patients (Figure 1E), suggesting that autophagy was activated. Muscle atrophy may also be accompanied by apoptosis of muscle cells. Indeed, we found increased levels of the pro-apoptotic Casp3, Casp9 and Bax transcripts and a decrease of the anti-apoptotic Bcl2 but the modifications were restricted to HD patients (Figure 1F). Altogether, our data suggest an up regulation of the UPS and the autophagy proteolytic systems, the most sensitive markers of the UPS being E3 ligases, i.e. enzymes that select the proteins to be degraded.

*A specific proteome identifies atrophying muscle independently of the etiology of the disease*

As we found an increased transcription of atrophying genes in muscles from LC and HD patients, we then addressed potential changes in the muscle proteome. Mass spectrometry analysis of the cytoplasmic fraction identified 1779 proteins (Table S2), of which 919 were differently expressed in at least one group ( $p < 0.05$  ANOVA for group factor after BH correction). Out of them, 257 proteins were increased or decreased in both LC and HD patients when compared to CT patients (Figure 2A). Moreover, LC/CT and HD/CT expression ratios of these proteins were well correlated, indicating that their variation levels were highly similar independently of the disease (Figure 2B).

PCA was performed on proteins differently expressed between the three groups (Figure 3A). PCA allows reducing the number of correlated variables to a limited number of independent variables (principal components) that better explain the observed variance. PCA grouped the proteins in 3 distinct sectors of the space generated by the two principal components, which nicely fitted respectively to the CT, LC and HD groups (Figure 3A). This indicates that each patient's group exhibited a specific proteome and that a distinct signature can be drawn for CT, LC and HD patients.

We then decided to focus on proteins that best characterized atrophying muscles independently of the causal pathology and we performed an O-PLS-DA (Figure 3B). The

horizontal component of the OPLS-DA score scatter plot captures variation between the groups (LC or HD vs CT) and the vertical component captures variation within the groups. The model obtained exhibited an  $R^2$  (measure of model fit to the original data) of 0.993 and a  $Q^2$  (internal measure of consistency between the original and cross-validation predicted data) of 0.983. The contribution of proteins to the model was evaluated by the calculation of the VIP (Variable Importance in Projection). We found 321 proteins exhibiting a  $VIP > 1$ , which was considered the threshold for selecting the proteins[29] (Figure 3C). By crossing these data (321 proteins with a  $VIP > 1$ ) with those of the differential expression analysis (257 proteins that both increased or decreased in the LC and HD groups), we finally selected 238 proteins (Table S3). Using an unsupervised hierarchical cluster analysis, we then addressed the capacity of these proteins for discriminating patients according to their original groups (Figure 3D). We found that a majority of proteins were potent indicators of catabolic conditions independently of the disease.

#### *Biological processes modified upon muscle atrophy*

We carried out a functional analysis of the 238 proteins that best witnessed muscle atrophy using the Clue Go plug in. This revealed that these proteins can be grouped in functional modules related to biological processes significantly enriched when compared to the healthy human proteome (Figure 4A and B). Overall, it included several metabolic pathways (proteostasis, glucose catabolic process, fatty acid and energy metabolism), inflammation, defense against free oxygen radicals, structural proteins (cytoskeleton organization and extracellular matrix protein) and proteins involved in muscle contractile function (Table 2). Regarding proteolysis, we found an increase of several proteins related to the UPS and the autophagy proteolytic systems (Figure 4C). To confirm these results we used a different approach. A co-expression network was created from the 1759 proteins identified in mass spectrometry. It was a scale free network with a node degree distribution following a power law ( $R^2=0.93$ ), confirming its biological relevance (Figure 5). Using the ClusterOne algorithm, proteins have been grouped into 50 clusters of co-expression. Eight cluster displayed enriched functions (cellular respiration, inflammatory response, leucocyte migration, translation factor activity, muscle contraction, extracellular matrix, glucose metabolic process and proteasome pathway) (Table 3).

*The Wnt-betacatenin and ATF4 signaling pathways are up-regulated in both HD and LC patients.*

In order to identify signaling pathways potentially involved, a protein interaction network analysis was performed using CluePedia software. Ten proteins characterizing pathological muscles belonged to the Wnt- $\beta$ -catenin pathway, which suggested an activation of this signaling pathway (Figure 6A). Similarly, ERp44 an ER stress marker was significantly increased in atrophying muscles, and we thus checked whether the ATF4 pathway was activated in the patients' muscles. We found a significant increase of ATF4, CHOP and 4EBP1 transcripts in both LC and HD patients when compared to CT patients (Figure 6B).

## Discussion

In this study, we focused on skeletal muscle proteolysis and proteome modifications induced by two diseases (lung cancer [LC] and hemodialysis [HD]) with a different etiology and known to induce muscle atrophy in humans. We first found that the UPS and the autophagy proteolytic systems were concomitantly activated in both LC and HD patients and that some E3 ligases are potent markers of human muscle atrophy. We then found a panel of 238 proteins belonging to 9 main cellular functions that characterized atrophying muscles independently of the disease. Finally, we found that the Wnt- $\beta$ -catenin and the ATF4 signaling pathways were activated in both HD and LC muscles.

In various models of rodent muscle atrophy, several genes are systematically overexpressed at the transcriptional level and these atrophy-related genes (atrogenes) include members of the main proteolytic systems (UPS and autophagy)[6,35]. Regarding the UPS, atrogenes include ubiquitin, 20S proteasome subunits, 19S regulatory complex subunits and ubiquitinating enzymes (E2s and E3s). Indeed, both substrate targeting (ubiquitination) and degradation (26S proteasome) steps are up regulated in various catabolic situations (fasting, diabetes mellitus, renal failure, tumor bearing, hindlimb suspension)[17,36,37]. Surprisingly, in this study, proteasome subunits (either belonging to the 20S proteasome core or to the 19S regulatory complex) appeared to be poor predictors of the atrophying process in humans. Indeed, none of the 20S and 19S RC subunits tested were up regulated in both LC and HD patients at the mRNA levels and only 3 of them were increased at the protein levels (Fig 1C-D, Table 2 and Table S1). E2 enzymes appeared also to be poor predictors of muscle atrophy in LC and HD patients (Fig. 1B and Suppl. Table 1) by contrast with animal models in which UBE2B was considered as a bona fide atrogene and other E2s were often up regulated during catabolic situations (see[38] for compiled data).

Several E3 ligases were up regulated in both LC and HD patients and more particularly MuRF1 and MAFbx, two muscle-specific E3 ligases considered as the best markers of muscle atrophy in rodents[6,39]. Even though human studies are relatively scarce compared to rodent, several investigations also observed an up regulation of MuRF1 and MAFbx following immobilization, spinal cord injury or chronic obstructive pulmonary disease[6]. The sustained up regulation of these E3 ligases over years (HD patients), suggests that both an increased degradation of the contractile apparatus (i.e. MuRF1 targets like  $\alpha$ -actin, myosin heavy chains, telethonin, etc.) and a repression of protein synthesis and anabolic factors (i.e. MAFbx targets like eIF3f and MyoD) are necessary for maintaining long-term muscle atrophy[7-9,38,40]. In our study, we also found that 2 other E3 ligases were up regulated at the mRNA level, i.e. human double minute (Hdm2) and F-box protein 30/muscle ubiquitin ligase of the SCF complex in atrophy-1 (Fbxo30/MUSA1). Hdm2 is a ubiquitous E3 ligase mostly known for its role in p53 ubiquitination during cancer development, but it is also up regulated in muscles from hindlimb suspended rats, a model of hypokinesia[17]. Finally, Fbxo30/MUSA1 is a muscle-specific E3 ligase that was described as essential for the development of muscle atrophy in several rodent models with the exception of mild renal failure in rats but Fbxo30/MUSA1 targets remain to be discovered[10,39,41-43]. The recruitment of E3 ligases in catabolic patients was further demonstrated at the proteome level. Indeed, we found that the Cul1 and Cul2 were up regulated in both LC and HD patients (Table 2 and Table S3). Cul1 and Cul2 are scaffold proteins included in several multi subunits Cullin-Ring E3 ligases, which means that numerous E3 ligases belonging to this family may be up regulated in LC and HD patients. Interestingly, Cul1 is the Cullin integrated to the multi-subunits MAFbx E3 ligase, which corroborates the data obtained at the mRNA level. Altogether, we found that several components of the UPS were up regulated in both LC and HD patients (Fig 1, Table 2 and Table S3) but this was restricted to E3 ligases, which is in striking contrast with rodent models. The main difference between animal models and human pathologies is the timing, which is generally in days for animal models while it is in months or years for humans. Indeed, even though we recruited LC patients soon after cancer discovery, the atrophying process was probably already activated for weeks. However, BMI was within the normal range, which suggests that LC and HD patients were not severely cachectic. We hypothesize that the 26S proteasome and the E2 enzymes do not need to be maintained up regulated once the pathology is established, the enzyme activity being sufficient for maintaining the skeletal muscle in a catabolic state. By contrast, some E3 ligases (MuRF1, MAFbx, Hdm2 and Fbxo30/MUSA1)

are involved in the atrophying program in both very early (3-7 days, rodents) and late (>1 year, humans) stages of muscle atrophy.

Autophagy is known for playing a crucial role in atrophying muscles from rodents[10,44,45] and we found that p62/SQSTM1 was up regulated in LC and HD patients. p62 is a cargo recognition protein implicated in the selective addressing of proteins (or protein aggregates) or organelles to the autophagy machinery. Increased p62 transcription levels is thus directly linked to an increased autophagy flux. We also found that Cathepsin L (CTPL) and myosin heavy chain 15 (MYH15) were also up regulated in both LC and HD patients. CTPL is a lysosomal protease (the catalytic organelle of autophagy) and is also known to be an atrogene in rodent muscles[17,37]. MYH15 is a heavy chain of myosin involved in the transport of lysosomal vesicles. Our data are in accordance with previous studies demonstrating that LC3B (a protein crucial for autophagosome formation) and CTPL were up regulated in muscles from cancer cachexia patients[46]. Similarly, autophagy was activated in nephrectomized mice, causing mitochondria dysfunction without affecting the contractile apparatus[47]. Altogether, key proteins of autophagy were up regulated in both LC and HD patients, which represent potent and persistent markers of muscle atrophy.

Another main goal of our study was to find a shared atrophying pattern in patients developing diseases with a completely different etiology and at different stages. Our hypothesis was that similar protein modifications in LC and HD patients are more likely due to the atrophying process rather than the pathology itself. Interestingly, we found 238 proteins that were either down or up regulated in both LC and HD patients. Interestingly, numerous proteins of unknown function (at least in skeletal muscle) were amongst the ones undergoing the sharpest modifications. For example, several proteins positively correlating with cellular proliferation were down regulated, e.g. dermcidin ([-76 – -80] %,  $P < 1.0E-07$ ). Future studies will have to investigate the role of these proteins in the development of muscle atrophy but one hypothesis is that a sustained repression of cell proliferation may be an adaptive mechanism of muscle atrophy.

Besides proteins of unknown functions, our data highlighted an activation of endoplasmic reticulum (ER) stress in both LC and HD patients. We found that several chaperones were up regulated in the skeletal muscle of these patients, notably ERp44 a marker of ER stress (+234 – +368 %,  $P < 1.0E-29$ ). ERp44 is a pH-regulated chaperone of the secretory pathway, which controls oxidative-related protein misfolding in the ER[48]. These results are in accordance with studies showing that ER stress is activated in several catabolic situations (denervation,

starvation, high fat diet, cancer cachexia and aging)[49]. The ER stress response can be activated by several stress factors (nutrient deprivation, reactive oxygen species, etc.) and more recently in mice injected with indoxyl sulfate, a uremic toxin[50]. However, it is the first time that an ER stress is detected in HD patients. The ER stress response involves in particular the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway that decreases overall protein translation, triggers the specific expression of chaperones, activates the UPS and autophagy proteolytic systems and may ultimately lead to apoptosis[51]. Accordingly, we found an up regulation of CHOP, ATF4 and 4EBP1 (a downstream key protein of this pathway) in the muscles from both LC and HD patients (Fig. 6B).

Another striking effect of both cancer and renal failure was the increased expression of several glycolytic enzymes and the down regulation of several proteins involved in mitochondrial respiration in the muscle from LC and HD patients (Tables 2 and 3). This is in agreement with the slow oxidative to fast glycolytic transformation process observed during muscle atrophy[52] and the increased expression of several glycolytic enzymes observed in atrophying muscles from hind limb suspended[53], denervated[54] or immobilized[55] animals. Mitochondrial dysfunction has also been found in different rodent models of cachexia[47,56] and is a regulator of myofiber protein turnover and apoptosis[57]. The proposed model is that mitochondrial dysfunction may precede the installation of muscular atrophy[58]. Increased reactive oxygen species[59] and inflammation[60] have also been proposed to explain the metabolic changes associated with muscle atrophy. Future studies will have to clarify the role of the modifications in the occurrence of muscle wasting.

Muscle atrophy is accompanied by modifications of proteins involved in contraction and in the architecture of muscle tissue, including cytoskeleton[61], increased muscle fibrosis[62] and adipogenic infiltration[63]. In mice subjected to hindlimb suspension, the expression of several cytoskeleton proteins was modified in the atrophying muscles[61]. A remodeling of the cytoskeleton appears essential for allowing the degradation of filamentous proteins and for preserving the functional integrity of myofibrils during muscle atrophy[64]. Similarly, several proteins involved in muscle architecture and muscle contraction were either down or up regulated in both LC and HD patients (Table 2). Indeed, a group of proteins whose expression levels were modified in the muscle of LC and HD patients belong to the cytoskeleton organization including intermediate filaments. We found an up regulation of ARPC1A (component of the ARP2/3 complex), cofilin 2 (CFL2) and profilin 2 (PFN2) (regulators of actin polymerization/depolymerization), and a down regulation of filamin A (FLNA) (a cellular

actin-network stabilizer) and junction plakoglobin (JUP) (a mechanical stress transduction protein). We have also noted increased levels of myopalladin (MYPN), a protein that participates to thin filament assembly by linking nebulin and  $\alpha$ -actinin[65]. Its translocation into the cytosol may witness the destabilization of the sarcomeric structure and the subsequent degradation of sarcomeric proteins by the UPS. Furthermore, profound modifications of extracellular matrix components were observed between control and diseased patients (Table 2) like peptidase D (PEPD) (+15 – +40 %,  $P < 1.0E-02$ ) a protein involved in collagen synthesis, and the acireductone dioxygenase 1 (ADI1), an extracellular protease inhibitor (-39 – -61%,  $P < 1.0E-04$ ) which further suggest a profibrotic process in skeletal muscles from LC and HD patients. Regarding muscle adiposity, we found an increase in fat tissue obesity (FTO) gene expression (+14 – +40 %,  $P < 1.0E-02$ ). FTO is a nucleic acid demethylase that controls the expression of genes involved in energy metabolism. Its overexpression has been shown to cause intracellular lipid accumulation in skeletal muscle cells[66] and increased white adipose tissue[67]. Interestingly, proteome analysis also revealed an activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in both groups, which is known to have a dual function as it is involved either in muscle regeneration[68] or fibrosis[69]. Inhibition of canonical Wnt signaling in aged skeletal muscle has the potential to reduce fibrosis development[69]. This suggests that targeting the canonical Wnt pathway may be a potential approach for preserving muscle integrity.

## **Conclusion**

We observed an activation of the UPS and autophagy proteolytic systems, and common proteomic modifications in atrophying skeletal muscles from lung cancer and hemodialysis patients. Our data suggests that the degradation of the contractile apparatus and of the muscular cell structure (cytoskeleton) may be highly similar whatever the pathology, which means similar therapeutic strategies may be applied for preserving muscle mass. Our work represents a proof of concept with a limited number of patients and future work will have to confirm these data on a larger number of patients with similar or different pathologies. Another important issue will be to determine whether the muscle-atrophying program may also induce common variations in blood (e.g. at the transcriptomic level), a more easy-to-handle compartment in patients. If so, this may end up with a valuable diagnostic tool for early detection of catabolic situations or for following disease remission.

## References

1. von Haehling, S., Anker, M.S. & Anker, S.D. Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; **7**:507-509.
2. Kalantar-Zadeh, K., Rhee, C., Sim, J.J., Stenvinkel, P., Anker, S.D. & Kovesdy, C.P. Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2013; **4**:89-94.
3. Argiles, J.M., Busquets, S., Stemmler, B. & Lopez-Soriano, F.J. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer* 2014; **14**:754-762.
4. Baracos, V.E., Martin, L., Korc, M., Guttridge, D.C. & Fearon, K.C.H. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primers* 2018; **4**:17105.
5. Wang, X.H. & Mitch, W.E. Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2014; **10**:504-516.
6. Bodine, S.C. & Baehr, L.M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; **307**:E469-484.
7. Polge, C., Heng, A.E., Jarzagueta, M., Ventadour, S., Claustre, A., Combaret, L., *et al.* Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J* 2011; **25**:3790-3802.
8. Csibi, A., Leibovitch, M.P., Cornille, K., Tintignac, L.A. & Leibovitch, S.A. MAFbx/Atrogen-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *J Biol Chem* 2009; **284**:4413-4421.
9. Lagrand-Cantaloube, J., Cornille, K., Csibi, A., Batonnet-Pichon, S., Leibovitch, M.P. & Leibovitch, S.A. Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS One* 2009; **4**:e4973.
10. Milan, G., Romanello, V., Pescatore, F., Armani, A., Paik, J.H., Frasson, L., *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun* 2015; **6**:6670.
11. Tomko, R.J., Jr. & Hochstrasser, M. Molecular architecture and assembly of the eukaryotic proteasome. *Annu Rev Biochem* 2013; **82**:415-445.
12. Tisdale, M.J. Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition* 2001; **17**:438-442.
13. Bossola, M., Tazza, L., Giungi, S. & Luciani, G. Anorexia in hemodialysis patients: an update. *Kidney Int* 2006; **70**:417-422.
14. Toledo, M., Busquets, S., Sirisi, S., Serpe, R., Orpi, M., Coutinho, J., *et al.* Cancer cachexia: physical activity and muscle force in tumour-bearing rats. *Oncol Rep* 2011; **25**:189-193.
15. Johansen, K.L., Chertow, G.M., Ng, A.V., Mulligan, K., Carey, S., Schoenfeld, P.Y., *et al.* Physical activity levels in patients on hemodialysis and healthy sedentary controls. *Kidney Int* 2000; **57**:2564-2570.
16. Wing, S.S., Haas, A.L. & Goldberg, A.L. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem J* 1995; **307 ( Pt 3)**:639-645.
17. Taillandier, D., Aourousseau, E., Meynial-Denis, D., Bechet, D., Ferrara, M., Cottin, P., *et al.* Coordinate activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *Biochem J* 1996; **316 ( Pt 1)**:65-72.
18. Konishi, M., Ishida, J., von Haehling, S., Anker, S.D. & Springer, J. Nutrition in cachexia: from bench to bedside. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; **7**:107-109.
19. Patel, H.J. & Patel, B.M. TNF-alpha and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. *Life Sci* 2017; **170**:56-63.
20. Bonetto, A., Aydogdu, T., Jin, X., Zhang, Z., Zhan, R., Puzis, L., *et al.* JAK/STAT3 pathway inhibition blocks skeletal muscle wasting downstream of IL-6 and in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; **303**:E410-421.

21. Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Jr., Melendez, P.A., Oh, B.C., Lidov, H.G., *et al.* IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004; **119**:285-298.
22. Wang, X., Hu, Z., Hu, J., Du, J. & Mitch, W.E. Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology* 2006; **147**:4160-4168.
23. Asp, M.L., Tian, M., Wendel, A.A. & Belury, M.A. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer* 2010; **126**:756-763.
24. Costelli, P., Muscaritoli, M., Bonetto, A., Penna, F., Reffo, P., Bossola, M., *et al.* Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest* 2008; **38**:531-538.
25. Zhang, L., Rajan, V., Lin, E., Hu, Z., Han, H.Q., Zhou, X., *et al.* Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB J* 2011; **25**:1653-1663.
26. Zhang, L., Pan, J., Dong, Y., Tweardy, D.J., Dong, Y., Garibotto, G., *et al.* Stat3 activation links a C/EBPdelta to myostatin pathway to stimulate loss of muscle mass. *Cell Metab* 2013; **18**:368-379.
27. Gallagher, I.J., Jacobi, C., Tardif, N., Rooyackers, O. & Fearon, K. Omics/systems biology and cancer cachexia. *Semin Cell Dev Biol* 2016; **54**:92-103.
28. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**:156-159.
29. Lazraq A., C.R., J.-P. Gauchi J.-P. . Selecting both latent and explanatory variables in the PLS1 regression model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2003; **66**:117-126.
30. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003; **13**:2498-2504.
31. Bindea, G., Mlecnik, B., Hackl, H., Charoentong, P., Tosolini, M., Kirilovsky, A., *et al.* ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* 2009; **25**:1091-1093.
32. Bindea, G., Galon, J. & Mlecnik, B. CluePedia Cytoscape plugin: pathway insights using integrated experimental and in silico data. *Bioinformatics* 2013; **29**:661-663.
33. Nepusz, T., Yu, H. & Paccanaro, A. Detecting overlapping protein complexes in protein-protein interaction networks. *Nat Methods* 2012; **9**:471-472.
34. Mostafavi, S., Ray, D., Warde-Farley, D., Grouios, C. & Morris, Q. GeneMANIA: a real-time multiple association network integration algorithm for predicting gene function. *Genome Biol* 2008; **9 Suppl 1**:S4.
35. Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., *et al.* Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* 2004; **18**:39-51.
36. Voisin, L., Breuille, D., Combaret, L., Pouyet, C., Taillandier, D., Aurousseau, E., *et al.* Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup> - activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* 1996; **97**:1610-1617.
37. Temparis, S., Asensi, M., Taillandier, D., Aurousseau, E., Larbaud, D., Obled, A., *et al.* Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res* 1994; **54**:5568-5573.
38. Polge, C., Cabantous, S., Deval, C., Claustre, A., Hauvette, A., Bouchenot, C., *et al.* A muscle-specific MuRF1-E2 network requires stabilization of MuRF1-E2 complexes by telethonin, a newly identified substrate. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018; **9**:129-145.
39. Aniot, J., Polge, C., Claustre, A., Combaret, L., Bechet, D., Attaix, D., *et al.* Upregulation of MuRF1 and MAFbx participates to muscle wasting upon gentamicin-induced acute kidney injury. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; **79**:505-516.

40. Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., *et al.* The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab* 2007; **6**:376-385.
41. Li, F., Buck, D., De Winter, J., Kolb, J., Meng, H., Birch, C., *et al.* Nebulin deficiency in adult muscle causes sarcomere defects and muscle-type-dependent changes in trophicity: novel insights in nemaline myopathy. *Hum Mol Genet* 2015; **24**:5219-5233.
42. Smith, H.K., Matthews, K.G., Oldham, J.M., Jeanplong, F., Falconer, S.J., Bass, J.J., *et al.* Translational signalling, atrogenic and myogenic gene expression during unloading and reloading of skeletal muscle in myostatin-deficient mice. *PLoS One* 2014; **9**:e94356.
43. Sato, A.Y., Richardson, D., Cregor, M., Davis, H.M., Au, E.D., McAndrews, K., *et al.* Glucocorticoids Induce Bone and Muscle Atrophy by Tissue-Specific Mechanisms Upstream of E3 Ubiquitin Ligases. *Endocrinology* 2017; **158**:664-677.
44. Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., *et al.* Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 2009; **10**:507-515.
45. Mammucari, C., Schiaffino, S. & Sandri, M. Downstream of Akt: FoxO3 and mTOR in the regulation of autophagy in skeletal muscle. *Autophagy* 2008; **4**:524-526.
46. Tardif, N., Klaude, M., Lundell, L., Thorell, A. & Rooyackers, O. Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2013; **98**:1485-1492.
47. Su, Z., Klein, J.D., Du, J., Franch, H.A., Zhang, L., Hassounah, F., *et al.* Chronic kidney disease induces autophagy leading to dysfunction of mitochondria in skeletal muscle. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; **312**:F1128-F1140.
48. Anelli, T., Alessio, M., Mezghrani, A., Simmen, T., Talamo, F., Bachi, A., *et al.* ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *EMBO J* 2002; **21**:835-844.
49. Afroze, D. & Kumar, A. ER stress in skeletal muscle remodeling and myopathies. *FEBS J* 2017.
50. Jheng, J.R., Chen, Y.S., Ao, U.I., Chan, D.C., Huang, J.W., Hung, K.Y., *et al.* The double-edged sword of endoplasmic reticulum stress in uremic sarcopenia through myogenesis perturbation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2018; **9**:570-584.
51. B'Chir, W., Maurin, A.C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., *et al.* The eIF2alpha/ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**:7683-7699.
52. Bigard, A.X., Boehm, E., Veksler, V., Mateo, P., Anflous, K. & Ventura-Clapier, R. Muscle unloading induces slow to fast transitions in myofibrillar but not mitochondrial properties. Relevance to skeletal muscle abnormalities in heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1998; **30**:2391-2401.
53. Seo, Y., Lee, K., Park, K., Bae, K. & Choi, I. A proteomic assessment of muscle contractile alterations during unloading and reloading. *J Biochem* 2006; **139**:71-80.
54. Sun, H., Liu, J., Ding, F., Wang, X., Liu, M. & Gu, X. Investigation of differentially expressed proteins in rat gastrocnemius muscle during denervation-reinnervation. *J Muscle Res Cell Motil* 2006; **27**:241-250.
55. Toigo, M., Donohoe, S., Sperrazzo, G., Jarrold, B., Wang, F., Hinkle, R., *et al.* ICAT-MS-MS time course analysis of atrophying mouse skeletal muscle cytosolic subproteome. *Mol Biosyst* 2005; **1**:229-241.
56. Argiles, J.M., Lopez-Soriano, F.J. & Busquets, S. Muscle wasting in cancer: the role of mitochondria. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2015; **18**:221-225.
57. Carson, J.A., Hardee, J.P. & VanderVeen, B.N. The emerging role of skeletal muscle oxidative metabolism as a biological target and cellular regulator of cancer-induced muscle wasting. *Semin Cell Dev Biol* 2016; **54**:53-67.
58. Brown, J.L., Rosa-Caldwell, M.E., Lee, D.E., Blackwell, T.A., Brown, L.A., Perry, R.A., *et al.* Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017; **8**:926-938.

59. Tang, H., Lee, M., Sharpe, O., Salamone, L., Noonan, E.J., Hoang, C.D., *et al.* Oxidative stress-responsive microRNA-320 regulates glycolysis in diverse biological systems. *FASEB J* 2012; **26**:4710-4721.
60. Remels, A.H., Gosker, H.R., Langen, R.C., Polkey, M., Sliwinski, P., Galdiz, J., *et al.* Classical NF-kappaB activation impairs skeletal muscle oxidative phenotype by reducing IKK-alpha expression. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1842**:175-185.
61. Wang, F., Zhang, P., Liu, H., Fan, M. & Chen, X. Proteomic analysis of mouse soleus muscles affected by hindlimb unloading and reloading. *Muscle Nerve* 2015; **52**:803-811.
62. Cisternas, P., Henriquez, J.P., Brandan, E. & Inestrosa, N.C. Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis. *Mol Neurobiol* 2014; **49**:574-589.
63. Vettor, R., Milan, G., Franzin, C., Sanna, M., De Coppi, P., Rizzuto, R., *et al.* The origin of intermuscular adipose tissue and its pathophysiological implications. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **297**:E987-998.
64. Sanger, J.W., Wang, J., Fan, Y., White, J., Mi-Mi, L., Dube, D.K., *et al.* Assembly and Maintenance of Myofibrils in Striated Muscle. *Handb Exp Pharmacol* 2017; **235**:39-75.
65. Bang, M.L., Mudry, R.E., McElhinny, A.S., Trombitas, K., Geach, A.J., Yamasaki, R., *et al.* Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol* 2001; **153**:413-427.
66. Wu, W., Feng, J., Jiang, D., Zhou, X., Jiang, Q., Cai, M., *et al.* AMPK regulates lipid accumulation in skeletal muscle cells through FTO-dependent demethylation of N(6)-methyladenosine. *Sci Rep* 2017; **7**:41606.
67. Merkestein, M., Laber, S., McMurray, F., Andrew, D., Sachse, G., Sanderson, J., *et al.* FTO influences adipogenesis by regulating mitotic clonal expansion. *Nat Commun* 2015; **6**:6792.
68. Rudolf, A., Schirwis, E., Giordani, L., Parisi, A., Lepper, C., Taketo, M.M., *et al.* beta-Catenin Activation in Muscle Progenitor Cells Regulates Tissue Repair. *Cell Rep* 2016; **15**:1277-1290.
69. Brack, A.S., Conboy, M.J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C.J., Keller, C., *et al.* Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 2007; **317**:807-810.
70. von Haehling, S., Morley, J.E., Coats, A.J.S. & Anker, S.D. Ethical guidelines for publishing in the journal of cachexia, sarcopenia and muscle: update 2017. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2017; **8**:1081-1083.

**Table 1. Patients characteristics**

	<b>Control patients (n=7)</b>	<b>Lung cancer patients (n=7)</b>	<b>Hemodialysis patients (n=7)</b>	<b>p</b>
Age (years)	71 [60-79]	69 [62-75]	69 [66-77]	> 0.9
M:F	6 :1	6 :1	6 :1	> 0.9
Weight (kg)	76 [73-78] <sup>a</sup>	66 [62-72] <sup>ab</sup>	64 [59-66] <sup>b</sup>	0.05
Height (cm)	170 [174-182] <sup>a</sup>	173 [169-176] <sup>ab</sup>	165 [160-170] <sup>b</sup>	0.03
BMI	24.8 [23.5-25.1]	21.3 [20.2-24.1]	23.4 [22.4-24.4]	0.15
CRP (mg/L)	3.0 [3.0-8.7] <sup>a</sup>	9.7 [4.1-37.3] <sup>b</sup>	12.8 [4.4-22.5] <sup>b</sup>	0.03
Creatinine (μmol/L)	66 [59-81] <sup>a</sup>	82 [64-90] <sup>a</sup>	535 [494-752] <sup>b</sup>	<0.001
GFR mL/min/1.73m <sup>2</sup>	88 [85-95]	84 [74-94]	NA	> 0.9

Values are median and interquartile range. BMI, body mass index ; CRP, C-reactive protein ; GFR, glomerular filtration rate ; M:F , sex ratio male-to-female ; P-value obtained with one-way ANOVA. Values with different letters are significantly different using Tukey multiple comparison post-hoc test.

**Table 2. Enriched biological process in LC and HD patients**

	Increased Expression	Decreased Expression	Enrichment P Value
<b>Proteostasis</b>			
<b>Proteolysis</b>	CAPNS1, CTTNB, CUL1, CUL2, I, PSMA3, PSMB1, PSMD13, GAPDH, , NPEPPS, QDPR, SCFD1, PGEP1, SERPINB1, SERPINB6, UBE2I, USP9X	APCS, ASPN, AZU1, BGN, CASP14, CLU, PARK7, PIP, SERPINB3, UBE3A, USP13, UCHL5	2,6E-7
<b>Protein folding</b>	BOLA2, GNB1, CLU, APCS, HSPA6, B2M, ERP44, PPIH, TXNDC5, HSPA1B, PARK7, STT3B	AHSA1, HSPE1	1.7E-3
<b>Cellular amino acid metabolic process</b>	AARS, AIMP1, BCKDK	ADI1, DBT, DDAH2,	5E-3
<b>Glucose catabolic process</b>	AKR1B1, ENO2, ENO3, GAPDH, GPD1, PFKFB1, PFKFB2, PGAM1, PGAM2, PGK1, PGLS, PGM1, PHKA1, PHKG1, PGPEP1, PKM, PTBP1, LDHD, UGP2,	SORD	2.5E-7
<b>Fatty acid metabolism</b>	ACAD9, AKR1C2, ECHDC2, FTO, HSD17B12, GPD, PLIN2, ZADH2	ACAA1, CDS2	1,4E-4
<b>Energy metabolism</b>			
<b>Acetyl Co A biosynthetic process</b>	ACSS1, LDHD	MPC1	5.2E-4
<b>Oxydative phosphorylation</b>	NDUFA1, MRP44, MIC13	ATP5D, DMAC1, SARS2, USP13, VGF	5E-3
<b>Inflammatory response</b>			
<b>Regulation of defense response</b>	ABCE1, AIMP1, ARPC1A, B2M, CUL1, F13A1, FGA, FGB, FGG, GAPDH, GRB2, IGHD, HSP1A, LTA4H, NLRX1, PSMA3, PSMB1, PSMD13, PTGIS, SAMHD1, SERPINB1, STAT3, SCNA	APCS, AZU1, BPI C4B, C5, MPO, PRTN3, CD47, CFHR2, KRT1, LCN2, LGAL3, NOS2, PARK7, PCBP2, PROS1, SAA, S100A7, S100A8, S100A9	3.3E-7
<b>Leucocyte migration</b>	AIMP1, BOLA2, CD47, GRB2, IGKV4-1, PRTN3, RHOA, STAT3	ADD2, AZU1, C5, CLU, GYPA, IGLV1-47, LCP1, LGALS3, MPP1, PROS1, SAA1, S100A7, S100A8, S100A9	1,8E-5
<b>Extracellular matrix</b>	FBLN5, GMPPB, PEPD, SERPB1	APCS, ASPN, BGL, CILP, FMOD, PIP	3.4E-02
<b>Skeletal muscle contraction</b>	CFL2, CSRP3, KELCCH, KLHL41, MYL4, MYH15, MYPN, ANXA6, ATP1A2, GPD1-L, NIPSNAP2	MYH6, NRAP, PLN, SLC20A2	8,5E-4

<b>Cytoskeleton organisation</b>	ACTBL2, ARHGDI1, ARPC1A, CFL2, CTNNA1, GDI1, NUBP2, PFN2, PRUNE1, RHOA, SNCA	ADD2, DMTN, FLNA, JUP, KRT1, KRT2, LCP1, MYOC, PALM, S100A8, S100A9, TUBA1A, TUBB1	1.3E-4
<b>Cellular oxidant detoxification</b>	AKR1B1, CCS, FAM213A, FBLN5, GSTM2, GSTT1, MPO, NUP93, NQO1, PARK7, S100A9, TXNRD, HAGH		9.9E-6

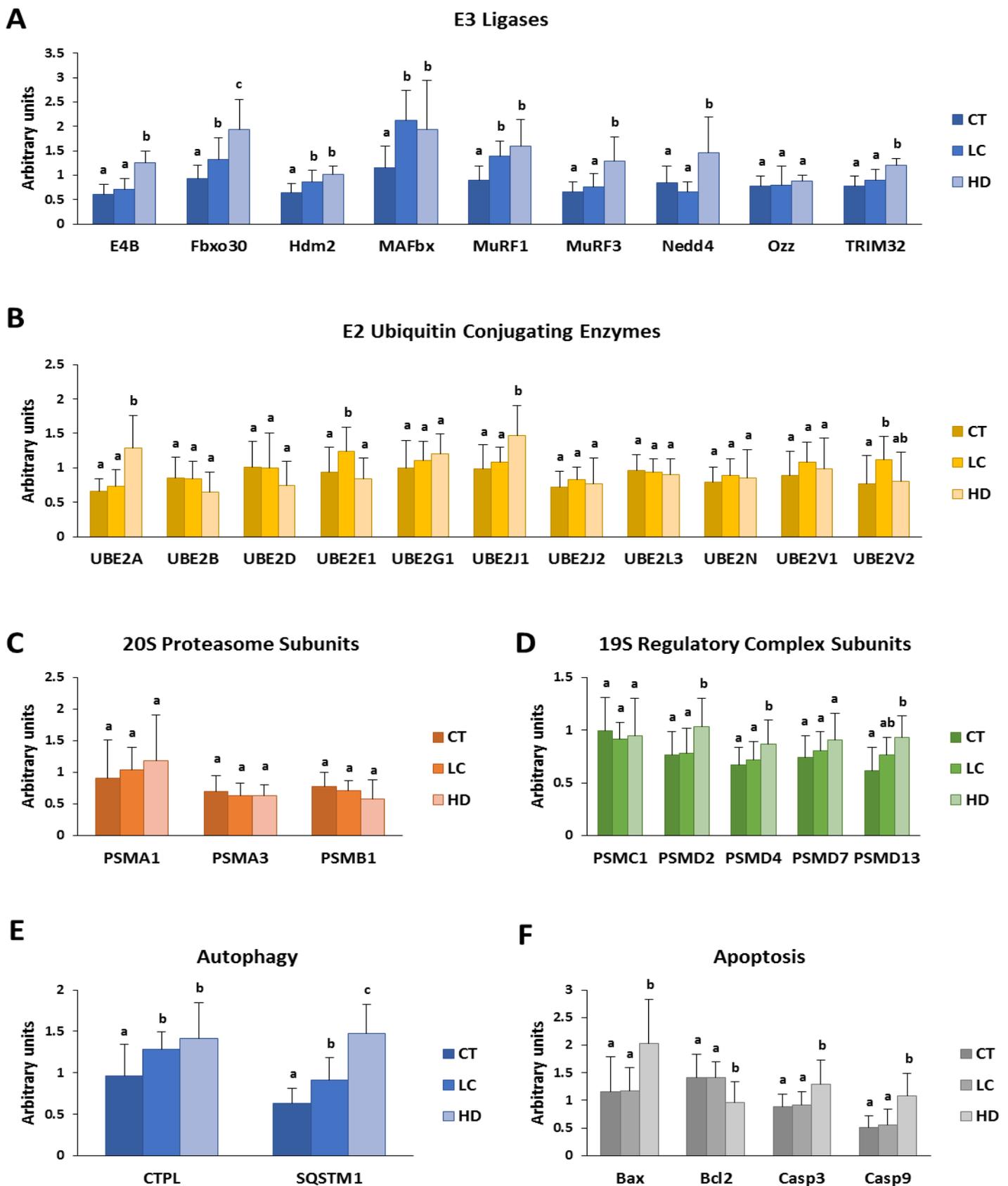
Enriched biological processes have been identified from the 321 proteins whose expression was significantly increased or decreased in both LC and HD patients, using ClueGO® plug-in in Cytoscape®

**Table 3. Functions of clusters of expression**

<b>Cluster</b>	<b>Enriched Function</b>	<b>Q-value</b>	<b>Proteins involved</b>
<b>1</b>	Cellular respiration	1.0E-161	ACO2, ALDH5A1, ATP5A1, ATP5B, ATP5C1, ATP5D, ATP5F1, ATP5H, ATP5I, ATP5J2, ATP5L, ATP5O, COX4I1, COX5A, COX5B, COX6B1, COX6C, CS, CYC1, CYCS, DLD, DLST, ETFA, ETFB, ETFDH, FH, IDH2, IDH3A, IDH3G, MDH2, MT-ATP6, MT-CO2, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFA2, NDUFA4, NDUFA5, NDUFA6, NDUFA8, NDUFA9, NDUFAB1, NDUFB1, NDUFB10, NDUFB11, NDUFB3, NDUFB4, NDUFB5, NDUFB6, NDUFB7, NDUFB8, NDUFB9, NDUF2, NDUF3, NDUF4, NDUF5, NDUF6, NDUF7, NDUF8, NDUF9, NDUF10, NDUF11, NDUF12, NDUF13, NDUF14, NDUF15, NDUF16, NDUF17, NDUF18, NDUF19, NDUF20, NDUF21, NDUF22, NDUF23, NDUF24, NDUF25, NDUF26, NDUF27, NDUF28, NDUF29, NDUF30, NDUF31, NDUF32, NDUF33, NDUF34, NDUF35, NDUF36, NDUF37, NDUF38, NDUF39, NDUF40, NDUF41, NDUF42, NDUF43, NDUF44, NDUF45, NDUF46, NDUF47, NDUF48, NDUF49, NDUF50, NDUF51, NDUF52, NDUF53, NDUF54, NDUF55, NDUF56, NDUF57, NDUF58, NDUF59, NDUF60, NDUF61, NDUF62, NDUF63, NDUF64, NDUF65, NDUF66, NDUF67, NDUF68, NDUF69, NDUF70, NDUF71, NDUF72, NDUF73, NDUF74, NDUF75, NDUF76, NDUF77, NDUF78, NDUF79, NDUF80, NDUF81, NDUF82, NDUF83, NDUF84, NDUF85, NDUF86, NDUF87, NDUF88, NDUF89, NDUF90, NDUF91, NDUF92, NDUF93, NDUF94, NDUF95, NDUF96, NDUF97, NDUF98, NDUF99, NDUF100, NDUF101, NDUF102, NDUF103, NDUF104, NDUF105, NDUF106, NDUF107, NDUF108, NDUF109, NDUF110, NDUF111, NDUF112, NDUF113, NDUF114, NDUF115, NDUF116, NDUF117, NDUF118, NDUF119, NDUF120, NDUF121, NDUF122, NDUF123, NDUF124, NDUF125, NDUF126, NDUF127, NDUF128, NDUF129, NDUF130, NDUF131, NDUF132, NDUF133, NDUF134, NDUF135, NDUF136, NDUF137, NDUF138, NDUF139, NDUF140, NDUF141, NDUF142, NDUF143, NDUF144, NDUF145, NDUF146, NDUF147, NDUF148, NDUF149, NDUF150, NDUF151, NDUF152, NDUF153, NDUF154, NDUF155, NDUF156, NDUF157, NDUF158, NDUF159, NDUF160, NDUF161, NDUF162, NDUF163, NDUF164, NDUF165, NDUF166, NDUF167, NDUF168, NDUF169, NDUF170, NDUF171, NDUF172, NDUF173, NDUF174, NDUF175, NDUF176, NDUF177, NDUF178, NDUF179, NDUF180, NDUF181, NDUF182, NDUF183, NDUF184, NDUF185, NDUF186, NDUF187, NDUF188, NDUF189, NDUF190, NDUF191, NDUF192, NDUF193, NDUF194, NDUF195, NDUF196, NDUF197, NDUF198, NDUF199, NDUF200, NDUF201, NDUF202, NDUF203, NDUF204, NDUF205, NDUF206, NDUF207, NDUF208, NDUF209, NDUF210, NDUF211, NDUF212, NDUF213, NDUF214, NDUF215, NDUF216, NDUF217, NDUF218, NDUF219, NDUF220, NDUF221, NDUF222, NDUF223, NDUF224, NDUF225, NDUF226, NDUF227, NDUF228, NDUF229, NDUF230, NDUF231, NDUF232, NDUF233, NDUF234, NDUF235, NDUF236, NDUF237, NDUF238, NDUF239, NDUF240, NDUF241, NDUF242, NDUF243, NDUF244, NDUF245, NDUF246, NDUF247, NDUF248, NDUF249, NDUF250, NDUF251, NDUF252, NDUF253, NDUF254, NDUF255, NDUF256, NDUF257, NDUF258, NDUF259, NDUF260, NDUF261, NDUF262, NDUF263, NDUF264, NDUF265, NDUF266, NDUF267, NDUF268, NDUF269, NDUF270, NDUF271, NDUF272, NDUF273, NDUF274, NDUF275, NDUF276, NDUF277, NDUF278, NDUF279, NDUF280, NDUF281, NDUF282, NDUF283, NDUF284, NDUF285, NDUF286, NDUF287, NDUF288, NDUF289, NDUF290, NDUF291, NDUF292, NDUF293, NDUF294, NDUF295, NDUF296, NDUF297, NDUF298, NDUF299, NDUF300, NDUF301, NDUF302, NDUF303, NDUF304, NDUF305, NDUF306, NDUF307, NDUF308, NDUF309, NDUF310, NDUF311, NDUF312, NDUF313, NDUF314, NDUF315, NDUF316, NDUF317, NDUF318, NDUF319, NDUF320, NDUF321, NDUF322, NDUF323, NDUF324, NDUF325, NDUF326, NDUF327, NDUF328, NDUF329, NDUF330, NDUF331, NDUF332, NDUF333, NDUF334, NDUF335, NDUF336, NDUF337, NDUF338, NDUF339, NDUF340, NDUF341, NDUF342, NDUF343, NDUF344, NDUF345, NDUF346, NDUF347, NDUF348, NDUF349, NDUF350, NDUF351, NDUF352, NDUF353, NDUF354, NDUF355, NDUF356, NDUF357, NDUF358, NDUF359, NDUF360, NDUF361, NDUF362, NDUF363, NDUF364, NDUF365, NDUF366, NDUF367, NDUF368, NDUF369, NDUF370, NDUF371, NDUF372, NDUF373, NDUF374, NDUF375, NDUF376, NDUF377, NDUF378, NDUF379, NDUF380, NDUF381, NDUF382, NDUF383, NDUF384, NDUF385, NDUF386, NDUF387, NDUF388, NDUF389, NDUF390, NDUF391, NDUF392, NDUF393, NDUF394, NDUF395, NDUF396, NDUF397, NDUF398, NDUF399, NDUF400, NDUF401, NDUF402, NDUF403, NDUF404, NDUF405, NDUF406, NDUF407, NDUF408, NDUF409, NDUF410, NDUF411, NDUF412, NDUF413, NDUF414, NDUF415, NDUF416, NDUF417, NDUF418, NDUF419, NDUF420, NDUF421, NDUF422, NDUF423, NDUF424, NDUF425, NDUF426, NDUF427, NDUF428, NDUF429, NDUF430, NDUF431, NDUF432, NDUF433, NDUF434, NDUF435, NDUF436, NDUF437, NDUF438, NDUF439, NDUF440, NDUF441, NDUF442, NDUF443, NDUF444, NDUF445, NDUF446, NDUF447, NDUF448, NDUF449, NDUF450, NDUF451, NDUF452, NDUF453, NDUF454, NDUF455, NDUF456, NDUF457, NDUF458, NDUF459, NDUF460, NDUF461, NDUF462, NDUF463, NDUF464, NDUF465, NDUF466, NDUF467, NDUF468, NDUF469, NDUF470, NDUF471, NDUF472, NDUF473, NDUF474, NDUF475, NDUF476, NDUF477, NDUF478, NDUF479, NDUF480, NDUF481, NDUF482, NDUF483, NDUF484, NDUF485, NDUF486, NDUF487, NDUF488, NDUF489, NDUF490, NDUF491, NDUF492, NDUF493, NDUF494, NDUF495, NDUF496, NDUF497, NDUF498, NDUF499, NDUF500, NDUF501, NDUF502, NDUF503, NDUF504, NDUF505, NDUF506, NDUF507, NDUF508, NDUF509, NDUF510, NDUF511, NDUF512, NDUF513, NDUF514, NDUF515, NDUF516, NDUF517, NDUF518, NDUF519, NDUF520, NDUF521, NDUF522, NDUF523, NDUF524, NDUF525, NDUF526, NDUF527, NDUF528, NDUF529, NDUF530, NDUF531, NDUF532, NDUF533, NDUF534, NDUF535, NDUF536, NDUF537, NDUF538, NDUF539, NDUF540, NDUF541, NDUF542, NDUF543, NDUF544, NDUF545, NDUF546, NDUF547, NDUF548, NDUF549, NDUF550, NDUF551, NDUF552, NDUF553, NDUF554, NDUF555, NDUF556, NDUF557, NDUF558, NDUF559, NDUF560, NDUF561, NDUF562, NDUF563, NDUF564, NDUF565, NDUF566, NDUF567, NDUF568, NDUF569, NDUF570, NDUF571, NDUF572, NDUF573, NDUF574, NDUF575, NDUF576, NDUF577, NDUF578, NDUF579, NDUF580, NDUF581, NDUF582, NDUF583, NDUF584, NDUF585, NDUF586, NDUF587, NDUF588, NDUF589, NDUF590, NDUF591, NDUF592, NDUF593, NDUF594, NDUF595, NDUF596, NDUF597, NDUF598, NDUF599, NDUF600, NDUF601, NDUF602, NDUF603, NDUF604, NDUF605, NDUF606, NDUF607, NDUF608, NDUF609, NDUF610, NDUF611, NDUF612, NDUF613, NDUF614, NDUF615, NDUF616, NDUF617, NDUF618, NDUF619, NDUF620, NDUF621, NDUF622, NDUF623, NDUF624, NDUF625, NDUF626, NDUF627, NDUF628, NDUF629, NDUF630, NDUF631, NDUF632, NDUF633, NDUF634, NDUF635, NDUF636, NDUF637, NDUF638, NDUF639, NDUF640, NDUF641, NDUF642, NDUF643, NDUF644, NDUF645, NDUF646, NDUF647, NDUF648, NDUF649, NDUF650, NDUF651, NDUF652, NDUF653, NDUF654, NDUF655, NDUF656, NDUF657, NDUF658, NDUF659, NDUF660, NDUF661, NDUF662, NDUF663, NDUF664, NDUF665, NDUF666, NDUF667, NDUF668, NDUF669, NDUF670, NDUF671, NDUF672, NDUF673, NDUF674, NDUF675, NDUF676, NDUF677, NDUF678, NDUF679, NDUF680, NDUF681, NDUF682, NDUF683, NDUF684, NDUF685, NDUF686, NDUF687, NDUF688, NDUF689, NDUF690, NDUF691, NDUF692, NDUF693, NDUF694, NDUF695, NDUF696, NDUF697, NDUF698, NDUF699, NDUF700, NDUF701, NDUF702, NDUF703, NDUF704, NDUF705, NDUF706, NDUF707, NDUF708, NDUF709, NDUF710, NDUF711, NDUF712, NDUF713, NDUF714, NDUF715, NDUF716, NDUF717, NDUF718, NDUF719, NDUF720, NDUF721, NDUF722, NDUF723, NDUF724, NDUF725, NDUF726, NDUF727, NDUF728, NDUF729, NDUF730, NDUF731, NDUF732, NDUF733, NDUF734, NDUF735, NDUF736, NDUF737, NDUF738, NDUF739, NDUF740, NDUF741, NDUF742, NDUF743, NDUF744, NDUF745, NDUF746, NDUF747, NDUF748, NDUF749, NDUF750, NDUF751, NDUF752, NDUF753, NDUF754, NDUF755, NDUF756, NDUF757, NDUF758, NDUF759, NDUF760, NDUF761, NDUF762, NDUF763, NDUF764, NDUF765, NDUF766, NDUF767, NDUF768, NDUF769, NDUF770, NDUF771, NDUF772, NDUF773, NDUF774, NDUF775, NDUF776, NDUF777, NDUF778, NDUF779, NDUF780, NDUF781, NDUF782, NDUF783, NDUF784, NDUF785, NDUF786, NDUF787, NDUF788, NDUF789, NDUF790, NDUF791, NDUF792, NDUF793, NDUF794, NDUF795, NDUF796, NDUF797, NDUF798, NDUF799, NDUF800, NDUF801, NDUF802, NDUF803, NDUF804, NDUF805, NDUF806, NDUF807, NDUF808, NDUF809, NDUF810, NDUF811, NDUF812, NDUF813, NDUF814, NDUF815, NDUF816, NDUF817, NDUF818, NDUF819, NDUF820, NDUF821, NDUF822, NDUF823, NDUF824, NDUF825, NDUF826, NDUF827, NDUF828, NDUF829, NDUF830, NDUF831, NDUF832, NDUF833, NDUF834, NDUF835, NDUF836, NDUF837, NDUF838, NDUF839, NDUF840, NDUF841, NDUF842, NDUF843, NDUF844, NDUF845, NDUF846, NDUF847, NDUF848, NDUF849, NDUF850, NDUF851, NDUF852, NDUF853, NDUF854, NDUF855, NDUF856, NDUF857, NDUF858, NDUF859, NDUF860, NDUF861, NDUF862, NDUF863, NDUF864, NDUF865, NDUF866, NDUF867, NDUF868, NDUF869, NDUF870, NDUF871, NDUF872, NDUF873, NDUF874, NDUF875, NDUF876, NDUF877, NDUF878, NDUF879, NDUF880, NDUF881, NDUF882, NDUF883, NDUF884, NDUF885, NDUF886, NDUF887, NDUF888, NDUF889, NDUF890, NDUF891, NDUF892, NDUF893, NDUF894, NDUF895, NDUF896, NDUF897, NDUF898, NDUF899, NDUF900, NDUF901, NDUF902, NDUF903, NDUF904, NDUF905, NDUF906, NDUF907, NDUF908, NDUF909, NDUF910, NDUF911, NDUF912, NDUF913, NDUF914, NDUF915, NDUF916, NDUF917, NDUF918, NDUF919, NDUF920, NDUF921, NDUF922, NDUF923, NDUF924, NDUF925, NDUF926, NDUF927, NDUF928, NDUF929, NDUF930, NDUF931, NDUF932, NDUF933, NDUF934, NDUF935, NDUF936, NDUF937, NDUF938, NDUF939, NDUF940, NDUF941, NDUF942, NDUF943, NDUF944, NDUF945, NDUF946, NDUF947, NDUF948, NDUF949, NDUF950, NDUF951, NDUF952, NDUF953, NDUF954, NDUF955, NDUF956, NDUF957, NDUF958, NDUF959, NDUF960, NDUF961, NDUF962, NDUF963, NDUF964, NDUF965, NDUF966, NDUF967, NDUF968, NDUF969, NDUF970, NDUF971, NDUF972, NDUF973, NDUF974, NDUF975, NDUF976, NDUF977, NDUF978, NDUF979, NDUF980, NDUF981, NDUF982, NDUF983, NDUF984, NDUF985, NDUF986, NDUF987, NDUF988, NDUF989, NDUF990, NDUF991, NDUF992, NDUF993, NDUF994, NDUF995, NDUF996, NDUF997, NDUF998, NDUF999, NDUF1000
<b>2</b>	Inflammatory response	7.9E-18	A2M, AGT, AHSG, APOA1, APOD, APOE, C3, C4A, C9, CFB, CFH, ITIH4, KNG1, ORM1, SERPINA3, SERPING1, VTN
<b>3</b>	Leucocyte migration	2.3E-06	AZU1, CD47, ITGB3, MPP1, PROS1, S100A7, S100A8, SAA1
<b>4</b>	Translation factor activity	4.5E-10	EEF1A2, EIF2S1, EIF3E, EIF3I, EIF4A2, EIF4G1
<b>5</b>	Muscle contraction	1.1E-58	TPM1, TMOD4, TNNT3, MYL1, TNNI2, TPM2, MYH7, MYH2, TPM3, ACTN3, TMOD1, MYL3, ASPH, MYL6B, TNNI1, MYL5, MYH3, ACTN2, TNNT1, TNNC1, ACTA1, MYBPC2, MYL2, MYH4
<b>6</b>	Extracellular Matrix	4.4E-5	COL15A1, CILP, SNCA, FMOD
<b>7</b>	Glucose metabolic process	2.6E-36	PGK1, PGAM2, ALDOA, ENO2, PGM1, FBP2, GAPDH, ENO3, GPI, ALDOC, TPI1
<b>8</b>	Proteasome complex	1.1E-71	PSMA5, PSMA3, PSMD6, PSMD4, VCP, PSMA1, PSMB7, PSMB1, PSMA7, PSMB2

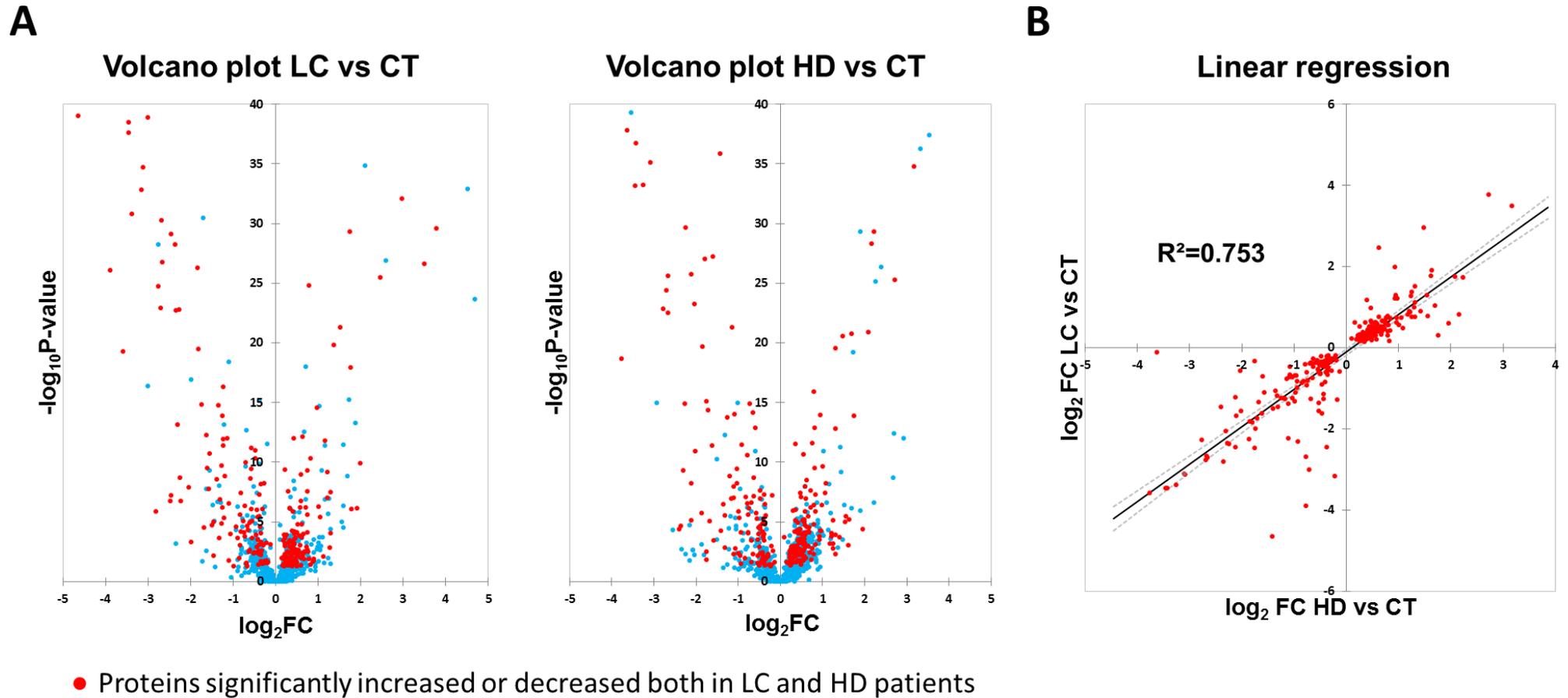
Eight clusters of expression identified using ClusterOne® display enriched function in GeneMania®.

Figure 1.



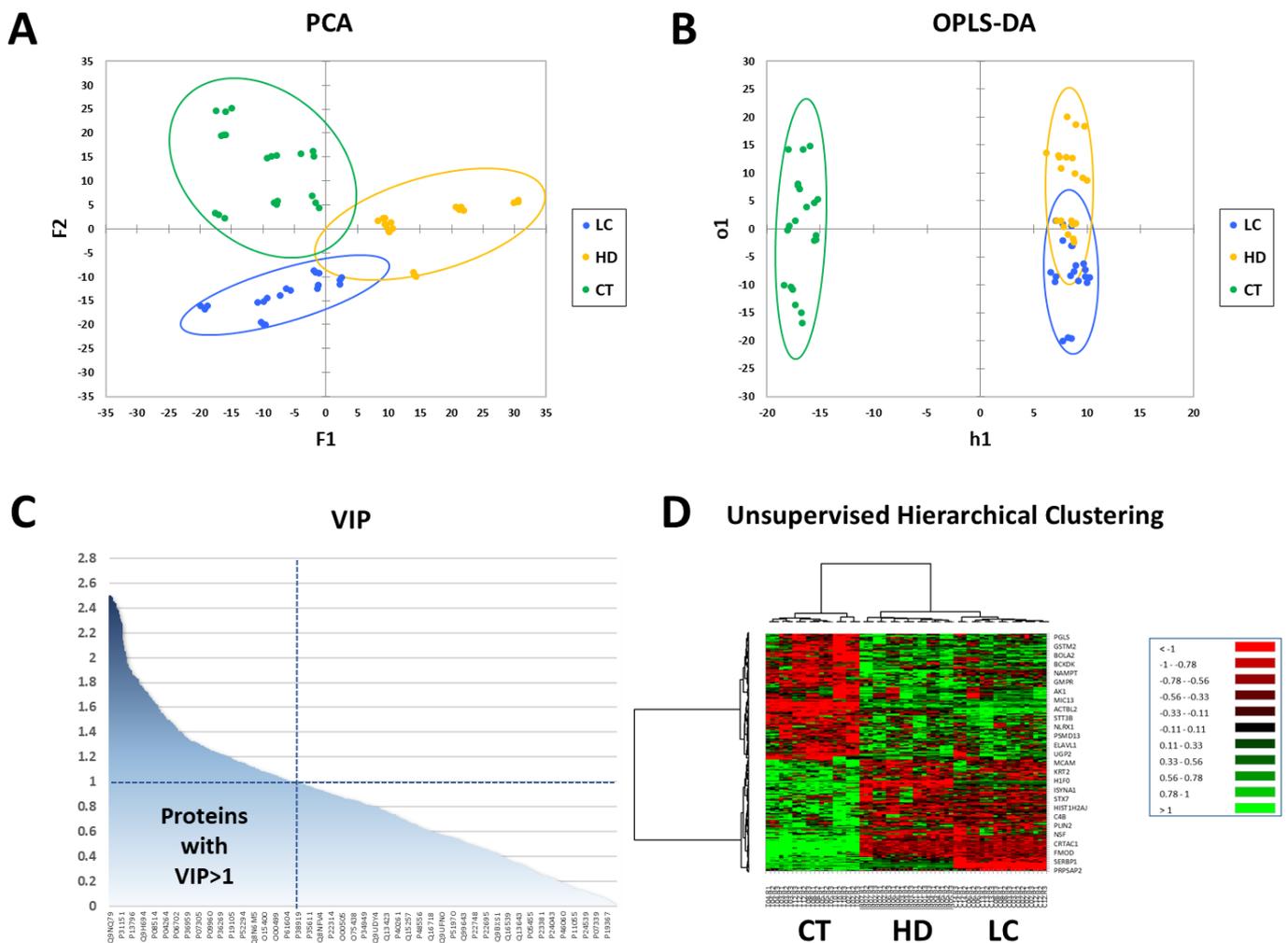
**Fig. 1 qRT-PCR of genes from UPS and autophagy proteolytic system.** mRNA levels of several components from UPS and autophagy proteolytic systems are increased in muscle of LC and HD patients. P-value obtained with one-ANOVA. Values with different letters are significantly different using Tukey multiple comparison post-hoc test.

Figure 2.



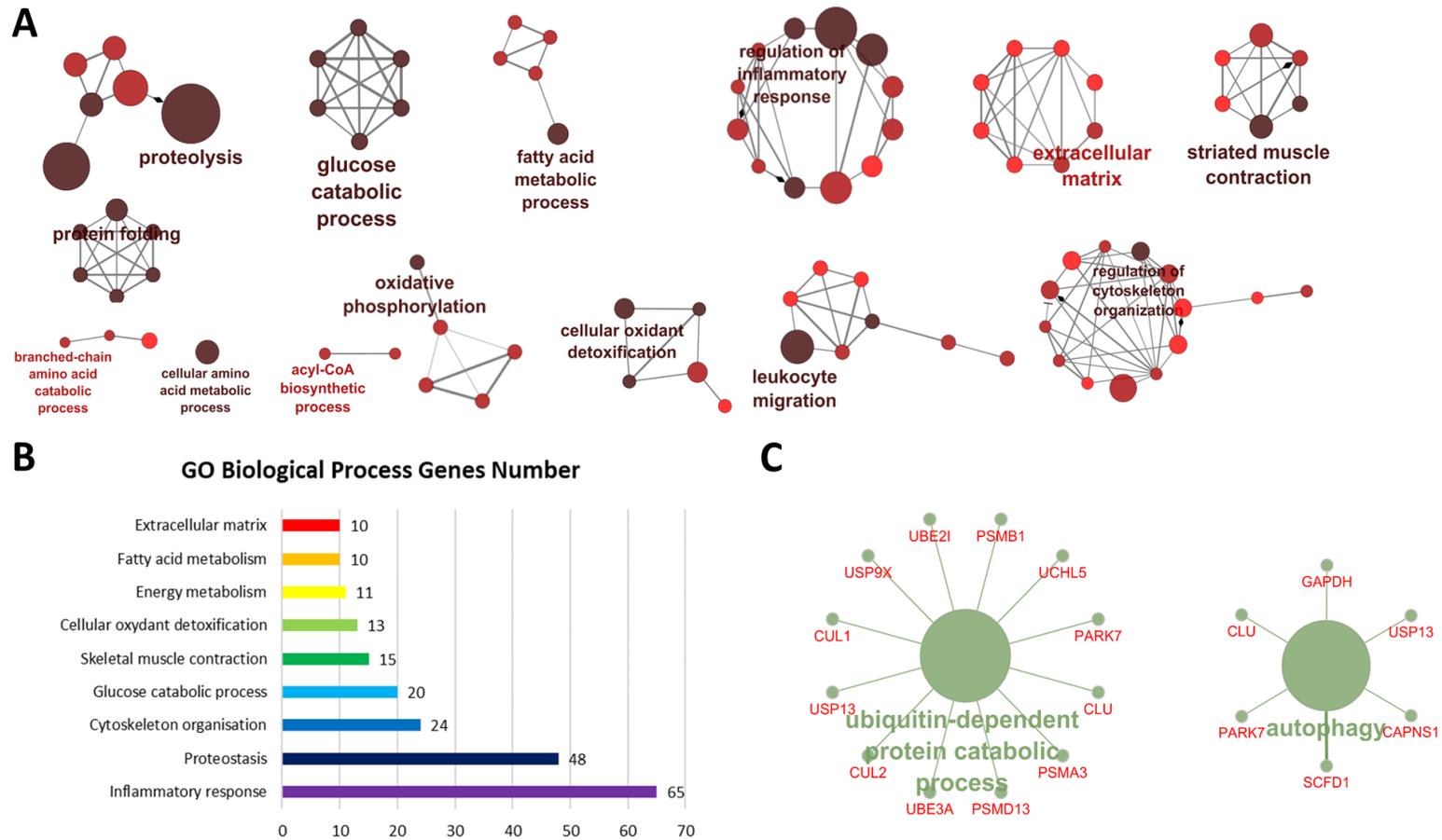
**Fig. 2 Shotgun proteomic analysis of muscle soluble proteome.** **A.** Volcano-Plots show differentially expressed proteins based on fold change versus P-value obtained with ANOVA after BH correction. Proteins represented with red point are significantly ( $P < 0.05$ ) increased or decreased in the muscles from both LC and HD patients. **B.** Fold change in protein expression in LC vs HD patients relative to CT patients. Change in expression of commonly variant proteins was similar in LC and HD.

**Figure 3.**



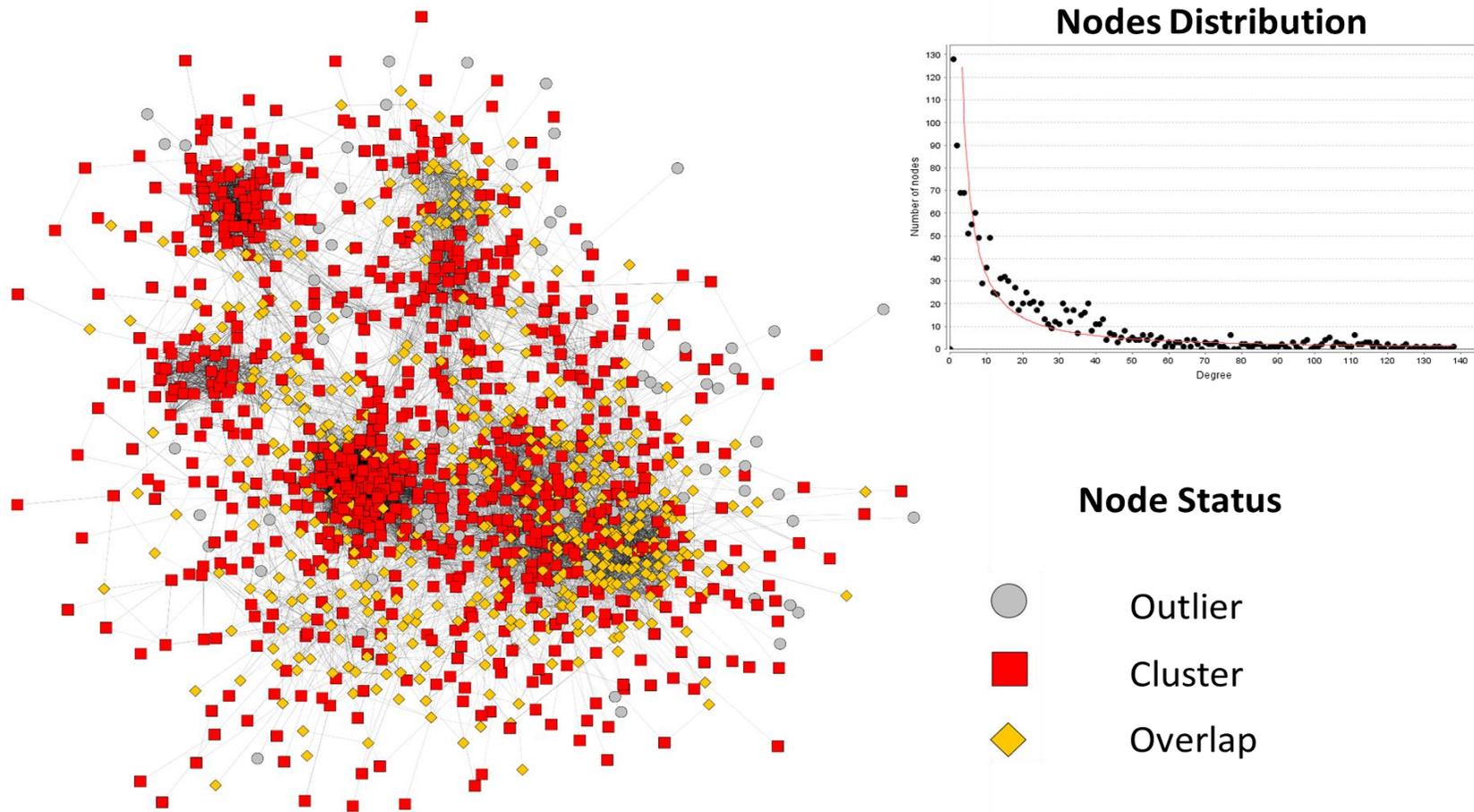
**Fig. 3 Multidimensional analysis of differentially expressed proteins in LC and HD groups.** Each point represents one of the three patient replicates. A. Principal components analysis reveals 3 different muscle soluble proteomes corresponding to the 3 different patients groups. B. Based on differentially expressed proteins, O-PLS-DA creates a model allowing differentiating muscle of LC and HD patient from muscle of CT patients. C. 321 proteins with VIP > 1 contribute significantly to the model. D. For these 321 proteins, unsupervised hierarchical clustering identify two different patterns of expression: proteins increased and proteins decreased in both LC and HD patients relative to CT patients.

**Figure 4.**



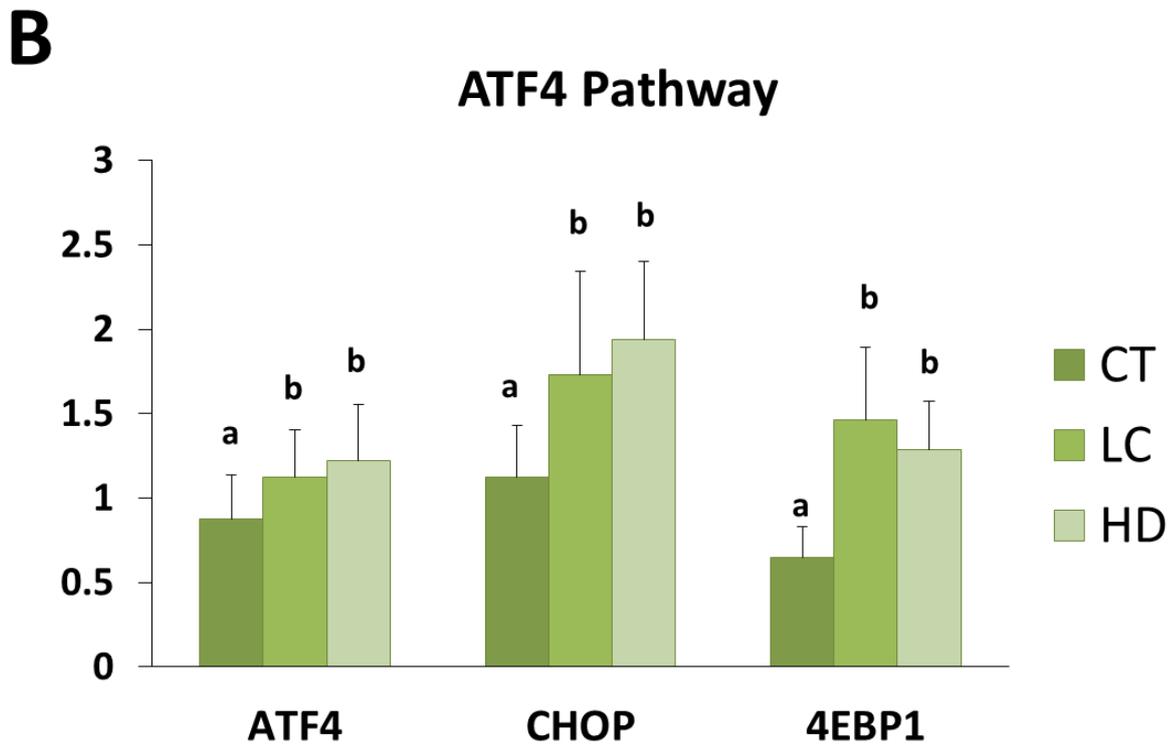
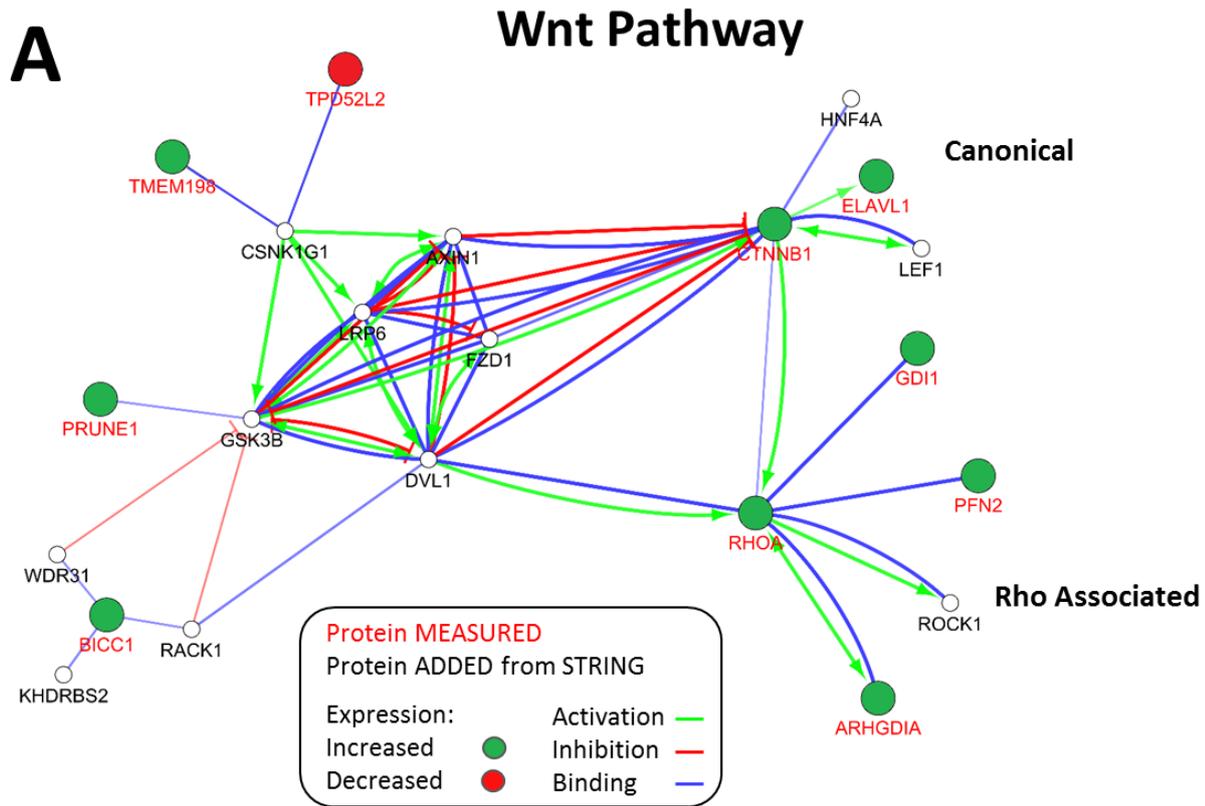
**Fig. 4 Functional enrichment analysis.** **A.** Proteins whose expression characterize pathologic muscle from LC and HD patients are involved in proteolysis, protein folding, amino acid metabolism, glucose catabolic process, fatty acid metabolic process, oxidative phosphorylation, regulation of inflammatory response, leukocyte migration, cellular oxidant detoxification, regulation of cytoskeleton organization, extracellular matrix and striated muscle contraction. **B.** Most proteins belong to the inflammatory response and proteostasis processes. **C.** Proteins involved in proteolysis and modified in both LC and HD patients belong to the UPS and autophagy proteolytic systems.

Figure 5.



**Fig. 5 Proteins co-expression network analysis.** Spearman rank correlation for expression of all possible protein pair is calculated. In graph, proteins are represented with nodes and an edge is created between two nodes if the Spearman rank correlation for the expression of the two proteins among all patients is above 0.6. Node degree distribution followed a power law. The ClusterOne algorithm led to the identification of 50 clusters of coexpressed proteins.

Figure 6.



**Fig. 6 Signaling pathways activated in LC and HD patients. A.** Analysis based on String protein interaction database predicts that the Wnt pathway signaling is activated in LC and HD patients. **B.** Increased mRNA levels of ATF4, CHOP and 4EBP1 revealed activation of the ATF4 pathway in both LC and HD patients.

## Conclusion

Plusieurs résultats marquants sont à dégager de cette première partie de l'étude Prométhé. Tout d'abord nous avons pu démontrer l'existence de profondes modifications des processus biologiques au sein du tissu musculaire, communes à deux situations cataboliques différentes chez l'homme. Ces modifications peuvent être soit directement soit indirectement liées à la perte de masse musculaire. Notre étude démontre chez l'homme, l'exécution potentielle d'un programme d'atrophie musculaire indépendamment de la pathologie causale.

Un second point important concerne les atrogènes, ces gènes impliqués systématiquement dans le développement de l'atrophie musculaire chez l'animal. Nous avons montré que les atrogènes identifiés chez les rongeurs ne sont pas tous valables en situation d'atrophie chez l'homme. Par exemple il n'y a pas d'augmentation de l'expression des sous-unités du protéasome 20S ni des enzymes E2 susceptibles d'intervenir. Cela ne veut pas dire que le protéasome ou les enzymes E2 testées ne sont pas impliquées dans le processus d'atrophie musculaire. En effet, leur surexpression a pu être transitoire et non détectée dans notre étude. Pour le protéasome, une autre hypothèse est que la régulation de son activité est effectuée par la surexpression du complexe régulateur 19S comme nous l'avons détecté. Cela suggère que tous les atrogènes rongeurs ne sont pas utilisables chez l'homme au moins dans certaines pathologies.

En revanche, un troisième point important est que plusieurs enzymes E3 sont surexprimées à la fois chez les patients ayant un cancer et chez les patients hémodialysés. C'est le cas de façon nette pour MuRF1, MAFbx mais aussi MUSA1/FbxO30. Nous confirmons ainsi que MuRF1 et MAFbx sont des marqueurs universels du développement d'une atrophie musculaire. Ceci suggère fortement que leur rôle chez l'homme est similaire à celui décrit chez le rongeur, c'est-à-dire la dégradation de la structure contractile pour MuRF1 et la diminution de la protéosynthèse globale pour MAFbx. De façon surprenante l'oncogène H/Mdm2 semble aussi un bon marqueur de l'atrophie musculaire. Cette E3 a pour principal rôle connu de réguler négativement l'apoptose ciblant p53 pour sa dégradation par le protéasome notamment dans le cadre de la progression tumorale. p53 induit en retour l'expression de H/Mdm2<sup>243</sup>. Une augmentation d'expression de H/Mdm2 a déjà été retrouvée dans un modèle d'atrophie musculaire (apesanteur simulée) par notre équipe<sup>79</sup>. Cela suggère que l'expression de H/Mdm2 n'est pas limitée aux atrophies liées à une pathologie. H/Mdm2 possède également des fonctions

indépendantes de son action sur p53. Récemment, il a été montré qu'H/Mdm2 pouvait être transloquée dans les mitochondries où elle bloque la synthèse de la NADH deshydrogenase 6 du complexe I de la chaîne respiratoire. Cela aboutit à une augmentation de la production de ROS par la mitochondrie<sup>244</sup>. De plus, des souris avec une invalidation sélective de H/Mdm2 dans le muscle montrent de meilleures capacités à l'endurance en condition d'hypoxie modérée<sup>244</sup>. Il est donc envisageable que H/Mdm2 soit impliquée dans le programme d'atrophie musculaire via son action négative sur le métabolisme mitochondrial. Au final, les E3 s'avèrent être les composants de l'UPS les plus sensibles pour détecter une situation catabolique en comparaison aux E2 et aux sous-unités du protéasome 26S. Surtout elles restent surexprimées pendant de longues périodes, si ce n'est pendant l'intégralité de la progression de l'atrophie musculaire.

Un résultat particulièrement important de nos travaux est l'identification de plus de 200 protéines dont l'expression est modifiée à la fois au cours du cancer et de l'insuffisance rénale. L'analyse bio-informatique a permis de mettre en évidence que les processus biologiques impliqués sont multiples. Ils concernent en plus de la protéolyse (systèmes UPS et autophagie), la structure (matrice extracellulaire, cytosquelette) et la fonction du tissu musculaire (activation de la glycolyse et dysfonction mitochondriale). Ces modifications ont probablement un rôle dans l'altération des propriétés contractiles du muscle au-delà de la perte de masse musculaire.

Egalement, bien que l'analyse protéomique réalisée n'ait pas été réalisée au départ pour explorer les voies de signalisation cellulaires, son analyse bio-informatique est en faveur d'une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. Cette voie de signalisation est connue pour être impliquée à la fois dans les phénomènes de régénération mais aussi de sénescence cellulaire/fibrose tissulaire. Son inhibition permet de réduire la fibrose musculaire dans un modèle d'atrophie lié à l'âge<sup>245</sup>. Cela laisse supposer qu'une inhibition de la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine pourrait être bénéfique pour préserver l'intégrité du muscle squelettique et pourrait offrir une nouvelle cible thérapeutique.

Enfin, de façon notable certaines protéines dont l'expression est la plus modifiée n'ont pas de rôle connu à ce jour dans le muscle squelettique comme la dermcidine. Par contre elles interviennent dans le contrôle de la prolifération dans d'autres types de cellules<sup>246</sup> et certaines sont utilisées comme marqueur de cellules tumorales. Cela ouvre la voie à des recherches

complémentaires plus ciblées sur leur rôle dans la fibre musculaire et peut être de nouvelles voies thérapeutiques pour lutter contre l'atrophie musculaire.

## CONCLUSIONS GLOBALES ET PERSPECTIVES

---

Nous avons montré qu'il existe chez l'homme de profondes modifications du protéome liées à la survenue d'une atrophie musculaire indépendamment de la pathologie causale et mis en jeu précocement. Ces modifications sont communes à deux pathologies que nous avons choisies le plus différentes possibles dans un large panel d'âge et incluant hommes et femmes. Cela permet d'émettre l'hypothèse que les marqueurs que nous avons identifiés pourraient être applicables à des populations hétérogènes de patients et peut être à d'autres pathologies.

Comme chez l'animal les E3 MuRF1 et MAFbx sont des éléments clés du programme d'atrophie musculaire. Afin de bloquer la protéolyse musculaire et prévenir l'apparition d'une atrophie musculaire l'inhibition de ces enzymes E3 apparait comme une piste prometteuse. Ainsi, les souris invalidées pour MuRF1 et MAFbx sont partiellement protégées contre l'atrophie musculaire induite par la dénervation. Néanmoins, les souris invalidées pour MAFbx développent rapidement une cardiomyopathie hypertrophique aboutissant au décès précoce de l'animal<sup>247</sup>. Les recherches menées à l'heure actuelle, notamment par des laboratoires pharmaceutiques, s'orientent donc vers la mise au point d'inhibiteurs de MuRF1. Un inhibiteur de MuRF1 visant à lutter contre l'atrophie musculaire se doit d'être spécifique, mais cela n'est pas suffisant pour prévenir d'éventuels effets indésirables. En effet, MuRF1 possède d'autres rôles dans la dégradation de protéines en dehors des situations d'atrophie musculaire et son inhibition complète pourrait s'avérer délétère. Une solution pourrait être la mise au point d'inhibiteurs de l'interaction entre un couple E2-MuRF1 et son substrat qui ciblerait de façon plus spécifique la dégradation de l'appareil contractile. Des travaux en ce sens sont actuellement conduits par des chercheurs travaillant au sein de mon équipe d'accueil.

Les résultats au cours de mon travail de thèse sont autant de pistes supplémentaires, mais de nombreux travaux seront nécessaires pour identifier le rôle de chaque protéine et l'effet bénéfique éventuel de leur manipulation. L'un des résultats les plus marquants de l'étude conduite sur les biopsies musculaires humaines est la mise en évidence d'une altération de l'expression d'enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans le muscle des patients atteints de cancer ou hémodialysés. Ces résultats corroborent ceux obtenus dans différentes études chez l'animal<sup>116</sup>, mais n'avaient pas été mis en évidence chez l'homme. Une piste pour préserver la masse musculaire des patients serait donc de favoriser la fonction mitochondriale.

La trimetazidine est un médicament inhibant la bêta-oxydation des acides gras au profit de la glycolyse aérobie. L'administration de trimetazidine permet d'augmenter l'expression de PGC $\alpha$ , d'activer la voie PI3K/AKT/mTORC1 et de préserver la fonction mitochondriale. Il a été montré que l'administration de trimetazidine était capable de prévenir l'atrophie de cellules C2C12 en présence de TNF $\alpha$  ou en cas de carence en facteur de croissance<sup>248</sup>. Plus récemment la même équipe a montré que l'atrophie musculaire observée dans un modèle de cachexie cancéreuse chez la souris est partiellement prévenue par l'administration de trimetazidine<sup>249</sup>. Son efficacité dans la prévention de l'atrophie musculaire induite par l'insuffisance rénale devra être explorée par exemple en utilisant dans un premier temps un système de culture de cellules C2C12 traitées par des toxines urémiques. Cependant, bien que la préservation de la fonction mitochondriale soit importante elle devra sans doute être couplée avec une action protectrice sur l'appareil contractile.

Les études que j'ai menées représentent une preuve de concept effectuée sur un nombre de patients limité. Cela implique un travail futur avec d'autres cohortes avec plus de patients et éventuellement d'autres pathologies. Si nos conclusions sont correctes les marqueurs que nous avons identifiés devraient aussi revenir à la normale en cas de réversion de l'atrophie musculaire. Il faudrait donc également inclure des patients en phase de récupération. Cependant il est difficile d'obtenir et de traiter des biopsies de dizaines ou de centaines de patients. Il sera donc nécessaire d'utiliser les marqueurs du compartiment sanguin. En effet, parallèlement aux études effectuées dans le muscle, nous avons émis l'hypothèse que certains profils d'ARN dans le sang pourraient être associés à l'activation des mécanismes de l'atrophie observés sur les biopsies musculaires. Une analyse du transcriptome par RNAseq du sang total des sujets dont les biopsies musculaires ont été étudiées est en cours. L'identification de ces profils devrait donc constituer un marqueur diagnostique de la protéolyse musculaire utilisable en pratique clinique par qPCR. La valeur de ces marqueurs pour prédire l'apparition d'une atrophie musculaire devra être validé sur des cohortes de patients suivies dans le temps idéalement avant le développement de la pathologie mais au moins à un stade précoce. A terme ces marqueurs sanguins devraient permettre la détection précoce de l'activation des mécanismes conduisant à une atrophie musculaire chez des patients développant une pathologie à risque.

Enfin, un autre résultat marquant de mes recherches est la mise en évidence, à côté de modifications communes, de différences au niveau du protéome et du transcriptome musculaire entre patients atteints de cancer et insuffisants rénaux. Il nous reste à déterminer si nous

retrouverons de telles différences au niveau des marqueurs sanguins et si elles sont liées aux différences de pathologie ou à leur stade de développement.

## RÉFÉRENCES

---

1. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney international supplements* **3**(2013).
2. Luyckx, V.A., Tonelli, M. & Stanifer, J.W. The global burden of kidney disease and the sustainable development goals. *Bulletin of the World Health Organization* **96**, 414-422D (2018).
3. Perlman, R.L., *et al.* Quality of life in chronic kidney disease (CKD): a cross-sectional analysis in the Renal Research Institute-CKD study. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* **45**, 658-666 (2005).
4. Fox, C.S., *et al.* Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet* **380**, 1662-1673 (2012).
5. Marcelli, D., *et al.* Body composition and survival in dialysis patients: results from an international cohort study. *Clin J Am Soc Nephrol* **10**, 1192-1200 (2015).
6. Frontera, W.R. & Ochala, J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international* **96**, 183-195 (2015).
7. Gillies, A.R. & Lieber, R.L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle & nerve* **44**, 318-331 (2011).
8. Hayashi, K., Miller, R.G. & Brownell, K.W. Three-dimensional architecture of sarcoplasmic reticulum and T-system in human skeletal muscle. *Anat Rec* **218**, 275-283 (1987).
9. Yin, H., Price, F. & Rudnicki, M.A. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological reviews* **93**, 23-67 (2013).
10. Schiaffino, S. & Reggiani, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological reviews* **91**, 1447-1531 (2011).
11. von Haehling, S., Anker, M.S. & Anker, S.D. Prevalence and clinical impact of cachexia in chronic illness in Europe, USA, and Japan: facts and numbers update 2016. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **7**, 507-509 (2016).
12. Williams, G.R., *et al.* Frailty and skeletal muscle in older adults with cancer. *Journal of geriatric oncology* **9**, 68-73 (2018).
13. Kalantar-Zadeh, K., *et al.* Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **4**, 89-94 (2013).
14. Bye, A., *et al.* Muscle mass and association to quality of life in non-small cell lung cancer patients. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **8**, 759-767 (2017).

15. Noori, N., *et al.* Mid-arm muscle circumference and quality of life and survival in maintenance hemodialysis patients. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* **5**, 2258-2268 (2010).
16. Taillandier, D., *et al.* Coordinate activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated and ATP-ubiquitin-dependent proteinases in the unweighted rat soleus muscle. *The Biochemical journal* **316 ( Pt 1)**, 65-72 (1996).
17. Mitch, W.E. & Goldberg, A.L. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* **335**, 1897-1905 (1996).
18. May, R.C., Kelly, R.A. & Mitch, W.E. Mechanisms for defects in muscle protein metabolism in rats with chronic uremia. Influence of metabolic acidosis. *J Clin Invest* **79**, 1099-1103 (1987).
19. Adey, D., Kumar, R., McCarthy, J.T. & Nair, K.S. Reduced synthesis of muscle proteins in chronic renal failure. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **278**, E219-225 (2000).
20. Sandri, M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 2121-2129 (2013).
21. Baracos, V.E., Martin, L., Korc, M., Guttridge, D.C. & Fearon, K.C.H. Cancer-associated cachexia. *Nature reviews. Disease primers* **4**, 17105 (2018).
22. Hasselgren, P.O., *et al.* Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2156-2168 (2005).
23. Rudrappa, S.S., *et al.* Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance-A Qualitative Review. *Front Physiol* **7**, 361 (2016).
24. Langen, R.C., Gosker, H.R., Remels, A.H. & Schols, A.M. Triggers and mechanisms of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2245-2256 (2013).
25. Ikizler, T.A., *et al.* Hemodialysis stimulates muscle and whole body protein loss and alters substrate oxidation. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **282**, E107-116 (2002).
26. Solomon, V. & Goldberg, A.L. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* **271**, 26690-26697 (1996).
27. Passmore, L.A. & Barford, D. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *The Biochemical journal* **379**, 513-525 (2004).
28. Sluimer, J. & Distel, B. Regulating the human HECT E3 ligases. *Cell Mol Life Sci* **75**, 3121-3141 (2018).
29. Polge, C., *et al.* Recent progress in elucidating signalling proteolytic pathways in muscle wasting: potential clinical implications. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **23 Suppl 1**, S1-5 (2013).

30. Budenholzer, L., Cheng, C.L., Li, Y. & Hochstrasser, M. Proteasome Structure and Assembly. *Journal of molecular biology* **429**, 3500-3524 (2017).
31. Dubiel, W., Ferrell, K. & Rechsteiner, M. Subunits of the regulatory complex of the 26S protease. *Mol Biol Rep* **21**, 27-34 (1995).
32. Bailey, J.L., *et al.* The acidosis of chronic renal failure activates muscle proteolysis in rats by augmenting transcription of genes encoding proteins of the ATP-dependent ubiquitin-proteasome pathway. *J Clin Invest* **97**, 1447-1453 (1996).
33. Lazarus, D.D., *et al.* A new model of cancer cachexia: contribution of the ubiquitin-proteasome pathway. *Am J Physiol* **277**, E332-341 (1999).
34. Fischer, D., Gang, G., Pritts, T. & Hasselgren, P.O. Sepsis-induced muscle proteolysis is prevented by a proteasome inhibitor in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 215-221 (2000).
35. Tawa, N.E., Jr., Odessey, R. & Goldberg, A.L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *The Journal of clinical investigation* **100**, 197-203 (1997).
36. Price, S.R., *et al.* Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest* **98**, 1703-1708 (1996).
37. Bossola, M., *et al.* Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Annals of surgery* **237**, 384-389 (2003).
38. Ottenheijm, C.A., *et al.* Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* **174**, 997-1002 (2006).
39. Ye, Y., Meyer, H.H. & Rapoport, T.A. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* **414**, 652-656 (2001).
40. Tanaka, A., *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *The Journal of cell biology* **191**, 1367-1380 (2010).
41. Bodnar, N.O. & Rapoport, T.A. Molecular Mechanism of Substrate Processing by the Cdc48 ATPase Complex. *Cell* **169**, 722-735 e729 (2017).
42. Du, J., *et al.* Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *The Journal of clinical investigation* **113**, 115-123 (2004).
43. Lee, S.W., *et al.* Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**, 1537-1545 (2004).
44. Hu, J., *et al.* XIAP reduces muscle proteolysis induced by CKD. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1174-1183 (2010).

45. Silva, K.A., *et al.* Inhibition of Stat3 activation suppresses caspase-3 and the ubiquitin-proteasome system, leading to preservation of muscle mass in cancer cachexia. *J Biol Chem* **290**, 11177-11187 (2015).
46. Boivin, M.A., *et al.* Activation of caspase-3 in the skeletal muscle during haemodialysis. *European journal of clinical investigation* **40**, 903-910 (2010).
47. Slimani, L., *et al.* The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E1335-1347 (2012).
48. Verzola, D., *et al.* Apoptosis and myostatin mRNA are upregulated in the skeletal muscle of patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* **79**, 773-782 (2011).
49. Lecker, S.H., *et al.* Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J* **18**, 39-51 (2004).
50. Satchek, J.M., *et al.* Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* **21**, 140-155 (2007).
51. Williams, A., Sun, X., Fischer, J.E. & Hasselgren, P.O. The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery* **126**, 744-749; discussion 749-750 (1999).
52. Bossola, M., *et al.* Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **280**, R1518-1523 (2001).
53. Tiao, G., *et al.* Sepsis is associated with increased mRNAs of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in human skeletal muscle. *The Journal of clinical investigation* **99**, 163-168 (1997).
54. Ogawa, T., *et al.* Ubiquitin ligase gene expression in healthy volunteers with 20-day bedrest. *Muscle & nerve* **34**, 463-469 (2006).
55. Polge, C., Attaix, D. & Taillandier, D. Role of E2-Ub-conjugating enzymes during skeletal muscle atrophy. *Front Physiol* **6**, 59 (2015).
56. Mansoor, O., *et al.* Increased mRNA levels for components of the lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated, and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways in skeletal muscle from head trauma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2714-2718 (1996).
57. Khal, J., Hine, A.V., Fearon, K.C., Dejong, C.H. & Tisdale, M.J. Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2196-2206 (2005).
58. Chen, Y.W., *et al.* Transcriptional pathways associated with skeletal muscle disuse atrophy in humans. *Physiological genomics* **31**, 510-520 (2007).
59. Bodine, S.C., *et al.* Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708 (2001).

60. Siddiqui, R.A., *et al.* Attenuation of proteolysis and muscle wasting by curcumin c3 complex in MAC16 colon tumour-bearing mice. *Br J Nutr* **102**, 967-975 (2009).
61. Jones, S.W., *et al.* Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 1025-1027 (2004).
62. Doucet, M., *et al.* Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **176**, 261-269 (2007).
63. Polge, C., *et al.* Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB J* **25**, 3790-3802 (2011).
64. Smith, I.J., *et al.* Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. *Muscle & nerve* **43**, 410-414 (2011).
65. D'Orlando, C., *et al.* Gastric cancer does not affect the expression of atrophy-related genes in human skeletal muscle. *Muscle & nerve* **49**, 528-533 (2014).
66. Murton, A.J., *et al.* Consequences of Late-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer Cachexia on Muscle Metabolic Processes. *Clinical lung cancer* **18**, e1-e11 (2017).
67. Yuan, L., *et al.* Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study. *Oncol Rep* **33**, 2261-2268 (2015).
68. Clarke, B.A., *et al.* The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism* **6**, 376-385 (2007).
69. Kedar, V., *et al.* Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 18135-18140 (2004).
70. Polge, C., *et al.* A muscle-specific MuRF1-E2 network requires stabilization of MuRF1-E2 complexes by telethonin, a newly identified substrate. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **9**, 129-145 (2018).
71. Hirner, S., *et al.* MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies. *Journal of molecular biology* **379**, 666-677 (2008).
72. Koyama, S., *et al.* Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *Journal of molecular biology* **376**, 1224-1236 (2008).
73. Tintignac, L.A., *et al.* Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry* **280**, 2847-2856 (2005).
74. Jogo, M., Shiraishi, S. & Tamura, T.A. Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS letters* **583**, 2715-2719 (2009).
75. Csibi, A., Leibovitch, M.P., Cornille, K., Tintignac, L.A. & Leibovitch, S.A. MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *The Journal of biological chemistry* **284**, 4413-4421 (2009).

76. Lokireddy, S., *et al.* Identification of atrogin-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *American journal of physiology. Cell physiology* **303**, C512-529 (2012).
77. Sartori, R., *et al.* BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet* **45**, 1309-1318 (2013).
78. Paul, P.K., *et al.* Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J Cell Biol* **191**, 1395-1411 (2010).
79. Polge, C., *et al.* UBE2D2 is not involved in MuRF1-dependent muscle wasting during hindlimb suspension. *Int J Biochem Cell Biol* **79**, 488-493 (2016).
80. Nagpal, P., *et al.* The ubiquitin ligase Nedd4-1 participates in denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *PLoS One* **7**, e46427 (2012).
81. Cohen, S., Zhai, B., Gygi, S.P. & Goldberg, A.L. Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol* **198**, 575-589 (2012).
82. Nicklas, S., *et al.* TRIM32 regulates skeletal muscle stem cell differentiation and is necessary for normal adult muscle regeneration. *PLoS One* **7**, e30445 (2012).
83. Mitch, W.E., *et al.* Metabolic acidosis stimulates muscle protein degradation by activating the adenosine triphosphate-dependent pathway involving ubiquitin and proteasomes. *J Clin Invest* **93**, 2127-2133 (1994).
84. Temparis, S., *et al.* Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res* **54**, 5568-5573 (1994).
85. Combaret, L., *et al.* Glucocorticoids regulate mRNA levels for subunits of the 19 S regulatory complex of the 26 S proteasome in fast-twitch skeletal muscles. *Biochem J* **378**, 239-246 (2004).
86. Medina, R., Wing, S.S. & Goldberg, A.L. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *The Biochemical journal* **307 ( Pt 3)**, 631-637 (1995).
87. Jagoe, R.T., Redfern, C.P., Roberts, R.G., Gibson, G.J. & Goodship, T.H. Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy. *Clin Sci (Lond)* **102**, 353-361 (2002).
88. Oku, M. & Sakai, Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **40**, e1800008 (2018).
89. Takikita, S., *et al.* The values and limits of an in vitro model of Pompe disease: the best laid schemes o' mice an' men. *Autophagy* **5**, 729-731 (2009).
90. Catarino, S., Pereira, P. & Girao, H. Molecular control of chaperone-mediated autophagy. *Essays in biochemistry* **61**, 663-674 (2017).
91. Li, W., Yang, Q. & Mao, Z. Signaling and induction of chaperone-mediated autophagy by the endoplasmic reticulum under stress conditions. *Autophagy*, 1-3 (2018).

92. Parzych, K.R. & Klionsky, D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling* **20**, 460-473 (2014).
93. Nazio, F. & Cecconi, F. Autophagy up and down by outsmarting the incredible ULK. *Autophagy* **13**, 967-968 (2017).
94. Romanello, V. & Sandri, M. Mitochondrial Quality Control and Muscle Mass Maintenance. *Front Physiol* **6**, 422 (2015).
95. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-141 (2011).
96. Nakatogawa, H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays in biochemistry* **55**, 39-50 (2013).
97. Wooten, M.W., *et al.* Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *The Journal of biological chemistry* **283**, 6783-6789 (2008).
98. Hishiya, A., *et al.* A novel ubiquitin-binding protein ZNF216 functioning in muscle atrophy. *The EMBO journal* **25**, 554-564 (2006).
99. Strachan, J., *et al.* Insights into the molecular composition of endogenous unanchored polyubiquitin chains. *Journal of proteome research* **11**, 1969-1980 (2012).
100. Geisler, S., *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology* **12**, 119-131 (2010).
101. Poole, A.C., Thomas, R.E., Yu, S., Vincow, E.S. & Pallanck, L. The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway. *PloS one* **5**, e10054 (2010).
102. Rikka, S., *et al.* Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover. *Cell death and differentiation* **18**, 721-731 (2011).
103. Medina, R., Wing, S.S., Haas, A. & Goldberg, A.L. Activation of the ubiquitin-ATP-dependent proteolytic system in skeletal muscle during fasting and denervation atrophy. *Biomedica biochimica acta* **50**, 347-356 (1991).
104. Lapierre, L.R., Kumsta, C., Sandri, M., Ballabio, A. & Hansen, M. Transcriptional and epigenetic regulation of autophagy in aging. *Autophagy* **11**, 867-880 (2015).
105. Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P. & Bonaldo, P. Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *Journal of cell science* **126**, 5325-5333 (2013).
106. Sandri, M. Protein breakdown in cancer cachexia. *Semin Cell Dev Biol* **54**, 11-19 (2016).
107. Voisin, L., *et al.* Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca<sup>2+</sup>-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *The Journal of clinical investigation* **97**, 1610-1617 (1996).

108. Deval, C., *et al.* Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *The Biochemical journal* **360**, 143-150 (2001).
109. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular biology of the cell* **15**, 1101-1111 (2004).
110. Sandri, M., *et al.* Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412 (2004).
111. Mammucari, C., *et al.* FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**, 458-471 (2007).
112. Zhao, J., *et al.* FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* **6**, 472-483 (2007).
113. Tardif, N., Klaude, M., Lundell, L., Thorell, A. & Rooyackers, O. Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients. *Am J Clin Nutr* **98**, 1485-1492 (2013).
114. Aversa, Z., *et al.* Autophagy is induced in the skeletal muscle of cachectic cancer patients. *Sci Rep* **6**, 30340 (2016).
115. Su, Z., *et al.* Chronic kidney disease induces autophagy leading to dysfunction of mitochondria in skeletal muscle. *Am J Physiol Renal Physiol* **312**, F1128-F1140 (2017).
116. Argiles, J.M., Lopez-Soriano, F.J. & Busquets, S. Muscle wasting in cancer: the role of mitochondria. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **18**, 221-225 (2015).
117. Tezze, C., *et al.* Age-Associated Loss of OPA1 in Muscle Impacts Muscle Mass, Metabolic Homeostasis, Systemic Inflammation, and Epithelial Senescence. *Cell metabolism* **25**, 1374-1389 e1376 (2017).
118. Brown, J.L., *et al.* Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 926-938 (2017).
119. Borgia, D., *et al.* Increased mitophagy in the skeletal muscle of spinal and bulbar muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet* **26**, 1087-1103 (2017).
120. Zhang, M., *et al.* Curcumin attenuates skeletal muscle mitochondrial impairment in COPD rats: PGC-1alpha/SIRT3 pathway involved. *Chemico-biological interactions* **277**, 168-175 (2017).
121. Liu, J., *et al.* Mitochondrial Dysfunction Launches Dexamethasone-Induced Skeletal Muscle Atrophy via AMPK/FOXO3 Signaling. *Mol Pharm* **13**, 73-84 (2016).
122. White, J.P., *et al.* Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* **300**, R201-211 (2011).
123. Zorzano, A., Hernandez-Alvarez, M.I., Palacin, M. & Mingrone, G. Alterations in the mitochondrial regulatory pathways constituted by the nuclear co-factors PGC-1alpha or PGC-

- 1beta and mitofusin 2 in skeletal muscle in type 2 diabetes. *Biochimica et biophysica acta* **1797**, 1028-1033 (2010).
124. Vescovo, G., Ravara, B., Gobbo, V., Angelini, A. & Dalla Libera, L. Skeletal muscle fibres synthesis in heart failure: role of PGC-1alpha, calcineurin and GH. *International journal of cardiology* **104**, 298-306 (2005).
  125. Tang, K., Wagner, P.D. & Breen, E.C. TNF-alpha-mediated reduction in PGC-1alpha may impair skeletal muscle function after cigarette smoke exposure. *J Cell Physiol* **222**, 320-327 (2010).
  126. Sandri, M., *et al.* PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16260-16265 (2006).
  127. Op den Kamp, C.M., *et al.* Preserved muscle oxidative metabolic phenotype in newly diagnosed non-small cell lung cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **6**, 164-173 (2015).
  128. White, J.P., *et al.* IL-6 regulation on skeletal muscle mitochondrial remodeling during cancer cachexia in the ApcMin/+ mouse. *Skelet Muscle* **2**, 14 (2012).
  129. White, J.P., *et al.* The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in the Apc(Min/+) mouse. *PLoS One* **6**, e24650 (2011).
  130. Stephens, N.A., *et al.* Evaluating potential biomarkers of cachexia and survival in skeletal muscle of upper gastrointestinal cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **6**, 53-61 (2015).
  131. Carson, J.A., Hardee, J.P. & VanderVeen, B.N. The emerging role of skeletal muscle oxidative metabolism as a biological target and cellular regulator of cancer-induced muscle wasting. *Seminars in cell & developmental biology* **54**, 53-67 (2016).
  132. Abrigo, J., *et al.* Role of Oxidative Stress as Key Regulator of Muscle Wasting during Cachexia. *Oxid Med Cell Longev* **2018**, 2063179 (2018).
  133. Puente-Maestu, L., *et al.* Site of mitochondrial reactive oxygen species production in skeletal muscle of chronic obstructive pulmonary disease and its relationship with exercise oxidative stress. *Am J Respir Cell Mol Biol* **47**, 358-362 (2012).
  134. McLean, J.B., Moylan, J.S. & Andrade, F.H. Mitochondria dysfunction in lung cancer-induced muscle wasting in C2C12 myotubes. *Frontiers in physiology* **5**, 503 (2014).
  135. Russell, S.T., Eley, H. & Tisdale, M.J. Role of reactive oxygen species in protein degradation in murine myotubes induced by proteolysis-inducing factor and angiotensin II. *Cell Signal* **19**, 1797-1806 (2007).
  136. Schulz, A., Jankowski, J., Zidek, W. & Jankowski, V. Absolute quantification of endogenous angiotensin II levels in human plasma using ESI-LC-MS/MS. *Clin Proteomics* **11**, 37 (2014).
  137. Kadoguchi, T., *et al.* Possible Role of NADPH Oxidase 4 in Angiotensin II-Induced Muscle Wasting in Mice. *Frontiers in physiology* **9**, 340 (2018).

138. Enoki, Y., *et al.* Indoxyl sulfate potentiates skeletal muscle atrophy by inducing the oxidative stress-mediated expression of myostatin and atrogin-1. *Scientific reports* **6**, 32084 (2016).
139. Schulze-Osthoff, K., *et al.* Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *The Journal of biological chemistry* **267**, 5317-5323 (1992).
140. Langen, R.C., *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits myogenesis through redox-dependent and -independent pathways. *American journal of physiology. Cell physiology* **283**, C714-721 (2002).
141. Derbre, F., *et al.* Inhibition of xanthine oxidase by allopurinol prevents skeletal muscle atrophy: role of p38 MAPKinase and E3 ubiquitin ligases. *PloS one* **7**, e46668 (2012).
142. Nemes, R., *et al.* Reactive Oxygen and Nitrogen Species Regulate Key Metabolic, Anabolic, and Catabolic Pathways in Skeletal Muscle. *Antioxidants (Basel)* **7**(2018).
143. Seo, Y., Lee, K., Park, K., Bae, K. & Choi, I. A proteomic assessment of muscle contractile alterations during unloading and reloading. *J Biochem* **139**, 71-80 (2006).
144. Sun, H., *et al.* Investigation of differentially expressed proteins in rat gastrocnemius muscle during denervation-reinnervation. *J Muscle Res Cell Motil* **27**, 241-250 (2006).
145. Guo, W., Fu, W.P., Yang, Y. & Dai, L.M. [Preliminary proteomic analysis of peripheral skeletal muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **92**, 948-951 (2012).
146. Ciciliot, S., Rossi, A.C., Dyar, K.A., Blaauw, B. & Schiaffino, S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 2191-2199 (2013).
147. Engineer, D.R. & Garcia, J.M. Leptin in anorexia and cachexia syndrome. *Int J Pept* **2012**, 287457 (2012).
148. Guillory, B., Splenser, A. & Garcia, J. The role of ghrelin in anorexia-cachexia syndromes. *Vitamins and hormones* **92**, 61-106 (2013).
149. Cheung, W.W., *et al.* A pegylated leptin antagonist ameliorates CKD-associated cachexia in mice. *J Am Soc Nephrol* **25**, 119-128 (2014).
150. Tsubouchi, H., *et al.* Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice. *Eur J Pharmacol* **743**, 1-10 (2014).
151. Khatib, M.N., *et al.* Ghrelin for the management of cachexia associated with cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **2**, CD012229 (2018).
152. Sanchez, A.M., *et al.* AMPK promotes skeletal muscle autophagy through activation of forkhead FoxO3a and interaction with Ulk1. *J Cell Biochem* **113**, 695-710 (2012).
153. Nakashima, K. & Yakabe, Y. AMPK activation stimulates myofibrillar protein degradation and expression of atrophy-related ubiquitin ligases by increasing FOXO transcription factors in C2C12 myotubes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **71**, 1650-1656 (2007).

154. Sengupta, S., Peterson, T.R. & Sabatini, D.M. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular cell* **40**, 310-322 (2010).
155. Jewell, J.L., Russell, R.C. & Guan, K.L. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 133-139 (2013).
156. Han, J.M., *et al.* Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* **149**, 410-424 (2012).
157. Ham, D.J., Caldwell, M.K., Lynch, G.S. & Koopman, R. Leucine as a treatment for muscle wasting: a critical review. *Clin Nutr* **33**, 937-945 (2014).
158. Kopple, J.D. & Fouque, D. Pro: The rationale for dietary therapy for patients with advanced chronic kidney disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **33**, 373-378 (2018).
159. Woodrow, G. Con: The role of diet for people with advanced Stage 5 CKD. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **33**, 380-384 (2018).
160. Spector, E.R., Smith, S.M. & Sibonga, J.D. Skeletal effects of long-duration head-down bed rest. *Aviation, space, and environmental medicine* **80**, A23-28 (2009).
161. Wall, B.T., *et al.* Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta Physiol (Oxf)* **210**, 600-611 (2014).
162. Fitts, R.H., *et al.* Prolonged space flight-induced alterations in the structure and function of human skeletal muscle fibres. *The Journal of physiology* **588**, 3567-3592 (2010).
163. Stein, T.P. & Wade, C.E. Metabolic consequences of muscle disuse atrophy. *The Journal of nutrition* **135**, 1824S-1828S (2005).
164. Tesch, P.A., von Walden, F., Gustafsson, T., Linnehan, R.M. & Trappe, T.A. Skeletal muscle proteolysis in response to short-term unloading in humans. *J Appl Physiol (1985)* **105**, 902-906 (2008).
165. Jamart, C., Raymackers, J.M., Li An, G., Deldicque, L. & Francaux, M. Prevention of muscle disuse atrophy by MG132 proteasome inhibitor. *Muscle Nerve* **43**, 708-716 (2011).
166. Kashiwagi, A., *et al.* Anesthesia with Disuse Leads to Autophagy Up-regulation in the Skeletal Muscle. *Anesthesiology* **122**, 1075-1083 (2015).
167. Maki, T., *et al.* Branched-chain amino acids reduce hindlimb suspension-induced muscle atrophy and protein levels of atrogen-1 and MuRF1 in rats. *Nutrition research* **32**, 676-683 (2012).
168. Ferreira, R., *et al.* Proteolysis activation and proteome alterations in murine skeletal muscle submitted to 1 week of hindlimb suspension. *European journal of applied physiology* **107**, 553-563 (2009).

169. McKenna, C.F. & Fry, C.S. Altered satellite cell dynamics accompany skeletal muscle atrophy during chronic illness, disuse, and aging. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **20**, 447-452 (2017).
170. Klossner, S., Durieux, A.C., Freyssenet, D. & Flueck, M. Mechano-transduction to muscle protein synthesis is modulated by FAK. *European journal of applied physiology* **106**, 389-398 (2009).
171. Talbert, E.E., *et al.* Immobilization-induced activation of key proteolytic systems in skeletal muscles is prevented by a mitochondria-targeted antioxidant. *J Appl Physiol (1985)* **115**, 529-538 (2013).
172. Ingalls, C.P., Wenke, J.C. & Armstrong, R.B. Time course changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, force, and protein content in hindlimb-suspended mouse soleus muscles. *Aviation, space, and environmental medicine* **72**, 471-476 (2001).
173. Vermaelen, M., *et al.* Differential localization of autolyzed calpains 1 and 2 in slow and fast skeletal muscles in the early phase of atrophy. *American journal of physiology. Cell physiology* **292**, C1723-1731 (2007).
174. Hu, N.F., *et al.* Tetramethylpyrazine ameliorated disuse-induced gastrocnemius muscle atrophy in hindlimb unloading rats through suppression of Ca<sup>2+</sup>/ROS-mediated apoptosis. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme* **42**, 117-127 (2017).
175. Sorimachi, H. & Ono, Y. Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc Res* **96**, 11-22 (2012).
176. Bogomolovas, J., *et al.* Titin kinase is an inactive pseudokinase scaffold that supports MuRF1 recruitment to the sarcomeric M-line. *Open biology* **4**, 140041 (2014).
177. Fouladiun, M., *et al.* Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **13**, 6379-6385 (2007).
178. Stene, G.B., *et al.* Effect of physical exercise on muscle mass and strength in cancer patients during treatment--a systematic review. *Critical reviews in oncology/hematology* **88**, 573-593 (2013).
179. Matsuzawa, R., *et al.* Exercise Training in Elderly People Undergoing Hemodialysis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Kidney international reports* **2**, 1096-1110 (2017).
180. van de Boel, C., *et al.* A randomized clinical trial investigating the efficacy of targeted nutrition as adjunct to exercise training in COPD. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 748-758 (2017).
181. Otto, A. & Patel, K. Signalling and the control of skeletal muscle size. *Experimental cell research* **316**, 3059-3066 (2010).
182. Fliser, D., *et al.* Insulin resistance and hyperinsulinemia are already present in patients with incipient renal disease. *Kidney international* **53**, 1343-1347 (1998).

183. Noguchi, Y., *et al.* Insulin resistance in cancer patients is associated with enhanced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications* **253**, 887-892 (1998).
184. Thomas, S.S., Dong, Y., Zhang, L. & Mitch, W.E. Signal regulatory protein- $\alpha$  interacts with the insulin receptor contributing to muscle wasting in chronic kidney disease. *Kidney Int* **84**, 308-316 (2013).
185. Oliveira, A.G. & Gomes-Marcondes, M.C. Metformin treatment modulates the tumour-induced wasting effects in muscle protein metabolism minimising the cachexia in tumour-bearing rats. *BMC Cancer* **16**, 418 (2016).
186. Long, D.E., *et al.* Metformin to Augment Strength Training Effective Response in Seniors (MASTERS): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* **18**, 192 (2017).
187. Hudson, M.B. & Price, S.R. Calcineurin: a poorly understood regulator of muscle mass. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 2173-2178 (2013).
188. Qin, W., Pan, J., Wu, Y., Bauman, W.A. & Cardozo, C. Anabolic steroids activate calcineurin-NFAT signaling and thereby increase myotube size and reduce denervation atrophy. *Mol Cell Endocrinol* **399**, 336-345 (2015).
189. Mavros, Y., *et al.* Oxandrolone Augmentation of Resistance Training in Older Women: A Randomized Trial. *Med Sci Sports Exerc* **47**, 2257-2267 (2015).
190. Ragnarsson, O., Burt, M.G., Ho, K.K. & Johannsson, G. Effect of short-term GH and testosterone administration on body composition and glucose homeostasis in men receiving chronic glucocorticoid therapy. *Eur J Endocrinol* **168**, 243-251 (2013).
191. Magnussen, L.V., *et al.* Testosterone therapy preserves muscle strength and power in aging men with type 2 diabetes-a randomized controlled trial. *Andrology* **5**, 946-953 (2017).
192. Sinclair, M., Grossmann, M., Hoermann, R., Angus, P.W. & Gow, P.J. Testosterone therapy increases muscle mass in men with cirrhosis and low testosterone: A randomised controlled trial. *J Hepatol* **65**, 906-913 (2016).
193. Kraut, J.A. & Madias, N.E. Adverse Effects of the Metabolic Acidosis of Chronic Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **24**, 289-297 (2017).
194. Raphael, K.L. Metabolic Acidosis and Subclinical Metabolic Acidosis in CKD. *J Am Soc Nephrol* **29**, 376-382 (2018).
195. Loniewski, I. & Wesson, D.E. Bicarbonate therapy for prevention of chronic kidney disease progression. *Kidney Int* **85**, 529-535 (2014).
196. Goraya, N., Simoni, J., Jo, C.H. & Wesson, D.E. A comparison of treating metabolic acidosis in CKD stage 4 hypertensive kidney disease with fruits and vegetables or sodium bicarbonate. *Clin J Am Soc Nephrol* **8**, 371-381 (2013).
197. Di Iorio, B., *et al.* Dialysate bath and QTc interval in patients on chronic maintenance hemodialysis: pilot study of single dialysis effects. *J Nephrol* **25**, 653-660 (2012).

198. Gabutti, L., Bianchi, G., Soldini, D., Marone, C. & Burnier, M. Haemodynamic consequences of changing bicarbonate and calcium concentrations in haemodialysis fluids. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 973-981 (2009).
199. Kirschbaum, B. Effect of high bicarbonate hemodialysis on ionized calcium and risk of metastatic calcification. *Clin Chim Acta* **343**, 231-236 (2004).
200. Vermeulen, M., *et al.* Acidosis improves uptake of antigens and MHC class I-restricted presentation by dendritic cells. *J Immunol* **172**, 3196-3204 (2004).
201. Galijasevic, S., *et al.* Myeloperoxidase interaction with peroxynitrite: chloride deficiency and heme depletion. *Free Radic Biol Med* **47**, 431-439 (2009).
202. Avesani, C.M., *et al.* Inflammation and wasting in chronic kidney disease: Partners in crime. *Kidney international* **70**, S8-S13 (2006).
203. Zhang, L., *et al.* Stat3 activation links a C/EBPdelta to myostatin pathway to stimulate loss of muscle mass. *Cell Metab* **18**, 368-379 (2013).
204. Tierney, M.T., *et al.* STAT3 signaling controls satellite cell expansion and skeletal muscle repair. *Nature medicine* **20**, 1182-1186 (2014).
205. Jackman, R.W., Wu, C.L. & Kandarian, S.C. The ChIP-seq-defined networks of Bcl-3 gene binding support its required role in skeletal muscle atrophy. *PloS one* **7**, e51478 (2012).
206. de Alvaro, C., Teruel, T., Hernandez, R. & Lorenzo, M. Tumor necrosis factor alpha produces insulin resistance in skeletal muscle by activation of inhibitor kappaB kinase in a p38 MAPK-dependent manner. *The Journal of biological chemistry* **279**, 17070-17078 (2004).
207. Henstridge, D.C., *et al.* Skeletal muscle-specific overproduction of constitutively activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) induces insulin resistance in mice. *Diabetologia* **55**, 2769-2778 (2012).
208. Zhang, G., Jin, B. & Li, Y.P. C/EBPbeta mediates tumour-induced ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx upregulation and muscle wasting. *The EMBO journal* **30**, 4323-4335 (2011).
209. Schakman, O., Kalista, S., Barbe, C., Loumaye, A. & Thissen, J.P. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2163-2172 (2013).
210. Steffen, B.T., Lees, S.J. & Booth, F.W. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *J Appl Physiol (1985)* **105**, 1950-1958 (2008).
211. Mann, D.L., *et al.* Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* **109**, 1594-1602 (2004).
212. Wiedenmann, B., *et al.* A multicenter, phase II study of infliximab plus gemcitabine in pancreatic cancer cachexia. *J Support Oncol* **6**, 18-25 (2008).
213. Subramaniam, K., *et al.* Infliximab reverses inflammatory muscle wasting (sarcopenia) in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **41**, 419-428 (2015).

214. DeBoer, M.D., *et al.* Increases in IGF-1 After Anti-TNF-alpha Therapy Are Associated With Bone and Muscle Accrual in Pediatric Crohn Disease. *J Clin Endocrinol Metab* **103**, 936-945 (2018).
215. Chen, C.Y., Tsai, C.Y., Lee, P.C. & Lee, S.D. Long-term etanercept therapy favors weight gain and ameliorates cachexia in rheumatoid arthritis patients: roles of gut hormones and leptin. *Curr Pharm Des* **19**, 1956-1964 (2013).
216. Marcora, S.M., Chester, K.R., Mittal, G., Lemmey, A.B. & Maddison, P.J. Randomized phase 2 trial of anti-tumor necrosis factor therapy for cachexia in patients with early rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr* **84**, 1463-1472 (2006).
217. Reid, J., *et al.* Thalidomide for managing cancer cachexia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD008664 (2012).
218. Reid, J., Hughes, C.M., Murray, L.J., Parsons, C. & Cantwell, M.M. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the treatment of cancer cachexia: a systematic review. *Palliat Med* **27**, 295-303 (2013).
219. Yan, Y., *et al.* Omega-3 fatty acids prevent inflammation and metabolic disorder through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. *Immunity* **38**, 1154-1163 (2013).
220. Tisdale, M.J. & Dhesi, J.K. Inhibition of weight loss by omega-3 fatty acids in an experimental cachexia model. *Cancer Res* **50**, 5022-5026 (1990).
221. Folador, A., *et al.* Effect of fish oil supplementation for 2 generations on changes in macrophage function induced by Walker 256 cancer cachexia in rats. *Int J Cancer* **120**, 344-350 (2007).
222. Deger, S.M., *et al.* High Dose Omega-3 Fatty Acid Administration and Skeletal Muscle Protein Turnover in Maintenance Hemodialysis Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* **11**, 1227-1235 (2016).
223. Mantovani, G., *et al.* Randomized phase III clinical trial of five different arms of treatment in 332 patients with cancer cachexia. *Oncologist* **15**, 200-211 (2010).
224. Cano, N.J., Heng, A.E. & Pison, C. Multimodal approach to malnutrition in malnourished maintenance hemodialysis patients. *J Ren Nutr* **21**, 23-26 (2011).
225. Elkina, Y., von Haehling, S., Anker, S.D. & Springer, J. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **2**, 143-151 (2011).
226. Zhang, L., *et al.* Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB J* **25**, 1653-1663 (2011).
227. Wang, Y. & Pessin, J.E. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **16**, 243-250 (2013).
228. Heng, A.E., *et al.* Coordinate expression of the 19S regulatory complex and evidence for ubiquitin-dependent telethonin degradation in the unloaded soleus muscle. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**, 2544-2552 (2008).

229. Baliga, R. & Shah, S.V. Effects of dietary protein intake on muscle protein synthesis and degradation in rats with gentamicin-induced acute renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **1**, 1230-1235 (1991).
230. Milan, G., *et al.* Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun* **6**, 6670 (2015).
231. D'Cruz, R., *et al.* PDLIM7 is a novel target of the ubiquitin ligase Nedd4-1 in skeletal muscle. *Biochem J* **473**, 267-276 (2016).
232. Desgeorges, M.M., *et al.* Molecular mechanisms of skeletal muscle atrophy in a mouse model of cerebral ischemia. *Stroke* **46**, 1673-1680 (2015).
233. Kudryashova, E., Kudryashov, D., Kramerova, I. & Spencer, M.J. Trim32 is a ubiquitin ligase mutated in limb girdle muscular dystrophy type 2H that binds to skeletal muscle myosin and ubiquitinates actin. *J Mol Biol* **354**, 413-424 (2005).
234. Volodin, A., Kosti, I., Goldberg, A.L. & Cohen, S. Myofibril breakdown during atrophy is a delayed response requiring the transcription factor PAX4 and desmin depolymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E1375-E1384 (2017).
235. Dave, N., Wu, J. & Thomas, S. Chronic Kidney Disease-Induced Insulin Resistance: Current State of the Field. *Curr Diab Rep* **18**, 44 (2018).
236. Stitt, T.N., *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* **14**, 395-403 (2004).
237. Wang, D.T., Yang, Y.J., Huang, R.H., Zhang, Z.H. & Lin, X. Myostatin Activates the Ubiquitin-Proteasome and Autophagy-Lysosome Systems Contributing to Muscle Wasting in Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 684965 (2015).
238. Enoki, Y., *et al.* Potential therapeutic interventions for chronic kidney disease-associated sarcopenia via indoxyl sulfate-induced mitochondrial dysfunction. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 735-747 (2017).
239. Mota, R., *et al.* Post-translationally modified muscle-specific ubiquitin ligases as circulating biomarkers in experimental cancer cachexia. *Am J Cancer Res* **7**, 1948-1958 (2017).
240. Wang, B., *et al.* MicroRNA-23a and MicroRNA-27a Mimic Exercise by Ameliorating CKD-Induced Muscle Atrophy. *J Am Soc Nephrol* **28**, 2631-2640 (2017).
241. Wada, S., *et al.* Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. *J Biol Chem* **286**, 38456-38465 (2011).
242. Hudson, M.B., *et al.* miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C551-558 (2014).
243. Wade, M., Li, Y.C. & Wahl, G.M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **13**, 83-96 (2013).

244. Arena, G., *et al.* Mitochondrial MDM2 Regulates Respiratory Complex I Activity Independently of p53. *Mol Cell* **69**, 594-609 e598 (2018).
245. Brack, A.S., *et al.* Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* **317**, 807-810 (2007).
246. Brauer, H.A., *et al.* Dermcidin expression is associated with disease progression and survival among breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **144**, 299-306 (2014).
247. Bodine, S.C. & Baehr, L.M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **307**, E469-484 (2014).
248. Ferraro, E., *et al.* The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes. *FEBS J* **280**, 5094-5108 (2013).
249. Molinari, F., *et al.* The mitochondrial metabolic reprogramming agent trimetazidine as an 'exercise mimetic' in cachectic C26-bearing mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **8**, 954-973 (2017).

## Résumé

Le tissu musculaire est la principale réserve protéique de l'organisme. Sa masse est régulée par les processus cellulaires de protéolyse et de protéosynthèse. De nombreuses situations physiologiques ou pathologiques conduisent à une diminution de la masse musculaire. La compréhension des mécanismes de l'atrophie musculaire est nécessaire pour envisager des stratégies thérapeutiques. L'un des objectifs de ce travail était donc d'identifier les modifications métaboliques survenant au cours d'une atrophie musculaire engendrée par une insuffisance rénale, en se focalisant plus particulièrement sur le rôle de la protéolyse.

Nous avons d'abord étudié chez le rat l'impact d'une insuffisance rénale aiguë induite par injection de gentamicine sur le muscle squelettique. Nous avons constaté, malgré une atrophie musculaire peu marquée, une augmentation importante de l'expression des E3 ligases musculaires MuRF1 et MAFbx (système protéolytique ubiquitine protéasome, UPS). Aucune augmentation n'a été observée pour les E3 ligases Nedd4, Trim32 et FbxO30/MUSA1. Ces changements concernaient les muscles rapides indiquant leur plus grande sensibilité à l'atrophie induite par l'insuffisance rénale. De plus, l'augmentation de l'expression de MuRF1 et MAFbx était corrélée à la sévérité de l'insuffisance rénale. MuRF1 et MAFbx apparaissent donc comme marqueurs sensibles et précoces de l'atrophie musculaire dans ce modèle.

Dans un second temps, des biopsies musculaires chirurgicales ont été réalisées au cours d'interventions programmées chez des patients atteints d'un cancer bronchique (LC), hémodialysés chroniques (HD) ou indemnes de pathologies (CT). Nous avons retrouvé une augmentation de l'expression des ARNm de plusieurs acteurs de l'UPS (dont les E3 MuRF1 et MAFbx) et de l'autophagie chez les patients LC et HD. En spectrométrie de masse, plus de 230 protéines sur 1700 identifiées étaient exprimées de façon différentielle dans le muscle de patients LC et HD par rapport aux patients CT. Ces protéines sont impliquées dans la protéolyse, le métabolisme des acides aminés, la glycolyse, la phosphorylation oxydative, la défense contre le stress oxydant, la contraction musculaire, la matrice extracellulaire et l'organisation du cytosquelette musculaire.

Nous avons donc identifié un programme d'atrophie musculaire comprenant l'activation de l'UPS et de l'autophagie et s'accompagnant de modifications métaboliques caractérisées principalement par une augmentation de la glycolyse et une dysfonction mitochondriale. Les mécanismes en jeu sont autant de pistes pour la mise au point de traitements de l'atrophie musculaire