

UNIVERSITE D'ANGERS

Année 2007

N° d'ordre : 875

**METABOLISME ENERGETIQUE AU COURS DE LA
CACHEXIE CANCEREUSE**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

le 17 décembre 2007

à ANGERS

par Gyasi JOHNSON

Devant le jury ci-dessous :

Monsieur Yves BOIRIE (Rapporteur), Professeur, Université de Clermont Ferrand

Monsieur Jean-Marie BARD (Rapporteur), Professeur, Université de Nantes

Monsieur Charles COUET (Examineur), Professeur, Université de Tours

Monsieur Yves MALTHIERY (Examineur), Professeur, Université d'Angers

Madame Sophie BURGAUD (Invitée), Docteur Vétérinaire (Intervet Pharma R&D)

Directeur de thèse : Monsieur Patrick RITZ, Professeur, Université d'Angers

Nom et coordonnées du Laboratoire :

Laboratoire de Biochimie et de Biologie moléculaire, INSERM UMR 694, CHU ANGERS
CHU, 4 rue Larrey, 49033 Angers Cedex, France

ED 363

Remerciements

Je remercie vivement :

Messieurs **Yves Boirie** et **Jean-Marie Bard** pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail en acceptant d'en être les rapporteurs. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

Messieurs **Yves Malthiery** et **Charles Couet**, d'avoir accepté de faire partie du jury et pour l'attention qu'ils ont porté à mes travaux. Plus particulièrement, je tiens à remercier Monsieur Yves Malthiery pour m'avoir accueilli au sein de l'unité INSERM U694 d'Angers et pour tous les moyens qui ont été mis à ma disposition pour réaliser ces travaux.

Monsieur **Patrick Ritz** de m'avoir proposé ce sujet de thèse et d'avoir su encadrer ce travail tout en me laissant une large autonomie. Qu'il trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de ma plus respectueuse admiration.

Messieurs **Gérard Lorimier**, **Laurent Laccourreye**, **Bernard Enon**, **Vincent Blin**, **Yann Jousset** et **Jean-Pierre Arnaud** et leurs équipes pour m'avoir chaleureusement accueilli dans leurs services et permis d'inclure des patients dans mon études.

Monsieur **Daniel Aguer** et Madame **Sophie Burgaud**, d'Intervet Pharma R&D, pour avoir soutenu ce projet et m'avoir fourni de précieux conseils. Ce projet n'aurait pas pu se concrétiser sans le soutien financier d'Intervet Pharma R&D. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

Messieurs **Damien Roussel** et **Jean-François Dumas** pour m'avoir initié et formé à l'énergétique mitochondriale. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Madame **Agnès Sallé** pour son aide technique et son accompagnement dans chacun des services hospitaliers.

Monsieur **Gilles Simard**, Madame **Françoise Foussard** et Monsieur **Olivier Douay**, pour votre précieuse aide et support tout au long de cette thèse.

Mesdemoiselles **Caroline Jacques**, **Laëtitia Lagoutte** et **Naïg Gueguen**, Monsieur **Matthieu Arvier**, pour leur aide technique, leurs conseils et soutien quotidien.

Tout le personnel de la plateforme transcriptome de Ouest Génopôle de Nantes et du Service Commun de Cytométrie et d'Analyses Nucléotidiques (IFR 132) d'Angers pour leur aide dans l'analyse moléculaire de ce travail.

Tous les membres et techniciens du Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire d'Angers, Anne, Arnaud, Aurélie, Carole, Céline, Chadi, Christelle, Dany, Delphine, Dominique, Françoise, Frédérique, Jean-Fred, Jocelyne, Julie, Julien, Louis, Marc, Marie-Anne, Mélissa, Mireille, Miriam, Nikky, Pascal, Pascale, Philippe, Soazig, Valérie, Virginie, pour leur bonne humeur et leur accueil.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement pour leurs encouragements (et leurs relectures), Clothilde, ma famille, et mes amis sans qui ce travail n'aurait jamais abouti.

A mon grand père, le Docteur Richard Johnson

A ma famille

A mes amis

Dans notre vie de tous les jours, nous apprenons une foule d'informations propres à chacun de nous. Ce caractère unique explique que chacun de nous ait un savoir et une vision strictement personnels, d'où l'utilité de travailler avec d'autres pour résoudre des problèmes. En mettant en commun notre connaissance, nous poursuivons les associations que nous faisons tous.

Michael Bloch

Abréviations

ADP : Adenosine Di-Phosphate
AH : Ascite Hepatoma
AMPc : Adénosine Monophosphate Cyclique
ANT : Adenine nucleotide Translocase
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ATP : Adenosine Tri-Phosphate
CMB : Circonférence Musculaire Brachiale
CRH : Corticotropin Releasing Hormon
CRP : C-Reactive Protein
Cyt c : Cytochrome c
DCD : Dermcidine
DEAP : Dépense Energétique liée à l'Activité Physique
 Δ pH : Gradient de protons
 Δ Phi : Potentiel de membrane
DER : Dépense Energétique de Repos
DET : Dépense Energétique Totale
DSEP : Diffusible Survival Evasion Peptide
 e^- : Electron
ECT : Epaisseur Cutanée Tricipitale
FADH₂ : Flavin Adenine Dinucleotide
FCCP : Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone
H⁺ : Proton
HCAP : Human Cachexia Associated Protein
IFN- γ : Interféron Gamma
IL : Interleukine
IMC : Indice de Masse Corporelle
IkB : Inhibiteur κ B
LLC: Lewis Lung Carcinoma
LMF : Lipid Mobilizing Factor
LPL : Lipoprotéine Lipase

LPS : Lipopolysaccharide
MAC : Murin Adenocarcinoma
MAFbx : Muscle Atrophy F-box
MCA : Methylcholantrene
MuRF1 : Muscle Ring Finger 1
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucléotide
NFκB : Facteur Nucléaire κB
NO : Oxyde Nitrique
NOS : NO-synthase
O : Oxygène
OXPHOS : Oxydation Phosphorylante
Pi : Phosphate inorganique
PIF : Proteolysis-Inducing Factor
ROS : Reactive Oxygen Species
TMPD : N,N,N',N' Tetra Méthyl-p-Phenylenediamine
TNF-α : Tumor Necrosis Factor Alpha
TPMP: Triphenylmethylphosphonium
UCP : Uncoupling Protein
ZAG : Zinc-α2 Glycoprotéine

Sommaire

AVANT PROPOS.....	11
 1. METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL MUSCULAIRE AU COURS DE LA CACHEXIE CANCEREUSE	16
1.1. Le cancer	17
1.2. La cachexie cancéreuse	18
1.2.1. Définition	18
1.2.2. Incidence de la cachexie cancéreuse	20
1.2.3. Pathophysiologie de la cachexie cancéreuse	21
1.3. La dénutrition.....	22
1.3.1. Facteurs de la dénutrition	23
1.3.2. Conséquences de la dénutrition	24
1.3.3. Evaluation de l'état nutritionnel du patient cancéreux	25
1.3.3.1. Mesures anthropométriques et interrogatoire.....	26
1.3.3.2. Paramètres biologiques	27
1.3.3.3. Evaluation de la composition corporelle par impédancemétrie	28
1.4. La pathogenèse de la cachexie cancéreuse	29
1.4.1. Interaction hôte-tumeur	29
1.4.1.1. Les cytokines	30
1.4.1.2. Le Proteolysis-Inducing Factor (PIF)	31
1.4.1.3. Le Lipid Mobilizing Factor (LMF).....	32
1.4.2. Réponses de l'hôte.....	34
1.4.2.1. Troubles du métabolisme glucidique	34
1.4.2.2. Troubles du métabolisme lipidique.....	35
1.4.2.3. Troubles du métabolisme protéique	35
1.4.2.4. L'inflammation chronique	37
1.4.2.5. Mitochondrie et état inflammatoire.....	40
1.4.2.6. Dépense énergétique, cancer et cachexie cancéreuse.....	42
1.4.2.7. Leptine et ghréline	46
1.5. Le muscle squelettique et la cachexie cancéreuse	48
1.6. La fonction énergétique mitochondriale	49
1.6.1. Régulation du rendement de conversion énergétique mitochondriale	51

1.6.2.	Mitochondrie et perte de poids	52
1.7.	La fonction mitochondriale et la cachexie cancéreuse	53
2.	RESTRICTION CALORIQUE ET METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL	56
2.1.	Article 1.....	57
3.	CACHEXIE CANCEREUSE ET DEPENSE ENERGETIQUE DE REPOS.....	69
3.1.	Article 2.....	70
4.	CACHEXIE CANCEREUSE ET METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL MUSCULAIRE	98
4.1.	Article 3.....	99
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	122
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	128
7.	ANNEXES.....	169
7.1.	Fiches techniques.....	170
	Fiche technique n°1 : Isolement de mitochondries de muscle squelettique.	170
	Fiche technique n°2 : Détermination de la consommation en oxygène mitochondriale : utilisation d'une électrode sensible à l'oxygène	171
	Fiche technique n°3 : Mesure de la cinétique de fuite de protons en conditions non-phosphorylantes.....	174
	Fiche technique n°4 : Mesure du potentiel de membrane de mitochondries isolées par une électrode sensible au TPMP.....	175
	Fiche technique n°5 : Détermination du rapport ATP/O par spectrophotométrie.....	178
	Fiche technique n°6 : Dosage protéique par spectrophotométrie, méthode de l'acide bicinchoninique.....	181
	Fiche technique n°7 : Mesure de composition corporelle.....	182
	Fiche technique n°8 : Dosages enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire par spectrophotométrie	184
	Fiche technique n°9 : Mesure de la dépense énergétique de repos par calorimétrie indirecte	192
	Fiche technique n°10 : Extraction d'ARN avec le kit Qiagen « RNeasy fibrous tissue kit »	193

7.2.	Les modèles expérimentaux de cachexie cancéreuse.....	194
7.2.1.	Quelques modèles animaux de cachexie cancéreuse	195
7.2.2.	Les tumeurs transplantables	196
7.2.2.1.	Le carcinome Colon 26.....	196
7.2.2.2.	L'adénocarcinome MAC 16	196
7.2.2.3.	L'hépatome ascitique Yoshida AH-130.....	197
7.2.2.4.	Le carcinosarcome Walker-256	197
7.2.2.5.	Le carcinome pulmonaire de Lewis (LLC)	198
7.2.2.6.	Le sarcome MCA.....	198
7.2.2.7.	Le sarcome MCG 101	198
7.2.3.	Les limites des modèles expérimentaux de cachexie cancéreuse	199
7.2.3.1.	Le développement tumoral	199
7.2.3.2.	La prise alimentaire	200
7.2.3.3.	La perte de poids.....	201
7.2.4.	Conclusions	201

Avant propos

« **Manger, c'est déjà guérir** » ...En effet, l'évolution de nombreuses pathologies est en directe relation avec l'état nutritionnel des patients. Néanmoins, dans certaines situations, malgré un support nutritionnel adéquat tant en qualité qu'en quantité, des dysfonctionnements métaboliques complexes engendrent une perte de poids et une dégradation progressive de l'état nutritionnel des patients. Ces anomalies sont observées lors de syndromes d'immunodéficience acquise, d'affections malignes, de sepsis, de maladies pulmonaires obstructives chroniques, de traumatismes majeurs comme des brûlures ou encore d'insuffisances cardiaques. Elles sont regroupées sous le terme de « cachexie » issu du grec « kakhexia » : « kakos » pour mauvais et « hexis » pour condition. Le syndrome de cachexie traduit un état d'affaiblissement, au cours duquel survient un bouleversement métabolique, un catabolisme musculaire et adipeux (Tisdale, 1993-a). Les mécanismes qui conduisent à la cachexie varient selon les états. Il en résulte un facteur de complication considérable pour la prise en charge des patients.

Chez les patients atteints de cancer, la cachexie augmente la durée et la fréquence d'hospitalisation, diminue les chances de succès des thérapies anti-cancéreuses et augmente ainsi le coût de prise en charge médicale. Parallèlement, elle limite la qualité et l'espérance de vie de ces patients.

La cachexie cancéreuse est un syndrome clinique complexe. De part son origine multifactorielle il est difficile d'en décrire la physiopathologie de façon uniforme (Argiles *et al.*, 2003-a). Selon MacDonald, il s'agit d'un syndrome caractérisé par une fonte tissulaire chronique du tissu adipeux et de la masse maigre, suite à l'action directe de facteurs tumoraux, ou indirectement causée par une réponse exacerbée de l'hôte face à la tumeur (MacDonald *et al.*, 2003). La cachexie se manifeste dans près de 50% des cas de cancer (Palesty et Dudrick, 2003). Elle est responsable de près de 25% des décès de patients cancéreux (Dworzak *et al.*, 1998 ; Warren, 1932). Typiquement, les patients cancéreux cachectiques présentent une perte de poids importante, une anorexie, une satiété précoce, une asthénie, une anémie (Tisdale, 2002). Bien que ce syndrome soit généralement associé aux patients cancéreux en stade terminal, il est aussi présent lors des stades précoces de la maladie précédant certains symptômes liés au cancer.

Les patients cachectiques ne répondent peu ou pas aux interventions nutritionnelles conventionnelles. En effet, les patients supplémentés nutritionnellement reprennent parfois de la masse grasse mais très difficilement de la masse maigre (Nixon and Lawson, 1983). L'anorexie est fréquente chez les patients atteints de cancer et représente souvent un

symptôme de diagnostic. Néanmoins, la prévalence de l'anorexie chez ces patients est difficile à estimer faute d'outils suffisants et d'évaluation systématique de sa présence. Lorsqu'elle est évaluée, l'anorexie est présente dans 15 à 40% des cas (Dewys *et al.*, 1979). Néanmoins, elle n'explique pas entièrement la perte de poids puisque l'importance de cette dernière n'est pas en rapport avec la prise alimentaire de ces patients.

La dénutrition présente chez ces patients n'est donc pas exclusivement expliquée par la réduction des apports alimentaires. La dénutrition est présente dans 50 à 80 % des cas de cancer (Dewys *et al.*, 1980). Elle résulte d'un déséquilibre entre les apports nutritionnels et les dépenses énergétiques métaboliques. Ses conséquences en terme clinique (fonte tissulaire, perte d'autonomie, affaiblissement du système immunitaire...) s'additionnent à celles du cancer pour aggraver davantage le pronostic des patients. De plus, l'état de dénutrition affecte la capacité des patients cancéreux à répondre aux traitements anti-cancéreux, limitant leur tolérance aux thérapies anticancéreuses (Ross *et al.*, 2004 ; Andreyev *et al.*, 1998).

La perte de poids observée lors de la cachexie cancéreuse est d'incidence et de sévérité variable selon le type de cancer. Néanmoins, l'incidence et la sévérité sont positivement corrélées. Considérant la perte de poids survenue lors des six mois précédents l'évaluation, il est possible de classer les types de cancers selon leurs capacités à induire une cachexie : les cancers gastriques (85%), pancréatiques (83%), les cancers pulmonaires (61%), les cancers ORL (57%), les cancers du colon (54%), les cancers du sein (36%) (Dewys *et al.*, 1980 ; Lees, 1999).

Chez des patients atteints de cancer, à stade identique, la perte de poids est un facteur de réduction de l'espérance de vie (Fein *et al.*, 1985). La variation pondérale, assimilée comme marqueur cachectique est simple à mesurer cliniquement et en relation directe avec le pronostic du patient. Néanmoins, lorsque la perte de poids est manifeste, la cachexie est bien établie et il est désormais difficile de la freiner. Il est donc nécessaire de disposer de marqueurs précoces et pratiques de la cachexie cancéreuse.

La perte pondérale, notamment la fonte du tissu musculaire, contribue à une perte importante de capacité physique des patients. Cette perte de capacité se traduit par une grande fragilité, une perte d'autonomie et une dépendance croissante. De plus, l'inactivité physique exacerbe le processus de fonte de la masse musculaire. Il se crée donc un cercle vicieux qui conduit à une fonte musculaire progressive.

La réduction d'activité physique conduit à une chute de la dépense énergétique totale journalière. En revanche, la perte de poids associée à la cachexie cancéreuse reflète un catabolisme accentué qui représente une dépense énergétique supplémentaire par rapport aux dépenses basales. De plus, ces patients peuvent perdre du poids malgré une prise alimentaire normale ce qui suggère une augmentation de leur dépense énergétique de repos (DER). Néanmoins, selon les investigations, les patients cachectiques présentent une DER soit augmentée (Hyltander *et al.*, 1991), normale (Nixon *et al.*, 1988) ou diminuée (Dempsey *et al.*, 1984). Il semble que la réponse en matière de dépense énergétique soit variable selon le type de cancer (Fredrix *et al.*, 1991-a).

Ainsi, lors de la cachexie cancéreuse, malgré un apport nutritionnel adéquat, le patient se trouve dans un état de déséquilibre protéino-énergétique chronique suggérant une anomalie d'efficacité de conversion de substrats en énergie disponible pour le métabolisme.

Au repos, près de 90% de l'oxygène est consommé au niveau des mitochondries. Près de 80% de cet oxygène est couplé à la synthèse d'ATP (Rolfe et Brown, 1997). Le rapport synthèse d'ATP sur consommation d'oxygène (ATP/O) reflète l'efficacité de la phosphorylation oxydative soit, l'efficacité de la mitochondrie à synthétiser de l'énergie à partir de substrats. Ainsi, pour un besoin énergétique donné, l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale sera améliorée si la consommation en oxygène est diminuée et inversement. Une chute de l'efficacité mitochondriale au niveau du muscle squelettique est susceptible de participer au mécanisme de fonte musculaire observé dans ce tissu. En effet une efficacité amoindrie pourrait provoquer une augmentation du taux d'oxydation de substrats afin de compenser cette chute. En situation normale, les lipides seraient une source privilégiée d'énergie. Cependant, au cours de la cachexie cancéreuse, les modifications métaboliques observées et l'action des facteurs de l'hôte et des facteurs tumoraux pourraient influencer sur la hiérarchie d'utilisation des substrats. Dans ce cas, le muscle squelettique serait, contrairement à l'état normal, une source d'acides aminés.

L'objectif des travaux de cette thèse était dans un premier temps d'étudier l'impact de la restriction calorique sur le métabolisme énergétique mitochondrial dans un modèle murin, le rat Sprague-Dawley restreint alimentaires de 25%, 50%, 75% et à jeun à court terme (3 jours). L'objectif était de pouvoir identifier l'impact d'une éventuelle diminution de la prise alimentaire chez des patients cachectiques sur la fonction mitochondriale musculaire.

Chez l'homme, ces travaux visaient à étudier au niveau du muscle squelettique de patients souffrant de cachexie cancéreuse le métabolisme énergétique mitochondrial ainsi que l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Il s'agissait d'évaluer le métabolisme énergétique mitochondrial à travers les mécanismes impliqués dans l'efficacité de phosphorylation oxydative (respiration mitochondriale, synthèse d'ATP, fuite de protons, activité et efficacité de la chaîne respiratoire, évaluation du niveau d'expression de gènes liés au métabolisme mitochondrial). En parallèle, l'analyse de la dépense énergétique corps entier était évaluée au cours de la cachexie cancéreuse.

La première partie de la thèse consiste en l'étude bibliographique de la cachexie cancéreuse et de son impact sur le métabolisme énergétique.

La deuxième partie concerne les différents travaux au cours desquels nous avons étudié les modifications du métabolisme énergétique de mitochondries isolées issues de muscles squelettiques de rats en restriction alimentaire et de patients atteints de cachexie cancéreuse ainsi que les modifications observées au niveau du corps entier.

1. Métabolisme énergétique mitochondrial musculaire au cours de la cachexie cancéreuse

1.1. Le cancer

A l'origine, c'est Hippocrate (460-377 av. JC), le père de la médecine grecque, qui donne son nom à la maladie. Le mot cancer vient du grec « karkinos » qui signifie crabe. Cette dénomination vient du fait que certaines tumeurs malignes, en envahissant les veines supérieures leur ont donné l'apparence de pince de crabe avec un noyau central et des expansions par lesquelles la maladie s'étend au corps entier (Tomatis, 1990).

Dès 1920, Warren étudie les causes de mortalité chez les patients souffrant du cancer et met en cause une part non négligeable de l'état de dénutrition des patients dans leur décès (Warren, 1932). Il met en évidence, suite à des autopsies, que chez près de 22% de patients atteints de cancer, la cause du décès est directement liée à une dégradation de l'état nutritionnel du malade.

Aujourd'hui, le cancer est l'une des causes de décès les plus fréquentes en Europe. Cette situation semble s'aggraver puisque le nombre de décès dus aux cancers les plus fréquents comme le cancer du poumon ou du colon sont en hausse et que nous assistons à un vieillissement des populations. L'incidence des cas de cancers diagnostiqués en Europe est de 3.2 millions de cas en 2006 contre 2.9 millions en 2004 et le nombre de décès liés à cette maladie est estimé à 1.7 million de personnes (Ferlay *et al.*, 2007). Les cancers pulmonaires représentent un cinquième des causes de décès liés au cancer, suivis par les cancers colorectaux (12%) et par les cancers du sein (7.8%) (Ferlay *et al.*, 2007).

En France, chaque année, 278 000 nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués et 150 000 personnes en décèdent, c'est-à-dire 410 morts par jour (Remontet *et al.*, 2002). Le cancer représente 37% des décès prématurés soit un taux 20% plus élevé que pour le reste de l'Europe, ce qui souligne le retard de notre système de prévention. Le coût du cancer pour le système de santé est estimé à 12 milliards d'euros par an (Amalric, 2007).

1.2. La cachexie cancéreuse

La cachexie cancéreuse est un syndrome bien souvent sous-estimé et parfois négligé. Bien qu'elle représente à elle seule un facteur de risque indépendant en matière de morbidité et de mortalité, elle ne fait pas encore l'objet de suffisamment d'attention en matière de prise en charge médicale. La thérapie qu'elle requière relève d'une approche coordonnée, flexible, et multidisciplinaire.

1.2.1. Définition

Le mot cachexie dérive du grec « kakos » et « hexis » et signifie « mauvaises conditions ». Elle décrit un mélange complexe de dysfonctionnements métaboliques, d'altérations du statut nutritionnel et de fonte tissulaire associés à différentes pathologies chroniques ou stades finaux (Cancer, SIDA, Arthrite rhumatoïde, sepsis, maladie de Crohn, troubles cardiaques...). La cachexie cancéreuse est un syndrome chronique de perte de poids impliquant à la fois la fonte de tissus adipeux et de tissus maigres. Une prise en charge nutritionnelle conventionnelle est inefficace face à ce syndrome, permettant une reprise de masse grasse mais rarement de masse maigre (Nixon *et al.*, 1983). Classiquement, le patient cancéreux cachectique présente une perte de poids nette, une asthénie, une satiété précoce, une anorexie, une anémie (Tisdale, 2002). De plus, son statut fonctionnel est diminué, il présente une réponse réduite face aux traitements anti-tumoraux (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie) (Ross *et al.*, 2004; Andreyev *et al.*, 1998) et son espérance de vie est réduite. La cachexie est présente chez près d'un patient sur deux souffrant du cancer (Palesty *et al.*, 2003 ; Skipworth *et al.*, 2007). Selon le type de cancer, elle serait impliquée de façon majeure dans près de 25% des décès qui surviennent chez les patients cancéreux (Warren, 1932, Nixon *et al.*, 1980, Lawson *et al.*, 1982, Mantovani *et al.*, 2001). Toutefois, il est difficile de décrire une physiopathologie uniforme de la cachexie cancéreuse du fait de sa complexité et de son origine multifactorielle (Raiten, 1999, Argiles *et al.*, 2003-a).

La cachexie est un syndrome dont le développement est progressif et fonction du stade de la maladie. Elle se présente par phases de cachexie légère, modérée puis sévère (figure 1). Il est aisé de diagnostiquer une cachexie chez des patients en phase sévère, étant donné que les

symptômes y sont nettement marqués. Néanmoins, ces critères ne sont pas spécifiques et ne peuvent servir pour mettre en évidence une cachexie en stade précoce.

Pour les études cliniques, le manque de critères diagnostiques stricts pour la cachexie cancéreuse conduit à prendre comme marqueurs des composantes dont le pouvoir pronostic est démontré, tel que la perte de poids, l'anorexie ou l'état inflammatoire. Ces composantes diagnostiques sont quantifiées et classées par degré de sévérité, permettant ainsi de stratifier les populations de patients. Ceci permet d'identifier des sous-groupes de patients cachectiques et de mieux cibler les thérapies.

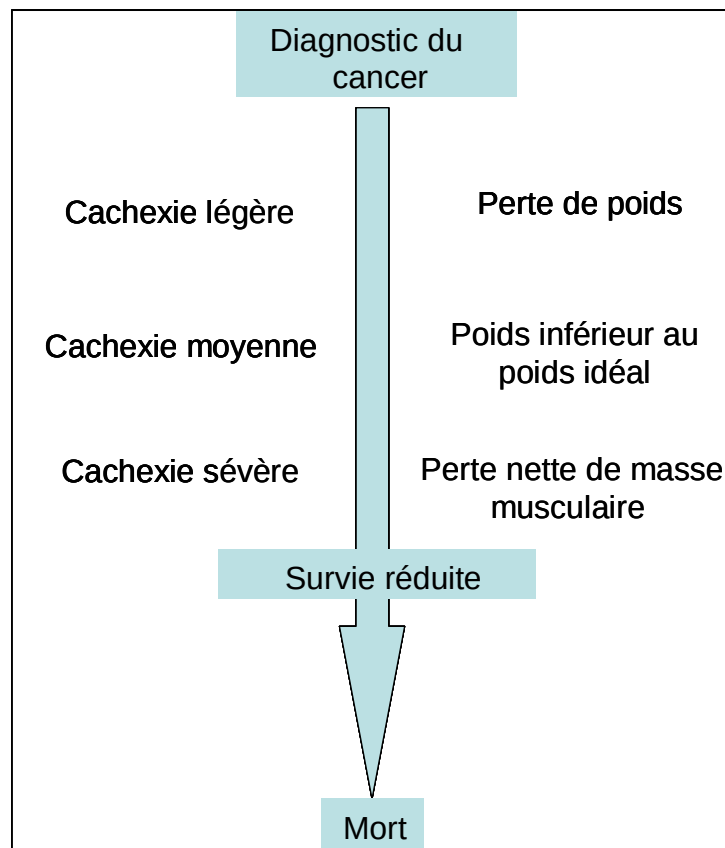


Figure 1. Chronologie des phases de cachexie cancéreuse

1.2.2. Incidence de la cachexie cancéreuse

L'incidence de la cachexie chez les patients cancéreux est généralement déterminée en évaluant le degré de perte de poids. En 1980, Dewys et l'équipe de la « Eastern Cooperative Oncology Group » ont réalisé une étude clinique afin d'analyser le potentiel pronostic de la perte de poids chez des patients atteints de cancers non traités (Dewys *et al.*, 1980). Au sein de différents types de cancers, ils ont mesuré l'incidence et la sévérité de la perte de poids sur les six mois précédant la mesure. Les résultats classés selon un ordre décroissant de perte de poids sont :

- Cancer gastrique : 85%
- Cancer du pancréas : 83%
- Cancer pulmonaire (non à petites cellules) : 61%
- Cancer pulmonaire (à petites cellules) : 57%
- Cancer de la prostate : 56%
- Cancer du colon : 54%
- Lymphome non-Hodgkinien non favorable : 48%
- Sarcome : 40%
- Leucémie aigue non lymphocytaire : 39%
- Cancer du sein : 36%
- Lymphome non-Hodgkinien favorable : 31%

L'incidence de la perte de poids va de pair avec sa sévérité. Chez les patients atteints de cancer du pancréas, cette évaluation a été faite sur les deux mois précédant la mesure, reflétant la sévérité de la cachexie dans ce groupe. Dans l'étude de Wigmore *et al.*, portant sur des patients atteints de cancer du pancréas, lors du diagnostic, 85% des patients avaient perdu près de 14% de leur poids habituel (Wigmore *et al.*, 1997-a). Cette perte de poids était d'environ 25% en phase finale (27 semaines plus tard). La masse maigre était passée de 43.4 kg à 40.1 kg et la masse grasse de 12.5 kg à 9.6 kg.

En dehors des patients souffrant de cancer du système gastro-intestinal supérieur, la plus forte perte de poids est observée chez les patients atteints de cancers pulmonaires (Ross *et al.*, 2004). Chez les patients atteints de cancer ORL, près de 57% d'entre eux présentent une perte

de poids d'environ 10% (Lees *et al.*, 1999). D'une façon générale, l'espérance de vie moyenne est significativement inférieure chez les patients ayant perdu du poids.

Le choix du critère « perte de poids » comme marqueur de la cachexie est donc compréhensible, d'autant qu'il est en relation avec l'évolution clinique du patient et facilement mesurable. Cependant, il est possible que ce critère manque de sensibilité quand aux dysfonctionnements liés à la cachexie. En effet, au stade où le patient présente une perte de poids significative, le processus cachectique est d'ores et déjà fermement établi et désormais difficile à freiner ou à endiguer. Il est donc nécessaire de prendre en compte la cachexie dès ses tous premiers signes et d'identifier ses signes précoces. La modification de la dépense énergétique de repos (DER) pourrait représenter un marqueur précoce. En effet, chez certains patients, il est établi qu'une modification de la DER est significative avant l'initiation d'une perte de poids (Jatoi *et al.*, 2001).

1.2.3. Pathophysiologie de la cachexie cancéreuse

Sur le plan clinique, la cachexie cancéreuse est décrite comme un dépérissement chronique et progressif en lien direct avec la présence tumorale. Ce syndrome est illustré comme un « flétrissement de l'intégrité physique » (Costa, 1977). Il s'agit d'un état de dénutrition progressif.

Les signes cliniques observés chez le patient cancéreux cachectique sont : une perte de poids impliquant à la fois le tissu adipeux et la masse maigre (Fearon *et al.*, 1990), une fatigue prématurée, une anémie, une chute des fonctions immunitaires, une anorexie (Lindsey, 1986 ; Tisdale, 2002). Ces modifications sont souvent concomitantes à d'autres signes plus subtils comme une altération du goût, une satiété précoce, une modification des habitudes alimentaires. Ce sont autant de signes qui passent inaperçus en début de la perte de poids. La fonte du tissu musculaire contribue à ce décharnement progressif et constitue la manifestation la plus caractéristique du syndrome. Cette fonte tissulaire est une grande source d'inquiétude et d'angoisse pour le malade et son entourage. La masse de tissu sain de l'organe atteint de cancer diminue, à l'exception du foie qui voit son poids augmenter chez les patients cachectiques. Cependant cette évolution semble plus relative qu'absolue.

D'un point de vue comportemental, le patient cachectique voit son activité physique progressivement réduite, avec une chute de l'énergie mise en jeu au cours des mouvements quotidiens. Parallèlement, ses aptitudes mentales comme l'attention, la concentration,

l'enthousiasme, sont réduites. Sur le plan psychologique, ces patients sont confrontés aux conséquences du diagnostic d'une maladie chronique à pronostic vital. La modification de l'image corporelle, la perte d'autonomie, la peur de la mort, des récives, des effets secondaires des traitements, le changement du statut social génèrent une forte anxiété et parfois une dépression (Zittoun *et al.*, 1988-a et b). Le flétrissement physique est perçu comme une prise de conscience de stade final, de mort imminente.

1.3. La dénutrition

Le développement de la cachexie cancéreuse est communément associé à une réduction des apports alimentaires ainsi qu'à des perturbations métaboliques conduisant à une dénutrition progressive (Nitenberg *et al.*, 1997). Selon le type de cancer, 40 à 80% des patients présentent un état de dénutrition (Tisdale, 1999). Chez ces patients, l'impact négatif de la dénutrition sur l'efficacité du traitement représente une justification pour que la médecine s'y intéresse.

Classiquement, la dénutrition est définie comme un état où les apports ou les stocks énergétiques du patient sont insuffisants pour répondre à ses besoins métaboliques. Elle peut résulter d'apports alimentaires inappropriés ou insuffisants, de l'augmentation des besoins métaboliques (pathologie, stress..) ou de pertes énergétiques accrues (malabsorption). Au cours du cancer, le métabolisme tumoral accentue ce déséquilibre. Le patient cancéreux se trouve dans un état nutritionnel où le déficit énergétique, protéique et de nutriments a un effet néfaste sur les tissus de son organisme. Il en résulte une atrophie des tissus conduisant à une perte de poids importante. Ce processus de dénutrition est une conséquence de la maladie néoplasique et il se différencie d'une situation de restriction alimentaire.

La prévention, le dépistage ainsi que la prise en charge de la dénutrition chez le patient cancéreux ont une place importante au sein des stratégies thérapeutiques. En effet, lors d'une pathologie, la dénutrition représente un facteur de risque indépendant important en matière de morbidité et de mortalité. Il est évident que la correction complète de la dénutrition n'est possible que par le traitement efficace de la pathologie causale. Néanmoins, le succès du traitement de cette dernière est souvent conditionné par le statut nutritionnel du patient. Un bon état nutritionnel est un adjuvant thérapeutique destiné à permettre d'administrer un

programme thérapeutique offrant au patient les meilleures chances de guérison (ou de rémission prolongée) avec un minimum de complications (Bachmann, 2004).

En cancérologie, la prise en charge nutritionnelle est souvent une question incontournable. Cependant, en raison de la multiplicité des facteurs de causalité des troubles nutritionnels (anorexie, troubles digestifs, hypermétabolisme, effets iatrogènes des traitements...), la nutrition demeure le parent pauvre de la cancérologie.

1.3.1. Facteurs de la dénutrition

Au cours du cancer, la réduction des apports alimentaires représente un facteur essentiel conduisant à la dénutrition. Selon le type de cancer, 30 à 75 % des patients sont anorexiques (Tchekmedyian *et al.*, 1992). La chute des apports alimentaires peut résulter de différents facteurs qui malheureusement peuvent se conjuguer. La localisation tumorale peut être un frein à l'alimentation. Les tumeurs situées à proximité ou envahissant l'appareil digestif représentent une gêne mécanique pour l'alimentation. C'est le cas lors de cancers de l'œsophage, du larynx ou de l'estomac. Cependant, l'anorexie est souvent due à des troubles accompagnants la prise alimentaire (altération du goût, de l'odorat, des sécrétions salivaires, satiété précoce, nausées, vomissements, troubles du transit, douleurs) (Fearon, 1992). Elle peut résulter d'une aversion alimentaire issue d'une perturbation de la transduction du signal depuis la périphérie vers le système nerveux central. Il s'agit de perturbations au niveau de l'hypothalamus impliquant des neurotransmetteurs tel le neuropeptide Y (Laviano *et al.*, 2003). Ainsi, les voies de signalisation habituelles de l'appétit et de la satiété seraient modifiées. Un déséquilibre entre peptides oréxigéniques et anorexigéniques se crée, conduisant à une chute de la prise alimentaire et une perte de poids (Perboni *et al.*, 2006). En plus de ces facteurs, les patients sont souvent sujets à la dépression ou à l'anxiété susceptibles de freiner les apports alimentaires.

Les traitements antinéoplasiques, en détruisant des cellules à renouvellement rapide, tumorales mais aussi normales (chimiothérapie), ou en portant atteinte directement aux structures sécrétoires et sensorielles des voies digestives et des surfaces de muqueuses (radiothérapie), peuvent entraîner des atteintes du goût, de l'odorat qui limiteront la prise alimentaire (Foltz *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 2006) et favoriseront les diarrhées et la dénutrition.

Cependant, la dénutrition du patient cancéreux résulte de mécanismes complexes que la réduction d'apports alimentaires ne peut expliquer entièrement (Heber *et al.*, 1986).

En effet, l'état de dénutrition observé au cours de la cachexie cancéreuse résulte d'une variété d'interactions entre l'hôte et la tumeur, interactions dont la nature n'est pas encore complètement connue (Heber *et al.*, 1992, Brink *et al.*, 2002). La complexité de ces interactions peut expliquer en partie pourquoi certains patients dont les tumeurs présentent des similarités macroscopiques montrent des tendances différentes à développer une cachexie. La réponse de l'hôte face à la tumeur implique souvent l'activation d'une réaction inflammatoire systémique (Argiles *et al.*, 2003-b ; Van Cutsem *et al.* 2005). Des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , interleukines : IL-6, IL-8, IL-12) seraient produites soit par les cellules de l'hôte, soit par la tumeur, soit par la combinaison des deux (Strassmann *et al.*, 1993). De plus, la perturbation du métabolisme glucidique (néoglucogenèse augmentée), lipidique (forte lipolyse et faible lipogenèse) et protéique (protéolyse importante) du patient participe au déclin de son état nutritionnel (De Blaauw *et al.*, 1997). L'action de la tumeur consisterait à amplifier cette réponse inflammatoire et ce stress ainsi qu'à produire des facteurs cachectiques cataboliques tels que le proteolysis-inducing factor (PIF) (Todorov *et al.*, 1996) et le lipid mobilizing factor (LMF) (Hirai *et al.*, 1998). Ainsi la dénutrition du patient cachectique résulte de la conjugaison de mécanismes complexes.

1.3.2. Conséquences de la dénutrition

La présence d'une dénutrition chez les patients atteints de cancer conduit à une dégradation progressive de leur qualité de vie (Ovesen *et al.*, 1993 ; O'Gorman *et al.*, 1998). En effet, ces patients sont sujets à une fonte de muscle, une perte de fonction du tissu musculaire, une asthénie, une réduction d'activités physiques et une perte d'autonomie (Zeiderman *et al.*, 1989 ; Stone *et al.*, 1998 ; Barber *et al.*, 1999 ; Al-Majid *et al.*, 2001 ; Foubert, 2006). Il se crée un cercle vicieux puisque la chute de l'activité physique contribue à la fonte musculaire. La dénutrition va déprimer le système immunitaire du patient et favoriser d'éventuelles infections (Schneider *et al.*, 2004) et contribuer à un alitement et une hospitalisation prolongés (Robinson *et al.*, 1987 ; Andreyev *et al.*, 1998).

Il est évident que la dénutrition est un frein à la thérapie proposée aux patients. La prise en charge thérapeutique de tumeurs solides par résection chirurgicale représente une étape majeure. Il est clairement établi que les complications post-opératoires sont plus fréquentes au

sein de populations dénutries que pour des populations non-dénutries (Dewys *et al.*, 1980 ; Windsor *et al.*, 1988 ; Meguid *et al.*, 1986 ; Naber *et al.*, 1997 ; Van Bokhorst-de Van der Schuer *et al.*, 2000 ; Jagoe *et al.*, 2001). L'acte chirurgical en lui-même est une source d'aggravation de la dénutrition (bilans et préparations pré-opératoires du patient, chirurgie). Ainsi, les complications post-opératoires seront d'autant plus nombreuses si le patient est dénutri avant l'opération, d'où la nécessité de prise en charge nutritionnelle péri-opératoire (Reilly *et al.*, 1988 ; Ottery, 1995 ; Kruizenga *et al.*, 2005 ; Stratton *et al.*, 2007 ; Grecu *et al.*, 2007). En cas de dénutrition, le risque de mortalité post opératoire est accru (Rey-Ferreiro *et al.*, 1997).

De plus, pour les patients dénutris, les doses de chimiothérapie sont réduites en vue de limiter les atteintes hématologiques (Lobato-mendizabal *et al.*, 2003). En conséquence, la chimiothérapie est moins efficace et la susceptibilité des patients à la toxicité du traitement est augmentée (Dewys *et al.*, 1980 ; Andreyev *et al.*, 1998 ; Persson *et al.*, 2002 ; Ross *et al.*, 2004). Ainsi, comparée à celle des patients non-dénutris, l'espérance de vie de patients cancéreux dénutris est réduite (Meguid *et al.*, 1986 ; Laviano *et al.*, 1996 ; Van Bokhorst-de Van der Schuer *et al.*, 1999 ; Andreyev *et al.*, 1998 ; Tisdale, 2003). Les patients dénutris atteints de cancers du colon ou de cancers pulmonaires ont une espérance de vie réduite de 51% et 30% respectivement, par rapport aux patients dont le poids est stable (Dewys *et al.*, 1980).

Pour ces raisons, la prise en compte de l'état nutritionnel du patient atteint de cancer doit faire l'objet d'une attention particulière car elle est partie intégrante et garante de la thérapie à lui appliquer. De plus, elle est un moyen de réduire le coût médical généré par des consultations et des complications plus fréquentes et d'une hospitalisation prolongée.

1.3.3. Evaluation de l'état nutritionnel du patient cancéreux

L'évaluation quantitative et qualitative de l'état nutritionnel au cours du cancer permet d'estimer l'ampleur des troubles métaboliques chez le patient, de mettre en place un éventuel programme de renutrition et d'évaluer son efficacité, d'orienter les choix en matière de thérapie à proposer, mais aussi, d'établir un pronostic. Cette évaluation fait partie de l'examen clinique du patient cancéreux. Elle consiste en un interrogatoire et un examen physique du

patient. Un complément de données biologiques et biophysiques est utile pour l'obtention de paramètres plus avancés.

1.3.3.1. Mesures anthropométriques et interrogatoire

Le poids actuel du patient est mesuré à jeun. Il est important de connaître le poids de forme du malade (ou poids habituel avant la maladie responsable de la dénutrition), l'éventuelle perte de poids et sa cinétique (caractère récent et vitesse d'amaigrissement). En effet, l'évolution du poids a un caractère important car un patient qui continue à maigrir présente un besoin d'assistance nutritionnelle plus urgent qu'un patient dont le poids est stabilisé ou en reprise. L'évaluation de la prise alimentaire, de la présence d'une anorexie, de troubles digestifs, des capacités fonctionnelles ainsi que de l'état général du patient sont autant d'éléments à renseigner et à prendre en compte dans l'interprétation du poids actuel. La variation de poids demeure un critère fort dans l'évaluation de la dénutrition (Kotler, 2000). Il est utile de calculer le pourcentage d'amaigrissement :

$$\% \text{ d'amaigrissement} = [(poids \text{ habituel} - poids \text{ actuel}) / poids \text{ habituel}] \times 100$$

Une perte de poids de plus de 10% sur 6 mois, par rapport au poids habituel est considérée comme reflétant une dénutrition sévère, modérée si elle est comprise entre 5 et 10% et légère si elle est inférieure à 5%.

Le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC), en utilisant la taille du patient, mesurée à l'aide d'une toise, permet une approximation de l'état nutritionnel ($IMC = [poids \text{ en kg}] / [taille \text{ en mètre}]^2$). Chez l'adulte, sa normalité est comprise entre 18.5 et 25. Néanmoins, sachant que le poids augmente avec l'âge, le seuil qui définit l'état de dénutrition ($<18.5 \text{ kg/m}^2$) est décalé vers une valeur de 21 kg/m^2 avec l'âge. La dénutrition est dite modérée si l'indice est de 60 à 80% des normes et sévère si l'indice est inférieur à 60% des normes (Melchior *et al.*, 1998).

Grâce aux mesures anthropométriques, il est possible d'évaluer certains compartiments corporels. L'évaluation de la masse grasse, donc des réserves énergétiques, peut être faite en mesurant l'épaisseur cutanée tricipitale (ECT) du patient. De même, la masse musculaire est évaluée en mesurant la circonférence musculaire brachiale (CMB). La mesure des plis cutanés présente un intérêt pour le suivi individuel de l'état nutritionnel d'un patient. Cependant, ces

mesures ne sont pas de pratique courante et ont de nombreuses limites : l'absence d'évaluation de la masse protéique profonde et des autres compartiments de masse maigre, une grande variabilité interindividuelle de répartition sous-cutanée de la graisse, l'influence de l'état de la peau sur la mesure. Il existe d'autres méthodes de mesures de la composition corporelle que nous aborderons ultérieurement.

1.3.3.2. Paramètres biologiques

La synthèse de certaines protéines sériques est dépendante de l'état nutritionnel du patient. Ces protéines sériques sont utilisées comme marqueurs de l'état nutritionnel. Les protéines les plus couramment utilisées comme indice de l'état nutritionnel sont : l'albumine, la transferrine, et la préalbumine. Toutefois, leur fluctuation est à interpréter avec prudence. En effet, de nombreux paramètres non nutritionnels (comme l'état inflammatoire, le taux d'hydratation) sont susceptibles de faire varier le taux de ces protéines. La quantification de leurs taux sériques doit être utilisée comme élément de criblage lors de l'évaluation de l'état nutritionnel du patient et non comme un reflet direct de celui-ci (Myron Johnson *et al.*, 2007).

L'albumine

L'albumine est probablement le marqueur le plus utilisé pour évaluer l'état nutritionnel de patients en milieux hospitaliers. Elle représente 40% des protéines sériques. Cette protéine est synthétisée par le foie et sa demi-vie est longue (20 jours). Sa valeur normale est de 42 ± 2 g/l. Sa synthèse chute en cas de carence nutritionnelle. Le principal facteur qui influence le taux sérique d'albumine est sa vitesse de transfert du secteur vasculaire vers le fluide interstitiel. Cette vitesse de transfert est augmentée dans des situations pathologiques, notamment par la présence d'un état inflammatoire. De plus, toute dilution du secteur vasculaire (hyperhydratation) ou déshydratation du patient influe sur sa concentration. Ainsi, bien que communément mesuré, le taux sérique d'albumine renseigne peu sur l'état nutritionnel du patient cancéreux (Shenkin, 2006). Chez le sujet âgé, la chute du taux d'albumine est en rapport avec la réduction de la masse musculaire (Baumgartner *et al.*, 1996).

La transferrine

Cette glycoprotéine plasmatique a une demi-vie de 8 jours. Elle sert de transporteur de fer plasmatique. Près de 99% du fer sérique est lié à un tiers du pool de transferrine. Ainsi, la

synthèse de transferrine est liée au stock de fer ce qui fait d'elle un marqueur précoce de carence martiale. Compte tenu de sa demi-vie courte, la variation de son taux sérique est plus sensible à la dénutrition que celui de l'albumine. Néanmoins, certains paramètres non nutritionnels ont une influence sur son taux. C'est le cas lors de carence martiale ou d'anémie, de traitement par antibiotiques, de contraception ou de troubles hépatiques. Isolément, son taux renseigne peu sur l'état nutritionnel du patient (Roza *et al.*, 1984).

La préalbumine

Cette protéine a une demi-vie courte (2 jours). Synthétisée par le foie, sa valeur normale est de 310 ± 35 mg/l. La préalbumine est une protéine de transport pour les hormones thyroïdiennes ainsi qu'un site de liaison pour le rétinol avec lequel elle circule sous forme de complexe protéique. Sa chaîne comporte une grande quantité de tryptophane, acide aminé important pour l'initiation de la synthèse de protéines. Pour cette raison, et du fait que son taux varie rapidement face à une dénutrition, cette protéine semble être un meilleur marqueur de dénutrition que les deux précédentes (Mears, 1996 ; Mears, 2005).

Le bilan fourni par ces taux de protéines hépatiques permet, plus que d'évaluer l'état nutritionnel des patients, d'identifier les patients les plus morbides, les plus susceptibles de présenter un déficit nutritionnel (Fuhrman *et al.*, 2004).

1.3.3.3. Evaluation de la composition corporelle par impédancemétrie

L'impédancemétrie est la seule technique facilement disponible en clinique permettant d'évaluer différents compartiments de l'organisme. Son principe repose sur la mesure d'un courant alternatif de très faible intensité traversant l'organisme (Boulier *et al.*, 1992). Le corps est considéré comme un milieu conducteur homogène, dans lequel baigne une suspension de cellules. Chacun de ces éléments est parcouru de façon différente selon la fréquence du courant. Les hautes fréquences (>100 Hz) traversent le milieu intérieur ainsi que les cellules. Les basses fréquences (≤ 5 Hz) ne franchissent pas les membranes cellulaires, elles ne traversent que le milieu intérieur. Ainsi il est possible d'apprécier l'eau corporelle totale, l'eau corporelle extra-cellulaire. Grâce à des équations établies (Segal *et al.*, 1988) issues de la

théorie bicompartimentale (poids = masse maigre + masse grasse) la masse grasse et la masse maigre corporelles sont calculées.

La masse maigre correspond à l'eau, les protéines et la masse calcique. Elle représente 77 à 85% du poids corporel. La masse grasse correspond aux lipides du corps (triglycérides essentiellement) et représente 15 à 23% du poids corporel. L'impédancemétrie permet d'évaluer ces compartiments et d'en apprécier la part. En effet, une diminution de la masse grasse est possible sans beaucoup de risque alors qu'une perte de la masse maigre s'accompagne de conséquences physiologiques plus lourdes.

L'impédancemétrie a comme avantage d'être simple à mettre en œuvre au chevet du patient, peu coûteuse, et non invasive. Cependant, elle est très sensible aux variations hydriques et les équations associées ne sont pas toujours disponibles pour des populations extrêmes (sujets très dénutris, âgés, en soins intensifs...). D'autres techniques sont disponibles (pléthysmographie, absorptiométrie biphotonique à rayons X, dilution isotopique), néanmoins elles nécessitent un déplacement du patient, elles sont moins faciles à mettre en œuvre, plus coûteuses, et rarement disponibles en milieux hospitaliers.

1.4. La pathogenèse de la cachexie cancéreuse

1.4.1. Interaction hôte-tumeur

L'interaction entre la tumeur et l'hôte s'établit tôt au cours de la croissance tumorale. Ceci a pour conséquence d'induire des troubles métaboliques qui seront persistants tout au long de la maladie. Le rôle de la tumeur dans l'étiologie de la cachexie implique une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui seront à l'origine de la réponse inflammatoire systémique de l'hôte (Deans *et al.*, 2006). De plus elle secrète des facteurs pro-cachectiques qui ont des effets cataboliques directs sur les tissus de l'hôte (Todorov *et al.*, 1996 ; Hirai *et al.*, 1998). Le mécanisme de réponse de l'hôte consiste en une réaction démesurée face à la présence d'une tumeur, d'une réponse inflammatoire généralisée (Deans *et al.*, 2006) ainsi qu'un stress neuroendocrine (Barber *et al.*, 2004 ; Costelli *et al.*, 2006). Les conséquences d'une telle

interaction hôte-tumeur sont des troubles qui concernent particulièrement le métabolisme protéique mais aussi le métabolisme glucidique et lipidique.

Produits spécifiques de la tumeur :

1.4.1.1. Les cytokines

De nombreuses études mettent en cause les cytokines pro-inflammatoires dans le développement de la cachexie cancéreuse (Wigmore *et al.*, 2002-a et b). Les cytokines sont des polypeptides produits par les macrophages, monocytes et lymphocytes. Ils sont synthétisés *de novo* en réponse à des stimuli tels qu'une infection microbienne, un traumatisme, un stress ou une croissance tumorale. Il est démontré que des lignées cellulaires issues de patients cancéreux cachectiques sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires et d'induire une réaction inflammatoire aiguë hépatique (O'Riordain *et al.*, 1999). Cependant, les cytokines libérées par la tumeur ne sont généralement pas détectables dans la circulation sanguine. In vivo, elles seraient libérées par la tumeur, agissant plutôt localement afin d'initier l'inflammation et d'activer les cellules immunitaires de l'hôte. Ces dernières stimuleraient leurs propres cascades de cytokines, conduisant à l'initiation de la phase inflammatoire aiguë. Ainsi, bien que la majorité des cytokines détectées chez le patient cancéreux cachectique soit issue de cellules de l'hôte, les cellules tumorales sont à l'origine de cette production. In vitro, l'induction de la réponse inflammatoire aiguë serait dépendante d'un mécanisme impliquant principalement l'IL-6 (O'Riordain *et al.*, 1999), bien que d'autres molécules telles que le TNF- α , IL-2, IL-8, IFN- γ puissent jouer un rôle important aussi. En effet, l'IL6 est incapable à elle seule d'induire un syndrome cachectique complet (Garcia-Martinez *et al.*, 1994 ; Bouffet *et al.*, 1997). Il semble qu'une combinaison de médiateurs soit requise pour l'induction de la cachexie. Certaines cytokines sont connues pour avoir une activité anti-inflammatoire (comme IL-4, IL-10, IL-13) (Baumann *et al.*, 1994, Argiles *et al.*, 1999) et seraient donc de potentiels inhibiteurs de la cachexie. Cependant, leurs taux sont réduits lors d'une cachexie (Argilés *et al.*, 2006). l'IL-15 semble avoir des effets anabolisants sur le muscle en inhibant directement la protéolyse (Busquets *et al.*, 2005). Il en résulte que l'état de fonte tissulaire observé chez les patients cachectiques repose en partie sur l'équilibre entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (Argilés *et al.*, 2006).

1.4.1.2. Le Proteolysis-Inducing Factor (PIF)

L'induction de la cachexie cancéreuse par des médiateurs tumoraux circulants a été mise en évidence chez des rats parabiotiques (Norton *et al.*, 1985) et PIF fait partie de ces facteurs. In vitro et in vivo, il induit une protéolyse du muscle squelettique (Lorite *et al.*, 1997). Parallèlement il inhibe la synthèse protéique (Smith *et al.*, 1999). Il s'agit d'un polypeptide hautement glycosylé, constitué d'un corps peptidique de 4 kDa et dont le poids moléculaire total est de 24 kDa (Todorov *et al.*, 1997). Initialement, PIF a été identifié, grâce à des anticorps de souris porteuses de l'adénocarcinome transplantable MAC16 (Todorov *et al.*, 1996). Puis, il est mis en évidence dans l'urine de patients cachectiques atteints de cancers du pancréas, du sein, du poumon ou de l'ovaire (Cariuk *et al.*, 1997). Isolé puis injecté à des souris, il a la capacité d'induire une fonte musculaire chez ces animaux (Cariuk *et al.*, 1997). Wigmore et son équipe observent que les patients atteints de cancer du pancréas qui excrètent PIF dans leurs urines subissent une perte de poids plus importante et plus rapide que les malades chez lesquels le facteur est absent (Wigmore *et al.*, 2000). Il est sécrété par les cellules tumorales (Cabal-Manzano *et al.*, 2001).

L'ARN messager de PIF est absent ou très faiblement transcrit dans les tissus sains, à l'exception des glandes sudoripares (Schitteck *et al.*, 2001), de la protubérance annulaire du tronc cérébral et du gyrus paracentral du cortex cérébral (Porter *et al.*, 2003). En effet, PIF a une homologie de séquence avec trois produits issus du même locus de gène (12q3.1). Le premier est un peptide antibiotique normalement sécrété par les glandes sudoripares et non-glycosylé, la dermcidine (DCD) (Schitteck *et al.*, 2001). Le second est un facteur de survie neuronal, le « diffusible survival evasion peptide » DSEP ou Y-P30 (Cunningham *et al.*, 1998 ; Lowrie *et al.*, 2006) qui, in vivo favorise la survie de cellules neuronales en hypoxie. Le dernier est un oncogène putatif du cancer du sein (Porter *et al.*, 2003). In vitro, dans des cellules issues de tumeurs du sein, il favorise la croissance et la survie cellulaire (Porter *et al.*, 2003). L'ARNm du Proteolysis-Inducing Factor code pour le noyau peptidique de PIF, le facteur Y-P30 et la dermcidine. Cependant, l'activité protéolytique de PIF semble dépendante de la glycosylation de son peptide. Lors de la transfection du gène de PIF et de l'expression stable de sa protéine dans divers modèles murins ou des lignées cellulaires humaines, on observe un produit non-glycosylé incapable d'induire une cachexie in vivo (Minitto *et al.*, 2004). Chez la souris, la présence du corps peptidique seul ou de la protéine glycosylée native n'a aucun effet en matière de perte de poids (Todorov *et al.*, 1996). La présence du peptide

« core » de PIF dans certains tissus sains et la nécessité de modification post-traductionnelle pour obtenir une activité protéolytique suggère que certaines tumeurs pro-cachectiques produiraient un variant glycosylé de ce peptide.

Le proteolysis-Inducing Factor est capable d'induire une fonte musculaire aussi bien in vivo que in vitro, par un mécanisme impliquant la protéolyse ubiquitine-protéasome dépendante (Tisdale, 2001-a ; Khal *et al.*, 2005-a). Au cours de la cachexie cancéreuse, la dégradation des protéines myofibrillaires se fait principalement par cette voie (Attaix *et al.*, 1998). Ce système de dégradation des protéines se déroule en deux étapes. L'ubiquitination des protéines cibles, effectuée par un pool de protéines d'ubiquitination est suivie de la dégradation des protéines polyubiquitinées par le protéasome 26S, complexe catalytique à plusieurs sous unités. PIF induit une augmentation de la transcription et de l'expression des protéines de l'ubiquitination et du protéasome (Lorite *et al.*, 2001). Dans les myotubes murins, PIF active le facteur nucléaire NFκB (Whitehouse *et al.*, 2003) par l'intermédiaire de la protéine kinase C (Smith *et al.*, 2004). Dans les hépatocytes, il stimule la production de cytokines, IL-6 et IL-8, et de CRP, en activant les facteurs de transcriptions NFκB et STAT3 (Watchorn *et al.*, 2001). Ainsi ce facteur participe à l'inflammation systémique et à la protéolyse associée à la cachexie. Le Proteolysis -Inducing Factor humain a été nommé Human Cachexia Associated Protein (HCAP) (Akerblom et Murry, 1998 ; Wang *et al.*, 2003). Il est à supposer que des agents susceptibles d'interférer dans l'activation du facteur de transcription NFκB puissent être actifs dans l'inhibition de la protéolyse musculaire induite par PIF. En effet, l'acide eicosapentanoïque, acide gras polyinsaturé, a la capacité de protéger le muscle d'une protéolyse en freinant l'expression des protéines de la voie protéolytique ubiquitine-protéasome dépendante (Whitehouse *et al.*, 2001). De plus, il freine la translocation nucléaire de NFκB ainsi que la dégradation de son inhibiteur IκB (Whitehouse *et al.*, 2003).

1.4.1.3. Le Lipid Mobilizing Factor (LMF)

LMF est un facteur tumoral cachectique qui stimule la lipolyse du tissu adipeux chez l'hôte en stimulant la lipase hormono-sensible par un mécanisme impliquant l'AMPc, libérant des acides gras et du glycérol dans la circulation (Hirai *et al.*, 1998). Cette glycoprotéine de 43kDa a été mise en évidence dans des adénocarcinomes murins (MAC16) puis dans l'urine de patients cancéreux cachectiques grâce à une combinaison de chromatographie hydrophobe, d'échange d'ions et d'exclusion (Todorov *et al.*, 1998). Administré à des souris,

il induit une forte perte de poids et de masse grasse, sans effets sur la masse musculaire ou la prise alimentaire (Hirai et al 1998). Chez l'animal, LMF est présent en cas de transplantation d'une tumeur cachectisante (MAC 16) et absent en cas de tumeur non-cachexigénique (MAC13) (McDevitt *et al.*, 1995). De même chez l'homme, LMF est absent des urines de patients cancéreux non-cachectiques (Todorov *et al.*, 1998).

LMF est un homologue d'une protéine plasmatique, la zinc- α 2glycoprotéine (ZAG) (Todorov *et al.*, 1998). ZAG est également sécrétée par les cellules épithéliales du foie, du sein, du tractus gastro-intestinal, des glandes sudoripares (Tada *et al.*, 1991, Bao *et al.*, 2005), mais sa fonction n'est pas connue. LMF et ZAG sont identiques du point de vue de leurs séquences d'acides aminés, de leurs mobilités électrophorétiques et de leurs immunoréactivités (Todorov *et al.*, 1998, Hirai *et al.*, 1998).

La présence de LMF circulant dans l'organisme de l'hôte aurait comme autre conséquence d'atténuer l'effet anti-prolifératif des agents anti-tumoraux, limitant ainsi la réponse du patient à la chimiothérapie (Sanders *et al.*, 2004). L'étude de Double et Bibby supporte cette hypothèse puisqu'ils observent une chimiosensibilité des cellules issues de tumeur MAC13 (qui ne produisent pas de LMF), et une chimiorésistance de celles issues de tumeur MAC16 (qui produisent du LMF) (Double et Bibby, 1989). De plus, chez l'homme, le niveau d'activité lipolytique plasmatique est significativement réduit chez des patients cancéreux qui répondent favorablement à la chimiothérapie contrairement aux patients qui présentent une résistance au traitement (Beck *et al.*, 1990). Le taux de LMF semble positivement corrélé à l'importance de la perte de poids, tant que celle-ci n'excède pas 20% chez l'homme et 16% chez l'animal, seuils au-delà desquels le niveau de LMF chute (Groundwater *et al.*, 1990).

Lorsque LMF est injecté à des souris, en plus d'induire une fonte de la masse adipeuse, il provoque dans le muscle squelettique, une augmentation de l'expression d'ARNm de la protéine découplante UCP2 (Bing *et al.*, 2002). Chez les souris MAC16, modèle murin de cachexie cancéreuse, l'expression de l'ARNm la protéine découplante UCP3 est augmentée de 163 % (Bing *et al.*, 2000). Chez le rat Yoshida AH130, autre modèle de cachexie cancéreuse, l'expression des ARNm des UCP2 et 3 est respectivement doublée et triplée en parallèle au doublement du taux d'acides gras circulants (Busquets *et al.*, 2001). L'inhibition de cette hyperlipidémie réduit le niveau d'UCP3. De même chez des patients atteints de cancer gastro-intestinaux et en perte de poids, l'expression de l'ARNm de UCP3 est augmentée (Collins *et al.*, 2002). Ces observations supportent l'idée que les UCP, en générant une perte d'énergie, pourraient participer au mécanisme qui conduit à la fonte tissulaire en cas de cachexie cancéreuse.

1.4.2. Réponses de l'hôte

1.4.2.1. Troubles du métabolisme glucidique

Chez le patient cachectique, les troubles du métabolisme glucidique sont de deux ordres : une augmentation du turn-over du glucose et une altération de l'utilisation du glucose.

De nombreuses études ont mis en évidence que les tissus tumoraux utilisent préférentiellement le glucose comme source d'énergie et dépendent principalement des voies glycolytiques pour leur fourniture énergétique (Weinhouse, 1973 ; Holroyde *et al.*, 1975).

Le fort taux de glycolyse anaérobie au sein de la tumeur libère de grandes quantités de lactate. Ce dernier retourne au foie où son utilisation est augmentée en vue d'une forte néoglucogenèse (Tayek, 1992). Elle peut, chez des patients cancéreux en perte de poids être augmentée de 40% (Tisdale, 2000 ; Inui, 2002). La synthèse hépatique de glucose à partir du lactate consomme de l'ATP et n'est pas énergétiquement rentable. En effet, la glycolyse ne produit que deux molécules d'ATP alors que six sont nécessaires pour transformer du lactate en glucose. Tout ce processus décrit un cycle futile, le cycle de Cori et pourrait représenter une dépense énergétique de près de 300 kcal par jour (Eden *et al.*, 1984). Ce cycle pourrait donc participer à augmenter la dépense énergétique de repos du patient (Inui, 2002). En somme, une importante perte d'énergie est générée par la transformation de lactate en glucose et par la forte consommation de glucose par la tumeur.

La résistance à l'insuline observée chez les patients cachectiques se manifeste de différentes façons. Comme mentionné précédemment, au niveau hépatique cela se traduit par une augmentation du turn-over du glucose via une forte néoglucogenèse (Argilès et Lopez-Soriano, 1999). En périphérie, la capacité du muscle squelettique à capter le glucose est diminuée aussi bien à jeun qu'après un repas. De plus la transformation de glucose en glycogène est limitée (Argilès et Lopez-Soriano *et al.*, 1999).

1.4.2.2. Troubles du métabolisme lipidique

Chez l'homme, le tissu adipeux représente une réserve de molécules à haute valeur énergétique. Chez l'adulte, il représente 90% des réserves énergétiques, réserves susceptibles d'être utilisées dès que la demande métabolique est augmentée (Tisdale, 1993-b).

Lors d'une cachexie avancée, la fonte du tissu adipeux est fréquemment observée (Fearon et Preston, 1990). L'étude de la composition corporelle de patients atteints de cancers pulmonaires en soins palliatifs révèle que lorsque la perte de poids est de 30%, la masse adipeuse de ces patients est réduite de 85% (Fearon, 1992 ; Fouladiun *et al.*, 2005). Cependant, ce processus est déjà initié aux stades précoces lorsque la tumeur est d'un volume réduit.

Au cours de la cachexie, on observe une augmentation de la mobilisation des lipides, une augmentation du turn-over du glycérol et des acides gras (Shaw et Wolfe, 1987). L'oxydation des acides gras est également élevée (Hansell *et al.*, 1986-a ; Fearon et Moses, 2002 ; Tisdale, 2005). En effet, l'action du LMF sur le tissu adipeux conduit à une forte lipolyse, une triglycérémie et un flux important d'acides gras dans la circulation (Hirai *et al.*, 1998). D'autre part, sous l'action des cytokines pro-inflammatoires, il s'opère une diminution de la lipogenèse due à une chute de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) (Tisdale, 2000). L'inhibition de la LPL freine la captation d'acides gras plasmatiques par les adipocytes, limitant la reconstitution de réserves (Fearon, 1992). La réduction d'activité de la LPL est corrélée à l'intensité de la perte de poids et, chez ces patients cachectiques, est indépendante du niveau d'insuline (Vlassara *et al.*, 1986 ; Younes et Noguchi, 2000). Chez l'animal, la résection de la tumeur permet de restaurer une activité de la LPL (Noguchi *et al.*, 1991 ; Younes *et al.*, 1990) ce qui n'est pas le cas chez l'homme (Yoshikawa *et al.*, 1994 ; Younes et Noguchi, 2000).

1.4.2.3. Troubles du métabolisme protéique

Au cours de la cachexie, le turn-over global des protéines est augmenté suite à une élévation aussi bien des synthèses que des dégradations (Norton *et al.*, 1981). Le coût énergétique de cette altération métabolique est estimé à 100 kcal par jour (Fearon et Moses, 2002). Au niveau du muscle, la synthèse protéique est réduite et la protéolyse exacerbée (Baracos, 2000) alors

qu'au niveau du foie, la synthèse est décuplée suite à la forte production de protéines inflammatoires tels que la CRP ou le fibrinogène (Warren *et al.*, 1985 ; Dworzak *et al.*, 1998). Il en découle une perte de muscle dont le retentissement est lourd puisqu'elle réduit l'espérance de vie, le fonctionnement des muscles respiratoires et locomoteurs (Inagaki *et al.*, 1974). Bien que l'injection chez l'animal de facteurs cachectiques tels que le PIF (Lorite *et al.*, 1997) ou de cytokines comme le TNF- α (Garcia-Martinez *et al.*, 1993) induise une chute de la synthèse protéique au niveau du muscle squelettique, les mécanismes impliqués ne sont pas encore connus. Les aminés branchés capables de stimuler la synthèse protéique musculaire ont un taux plasmatique réduit au cours de la cachexie (Tisdale, 2005). La synthèse protéique musculaire serait réduite de 45% chez des patients atteints de cachexie cancéreuse comparés à des témoins sains (Rennie *et al.*, 1983 ; Tisdale, 2001-b).

En revanche, les mécanismes impliqués dans la protéolyse sont plus évidents. En effet, la dégradation de protéine peut se faire selon trois voies différentes : La voie lysosomale, la voie calcium dépendante impliquant les calpaïnes et la voie ATP-ubiquitine protéasome dépendante. Cette dernière est la plus importante au cours de la protéolyse musculaire induite par la cachexie cancéreuse (Attaix *et al.*, 1998 ; Bossola *et al.*, 2003). Sous l'action des cytokines et des facteurs tumoraux, l'expression d'ubiquitine et des sous unités du protéasome est accrue (Lecker *et al.*, 1999). Cette dégradation massive de protéines conduit à des modifications des taux d'acides aminés circulants (Muscaritoli *et al.*, 1996 ; Kubota *et al.*, 1992 ; Kurzer *et al.*, 1988). Par conséquent, en modifiant la disponibilité de ces composés, cette protéolyse altère différentes voies métaboliques telle que la synthèse de neuropeptides (Ramos *et al.*, 2005). De ce fait, le tryptophane, précurseur de la sérotonine, voit son taux circulant augmenter. Il en découle une anorexie, conséquence de l'inhibition par la sérotonine du neuropeptide Y (NPY) et de la voie de signalisation orexigénique au niveau de l'hypothalamus (Meguid *et al.*, 1992 ; Inui, 2002).

De façon physiologique, au cours du jeûne, le glucose consommé par le cerveau est substitué par les corps cétoniques. Ceci conduit à une chute de l'utilisation d'acides aminés pour la néoglucogenèse hépatique et donc une préservation de la masse musculaire. Au cours de la cachexie cancéreuse, le muscle n'est plus épargné par une telle régulation et représente une source d'acides aminés pour la néoglucogenèse et la synthèse de protéines de l'inflammation (Inui, 2002). Il en découle un bilan azoté constamment négatif et des anomalies de l'acido-gramme plasmatique.

1.4.2.4. L'inflammation chronique

L'état inflammatoire systémique est très fréquent chez les patients cancéreux cachectiques comme dans les modèles animaux de cachexie (Falconer *et al.*, 1995 ; Baracos, 2006). Cet état est caractérisé par une forte production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ (Argiles *et al.*, 2003-a) et un taux élevé de CRP et de fibrinogène (Skipworth *et al.*, 2007). Il s'agit d'un facteur indépendant aggravant le pronostic puisqu'il est associé à une perte de poids accentuée et une espérance de vie réduite et ce, aussi bien pour des cancers pancréatiques, pulmonaires ou gastro-oesophagiens (Falconer *et al.*, 1995 ; Forrest *et al.*, 2004 ; Deans *et al.*, 2004).

La présence d'un taux élevé de CRP est associée à une perte de poids sévère chez le patient cancéreux (McMillan *et al.*, 1998). Bien que le nombre d'études concernant le niveau de fibrinogène des patients cancéreux soit plus rare, son augmentation est elle aussi associée à un mauvais pronostic (Macdonald, 2007 ; Pavey *et al.*, 2001). D'autre part, les concentrations plasmatiques de protéines négatives de la phase inflammatoire telles que l'albumine, la transferrine et la préalbumine sont réduites. Cependant, chez des patients cachectiques, le taux de synthèse de l'albumine est identique à celui de patients sains (Fearon *et al.*, 1998). Ceci indique que la chute de sa concentration résulterait d'un autre mécanisme, tel qu'un transfert accru du secteur vasculaire vers les fluides interstitiels plutôt que d'une chute de sa synthèse (Skipworth *et al.*, 2007).

Le mécanisme précis reliant l'état inflammatoire et la perte de poids est encore à l'étude. Comme nous l'avons vu précédemment, les cytokines pro-inflammatoires sont connues pour agir sur certaines enzymes comme la LPL au niveau du tissu adipeux et favoriser un déséquilibre entre synthèse et dégradation de la masse grasse. Toutefois, l'inhibition de la LPL n'explique pas à elle seule la fonte du tissu adipeux. D'autres cytokines comme le TNF- α sont connues pour stimuler la lipolyse (Zhang *et al.*, 2002) et probablement la thermogénèse par activation de l'expression des protéines UCP2 et UCP3 dans le muscle (Busquets *et al.*, 1998 ; Masaki *et al.*, 1999). D'une façon générale, le niveau de TNF- α corrèle positivement avec la dépense énergétique de repos (Elborn *et al.*, 1993 ; Nguyen *et al.*, 1999).

Cet état inflammatoire contribue à la fonte musculaire en mobilisant les acides aminés pour la néoglucogénèse et la synthèse de protéines inflammatoires (Inui, 2002). La synthèse de protéines structurales hépatiques est réduite de 30% face à une production de protéines inflammatoire accrue (Fearon *et al.*, 1991). De surcroît, la fonte musculaire est aggravée par

la différence de composition en acides aminés entre protéines inflammatoires synthétisées dans le foie et celles dégradées dans le muscle (Reeds *et al.*, 1994). Le besoin en acides aminés aromatiques (Tryptophane, tyrosine, phénylalanine) au niveau du foie mobilise une quantité de protéines musculaires disproportionnée.

L'injection de TNF- α chez le rat induit une élévation de la protéolyse musculaire et une chute de la protéosynthèse (Garcia-Martinez *et al.*, 1993). De plus, le traitement de rats cachectiques porteurs de tumeurs Yoshida AH-130 par un inhibiteur du TNF- α (pentoxifylline) freine la fonte musculaire et limite la protéolyse ATP-ubiquitine protéasome dépendante (Costelli *et al.*, 2002). L'état inflammatoire semble contribuer à redéfinir les priorités du métabolisme des protéines et ainsi favoriser la fonte du tissu musculaire (Preston *et al.*, 1998).

L'état inflammatoire chronique est d'autant plus préjudiciable que les apports alimentaires sont réduits. En effet, les cytokines peuvent limiter la prise alimentaire en bloquant les voies orexigéniques et en stimulant les voies anorexigéniques via la corticotropin-releasing-hormon (CRH) (Meguid *et al.*, 1992 ; Inui, 2002). Elles ont ainsi une action qui mime celle de la leptine. Cependant, lors de la cachexie cancéreuse, chez l'homme comme chez l'animal, le niveau de leptine est réduit (Simons *et al.*, 1997 ; López-Soriano *et al.*, 1999). Plus encore, les cytokines sont capables de freiner les mécanismes de vidange et de mobilité gastrique et ainsi altèrent la satiété.

L'état inflammatoire est activé par des cytokines proinflammatoires ce qui laisse à supposer que ces cytokines ont un rôle important dans l'établissement de la cachexie cancéreuse. L'activité d'IL-6 est positivement corrélée au niveau plasmatique de CRP (Deans et Wigmore, 2005). Chez l'animal, l'injection d'IL-6 peut effectivement induire un état inflammatoire systémique mais ceci sans impliquer une perte de poids (Espat *et al.*, 1996). L'implantation d'une tumeur cachectisante, l'adénocarcinome colon-26 chez des souris induit une hausse du taux d'IL-6 circulant ainsi qu'une cachexie dont les effets sont réversibles par injection d'anticorps monoclonaux anti IL-6 (Strassmann *et al.*, 1992). Par contre, l'implantation du variant clonal non-cachectisant de cette tumeur induit lui aussi une augmentation du taux de IL-6 (Fujimoto-Ouchi *et al.*, 1995). De même, les anticorps monoclonaux anti-IFN- γ permettent de freiner la fonte tissulaire chez des souris cachectiques porteuses de carcinomes pulmonaires de Lewis (Matthys *et al.*, 1991). L'injection épisodique de TNF- α chez l'animal provoque une cachexie passagère suivie d'une résistance à cette cytokine avant une normalisation de la prise alimentaire et du poids (Argilès *et al.*, 2005). Ceci laisse à penser que la cachexie s'installe en relation avec l'état inflammatoire puisqu'à lui seul ce dernier ne peut reproduire toutes les caractéristiques de la cachexie.

La nature des cytokines impliquées dans le développement de la cachexie semble varier selon le type tumoral. Elles agissent très probablement en synergie les unes avec les autres en activant d'autres cytokines ou facteurs responsables de l'induction de la cachexie. Quoiqu'il en soit les cytokines impliquées sont aussi bien celles de la tumeur que celles de l'hôte.

En effet, l'état inflammatoire résulte d'une interaction entre tissus tumoraux et lymphocytes de l'hôte (McKechnie *et al.*, 2004 ; Duffield, 2003, Dalglish et O'Byrne, 2002) créant un micro-environnement qui favorise la croissance tumorale (O'Byrne et Dalglish, 2001 ; Sharma *et al.*, 2003). L'initiation de l'état inflammatoire au niveau du foie se ferait par l'intermédiaire de cellules mononucléaires tumorales par un mécanisme impliquant l'IL-6 (O'Riordain *et al.*, 1999). La voie de transduction du signal implique, au sein de la tumeur, l'activation de monocytes qui, en passant dans la circulation sanguine peuvent libérer des cytokines aux niveaux des différents organes cibles (Wigmore *et al.*, 2002-a). D'autre part, le facteur tumoral associé à la cachexie, PIF, en activant le facteur de transcription nucléaire NFκB, stimule la production de cytokines pro-inflammatoires IL-8, IL-6, et de CRP tout en freinant la production de transferrine (Watchorn *et al.*, 2001). En fonction du phénotype de la tumeur il en découlerait une inflammation systémique ou pas.

L'inflammation est une conséquence fréquente du cancer mais l'effet de cette inflammation sur l'hôte est probablement lié à la capacité de l'hôte à gérer cette inflammation. Au sein de patients atteints de cancer du pancréas, Barber *et al.* ont observé une relation entre l'espérance de vie et un polymorphisme du gène d'une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-1β (Barber *et al.*, 1999-b). Cette étude s'intéressait aux cytokines pro-inflammatoires uniquement mais il est probable que l'étude des cytokines anti-inflammatoires révélerait des relations analogues.

L'inflammation chronique chez les patients cachectiques est aussi à l'origine de la résistance des patients aux traitements anticancéreux. Cette résistance implique la capacité de l'organisme à prendre en charge ces molécules. La superfamille du cytochrome P450 représente une voie importante de dégradation de molécules exogènes dont les médicaments. Ce sont des mono-oxygénases, exprimées dans différents organes et particulièrement dans le foie. CYP3A4 est l'isoenzyme majoritaire de cette famille. L'état inflammatoire chronique inhibe le système enzymatique du cytochrome P450 (Macdonald, 2007). L'inhibition du CYP3A4 limite la capacité à métaboliser plusieurs classes d'agents chimiothérapeutiques et donc augmente leur toxicité (Slaviero *et al.*, 2003).

En participant à l'établissement de troubles métaboliques au cours de la cachexie, l'état d'inflammation chronique, via les cytokines participe à l'altération de l'équilibre énergétique de l'hôte. Effectivement, en augmentant le turn-over glucidique, protéique et lipidique, en

stimulant des voies cataboliques et des cycles futiles tel que le cycle de Cori ou l'activité des UCP2 et UCP3 (Busquets *et al.*, 1998), cet état contribue très probablement à une redéfinition des priorités énergétiques de l'organisme (Argilès et Lopez-Soriano, 1999).

1.4.2.5. Mitochondrie et état inflammatoire

La production systémique de cytokines au cours de l'inflammation s'accompagne de dysfonctionnements mitochondriaux qui pourraient expliquer les dommages causés aux tissus. Zang *et al.* observent que l'augmentation de la production de cytokines au cours de l'inflammation coïncide avec l'altération de la membrane externe mitochondriale, la libération de cytochrome-c et une chute de l'activité de la superoxyde dismutase et glutathion peroxydase (Zang *et al.*, 2007). Ainsi l'état inflammatoire favorise le stress oxydatif et limite les défenses anti-radicaux libres oxygénés (ROS) (Zang *et al.*, 2007 ; Noble *et al.*, 2007). Boulos *et al.* montrent qu'en présence de sérum issu de personnes en état inflammatoire systémique, la consommation en oxygène de mitochondries issues de cellules endothéliales est diminuée de 39% et la quantité d'ATP cellulaire réduite de 51% (Boulos *et al.*, 2003). Dans cette étude, l'ajout d'inhibiteur de la NO-synthase (NOS) permet de restaurer partiellement le niveau respiratoire mitochondrial, laissant penser que l'oxyde nitrique (NO) jouerait un rôle important dans l'inhibition de la respiration mitochondriale.

En effet, comme décrit dans la revue de Brown (Brown, 2001-a), le NO produit au cours de la réaction inflammatoire inhibe la chaîne respiratoire au niveau du complexe cytochrome oxydase en se liant à son site de fixation pour l'oxygène. Ainsi, en rentrant en compétition avec l'oxygène le NO affecte la respiration et la production d'ATP. Cette inhibition induite par un faible niveau de NO est réversible contrairement à celle induite par des dérivés du NO tel que le peroxytnitrite (ONOO-), formés lorsque le niveau de NO est plus élevé (Brown, 2001-a). D'après Boveris *et al.*, l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale au cours de l'état inflammatoire serait due à une production excessive de NO par la NOS mitochondriale induisant une inhibition irréversible des complexes NADH-ubiquinone réductase et ubiquinone cytochrome-c reductase et une inhibition réversible du complexe cytochrome oxydase (Boveris *et al.*, 2002).

Hunter *et al.* décrivent que l'inflammation induite par injection de lipopolysaccharide (LPS) à des rats induit une chute de la respiration mitochondriale à l'état III et provoque un stress mitochondrial (Hunter *et al.*, 2007). Là encore l'utilisation d'anti-inflammatoires permet de

restaurer partiellement les fonctions de la mitochondrie. En plus d'observer la même chute de consommation en oxygène à l'état III, Crouser *et al.* notent une augmentation de la respiration à l'état IV, ce qui reflète un découplage de la phosphorylation oxydative (Crouser *et al.*, 2002). Cependant, l'équipe de Callahan *et al.* ne note aucune altération de l'état IV ou de découplage malgré une chute de la respiration à l'état III (Callahan *et al.*, 2001). Si l'on considère un découplage induit par les protéines découplantes, les études réalisées fournissent les résultats suivants : l'injection de TNF- α chez le rat induit une augmentation de l'expression des ARNm UCP2 et UCP3 (+ 242% et + 113% respectivement) dans le muscle squelettique (Busquet *et al.*, 1998). Chez la souris, l'injection du facteur tumoral lipolytique LMF induit également une augmentation de l'expression des ARNm UCP2 (+146%) dans le même tissu (Bing *et al.*, 2002). Dans ces deux études les animaux témoins sont nourris à volonté. L'inflammation et les facteurs cachectiques tumoraux seraient donc en capacité d'induire un découplage mitochondrial. Chez le rat porteur d'hépatome ascitique Yoshida AH-130, modèle de cachexie cancéreuse, le niveau d'expression des ARNm des UCP2 et UCP3 est respectivement multiplié par deux et par trois au sein du muscle squelettique (Busquets *et al.*, 2001).

Dans un autre modèle de cachexie cancéreuse, la souris MAC16, les niveaux d'expression des ARNm UCP2 et d'UCP3 sont augmentés par rapport à ceux d'animaux contrôles nourris à volonté mais inchangés par rapport aux animaux pair-fed (Bing *et al.*, 2000). Dans cette étude les auteurs penchent en faveur d'un effet de la chute de la prise alimentaire sur l'expression des UCP plutôt qu'un effet de la cachexie ou de l'inflammation. L'équipe de Sanchis *et al.* font les mêmes observations sur le rat Yoshida AH-130 (Sanchis *et al.*, 1998). Néanmoins, chez la souris porteuse de carcinome pulmonaire de Lewis (souris LLC) où la cachexie se développe sans altérer la prise alimentaire des animaux, les niveaux d'expression des UCP2 et UCP3 sont augmentés dans le muscle (Busquets *et al.*, 2005-b). Les auteurs concluent que cette stimulation aurait pour rôle de lutter contre le stress oxydant et de limiter la production de ROS en découplant la chaîne respiratoire mitochondriale.

Chez l'homme, au cours de la cachexie due à des cancers gastro-intestinaux, Collins *et al.* observent une augmentation de l'expression des ARNm d'UCP3 chez les patients cachectiques en comparaison à des patients cancéreux non cachectiques et aux témoins sains (Collins *et al.*, 2002). Aucun effet sur UCP2 n'est observé. Enfin, au cours de la cachexie, Dejong *et al.* n'observent aucun effet de l'état inflammatoire sur l'expression d'UCP2 ou UCP3 chez des patients atteints de cancers pancréatiques comparés à des patients non cancéreux (Dejong *et al.* 2005). Ainsi, un découplage induit par des UCP lors de la réaction

inflammatoire semble net lorsqu'il s'agit de modèles d'animaux auxquels sont injectés des facteurs inflammatoires ou cachectiques. Toutefois, lorsqu'il s'agit de modèle de cachexie ou de patients cachectiques, les résultats ne sont pas unanimes. De nouvelles études sont à envisager afin de clarifier le rôle des UCP dans le découplage en situations inflammatoires.

Selon Uyemura *et al.*, l'état inflammatoire induirait dans un premier temps un changement de conformation de la F₀F₁-ATPase afin de maintenir le potentiel de phosphorylation face à un découplage des fonctions mitochondriales. Dans un second temps ils observent une chute de l'affinité de la F₀F₁-ATPase pour l'ADP, ce qui induit une chute de l'efficacité de phosphorylation (Uyemura *et al.*, 1996). Ainsi dans le muscle squelettique, le processus inflammatoire serait responsable d'une élévation du taux de phosphate inorganique (Kaminsky *et al.*, 1992). La production de ROS et de NO au cours de l'inflammation serait la cause de dysfonctionnements mitochondriaux et notamment de la chute du potentiel de membrane mitochondriales (Noble *et al.*, 2007).

Simonson *et al.* montrent que la chute des capacités oxydatives mitochondriales est due à une altération de la fourniture en oxygène à la mitochondrie et à une perte de fonction du cytochrome aa3, le dernier élément de la chaîne respiratoire mitochondriale (Simonson *et al.*, 1994). Cette équipe met en évidence dans le muscle squelettique, au cours de sepsis, des altérations de l'ultrastructure mitochondriale telles qu'une dégradation et une réorganisation progressive des deux membranes mitochondriales et une réduction de la densité de la matrice mitochondriale (Welty-Wolf *et al.*, 1996).

L'effet de l'inflammation sur le métabolisme mitochondrial est évident, cependant, l'impact de la cachexie cancéreuse et ses multiples facteurs sur la mitochondrie restent à éclaircir.

1.4.2.6. Dépense énergétique, cancer et cachexie cancéreuse

Chez l'homme, la dépense énergétique totale est constituée de la dépense énergétique de repos (DER) et de la thermogenèse induite par la prise alimentaire et par l'activité physique. La DER est le déterminant majeur de la dépense énergétique totale et représente près de 70% de celle-ci chez le sujet sain sédentaire. La DER correspond à la somme de la dépense énergétique de sommeil et de la dépense énergétique à l'éveil en état de repos (dépense

énergétique minimale d'une personne allongée, à l'éveil après une nuit à jeun). (Ravussin *et al.*, 1986 ; Ravussin et Bogardus, 1989).

La cachexie cancéreuse se manifeste avec de nombreuses perturbations métaboliques susceptibles de modifier la dépense énergétique globale de l'hôte. Ces changements sont différents de ceux observés au cours d'un jeûne et sont plus comparables à ceux rencontrés lors de traumatismes ou de sepsis (Cori et Cori, 1925). En effet, les patients cachectiques continuent à perdre du poids même lorsqu'une supplémentation alimentaire est mise en place afin de leur fournir les apports caloriques nécessaires (Bosaeus *et al.*, 2001 ; Herber *et al.*, 1992).

Il est admis que la cachexie cancéreuse induit une élévation de la DER lorsque l'on compare des patients cachectiques à des sujets contrôles (Hyltander *et al.*, 1991 ; Lindmark *et al.*, 1984). Cette augmentation de DER qui intervient en même temps qu'une diminution des apports alimentaires est une caractéristique qui différencie la cachexie cancéreuse du jeûne. Effectivement, chez le sujet sain à jeun, la DER est diminuée (Brennan, 1977). Toutefois, de nombreuses investigations mettent en évidence des mesures de DER de patients cachectiques cancéreux fluctuant autour de la normale, révélant des statuts tantôt hypométaboliques (Dempsey *et al.*, 1984 ; Bosaeus *et al.*, 2001), normométaboliques (Knox *et al.*, 1983 ; Nixon *et al.*, 1988 ; DeJong *et al.*, 2005) ou hypermétaboliques (Lindmark *et al.*, 1984 ; Arbeit *et al.*, 1984 ; Hyltander *et al.*, 1991 ; Moses *et al.*, 2004).

Lorsque la DER est estimée grâce à une équation de prédiction, dans la majorité des études ce sont les équations de Harris et Benedict (Harris et Benedict, 1918) qui sont utilisées.

Selon le type et le volume tumoral on note des différences de DER absolues fluctuant autour des valeurs prédites (Knox *et al.*, 1983 ; Dempsey *et al.*, 1984). Il est communément observé une augmentation de la DER chez des patients cachectiques atteints de cancer du poumon (Staal-van den Brekel *et al.*, 1997 ; Fredrix *et al.*, 1991) ou du pancréas (Falconer *et al.*, 1994). En revanche, les cancers gastriques et colorectaux auraient moins d'effet sur la DER (Fredrix *et al.*, 1991-b ; Dempsey *et al.*, 1984).

Cependant, la comparaison de DER brute ne prend pas en compte la variation de poids ni la variation de composition corporelle. La masse maigre est métaboliquement plus active que la masse grasse. Pour cette raison, de nombreux auteurs rapportent la DER à la masse maigre des patients. Néanmoins des variations de résultats persistent. Hansel *et al.* ont comparé la DER de patients cachectiques atteints de cancers pulmonaires à celle de patients cachectiques

atteints de cancers gastriques ou colorectaux (Hansell *et al.*, 1986-b). Bien que le groupe de patients atteints de cancers pulmonaires semblait avoir une DER absolue supérieure à celle des autres groupes, après ajustement par la masse maigre, les différences entre ces trois groupes s'estompent. Cependant, malgré un ajustement de la DER à la masse maigre Fredrix *et al.* notent une DER supérieure chez des patients atteints de cancers pulmonaires comparés à des patients atteints de cancers gastriques et colorectaux (Fredrix *et al.*, 1991-b). Dans ces deux études, les groupes de patients sont similaires, cependant, Hansell *et al.* évaluent la masse maigre par une méthode de dilution isotopique alors que Fredrix *et al.* utilisent une technique d'impédancemétrie.

Des études menées afin d'examiner la relation entre DER, masse maigre et masse grasse des patients révèlent que 60 à 85% de la variation de la DER peuvent être expliqués par des variations de masse maigre (Cunningham, 1991). Selon Nelson *et al.*, la masse grasse n'explique qu'une faible partie de la variation de DER restante (Nelson *et al.*, 1992).

Chez l'animal, les résultats sont aussi variés. Chez la souris cachectique porteuse du sarcome MGC 101, Lindmark *et al.* observent une DER augmentée de 20% par rapport aux souris contrôles pair-fed mais diminuée lorsque comparée à la DER des souris contrôles nourries à volonté (Lindmark *et al.*, 1983). Cette étude permet d'observer l'effet de la tumeur sur la DER indépendamment de la prise alimentaire tout en soulevant la question du choix des groupes contrôles. En effet la majorité des études comparent des patients cachectiques cancéreux à des patients sains ou à une valeur de DER théorique, sans inclure de groupes de patients cancéreux non cachectiques ou de groupes témoins en perte de poids.

Ravasco *et al.* montrent que chez des patients cachectiques atteints de cancers colorectaux la DER augmente avec la progression de la maladie et l'histologie de la tumeur (les tumeurs indifférenciées étant plus hypermétabolisantes) (Ravasco *et al.*, 2007). Ils notent chez ces patients que la contribution à la variation de la DER est pour 25% due au stade de la maladie, pour 25% à l'histologie de la tumeur, pour 3% à la prise alimentaire et pour 4 % due à la perte de poids. Les différences de DER induites par le stade de la maladie ne sont nettes que lorsque l'on compare des stades initiaux (I et II) à des stades plus avancés (III et IV). Effectivement, dans leurs études concernant uniquement des stades initiaux, Fredrix *et al.* écartent l'influence du stade de la maladie sur la DER (Fredrix *et al.*, 1991-b ; Fredrix *et al.*, 1991-c) alors que Ravasco *et al.* comparent des stades I et II à des stades III et IV (Ravasco *et al.*, 2007). Arbeit *et al.* mettent en évidence chez des patients cancéreux une chute de la DER

après l'exérèse de la tumeur (Arbeit *et al.*, 1984) ce qui supporte l'idée que la tumeur impose ses priorités énergétiques à l'hôte.

Un hyper métabolisme chronique peut contribuer à un déséquilibre de la balance énergétique et conduire à une fonte tissulaire si les apports alimentaires ne sont pas ajustés ou pire, s'ils sont diminués. Chez le patient cachectique cancéreux, compte tenu du fait que la DER peut être diminuée, normale ou augmentée malgré une perte de poids nette (Dempsey *et al.*, 1984), la contribution de la DER à la perte de poids n'est pas aussi directe.

Dans les études réalisées sur la cachexie cancéreuse, la prise alimentaire semble être peu ou pas impliquée dans la perte de poids bien que les mécanismes de régulation de cette prise alimentaire en regard de la balance énergétique soient altérés (Bosaeus *et al.*, 2002 ; Fouladiun *et al.*, 2005). Toutefois, bien que les patients cachectiques puissent maintenir une prise alimentaire comparable à celle précédant la maladie, celle-ci ne correspond probablement plus aux besoins énergétiques de l'état cachectique. Néanmoins, les troubles métaboliques associés à ce syndrome tels que l'état inflammatoire, l'augmentation du turn-over protéique, lipidique et glucidique sont probablement en relation plus directe avec la perte de poids que la DER (Tisdale, 2005). Dans leur étude, Fearon *et al.* comparent des patients cancéreux cachectiques et non cachectiques (Fearon *et al.*, 1988). Ils observent une DER identique pour ces deux groupes bien que le turn-over protéique des patients cachectiques soit 70% supérieur à celui des patients non cachectiques. Selon l'étude de Gibney *et al.*, les patients cachectiques atteints de cancers pulmonaires bien qu'ayant une DER élevée, ont une dépense énergétique totale (DET) diminuée suite à la réduction de leur activité physique (Gibney *et al.*, 1997). La dépense énergétique liée à l'activité physique (DEAP) est variable puisqu'elle peut représenter 5% de la DET au repos lors d'un alitement (Goran *et al.*, 1994) et jusqu'à 75% chez un athlète (Sjodin *et al.*, 1994). Après la DER, la DEAP représente la seconde composante principale de la DET. Ainsi les patients cachectiques tendraient à limiter leur déséquilibre énergétique en réduisant leur DEAP. Moses *et al.* font la même observation sur des patients cachectiques atteints de cancers pancréatiques (Moses *et al.*, 2004). Selon les résultats de Gibney *et al.* et Moses *et al.*, il semble que la DET soit réduite au cours de la maladie, principalement due à une chute de la DEAP. Ainsi, la DEAP serait un régulateur de la DET dans ces conditions pathologiques et sa chute serait d'amplitude plus grande que l'augmentation de DER observée. Selon Toth *et al.*, dans ces conditions, il est peu probable que la DER soit responsable de la perte de poids (Toth, 1999). Ainsi, au cours de la cachexie cancéreuse, certains troubles métaboliques impliqueraient un coût énergétique supplémentaire

en parallèle d'autres mécanismes dont le coût énergétique serait diminué, la résultante n'étant pas nécessairement une augmentation des dépenses énergétiques totales.

Malgré une hétérogénéité sur plan méthodologique et/ou expérimental (types de cancers, groupes témoins, techniques de mesure) ces différentes études mettent en évidence des anomalies du métabolisme énergétique des patients cachectiques cancéreux. Il est important de noter que la cachexie cancéreuse lorsqu'elle se manifeste ne s'accompagne pas systématiquement d'une augmentation de la DER.

1.4.2.7. Leptine et ghréline

La leptine

La leptine est une hormone qui informe le cerveau du statut des réserves énergétiques de l'organisme, ce qui permet de réguler la prise alimentaire, l'utilisation des substrats, l'équilibre énergétique ainsi que le système endocrine (Friedman et Halaas, 1998 ; Machado *et al.*, 2004). Elle joue un rôle important dans les régulations induites par un jeûne. Chez le sujet sain, la perte de poids s'accompagne d'une chute du taux de leptine, chute proportionnelle à la perte de masse grasse (Inui, 2002). Un taux faible de leptine au niveau du cerveau induit une augmentation de la voie orexigénique de l'hypothalamus, ce qui stimule la prise alimentaire, réduit la dépense énergétique et freine la voie anorexigénique (Flier, 1998 ; Inui 1999-a). La leptine fait partie de la famille des cytokines et serait un facteur pro-inflammatoire (Dixit *et al.*, 2004). Chez la souris, sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires, le niveau de leptine plasmatique est augmenté ainsi que son expression au niveau du tissu adipeux (Lugarini *et al.*, 2005). Cependant, au cours de la cachexie cancéreuse, notamment lors de cancers pulmonaires, malgré un état inflammatoire chronique, le taux de leptine circulant chute (Aleman *et al.*, 2002). Cette observation a été faite pour différents sites tumoraux (Simons *et al.*, 1997 ; Brown, 2001-b ; Wallace *et al.*, 1998 ; Mantovani *et al.*, 2000). Selon plusieurs auteurs, les cytokines pro-inflammatoires induiraient une inhibition durable de la prise alimentaire en simulant un signal normalement transmis par la leptine à l'hypothalamus et par conséquent en empêcheraient la mise en place de mécanismes de régulation face à une chute de la prise alimentaire et du poids (Inui, 1999-b ; Wigmore *et al.*, 1997 ; Inui, 1999-c). Pour cette raison, la perte de poids observée au cours de la cachexie cancéreuse diffère de celle observée au cours d'une restriction alimentaire.

Chez les patients atteints de cancer et en stades avancés, ce taux de leptine semble en rapport avec la masse grasse (Somasundar *et al.*, 2004). Chez les modèles animaux de cachexie cancéreuse, les concentrations de leptine circulante dans le plasma et dans le tissu adipeux sont réduites dès le quatrième jour après implantation de la tumeur (Machado *et al.*, 2004). Au niveau du tissu adipeux cette chute serait due à l'action du TNF- α . Chez la souris cachectique (tumeur MAC 16) la production de leptine est réduite alors que les récepteurs hypothalamiques de la leptine et l'expression de neuropeptide-Y sont accrus en réponse à la chute de la masse grasse (Bing *et al.*, 2001).

La ghréline

La ghréline est un polypeptide de 28 acides aminés synthétisé principalement au niveau de l'estomac. Elle est considérée comme l'une des seules hormones orexigènes et agit en antagoniste de l'effet de la leptine sur la prise alimentaire en activant la voie du neuropeptide-Y (Inui, 2001). Elle réduit l'oxydation des graisses et favorise les dépôts adipeux (Plata-Salaman, 2000). Le taux de ghréline endogène est maximum avant chaque repas et chute dans l'heure suivant la prise alimentaire ce qui renforce l'hypothèse que cette hormone stimule la faim. Les taux plasmatiques de ghréline sont inversement proportionnels à l'indice de masse corporelle et augmente lors d'une perte de poids induite par restriction calorique (Neary *et al.*, 2004). Des études récentes montrent une augmentation du niveau de ghréline chez des patients cancéreux cachectiques (Garcia *et al.*, 2005 ; Shimizu *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que l'augmentation du niveau de ghréline serait due à la cachexie et pourrait représenter un mécanisme compensatoire mis en place face à un déséquilibre entre anabolisme et catabolisme (Hanada *et al.*, 2004). Cependant, cette augmentation semble plus faible que celle observée dans des cas non pathologiques. En effet, malgré une augmentation du taux de ghréline endogène, les patients cachectiques présentent une résistance à l'effet orexigénique de cette hormone ce qui se traduit par une prise alimentaire inchangée et une perte de poids (Zigman et Elmquist, 2003). Néanmoins il semble que cette résistance à la ghréline observée chez les patients cachectiques ne soit que partielle puisqu'une administration massive de ghréline exogène à ces patients permet une stimulation de la prise alimentaire (Neary *et al.*, 2004 ; Garcia *et al.*, 2005). Les cytokines produites au cours de l'état inflammatoire chronique de la cachexie cancéreuse ont un effet opposé à celui de la ghréline et selon Asakawa *et al.*, elles pourraient directement inhiber la production de ghréline (Asakawa *et al.*, 2001).

1.5. Le muscle squelettique et la cachexie cancéreuse

Au cours d'une restriction calorique, les protéines musculaires sont dégradées afin de fournir des acides aminés qui alimenteront la néoglucogenèse. Pendant un jeûne prolongé, la protéolyse est freinée afin de maintenir l'équilibre azoté et la masse maigre corporelle. Cette capacité à maintenir la balance azotée lorsque les apports alimentaires sont limités, est altérée chez le patient cancéreux cachectique conduisant à une perte de la masse protéique. Au cours de ce syndrome, le muscle squelettique qui représente près de 50% de la masse protéique corporelle est sévèrement affecté. En effet, la fonte musculaire est l'une des caractéristiques principales de la cachexie cancéreuse et résulte d'une dégradation protéique accrue associée à une synthèse réduite (Costelli et Baccino, 2003).

Lors de la cachexie cancéreuse, la protéolyse musculaire dépend 1) de l'activation des protéases calcium-dépendantes (les calpaïnes) essentielles pour l'initiation de la dégradation des protéines myofibrillaires et 2) de l'hyperactivation de la voie de dégradation ATP-ubiquitine protéasome dépendante (Costelli et Baccino, 2003 ; Costelli *et al.*, 2001).

Dans ce deuxième processus, les protéines cibles sont marquées (ubiquitinées) puis adressées et dégradées par un complexe catalytique. Le mécanisme de marquage ou ubiquitination des protéines à dégrader met en œuvre trois systèmes enzymatiques : des enzymes E1 activatrices (E1 ubiquitin activating enzyme), des enzymes E2 de conjugaison (E2 ubiquitin conjugating enzyme) et des enzymes E3 de ligation (E3 ubiquitin ligating enzyme). Les protéines marquées sont ensuite dégradées par le protéasome 26S (Costelli et Baccino, 2003). Au cours de la cachexie cancéreuse, l'expression et l'activité de cette machinerie sont augmentées dans le muscle squelettique (Bossola *et al.*, 2001 ; Bossola *et al.*, 2003). Dans ce processus de dégradation, deux ligases (E3 ubiquitin ligating enzyme) semblent jouer un rôle important dans l'initiation de la protéolyse et le développement de la cachexie (Gordon *et al.*, 2005) : elles sont respectivement codées par les gènes MuRF1 (muscle ring finger1) et MAFbx (muscle atrophy F-box) (Bodine *et al.*, 2001 ; Gomes *et al.*, 2001). Gomes *et al.* observent une surexpression de MAFbx au sein du muscle squelettique de rats cachectiques (Gomes *et al.*, 2001). Lecker *et al.* mettent en évidence une augmentation de l'expression de MuRF-1 au sein du muscle squelettique murin au cours de la cachexie cancéreuse (Lecker *et al.*, 2004).

Le « myogenic regulator factor » MyoD est un facteur de transcription spécifique du muscle squelettique impliqué dans la myogenèse (Guttridge *et al.*, 2000). Il permet d'activer le programme de régénération musculaire mis en place après une agression du muscle. Dans des

modèles murins de cachexie cancéreuse, Costelli *et al.* mettent en évidence une chute de l'expression de ce facteur, ce qui laisse à croire qu'il serait impliqué dans le déséquilibre de la masse musculaire (Costelli *et al.*, 2005). Tintignac *et al.* ont démontré que la protéine de MAFbx interagit directement avec Myo-D et induit son ubiquitination et sa dégradation via le protéasome (Tintignac *et al.*, 2005). De surcroît les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ pourraient contribuer au mécanisme de dégradation de Myo-D (Bossola *et al.*, 2007). Les mécanismes contribuant au déséquilibre de la masse de muscle squelettique au cours de la cachexie cancéreuse sont multiples. Des études sont encore nécessaires afin d'intégrer les différents processus qui conduisent à la fonte de ce tissu chez le patient cachectique cancéreux.

1.6. La fonction énergétique mitochondriale

L'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire des eucaryotes aérobies est fournie par l'oxydation des nutriments. Cette oxydation, réalisée au sein des mitochondries par l'oxygène, fournit une énergie qui est stockée sous forme d'ATP. La synthèse d'ATP par phosphorylation d'ADP, principalement réalisée au niveau des mitochondries, consomme de l'oxygène et est donc assimilée à une respiration. Il s'agit de la phosphorylation oxydative ou oxydation phosphorylante (OXPHOS). Ces réactions OXPHOS ont lieu au niveau des membranes internes mitochondriales, au sein des chaînes respiratoires.

La mitochondrie est le siège de la respiration. Elle comporte une double membrane : membrane externe et membrane interne séparées par l'espace inter-membranaire. A l'intérieur de la membrane interne est un compartiment soluble appelé matrice. Les enzymes impliquées dans cette respiration font partie de la chaîne respiratoire. Elles sont situées dans la membrane interne mitochondriale (figure 2). La phosphorylation oxydative consiste en plusieurs réactions d'oxydoréduction, depuis des donneurs d'électrons, les coenzymes réduits (NADH, principalement et FADH₂) fournis par l'oxydation de combustibles cellulaires (glucides, acides gras, acides aminés) jusqu'à l'oxygène, accepteur final. Il se crée donc un flux d'électrons grâce aux quatre complexes de la chaîne respiratoire (le complexe I : NADH déshydrogénase, le complexe II : la succinate déshydrogénase, le complexe III : cytochrome c réductase, le complexe IV : la cytochrome c oxydase) et aux accepteurs d'électrons

(l'ubiquinone ou coenzyme Q et le cytochrome c (Cyt c)). A ce transfert d'électrons est couplé un transport de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Ce transfert est assuré par les complexes I, III et IV. Il s'ensuit la formation d'un gradient de protons (ΔpH) entre les deux compartiments ainsi qu'une différence de potentiel ($\Delta \Psi$) entre la matrice et l'espace inter-membranaire. La résultante de ces deux éléments constitue une force proton motrice (Δp). En permettant le retour de protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale la F₀-F₁ ATPase utilise cette force pour phosphoryler des molécules d'ADP pour fournir de l'ATP. L'ATP ainsi formé est exporté vers le cytoplasme grâce à un antiport, une translocase de nucléotides adényliques (ANT). Le mécanisme de couplage de la respiration et de la synthèse d'ATP a été décrit par Mitchell dès 1961 (Mitchell, 1961).

Le couplage entre le transfert d'électrons, le transfert de protons, la formation d'ATP définit une stoechiométrie qui permet d'évaluer le rendement énergétique mitochondrial. En effet la conversion de coenzymes réduits en molécules d'ATP avec consommation d'oxygène, se fait avec un rendement qu'il est possible d'évaluer. Il s'agit d'un rendement de conversion énergétique. Lors des réactions de phosphorylation oxydative, une partie de l'énergie est perdue sous forme de chaleur, ce qui affecte ce rendement. Cette perte d'énergie sous forme de chaleur (thermogenèse) peut être variable selon le statut métabolique de la cellule. De plus, en fonction des besoins énergétiques cellulaires, la mitochondrie peut moduler sa capacité à fournir de l'ATP en modulant la stoechiométrie des réactions OXPHOS. L'efficacité de couplage des réactions OXPHOS conditionne donc le rendement mitochondrial.

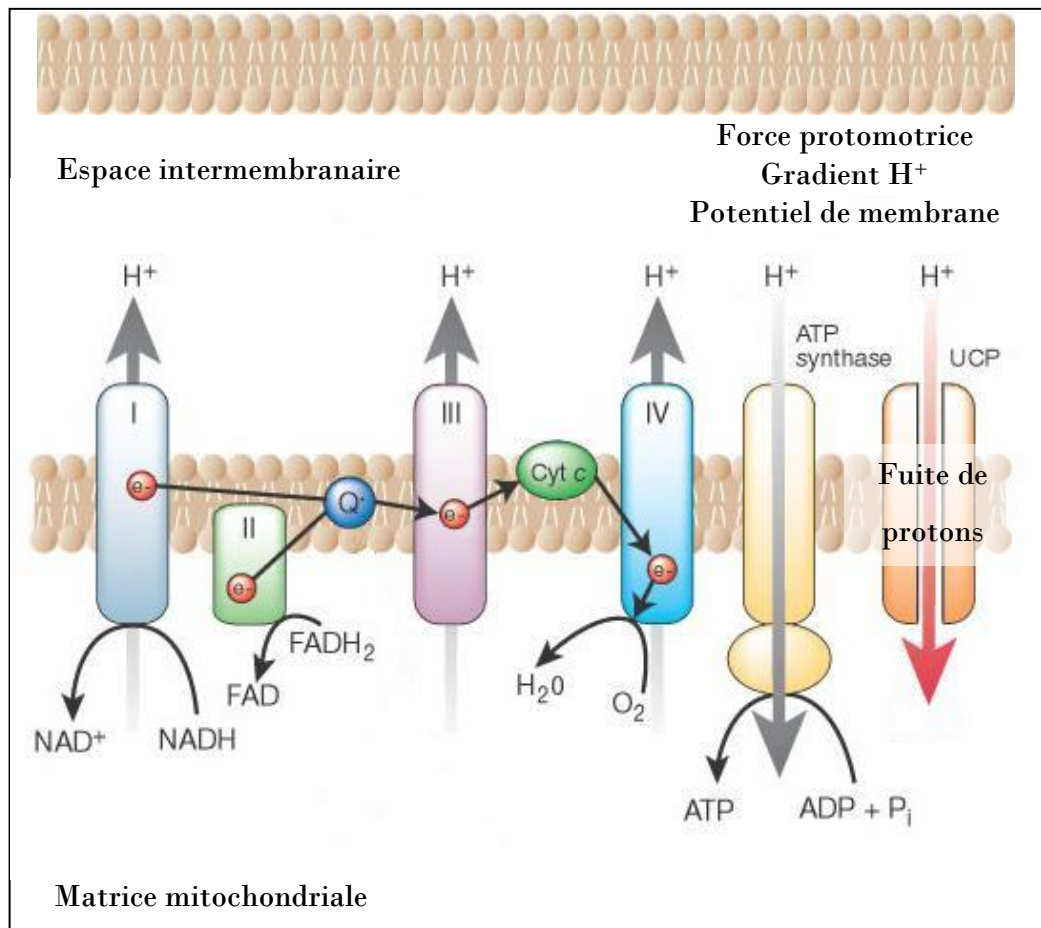


Figure 2. La chaîne respiratoire mitochondriale. (Issue de Brownlee, 2001)

1.6.1. Régulation du rendement de conversion énergétique mitochondriale

Lors de l'oxydation de substrats, l'efficacité mitochondriale est évaluée en calculant le rendement de conversion énergétique c'est-à-dire, le nombre de molécules d'ATP produites par atome d'oxygène consommé lors des réactions OXPHOS. Il s'agit du rapport ATP/O. Sachant que la plupart des réactions biochimiques ont une consommation en ATP fixe, la valeur du rapport ATP/O détermine donc la quantité d'oxygène nécessaire à ces processus. Une modification de ce rapport a donc une conséquence sur les mécanismes qui produisent ou consomment l'ATP et l'oxygène.

Selon la théorie chimiosmotique (Mitchell, 1961), le rapport ATP/O est dépendant de :

- la stoechiométrie reliant le nombre de protons pompés depuis la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire et le nombre de paires d'électrons transférées d'un donneur vers un accepteur d'électrons. Il s'agit du rapport $H^+/2e^-$ relatif à la formation de la force protomotrice. Ce rapport est équivalent au rapport entre le nombre de protons pompés par atome d'oxygène consommé (H^+/O) puisqu'un atome d'oxygène reçoit une paire d'électrons.
- le nombre de protons transférés vers la matrice via la F0-F1 ATPase par molécule d'ADP phosphorylée. Il s'agit du rapport H^+/ATP relatif à l'utilisation de la force protomotrice.

Ainsi le rapport ATP/O est fonction des réactions qui contribuent à générer la force protomotrice et celles qui la consomment (Brand, 1994 ; Hinkle, 2005). Chacune de ces réactions met en jeu des pompes assurant le transfert de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Pour cette raison, toute modification de l'efficacité de ces pompes à protons est susceptible d'affecter le rapport ATP/O. Il s'agit d'un découplage intrinsèque de la phosphorylation oxydative.

Bien que la membrane interne mitochondriale ne soit pas perméable aux protons, cette imperméabilité n'est pas parfaite, permettant le retour d'une faible quantité de protons de l'espace inter-membranaire vers l'espace matriciel. Cette fuite de protons est dite « basale » en opposition à la fuite de protons inductible qui met en œuvre des protéines spécifiques pour le transfert de protons, des protéines découplantes.

En déstabilisant le couplage entre les réactions d'oxydation et celles de phosphorylation, ces deux types de fuites de protons affectent le rendement de conversion énergétique. Il s'agit d'un découplage extrinsèque de la phosphorylation oxydative.

1.6.2. Mitochondrie et perte de poids

Une proportion importante de la respiration n'est pas couplée à la production d'ATP.

Lors des différentes réactions d'oxydoréduction, une partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur. Il s'agit de la thermogénèse et représente un coût énergétique. La dépense énergétique est un élément important de la régulation du poids corporel. En effet, le poids est fonction de la différence entre les apports et les dépenses énergétiques. Une faible

thermogenèse s'accompagne d'une prise de poids. Différentes situations physiologiques ou physiopathologiques s'accompagnent de modification de l'équilibre énergétique (exercice physique, jeûne, infection, exposition au froid). Au niveau mitochondrial, une perte de poids suite à une restriction calorique induit une chute de la respiration mitochondriale musculaire (Hansen-Smith *et al.*, 1977 ; Ardawi *et al.*, 1989 ; Lal *et al.*, 2001; Madapallimattam *et al.*, 2002) ainsi qu'une augmentation de l'expression et de la quantité de protéines découplantes.

1.7. La fonction mitochondriale et la cachexie cancéreuse

Les premières observations d'altérations mitochondriales de cellules cancéreuses ont été faites par Otto Warburg selon qui au cours de la transformation tumorale s'opèrerait une augmentation du taux de glycolyse et une chute concomitante de la fonction mitochondriale : l'effet Warburg (Warburg, 1956). Cependant le rôle de la mitochondrie dans le mécanisme de transformation tumorale n'est pas encore élucidé. En se basant sur cette hypothèse, la fonction mitochondriale de cellules cancéreuses a fait l'objet de nombreuses études. Récemment, Wu *et al.* ont observé cette corrélation entre l'augmentation de l'activité glycolytique et la chute des capacités de phosphorylation oxydative de mitochondries de cellules cancéreuses (Wu *et al.*, 2007). Lichtor et Dohrmann ont montré des altérations « substrat-spécifiques » de la consommation en oxygène à l'état III des mitochondries issues de cellules tumorales (Lichtor et Dohrmann, 1986). Boitier *et al.* font les mêmes observations pour les complexes I et III et concluent par un effet inhibiteur des ROS sur la chaîne respiratoire mitochondriale (Boitier *et al.*, 1995). Globalement, la cellule s'orienterait vers une production d'énergie en anaérobie et tendrait à limiter ses fonctions mitochondriales (Perumal *et al.*, 2005 ; Wu *et al.*, 2007).

Toutefois, chez l'homme, rares sont les études qui se sont intéressées au cours du cancer à l'impact de la cachexie sur la fonction mitochondriale de cellules non-tumorales du muscle squelettique. Quelle est l'influence de l'état cachectique sur la fonction mitochondriale des cellules musculaires de l'hôte ? Quelques études sur l'animal se sont penchées sur la question et concernent principalement le foie.

Au cours de la cachexie chez le rat porteur de tumeurs mammaires, Perumal *et al.* notent une diminution de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire, notamment une chute de l'activité des complexes I, II et IV dans les mitochondries de foie (Perumal *et al.*, 2005). Il en découlerait une altération de l'oxydation des substrats, une réduction du transfert des coenzymes réduits et une chute de la synthèse d'ATP favorisant la cachexie. A l'inverse, dans le modèle de cachexie du rat Walker 256, Greene et Haven mettent en évidence une augmentation de l'activité cytochrome oxydase dans les mitochondries de foie proportionnelle à la taille tumorale (Greene et Haven, 1957 ; Greene, 1960). Cependant, cette variation n'est significative que lorsque la tumeur représente 30% du poids total de l'animal ce qui semble exagéré et met en doute toute interprétation de l'effet d'une cachexie sur la chaîne respiratoire (Greene et Haven, 1957). Ils n'observent aucun effet de la cachexie cancéreuse sur le découplage de la chaîne respiratoire (Greene, 1960).

Dans le muscle squelettique de souris cachectiques porteuses de sarcome MCA (tumeur primaire induite par injection de methyl-cholanthrène), les activités respiratoires des complexes II-III et du complexe IV sont réduites (Ushmorov *et al.*, 1999). Les auteurs émettent l'hypothèse que cette chute pourrait expliquer l'augmentation de l'activité glycolytique du muscle et de sa production de lactate au cours du catabolisme. Chez le rat Walker 256, Cummings *et al.* observent une chute de la respiration à l'état III dans des mitochondries de muscle squelettique, de foie et de rein (Cummings *et al.*, 1984). Ils notent également une dépendance de cette respiration pour la concentration en magnésium du milieu respiratoire pour le foie et le rein. Selon eux, un déficit en magnésium dans ces tissus inhiberait la chaîne respiratoire en altérant l'imperméabilité des membranes mitochondriales (Cummings *et al.*, 1984).

Schneeberger *et al.* décrivent chez le rat cachectique (rat MCA), une augmentation du rapport de concentrations phosphate inorganique/ATP ou $[Pi]/[ATP]$ dans les cellules du foie et ce, en comparaison avec des rats pair-fed et des rats nourris à volonté (Schneeberger *et al.*, 1989). Ce rapport augmentait significativement avec la masse tumorale aussi bien dans le foie que dans le muscle squelettique avant même que la prise alimentaire ne chute. Ils en concluent qu'au cours de la cachexie cancéreuse, la déplétion énergétique au sein de ces deux tissus intervient indépendamment de la prise alimentaire et que celle-ci n'est pas responsable de la variation du rapport $[Pi]/[ATP]$ puisqu'il est inchangé chez les rats pair-fed (Schneeberger *et al.*, 1989). La restriction que subissent ces rats n'était pas suffisante pour affecter le rapport $[Pi]/[ATP]$. En effet, Cunningham *et al.* décrivent que le $[Pi]/[ATP]$ est augmenté de 58% chez le rat après un jeûne de 48 heures (Cunningham *et al.*, 1986). Dans ce même modèle de cachexie cancéreuse,

l'équipe de Tsuburaya remarque une chute du contenu en ATP dans les cellules hépatiques, ce qui confirme l'hypothèse de déplétion énergétique de Schneeberger *et al.* (Tsuburaya *et al.*, 1995). De même, l'équipe de Morozkina décrit chez le rat porteur de tumeur Walker une chute du contenu en ATP des mitochondries de cellules hépatiques (Morozkina et Shapot, 1976). Selon eux, cette chute serait due 1) à une réduction de la synthèse d'ATP liée à un découplage de la chaîne respiratoire, 2) à une augmentation de la dégradation d'ATP en ADP due à une augmentation de l'activité ATPase (Morozkina et Shapot, 1976).

La mort cellulaire induite au niveau mitochondrial par apoptose au cours de la cachexie a fait également l'objet de quelques études. Dans des lymphocytes issus de rats cachectiques (Rats Walker 256), de Lima *et al.* constatent une dépolarisation des membranes mitochondriales et une forte apoptose pouvant expliquer la chute du système immunitaire chez ces animaux (de Lima *et al.*, 2005). Au sein du muscle squelettique de rats cachectiques Yoshida AH-130 et la souris LLC (Lewis Lung Carcinoma), Van Royen *et al.* constatent une augmentation de l'apoptose (Van Royen *et al.*, 2000). Smith et Tisdale démontrent que le facteur tumoral PIF est capable d'induire l'apoptose in vitro (Smith et Tisdale, 2003). Plus récemment, Busquets *et al.* observent chez l'homme un fort niveau d'apoptose dans le muscle squelettique de patients cachectiques atteints de cancers gastro-intestinaux (Busquets *et al.*, 2007).

Ainsi, il semble qu'au cours de la cachexie cancéreuse, les cellules non-tumorales de l'hôte soient l'objet de modification de la fonction mitochondriale. Les résultats portent principalement sur les cellules hépatiques de modèles murins. A notre connaissance, aucune étude ne porte sur l'étude du métabolisme mitochondrial du muscle squelettique, chez l'homme au cours de la cachexie cancéreuse.

2. Restriction calorique et métabolisme énergétique mitochondrial

2.1. Article 1

Influence of intensity of food restriction on skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in rats. Gyasi Johnson, Damien Roussel, Jean-François Dumas, Olivier Douay, Yves Malthiery, Gilles Simard, Patrick Ritz. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Sep;291(3):E460-7.

La cachexie cancéreuse est caractérisée par une perte de poids progressive accompagnée de nombreux troubles métaboliques (Tisdale, 2002). L'anorexie est souvent associée à ce syndrome. Elle est variable selon la localisation tumorale et peut aussi résulter de nombreux facteurs. Selon le type de cancer, l'étude de Tchekmedyian *et al.*, estime qu'elle est présente dans 30 à 75% des cas (Tchekmedyian, 1992). Bien que la réduction de prise alimentaire chez le patient cachectique ne puisse pas expliquer à elle seule la perte de poids observée, elle peut, selon son intensité et sa durée avoir une incidence sur le métabolisme énergétique mitochondrial au niveau du muscle squelettique (Lal *et al.*, 2001 ; Bevilacqua *et al.*, 2004).

Dans le muscle squelettique, la restriction calorique a pour effet de réduire la consommation mitochondriale en oxygène (Hansen-Smith *et al.*, 1977 ; Ardawi *et al.*, 1989 ; Bevilacqua *et al.*, 2004). Elle semble agir en réduisant la fuite de protons au niveau des membranes mitochondriales et en limitant la production de radicaux libres (Bevilacqua *et al.*, 2005). Ceci aurait pour effet de limiter les dommages causés aux macromolécules de l'organisme. Cependant, le couplage des oxydations aux phosphorylations ne semble pas affecté (Madapallimattam *et al.*, 2002).

Les études concernant l'impact de la restriction calorique sur le métabolisme énergétique mitochondrial se placent dans la majorité des cas dans un contexte d'analyse des mécanismes liés au vieillissement. En effet, la restriction calorique s'avère être un moyen d'augmenter l'espérance de vie moyenne de nombreuses espèces (Simpson et Raubenheimer, 2007). Dans cette optique, ces études se penchent sur des périodes de restriction à moyen ou long terme. L'intensité des restrictions alimentaires appliquées aux groupes étudiés est souvent du même ordre c'est-à-dire d'environ 40 % de la consommation habituelle.

L'objectif de ce premier article était d'observer l'impact de la restriction alimentaire de courte durée (de l'ordre de quelques jours) sur la mitochondrie. En effet, les patients à inclure dans

l'étude sur la cachexie cancéreuse seraient susceptibles, lors de leur accueil, de présenter une restriction alimentaire de courte durée. Effectivement, la perspective de l'hospitalisation ainsi que les recommandations données aux patients pour leur entrée à l'hôpital laissait supposer qu'ils seraient, au moment de leur inclusion dans une phase de restriction alimentaire. Cette étude nous permettait aussi d'observer si les modifications de la fonction mitochondriale décrites à moyen et long terme lors d'études sur le vieillissement étaient manifestes à très court terme.

De plus, nous voulions évaluer l'influence de l'intensité de la restriction alimentaire sur le métabolisme énergétique mitochondrial du muscle squelettique.

Enfin, sachant que le muscle squelettique contient deux populations distinctes de mitochondries, les mitochondries subsarcolemmales et les mitochondries intermyofibrillaires il était important d'identifier si l'une des deux était principalement responsable des adaptations à observer.

Dans cette optique, nous avons réalisé cette étude sur un modèle murin, le rat Sprague-Dawley restreint alimentaires à intensité variable pendant trois jours. L'analyse portait sur les deux populations mitochondriales.

Résultats

Les résultats de ce premier article montrent que seule la restriction alimentaire de 50% induit un effet sur le métabolisme mitochondrial. Il s'agit d'une réduction de la consommation en oxygène en condition phosphorylante et découplée. Cet effet ne concerne que les mitochondries subsarcolemmales respirant avec du pyruvate comme substrat. De plus, toujours à 50% de restriction, les perméabilités membranaires des deux sous populations mitochondriales sont diminuées. Le couplage entre oxydations et phosphorylations n'est affecté à aucun degré de restriction et dans aucune population mitochondriale. Ces modifications ne trouvent pas d'explications dans des variations d'activités enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire. Il est cependant important de noter que cette adaptation mitochondriale se fait sans aucune variation de la masse musculaire.

Discussion

L'objectif de cet article était de déterminer l'effet d'une restriction calorique à très court terme sur la fonction mitochondriale dans le muscle. Bien que de nombreuses études se soient déjà penchées sur la question au long terme, les conditions que nous avons choisies n'avaient

pas encore été abordées. Cet article présente pour la première fois une restriction graduelle à très court terme sur deux populations mitochondriales musculaires. Dans ce sens, les informations qu'il apporte sont complémentaires de celles trouvées dans la littérature.

Les résultats de cette étude démontrent qu'une restriction à très court terme est dans la capacité d'induire une adaptation au niveau mitochondrial. Cependant, cette adaptation n'est significative qu'à 50% de restriction calorique. Elle concerne majoritairement la sous population la plus en contact avec le milieu environnant, les mitochondries subsarcolemmales. La perméabilité membranaire semble quant à elle régulée plus finement puisqu'elle est diminuée dans les deux populations. Ces résultats vont dans le sens des études précédentes qui observent une chute de la fonction mitochondriale sous l'effet d'une restriction calorique plus longue (Hansen-Smith *et al.*, 1977 ; Ardawi *et al.*, 1989 ; Lal *et al.*, 2001 ; Bevilacqua *et al.*, 2004).

L'adaptation mitochondriale mise en place n'est pas en corrélation avec l'intensité de la restriction comme nous aurions pu le croire. En effet, les modifications observées apparaissent dans une situation à mi-chemin entre restriction partielle et restriction totale. Ceci laisse envisager que dans ces deux situations, la mitochondrie met en œuvre des mécanismes de régulation bien distincts.

L'adaptation observée n'est cependant pas exclusive au muscle puisqu'elle est également observée dans le foie (Dumas *et al.*, 2004). Cependant, dans le foie elle met en jeu plus précocement la masse de l'organe. Ce mécanisme représente probablement un mode énergétique adapté par l'organisme entier visant à réduire la quantité d'oxygène consommée par unité de masse corporelle. En effet, les mesures de consommation en oxygène du corps entier montrent une chute de celle-ci par unité de masse ce qui semble correspondre à un gain en matière de rendement énergétique (Dulloo et Girardier, 1993 ; Gonzales-Pacheco *et al.*, 1993).

Selon Ramsey *et al.*, la fuite de protons serait le point central du mécanisme de retardement du vieillissement par la restriction calorique (Ramsey *et al.*, 2000). Cette restriction aurait comme effet de limiter la fuite de protons, la production mitochondriale de radicaux libres et le stress oxydant. Cette hypothèse est soutenue par différents résultats. En effet, la fuite de proton est inversement proportionnelle à l'espérance de vie et à la masse corporelle (Porter *et al.*, 1993) mais positivement corrélée avec les stress oxydatif (Sohal et Weindruch, 1996).

L'effet de la restriction alimentaire sur l'adaptation énergétique musculaire est fonction aussi bien de la durée que de l'intensité de cette restriction et les mécanismes mis en œuvre semblent différents selon ces conditions. Le métabolisme énergétique mitochondrial musculaire est finement ajusté très tôt au cours de la restriction calorique.

Pour la suite des travaux de cette thèse ces résultats représentent une étape préliminaire. Il est évident que ces résultats chez le rat ne sont pas transposables à l'homme. Néanmoins, ils sont indicatifs sur le fait que l'état nutritionnel et la prise alimentaire puissent être des éléments à prendre en compte dans l'évaluation du métabolisme énergétique mitochondrial. De plus, les situations « humaines » où une restriction d'environ 25% des apports alimentaires survient sont fréquentes. Celles où la restriction est plus intense sont moins fréquentes. Nous pouvons supposer qu'une réduction à 25 % affecte peu ou pas le métabolisme énergétique musculaire et risque peu d'interférer avec les résultats obtenus chez les patients atteints de cachexie cancéreuse.

Influence of intensity of food restriction on skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in rats

Gyasi Johnson, Damien Roussel, Jean-François Dumas, Olivier Douay, Yves Malthiery, Gilles Simard, and Patrick Ritz

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 694; Université d'Angers; and Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire Angers, Angers, France

Submitted 9 June 2005; accepted in final form 24 March 2006

Johnson, Gyasi, Damien Roussel, Jean-François Dumas, Olivier Douay, Yves Malthiery, Gilles Simard, and Patrick Ritz. Influence of intensity of food restriction on skeletal muscle mitochondrial energy metabolism in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E460–E467, 2006. First published April 18, 2006; doi:10.1152/ajpendo.00258.2005.—Variable durations of food restriction (FR; lasting weeks to years) and variable FR intensities are applied to animals in life span-prolonging studies. A reduction in mitochondrial proton leak is suggested as a putative mechanism linking such diet interventions and aging retardation. Early mechanisms of mitochondrial metabolic adaptation induced by FR remain unclear. We investigated the influence of different degrees of FR over 3 days on mitochondrial proton leak and mitochondrial energy metabolism in rat hindlimb skeletal muscle. Animals underwent 25, 50, and 75% and total FR compared with control rats. Proton leak kinetics and mitochondrial functions were investigated in two mitochondrial subpopulations, intermyofibrillar (IMF) and subsarcolemmal (SSM) mitochondria. Regardless of the degree of restriction, skeletal muscle mass was not affected by 3 days of FR. Mitochondrial basal proton conductance was significantly decreased in 50% restricted rats in both mitochondrial subpopulations (46 and 40% for IMF and SSM, respectively) but was unaffected in other groups compared with controls. State 3 and uncoupled state 3 respiration rates were decreased in SSM mitochondria only for 50% restricted rats when pyruvate + malate was used as substrate (−34.5 and −38.9% compared with controls, $P < 0.05$). IMF mitochondria respiratory rates remained unchanged. Three days of FR, particularly at 50% FR, were sufficient to lower mitochondria energetic metabolism in both mitochondrial populations. Our study highlights an early step in mitochondrial adaptation to FR and the influence of the severity of restriction on this adaptation. This step may be involved in an aging-retardation process.

proton leak; oxidative phosphorylation; mitochondria

AGING AND A NUMBER OF AGE-ASSOCIATED PATHOLOGIES such as Parkinson's disease and type 2 diabetes involve mitochondrial abnormalities (42). Although the precise mechanisms are unclear, mitochondria are thought to play an important role (38, 40). Given that ~90% of cellular oxygen consumption and the majority of reactive oxygen species (ROS) production in the cell takes place in the mitochondria (1), these organelles represent a highly exposed oxidative stress site. According to the oxidative stress theory of aging, the accumulation of free radical-induced macromolecule injuries in mitochondria and cells may lead to dysfunction and aging (17).

As far as Harman's free radicals theory of aging and diseases retardation is concerned, calorie restriction (CR) as a means of

delaying aging has been widely studied. CR interventions are known for extending mean and maximum life span of a wide range of species (19). Long-term CR (lasting months to years) has been used in animal models to investigate different aspects of aging (28). Hypotheses proposed to account for the life-prolonging effect of CR include a decrease in ROS production and limited oxidative stress in macromolecules (41, 3, 4, 25).

The mechanisms that reduce ROS production during CR are still debated. However, Ramsey et al. (31) have proposed that a decrease in mitochondrial proton leak or a lowered membrane potential that reduces resting oxygen consumption is a likely explanation. Indeed, proton leak increases with age in both intact hepatocytes (18) and skeletal muscle mitochondria (24), as does ROS production (40, 44). Furthermore, in skeletal muscle, a postmitotic tissue that is highly susceptible to oxidative damage (37), maximum leak-dependent respiration (state 4) is decreased by 40% CR in the short and medium term (2 wk, 2 mo, and 6 mo) (3) as well as in the long term (12 mo) (4) and by 33% CR at 23 mo (24). No study has evaluated the impact of CR on mitochondria metabolism over a duration shorter than 5 days. Similarly, most trials have been performed with ~40% food restriction (FR), and it is not known whether similar conclusions can be made at restrictions that are higher or lower than this.

In skeletal muscle, mitochondria form a reticulum, with compartmentalization into subsarcolemmal (SSM) and intermyofibrillar (IMF) populations. SSM mitochondria provide energy for membrane-related processes including signal transduction, ion exchanges, substrate transport, and activation. IMF mitochondria are more involved in muscle contraction. Both populations appear to be regulated differently (6, 11, 20, 21, 36).

The aim of the present study was to investigate the early effect of FR on skeletal muscle mitochondrial proton leak kinetics and mitochondrial functions. To identify the mitochondrial subpopulation responsible for the adaptive mechanism observed, we focused on both IMF and SSM mitochondria populations. Furthermore, we chose to submit animals to various levels of FR over the same period of time (3 days).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) except for Tris and Tris-HCl, which were purchased from Eurobio (Les Ulis, France), and nargare and KCN, which were purchased from Fluka (Saint Quentin

Address for reprint requests and other correspondence: P. Ritz, 4 rue Larrey, Médecine B, CHU, F-49033 Angers Cedex 01, France (e-mail: paritz@chu-angers.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Fallavier, France). Triphenylmethylphosphonium (TPMP) was purchased from Merck (VWR International, Strasbourg, France); BSA, NADH, and Triton X-100 were purchased from Roche-Boehringer (Meylan, France), and the bicinchoninic acid assay kit was purchased from Interchim (Montluçon, France).

Animals. Thirty male Sprague-Dawley rats, born and bred in our animal facility, were housed in individual cages at 12 wk of age (350–400 g) and maintained in a temperature-controlled room (22°C) with a 12:12-h dark-light cycle. Animals were provided with standard rat chow A04 (Scientific Animal Food and Engineering, Epinay-sur-Orge, France) consisting of 16% fish protein, 3% fat (0.4% fish and 99.6% vegetal), 60% carbohydrate (corn starch), 3.9% cellulose, 12% water, and 5.1% vitamins and minerals, and water was available ad libitum. The metabolizable energy content was 2.9 kcal/g. Rats were randomly separated into five groups of six rats as follows: control, 25% food restricted (FR), 50% FR, 75% FR, and 100% FR (fasted) groups. Control rats were fed ad libitum before and during the FR regimen. Baseline food intake [31 ± 4 g (mean $\pm$ SD)] was then measured to determine the amount of food required for restricted animals during the FR intervention phase. Rats were food restricted, receiving 75% (25% FR group), 50% (50% FR group), or 25% (75% FR group) of the total amount of food eaten by the control group. The fasted rats were totally deprived of feeding. The food restriction design was conducted over 3 full days. Rats were fed each day between 5:00 and 6:00 PM and killed on the morning of the fourth day. The present investigations were conducted in accordance with the guiding principles of the French Department of Animal and Environmental Protection for the care and use of laboratory animals and in accordance with the American Physiological Society "Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings."

Rat skeletal muscle mitochondria. IMF and SSM mitochondria were isolated from the quadriceps and gastrocnemius muscles as previously described (36). On the fourth day, the animals were killed by decapitation. For each rat, quadriceps and gastrocnemius muscle of each hindlimb was quickly removed, weighed, and immediately placed in an ice-cold isolation medium consisting of 100 mM sucrose, 50 mM KCl, 50 mM Tris, and 5 mM EGTA, pH 7.4. Muscles were minced with scissors and homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer (5 passages). The homogenate was centrifuged at 600 g for 10 min. The supernatant containing the SSM was centrifuged at 1,000 g for 10 min. The pellet containing most of the IMF was resuspended in 40 ml of isolation medium and treated with nagarse (1 mg/g muscle wet weight) for 5 min in an ice bath. The mixture was diluted 1:2, homogenized, and then centrifuged at 1,000 g for 10 min. The resulting supernatants were filtered through cheesecloth and centrifuged at 10,000 g for 10 min to obtain the IMF and SSM pellets. The pellets were washed by resuspension in the isolation medium and centrifuged at 10,000 g for 10 min. Finally, IMF and SSM pellets were stored in ice-cold isolation medium. Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid assay kit with bovine serum albumin used as a standard.

Mitochondrial respiration. Oxygen was measured using a Clark oxygen electrode (Oxytherm respirometer; Hansatech), in a 1.5-ml-volume glass cell, thermostatically controlled at 30°C, with constant stirring. Mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , and 3 mM HEPES, pH 7.4, supplemented with 0.3% (wt/vol) bovine serum albumin and saturated with room air. Substrate concentrations were 5 mM pyruvate + 2.5 mM malate and 40 μM palmitoyl-L-carnitine + 2.5 mM malate. The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 500 μM ADP. The basal nonphosphorylating respiration rate (state 4 oligomycin) was obtained by adding 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligomycin (6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ mitochondrial protein). The uncoupled state of respiration was initiated by the addition of 2 μM carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP).

Mitochondrial ATP synthesis. ADP-stimulated mitochondria ATP production rate was measured by exploiting a coupled enzyme system linked to NADPH production as previously described by Cairns et al. (10). The coupled enzyme detection system (1 mM glucose, 0.5 mM NADP, 1 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 0.9 IU/ml hexokinase) was then combined with 5 mM pyruvate + 2.5 mM malate, 40 μM palmitoyl-L-carnitine + 2.5 mM malate, and respiratory reaction medium, consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 2 mM MgCl_2 , 3 mM HEPES, pH 7.4, and 0.3% (wt/vol) bovine serum albumin. After the addition of 0.2 mg/ml isolated mitochondria, the rate of NADPH formation in response to 0.3 mM ADP was measured at 37°C at 340 nm with a spectrophotometer (Beckman DU-640B). Parallel measurements were made with 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oligomycin. The rate of ATP synthesis specifically from oxidative phosphorylation was then determined by subtracting the oligomycin-insensitive rate from the total rate. P/O represents the ratio of ATP synthesis after the addition of ADP to the oxygen consumption rate under the same conditions.

Mitochondrial enzyme activities. Activities of citrate synthase and the electron transport chain complexes (complexes I–IV) were measured spectrophotometrically (Beckman DU-640B) at 37°C in the muscle mitochondria suspensions through modified procedures of Malgat et al. (27) in agreement with the Mitochondrial Diseases group of the Association Française de Myopathie.

The activity of citrate synthase was measured in reaction medium consisting of 100 mM Tris-HCl, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), 1 mM oxaloacetate, 0.3 mM acetyl-CoA, and 4% Triton X-100, pH 8.1. After 3 min of incubation, the reaction was initiated by adding the biological material (10 μg of proteins for IMF and SSM suspensions), and the change in optical density at 412 nm was recorded over 1.5 min.

Complex I activity was measured in reaction medium containing 50 mM phosphate buffer, 3.75 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, and 0.1 mM decylubiquinone with or without 0.01 mM rotenone and biological material (20 μg of proteins for IMF and SSM suspensions). After 3 min of incubation at 37°C, the reaction was initiated by adding 0.1 mM NADH. The activity was measured at 340 nm by monitoring the oxidation of NADH.

The activity of succinate dehydrogenase (complex II) was measured after the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) in the presence of phenazine methosulfate (PMS) at 600 nm. Isolated mitochondria (3 μg of proteins for IMF and SSM suspensions) were preincubated in a buffer containing 50 mM KH_2PO_4 , 16 mM succinate, 1.5 mM KCN, and 100 μM PMS, pH 7.5 for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 103 μM DCPIP, and the optical density was recorded for 1.5 min.

The activity of ubiquinone-cytochrome *c* reductase (complex III) was determined by monitoring the reduction of cytochrome *c* at 550 nm. Biological materials (10 μg of proteins for IMF and SSM suspensions) were incubated for 30 s in a reaction medium consisting of 35 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 2.5 mg/ml bovine serum albumin, 1.8 mM KCN, 125 μM oxidized cytochrome *c*, 12.5 μM rotenone, and 62.5 mM EDTA, pH 7.5. The reaction was initiated by adding 80 μM decylubiquinol, and the optical density was measured over 3 min. The nonenzymatic reduction of cytochrome *c* was measured under the same conditions after the addition of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antimycin A. The specific activity of complex III was calculated by subtracting the activity of the nonenzymatic reaction from that of the total activity of complex III.

The activity of cytochrome-*c* oxidase (complex IV) was measured by monitoring the oxidation of reduced cytochrome *c* at 550 nm. A 50 μM solution of reduced cytochrome *c* (92–97% reduced using dithionite) in 10 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, was preincubated over 5 min. The reaction was initiated by adding the isolated mitochondria (2 μg of proteins for IMF and SSM suspensions), and the change in optical density was measured over 1.5 min.

Kinetic response of proton leak. Respiration rate and membrane potential were measured simultaneously by using electrodes sensitive

Table 1. Effect of 3 days of gradual food restriction on total body, muscle (gastrocnemius and quadriceps), and organ (heart, kidney, liver, spleen) weight

	Control Rats	Food-Restricted Rats			Fasted Rats	Correlation, <i>r</i>
		25%	50%	75%		
Food intake, g/day	31±4	23±3	16±2	8±1	0	-0.97†
Initial body weight, g	400±19	374±14	407±27	408±20	398±15	NS
Final body weight, g	419±21	371±14	383±27	373±20	338±15	-0.44*
Gastrocnemius, g	4.3±0.1	4.3±0.0	4.4±0.2	4.4±0.3	4.1±0.1	NS
Quadriceps, g	5.5±0.3	5.5±0.1	5.7±0.3	5.6±0.4	5.4±0.1	NS
Heart, g	1.3±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	NS
Kidney, g	2.7±0.1	2.6±0.1	2.6±0.2	2.6±0.1	2.3±0.1	NS
Liver, g	16.5±1.1	12.9±0.5	12.8±1.0	10.6±0.4	8.5±0.4	-0.82†
Liver, g/100 g body wt	3.9±0.1	3.5±0.1	3.3±0.1	2.9±0.1	2.5±0.0	-0.93†
Spleen, g	0.78±0.07	0.72±0.03	0.68±0.06	0.70±0.03	0.59±0.04	-0.44*
Spleen, g/100 g body wt	0.19±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01	0.19±0.01	0.17±0.01	NS

Values are expressed as means ± SE. **P* < 0.05; †*P* < 0.0001. NS, not significant.

to oxygen and to the potential-dependent probe TPMP⁺. IMF and SSM (0.5 mg protein/ml) were suspended in assay medium containing 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0.3% bovine serum albumin (wt/vol), and 3 mM HEPES, pH 7.4, and supplemented with 5 μM rotenone, 1 μg/ml oligomycin, and 80 ng/ml nigericin. The TPMP electrode was calibrated by sequential 0.5 μM additions up to 2 μM TPMP⁺, and 4 mM succinate was added to start the reaction. Respiration and membrane potential were progressively inhibited through successive steady states induced by the addition of malonate. After each run, 2 μM FCCP was added to dissipate the membrane potential and release all TPMP back into the medium for baseline correction. Membrane potentials were calculated as previously described by Brand et al. (7), assuming a TPMP binding correction of 0.35 (μl/mg protein)⁻¹ for skeletal muscle mitochondria (35). For the interpretation of these results, we will assume that no redox slip occurred in the mitochondrial electron transport chain under any of the experimental conditions that we examined, keeping in mind that if a slip in the proton pumps did occur, then although our results would remain valid, their underlying mechanism could be due in part to slip.

Statistical analysis. Results are expressed as means ± SE. The relation between the intensity of FR and weight loss (total body and organ weights) was compared using linear regression. For the other parameters measured, means were compared using a one-way ANOVA and the Dunnett post hoc test. A value of *P* ≤ 0.05 was considered significant in all cases. Analyses were performed using SPSS for Windows (version 13.0).

RESULTS

Body weight and tissue masses. The body weight of the rats did not differ between experimental groups at the beginning of treatment (Table 1). Whereas control rats gained weight (+4.7%), all restricted rats progressively lost weight as the intensity of FR increased. Indeed, weight changes were negatively correlated with the intensity of FR (slope = -0.19%, *R*² = 0.961). At any given percentage of FR, the gastrocnemius and quadriceps muscle weights and heart and kidney masses remained unchanged (Table 1). Liver mass and the liver-to-body weight ratio decreased linearly with the intensity of FR (slope = -0.073%, *R*² = 0.68 and slope = -0.014%, *R*² = 0.86 respectively), with a final loss of 49% (liver mass) and 36% (liver to weight ratio) in 3-day-fasted rats. The wet weight of spleen decreased in line with the intensity of FR (slope = -0.002%, *R*² = 0.19), reaching -24% in 3-day-fasted rats but remaining unaffected relative to body weight (g/100 g body wt).

Mitochondrial enzyme activities. The activity of cytochrome-*c* oxidase was significantly increased in SSM at 50–100% FR compared with control rats and reached a maximum in 50% FR rats (Table 2). All the other enzyme activities measured were not affected by FR in SSM or in any of the mitochondrial enzyme activities in IMF (Table 2).

Table 2. Effect of 3 days of gradual food restriction on IMF and SSM mitochondrial enzymatic activities

Enzyme activities	Control Rats	Food-Restricted Rats			Fasted Rats
		25%	50%	75%	
IMF					
Citrate synthase	1,220±179	1,603±264	1,452±285	1,333±333	1,724±211
NADH-ubiquinone reductase	555±69	778±26	606±130	596±68	808±128
Succinate dehydrogenase	206±15	255±33	242±26	218±36	205±41
Ubiquinone-cytochrome <i>c</i> reductase	1,240±181	1,568±268	1,200±158	1,135±252	1,525±86
Cytochrome- <i>c</i> oxidase	3,191±411	2,579±215	2,791±378	2,767±604	3,794±527
SSM					
Citrate synthase	2,402±87	1,948±247	2,619±178	2,547±244	2,357±55
NADH-ubiquinone reductase	766±114	536±88	652±16	722±170	710±74
Succinate dehydrogenase	404±18	378±40	432±47	388±39	321±56
Ubiquinone-cytochrome <i>c</i> reductase	1,888±103	1,818±105	2,016±288	2,153±151	1,932±107
Cytochrome- <i>c</i> oxidase	3,367±422	5,286±623	6,211±207*	6,086±785*	5,348±501*

Values are expressed as means ± SE; enzymatic activities are expressed as nmol·min⁻¹·mg protein⁻¹. IMF, intramyofibrillar; SSM, subsarcolemmal. **P* < 0.05 vs. control rats.

Table 3. Effect of 3 days of gradual food restriction on IMF mitochondria respiration rates with pyruvate/malate or palmitoyl-carnitine/malate as substrate

Respiratory Substrates	Control Rats	Food-Restricted Rats			Fasted Rats
		25%	50%	75%	
Pyruvate/malate					
State 3	220±42	274±20	185±41	267±37	280±28
State 4	22±4	28±2	28±3	32±2	28±2
State 3unc	250±43	335±47	224±61	321±60	303±27
RCR	9.8±1.2	9.7±0.2	6.6±1.1	8.6±1.3	10.0±0.6
Palmitoyl-carnitine/malate					
State 3	158±28	193±22	157±33	200±27	219±11
State 4	24±5	29±3	27±3	32±4	30±1
State 3unc	183±35	216±26	179±38	223±33	228±10
RCR	6.7±0.4	6.6±0.4	5.7±0.8	6.1±0.5	7.3±0.2

Values are expressed as means ± SE; respiration rates are expressed as nmol O₂·min⁻¹·mg protein⁻¹. State 3unc, uncoupled state 3 respiration; RCR, respiratory control ratio.

Mitochondrial oxidative and phosphorylation rates. Table 3 reports the respiratory parameters of IMF mitochondria isolated from skeletal muscles of control, FR, and fasted rats. Three days of FR (regardless of the intensity) did not affect the rates of oxygen consumption in IMF mitochondria respiring on either pyruvate + malate or palmitoyl-carnitine + malate. Compared with ad libitum feeding, 3 days of fasting increased the rate of ATP synthesis in IMF mitochondria respiring on either pyruvate + malate or palmitoyl-carnitine + malate (Table 4). In contrast, a lower intensity of FR did not modify the rate of ATP synthesis in this mitochondrial population regardless of the respiratory substrate used.

Three days of FR elicited significant changes in respiratory parameters of SSM mitochondria respiring on pyruvate + malate (Table 5). Both state 3 and uncoupled state 3 were significantly decreased compared with control values after 50% FR (−34.5 and −38.9%, respectively; $P < 0.05$). Furthermore, it appears that the phenomenon was present only at 50% FR. Neither state 4 nor the respiratory control ratio was affected by FR. SSM mitochondria oxygen consumption, with palmitoyl-carnitine + malate used as substrate, was not affected by 3 days of FR regardless of the intensity of the restriction applied.

Figure 1 shows the oxygen consumed by phosphorylative mitochondria to drive ATP synthesis or proton leakage across the mitochondrial membrane with succinate as respiratory substrate. Total rates of oxygen consumption under state 3 in the experimental groups were not significantly different compared with controls in both IMF and SSM. Furthermore, there was no significant effect of FR on the oxygen consumed to drive ATP synthesis ($\sim 83 \pm 2$ and $79 \pm 2\%$ of total state 3 respiration rate in IMF and SSM, respectively) or proton leakage ($\sim 17 \pm 2$ and $21 \pm 2\%$ of total state 3 respiration rate in IMF and SSM, respectively) in both IMF and SSM. Consequently, mitochondrial oxidative phosphorylation yield (P/

O), which represents the balance between the rates of ATP synthesis and proton leak, was not affected by FR irrespective of the mitochondrial population concerned (when data were combined, P/O was $\sim 1.24 \pm 0.02$ in IMF and 1.19 ± 0.03 in SSM).

Proton leak kinetics. Figure 2 shows the kinetics of proton leak in skeletal muscle mitochondrial subpopulations (IMF and SSM) respiring on succinate and isolated from control, FR, and fasted rats. At any membrane potential value, IMF from 50% FR rats displayed a lower rate of proton leak than control, 25% FR, 75% FR, and fasted groups. Basal proton conductance, calculated at 162 mV, the highest common membrane potential, was significantly decreased by 46% in IMF of 50% FR rats compared with corresponding control mitochondria (Fig. 2A). In contrast, basal proton conductance did not differ among the other three experimental groups (25% FR, 75% FR, and fasted groups) and the control group. Maximum leak-dependent respirations (state 4) of IMF mitochondria respiring on succinate were not significantly different when experimental groups were compared with controls.

At any membrane potential value, SSM from 50% FR rats displayed a lower rate of proton leak than control, 25% FR, 75% FR, and fasted groups. The basal proton conductance calculated at 162 mV was significantly decreased by 40% in 50% FR SSM mitochondria compared with controls (Fig. 2B). Basal proton conductance did not differ among the three experimental groups (25% FR, 75% FR, and fasted groups) and the control group. Maximum leak-dependent respirations (state 4) of SSM mitochondria respiring on succinate were not significantly different when experimental groups were compared with controls.

DISCUSSION

We demonstrated that very short-term FR was effective to trigger mitochondrial adaptive mechanisms in skeletal muscle.

Table 4. Effect of 3 days of gradual food restriction on IMF mitochondria ATP synthesis with pyruvate/malate or palmitoyl-carnitine/malate as substrate

Respiratory Substrates	Control Rats	Food-Restricted Rats			Fasted Rats
		25%	50%	75%	
Pyruvate/malate	126±12	166±16	127±17	140±19	234±15†
Palmitoyl-carnitine/malate	97±10	143±7*	126±12	126±18	171±10†

Values are expressed as means ± SE; rates of ATP synthesis are expressed as nmol ATP·min⁻¹·mg protein⁻¹. * $P < 0.05$; † $P < 0.01$ vs. control rats.

Table 5. Effect of 3 days of gradual food restriction on SSM mitochondria respiration rates with pyruvate/malate or palmitoyl-carnitine/malate used as substrate

Respiratory Substrates	Control Rats	Food-Restricted Rats			Fasted Rats
		25%	50%	75%	
Pyruvate/malate					
State 3	310±34	254±20	203±21*	327±44	255±11
State 4	44±7	36±3	33±2	42±5	39±5
State 3unc	367±22	283±25	224±17*	413±60	321±18
RCR	7.6±1.0	7.2±0.3	6.2±0.7	7.7±0.8	6.9±0.6
Palmitoyl-carnitine/malate					
State 3	163±12	150±10	126±10	195±22	152±10
State 4	34±1	31±2	29±2	35±3	32±2
State 3unc	201±14	178±8	159±11	240±29	186±12
RCR	4.8±0.4	4.9±0.4	4.5±0.6	5.5±0.3	4.9±0.5

Values are expressed as means ± SE; respiration rates are expressed as nmol O·min⁻¹·mg protein⁻¹. **P* < 0.05 vs. control rats.

Three days of FR was sufficient to 1) significantly decrease the proton leak rate in both skeletal muscle mitochondrial populations, 2) decrease the oxidative phosphorylation activity in SSM but not in IMF, and 3) specifically increase the oxidative

capacity of SSM as measured by the activity of cytochrome-*c* oxidase. Interestingly, we also observed that the degree of FR was a determining factor, because different adaptations were observed at different FR intensities, with most alterations occurring at 50% FR. Moreover, the two mitochondrial sub-

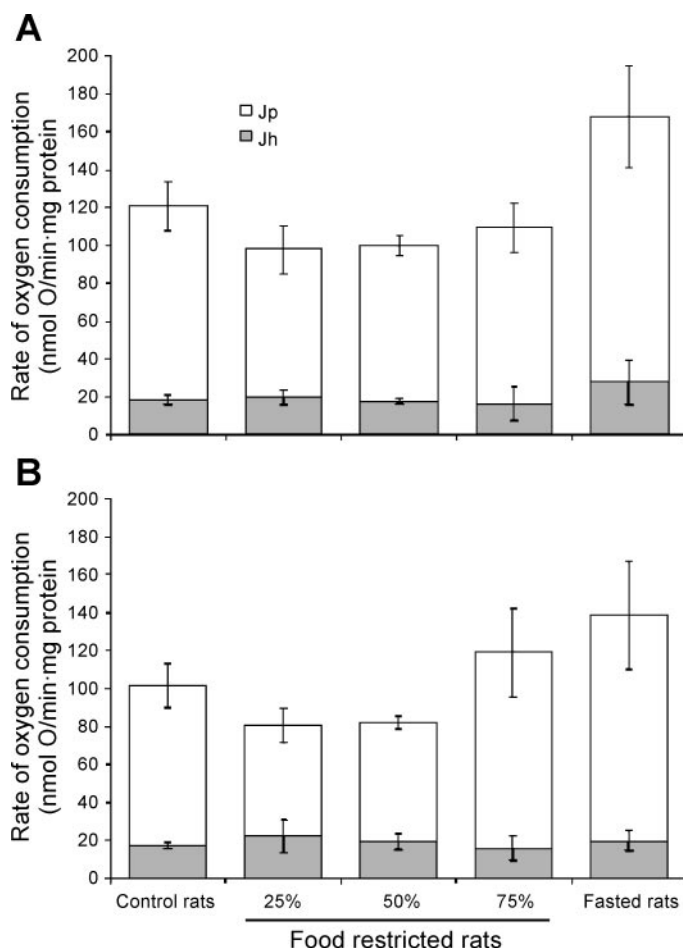


Fig. 1. Effect of 3 days of gradual food restriction on effective ratio of ATP synthesis after the addition of ADP to the oxygen consumption rate under the same conditions (P/O) and on the contributions of ATP synthesis and proton leak to mitochondrial state 3 respiration in intermyofibrillar (IMF; A) and subsarcolemmal (SSM; B) mitochondria respiring on succinate. IMF and SSM mitochondria were isolated from skeletal muscles of control, food restricted, and fasted rats. Succinate (4 mM), in the presence of rotenone (5 μ M), was used as substrate (see MATERIALS AND METHODS for details). Jp, respiration driving ATP synthesis.

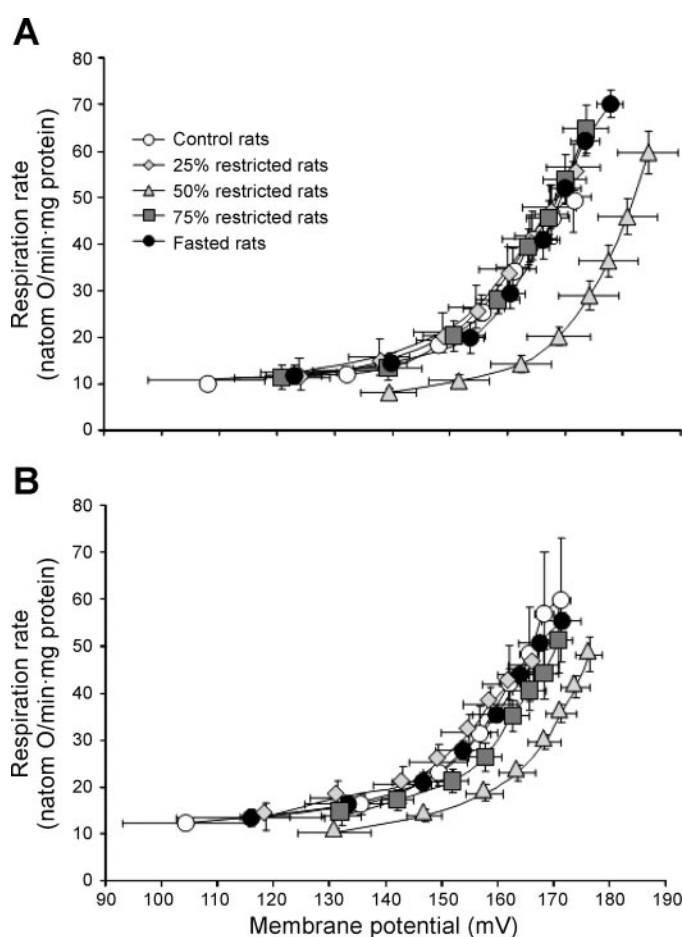


Fig. 2. Effect of 3 days of gradual food restriction on kinetics of proton leak in IMF (A) and SSM mitochondria (B). The kinetics of proton leak were measured in IMF and SSM mitochondria respiring on 4 mM succinate from skeletal muscles of control, food restricted, and fasted rats. Proton leak kinetics were measured with succinate and oligomycin and titrated with malonate. The conditions used for these measurements are described in MATERIALS AND METHODS.

populations were involved differently in this adaptive mechanism.

Our results show that 0% FR over 3 days elicited a 4.7% total weight gain in control animals compared with their initial weight, whereas 25–100% FR caused a proportional weight loss in experimental animals, reaching 15% in the fasted group (Table 1). Organs contributing to a total body weight decrease are known to be sequentially affected by FR and CR, with the liver being affected first, followed by the kidney and the heart. As shown in the present data, after 3 days of FR, liver and spleen weight had already decreased, whereas heart and kidney weights remained unaffected (14) (Table 1). In contrast, gastrocnemius and quadriceps muscle weights were unchanged whatever the FR degree applied, as shown in previous short- and long-term studies (2, 13). Rat skeletal muscle adaptive mechanisms induced by 3 days of FR appear to occur without any change in the mass of major hindlimb muscles and may vary later as described by Bevilacqua et al. (3), and in this way may not be due to a muscular remodeling.

The main objective of the present study was to determine the effect of short-term FR on mitochondrial proton leak. We focused on mitochondrial proton leak, since it is an important contributor to resting cellular energy expenditure (34). Because a muscle contains two types of mitochondria, which exhibit different biochemical properties and physiological functions, the study was performed on both SSM and IFM mitochondria.

The findings presented demonstrate that proton leak rate and basal proton conductance of 50% FR rats in both mitochondrial subpopulations were significantly decreased compared with all other groups (Fig. 2). Our results from skeletal muscle mitochondria provide evidence for the rapidity in which FR operates and, furthermore, they extend previous reports that show decreased skeletal proton leak rate following long-term CR. This is organ specific, given that liver mitochondrial proton leak has remained unaltered after 3 days of FR (14) and after 1 and 6 mo of CR (30), whereas it has been decreased by 18 mo of CR (15). This may reflect the tissue specificity of mitochondrial metabolism and the differences between mitotic (liver) and postmitotic (muscle) tissues. The result is also quite different from a decrease in state 4 associated with an unexpected decrease in protonmotive force as observed by Bevilacqua et al. (3), all occurring after 2 wk of CR at the same intensity. This highlights the impact of the duration of the CR and the need to better analyze the consequences of short-term CR.

The precise mechanism underlying the decrease in proton leak is uncertain; however, it likely involves a reduced permeability of the mitochondrial inner membrane to protons. Modifications of the lipids composition of the mitochondrial inner membrane may provide one explanation. Effectively, energy restriction was shown to decrease the concentration of long-chain polyunsaturated fatty acids and to increase the concentration of linoleic acid (22, 23), both modifications that lead to reduced membrane permeability. Another possibility may be through the reduction in uncoupling proteins. However, several reports have demonstrated that long- or short-term CR induces an increase in uncoupling protein-3 (UCP-3) level without any corresponding increase in proton leak (5, 9). Recently, Brand et al. (8) presented evidence to show that one-half to two-thirds of basal proton conductance in mitochondria depends on adenine nucleotide translocase (ANT) content. However, no information is available concerning FR and ANT.

Whatever the exact mechanism involved, according to Ramsey's hypothesis (31), a decrease in the rate of mitochondrial proton leak would lead to a reduced resting oxygen consumption, and hence a lower rate of reactive oxygen species (ROS) generation, by limiting the number of interactions between mitochondria and oxygen molecules. This mechanism could explain why proton leak is positively correlated to ROS synthesis (3, 4).

Mitochondrial function is usually assessed by state 3 and 4 oxygen respiration rates. Most studies report that a mixed mitochondrial population exhibits a decrease in state 3 or state 4 during short- or long-term CR (Table 6). In our study, mitochondrial oxidative capacities of both SSM and IFM mitochondria were investigated in the presence of substrates that were either nonlipidic (pyruvate, succinate) or lipidic (palmitoyl-carnitine). In both subpopulations of mitochondria, respiratory state 4 was found unchanged irrespective of the substrate oxidized. Decreasing state 3 respiratory rate was only observed in SSM mitochondria, with pyruvate + malate used as substrates. This is unlikely to be due to a change in mitochondrial mass, because citrate synthase activity was found to be unchanged (Table 2). In addition, activity of complex IV also was only increased in SSM. This could contribute to the maintenance of a high degree of oxidation of electron transporters by preventing the accumulation of electrons along the respiratory chain during transfer. Associated with the reduction in proton leak, these modifications that were only observed in the mitochondria of the 50% FR group could

Table 6. Summary of studies showing an effect of calorie or food restriction on skeletal muscle mitochondrial respiration

Reference	Rat Strain	Age or Weight	Restriction Intensity, %	Duration	Variation in Total Weight, %	Result
16	Sprague-Dawley	127 g	65	8–10 wk	–50	No change
2	Wistar	195–205 g	75	21 days	–53	↓ State 3 (–21%) ↓ State 4 (–21%)
24	Wistar	10 mo	34	23 mo	–41	↓ State 4 (–23%)
29	Wistar	250 g	60	5 wk	–40	↓ State 3 (–33%) State 4 unchanged
26	Wistar	8 wk	75	10 days	–29	↓ State 3 (–37%) ↓ State 4 (–18%)
12	Sprague-Dawley	7 wk	50	2 wk	Growth stopped	↓ State 3 (–30%) ↓ State 4 (–20%)
3	FBNF1	6 mo	40	2 wk; 2 mo; 6 mo	–8.3; –17; –32%	↓ State 3 (–43%; –17%; unchanged) ↓ State 4 (–26%; –42%; –53%)

contribute in the control of SSM oxidative stress. Given the potential importance of SSM mitochondria for signal transduction, substrate transport (32) and the rapid adaptation of subsarcolemmal mitochondria (the decrease in both state 3 and proton leak) may contribute to the benefit of short-term FR.

It was already thought that IMF and SSM mitochondria might have different adaptive capacities toward various physiological situations such as endurance training (36, 6), immobilization (21), or a high-fat diet (20). The distinct response to 3 days of FR may be explained by regional metabolic differences between the two mitochondrial subpopulations. Given that SSM mitochondria occupy a smaller volume within skeletal muscle fibers compared with the IMF population, it is unlikely that the decreasing state 3 respiration rates reported exclusively in SSM from food-restricted rats would affect the whole skeletal oxygen consumption. Nevertheless, this adaptation may be important for local energy production. Indeed, SSM mitochondria, located near the sarcolemma, provide energy for membrane-related processes, including signal transduction, ion exchange, substrate transport, and activation, whereas the IMF mitochondria are more involved in muscle contraction. Thus mitochondria subpopulations react to FR, but not exactly in the same way, with SSM mitochondria being more reactive. SSM located under the cell membrane may be more sensitive to external variations in substrate availability. It also is possible that SSM exhibit differential hormonal regulation in mitochondrial energy production (33). In line with this view, it is interesting to note that a deficiency of SSM mitochondria was reported in muscle insulin resistance (32).

In conclusion, very short-term FR has been shown to differentially affect the two mitochondrial subpopulations. In IMF mitochondria, a decrease in proton leak was reported without modification of ATP synthesis rate. As proposed by Drew et al. (13) and Sreekumar et al. (39), the capacity of skeletal muscle mitochondria to generate ATP was preserved despite the FR, probably because ATP requirements were in balance with ATP synthesis. SSM mitochondria display a more complex regulatory mechanism, which may control oxidative stress in this population. Importantly, mitochondrial metabolism adjustments were principally induced by 50% FR and were shown not to occur in a linear way between fed and fasted states. This suggests the possibility of a specific response at this FR level. The precise regulation producing such effects remains largely unknown, but it does imply a role of insulin signaling. Indeed, insulin and insulin-like signaling have been proposed to play a role in the aging process, and they are decreased by CR.

REFERENCES

- Ames BN, Shigenaga MK, and Hagen TM. Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1271: 165–170, 1995.
- Ardawi MS, Majzoub MF, Masoud IM, and Newsholme EA. Enzymic and metabolic adaptations in the gastrocnemius, plantaris and soleus muscles of hypocaloric rats. *Biochem J* 261: 219–225, 1989.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, and Harper ME. Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E852–E861, 2004.
- Bevilacqua L, Ramsey JJ, Hagopian K, Weindruch R, and Harper ME. Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E429–E438, 2005.
- Bezaire V, Hofmann W, Kramer JK, Kozak LP, and Harper ME. Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in *Ucp3*($-/-$) and wild-type mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281: E975–E982, 2001.
- Bizeau ME, Willis WT, and Hazel JR. Differential responses to endurance training in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria. *J Appl Physiol* 85: 1279–1284, 1998.
- Brand M. Measurement of mitochondrial protonmotive force. In: *Bioenergetics—A Practical Approach*. Oxford, UK: IRL, 1995.
- Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, and Cornwall EJ. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *Biochem J* 392: 353–362, 2005.
- Cadenas S, Buckingham JA, Samec S, Seydoux J, Din N, Dulloo AG, and Brand MD. UCP2 and UCP3 rise in starved rat skeletal muscle but mitochondrial proton conductance is unchanged. *FEBS Lett* 462: 257–260, 1999.
- Cairns CB, Walther J, Harken AH, and Banerjee A. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R1376–R1383, 1998.
- Cogswell AM, Stevens RJ, and Hood DA. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol Cell Physiol* 264: C383–C389, 1993.
- Crescenzo R, Mainieri D, Solinas G, Montani JP, Seydoux J, Liverini G, Iossa S, and Dulloo AG. Skeletal muscle mitochondrial oxidative capacity and uncoupling protein 3 are differentially influenced by semistarvation and refeeding. *FEBS Lett* 544: 138–142, 2003.
- Drew B, Phaneuf S, Dirks A, Selman C, Gredilla R, Lezza A, Barja G, and Leeuwenburgh C. Effects of aging and caloric restriction on mitochondrial energy production in gastrocnemius muscle and heart. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R474–R480, 2003.
- Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, and Ritz P. Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1670: 126–131, 2004.
- Hagopian K, Harper ME, Ram JJ, Humble SJ, Weindruch R, and Ramsey JJ. Long-term calorie restriction reduces proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E674–E684, 2005.
- Hansen-Smith FM, Maksud MG, and Van Horn DL. Effect of dietary protein restriction or food restriction on oxygen consumption and mitochondrial distribution in cardiac and red and white skeletal muscle of rats. *J Nutr* 107: 525–533, 1977.
- Harper ME, Bevilacqua L, Hagopian K, Weindruch R, and Ramsey JJ. Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiol Scand* 182: 321–331, 2004.
- Harper ME, Monemdjou S, Ramsey JJ, and Weindruch R. Age-related increase in mitochondrial proton leak and decrease in ATP turnover reactions in mouse hepatocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275: E197–E206, 1998.
- Holston RRDP, Ali SF, and Scalzo FM. Aging, dietary restriction and glucocorticoids: a critical review of the “Glucocorticoid Hypothesis.” In: *The Biological Effects of Dietary Restriction*. Washington, DC: International Life Sciences Institute, 1991.
- Iossa S, Mollica MP, Lionetti L, Crescenzo R, Botta M, Samec S, Solinas G, Mainieri D, Dulloo AG, and Liverini G. Skeletal muscle mitochondrial efficiency and uncoupling protein 3 in overeating rats with increased thermogenesis. *Pflügers Arch* 445: 431–436, 2002.
- Krieger DA, Tate CA, McMillin-Wood J, and Booth FW. Populations of rat skeletal muscle mitochondria after exercise and immobilization. *J Appl Physiol* 48: 23–28, 1980.
- Laganiere S and Yu BP. Effect of chronic food restriction in aging rats. I. Liver subcellular membranes. *Mech Ageing Dev* 48: 207–219, 1989.
- Laganiere S and Yu BP. Modulation of membrane phospholipid fatty acid composition by age and food restriction. *Gerontology* 39: 7–18, 1993.
- Lal SB, Ramsey JJ, Monemdjou S, Weindruch R, and Harper ME. Effects of caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial proton leak in aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: B116–B122, 2001.
- Lass A, Sohal BH, Weindruch R, Forster MJ, and Sohal RS. Caloric restriction prevents age-associated accrual of oxidative damage to mouse skeletal muscle mitochondria. *Free Radic Biol Med* 25: 1089–1097, 1998.
- Madapallimattam AG, Law L, and Jeejeebhoy KN. Effect of hypoen-ergetic feeding on muscle oxidative phosphorylation and mitochondrial complex I–IV activities in rats. *Am J Clin Nutr* 76: 1031–1039, 2002.
- Malgat MLT, Durrieu G, and Mazat JP. Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: *Mitochondrial Diseases*. Berlin: Springer, 1999.

28. **Masoro EJ.** Caloric restriction and aging: an update. *Exp Gerontol* 35: 299–305, 2000.
29. **Matecki S, Py G, Lambert K, Peyreigne C, Mercier J, Prefaut C, and Ramonatxo M.** Effect of prolonged undernutrition on rat diaphragm mitochondrial respiration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26: 239–245, 2002.
30. **Ramsey JJ, Hagopian K, Kenny TM, Koomson EK, Bevilacqua L, Weindruch R, and Harper ME.** Proton leak and hydrogen peroxide production in liver mitochondria from energy-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E31–E40, 2004.
31. **Ramsey JJ, Harper ME, and Weindruch R.** Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radic Biol Med* 29: 946–968, 2000.
32. **Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, and Kelley DE.** Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 54: 8–14, 2005.
33. **Ritz P, Dumas JF, Ducluzeau PH, and Simard G.** Hormonal regulation of mitochondrial energy production. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8: 415–418, 2005.
34. **Rolfe DF and Brown GC.** Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77: 731–758, 1997.
35. **Rolfe DF, Hulbert AJ, and Brand MD.** Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* 1188: 405–416, 1994.
36. **Roussel D, Lhenry F, Ecochard L, Sempore B, Rouanet JL, and Favier R.** Differential effects of endurance training and creatine depletion on regional mitochondrial adaptations in rat skeletal muscle. *Biochem J* 350: 547–553, 2000.
37. **Sohal RS, Agarwal S, Candas M, Forster MJ, and Lal H.** Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. *Mech Ageing Dev* 76: 215–224, 1994.
38. **Sohal RS and Weindruch R.** Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59–63, 1996.
39. **Sreekumar R, Unnikrishnan J, Fu A, Nygren J, Short KR, Schimke J, Barazzoni R, and Nair KS.** Effects of caloric restriction on mitochondrial function and gene transcripts in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E38–E43, 2002.
40. **Van Remmen H and Richardson A.** Oxidative damage to mitochondria and aging. *Exp Gerontol* 36: 957–968, 2001.
41. **Weindruch R, Walford RL, Fligiel S, and Guthrie D.** The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 116: 641–654, 1986.
42. **Weindruch RWR.** *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction.* Springfield, IL: Thomas, 1988.



3. Cachexie cancéreuse et dépense énergétique de repos

3.1. Article 2

Cancer cachexia: Measured and predicted resting energy expenditure for the nutritional needs evaluation. Gyasi Johnson, Agnès Sallé, Gérard Lorimier, Laurent Laccourreye, Bernard Enon, Vincent Blin, Yann Jousset, Jean-Pierre Arnaud, Yves Malthiery, Gilles Simard, Patrick Ritz. (Article soumis)

La cachexie cancéreuse est souvent associée à différents troubles métaboliques. Parmi ceux-ci on trouve le métabolisme énergétique. Communément, une dépense énergétique de repos élevée est associée au syndrome cachectique. Selon certains auteurs, celle-ci pourrait expliquer en partie la perte de poids associée à ce syndrome (Warnold *et al.*, 1978 ; Bozzetti *et al.*, 1980 ; Macfie, 1982). En effet, au cours de la cachexie cancéreuse de nombreuses altérations métaboliques coûteuses en énergie sont mises en place. Le cycle de Cori en est un exemple, son rendement énergétique est faible. Ces altérations sont donc coûteuses en substrats énergétiques et représentent un coût énergétique supplémentaire pour l'organisme. On peut supposer que cette demande énergétique mobilise une grande partie des réserves de l'organisme ainsi que des tissus tels que le muscle squelettique dont la fonction n'est pas de service de réserve énergétique. Les facteurs cachectiques tels que PIF et LMF sont à l'origine d'un fort catabolisme qui lui aussi est coûteux en énergie. Le coût énergétique imposé par ces nouvelles priorités métaboliques pourrait expliquer une augmentation de la dépense énergétique de repos et une fonte des réserves de l'organisme. Au niveau mitochondrial, une chute du rendement de conversion énergétique au niveau musculaire pourrait, compte tenu de la part relative du muscle dans l'organisme, générer au niveau du corps entier un déficit énergétique, une oxydation de substrats de réserves et une consommation en oxygène supplémentaire en vue d'atteindre une production énergétique (ATP) suffisante.

Les études qui se sont penchées sur la dépense énergétique de repos du patient cancéreux cachectique fournissent des résultats mitigés (Knox *et al.*, 1983 ; Dempsey *et al.*, 1984 ; Lindmark *et al.*, 1984 ; Arbeit *et al.*, 1984 ; Nixon *et al.*, 1988 ; Hyltander *et al.*, 1991 ; Bosaeus *et al.*, 2001, Moses *et al.*, 2004 ; DeJong *et al.*, 2005 ; Ravasco *et al.*, 2007). La dépense énergétique de repos de patients cachectiques cancéreux est trouvée tantôt inférieure, égale ou supérieure à celle observée ou prédite pour des personnes saines. Dans ces conditions, l'impact des différents troubles métaboliques observés au cours de la cachexie

cancéreuse sur la dépense énergétique de repos n'est plus aussi simple et nécessite une analyse plus fine.

La grande majorité des études menées sur la dépense énergétique des patients cachectiques cancéreux tend à comparer les données de patients cachectiques à celles de sujets sains. De plus, lorsqu'une valeur de référence est obtenue à partir d'équations prédictives, les équations d'Harris et Benedict (Harris et Benedict, 1918) sont celles les plus fréquemment utilisées.

Afin d'avoir une approche corps-entier du métabolisme énergétique du patient cachectique cancéreux, l'objectif de cet article était de comparer cette dépense à celle de patients cancéreux non cachectiques. Ceci permettait d'isoler l'impact de la cachexie sur la dépense énergétique de repos du patient cancéreux. Le second objet de cet article était d'évaluer la précision des équations d'Harris et Benedict à prédire cette dépense énergétique. Ces équations sont fréquemment utilisées pour prédire la dépense énergétique de repos dans des cas pathologiques alors qu'elles ont été mises au point à partir de groupes de personnes saines. Dans l'éventualité d'une prédiction inadéquate nous pourrions proposer une équation prédictive plus appropriée à la cachexie et en valider les résultats. Enfin, cet article visait à observer l'influence de l'état inflammatoire sur la dépense énergétique de repos de patients cachectiques.

Résultats et discussion

Nous observons que les dépenses énergétiques de repos des patients cachectiques et celles des patients cancéreux non-cachectiques sont identiques. Malgré la perte de poids des patients cachectiques, la dépense énergétique de repos ajustée à la masse maigre reste identique dans les deux groupes. Ceci remet en cause le fait que la perte de poids soit directement liée à une élévation de la dépense énergétique de repos chez le patient cachectique. Il est donc envisageable que d'autres mécanismes agissent directement sur la masse tissulaire du patient cachectique sans pour autant induire une élévation de sa dépense énergétique de repos. L'équipe de Fearon *et al.* fait cette observation chez des patients cachectiques atteints de cancers pulmonaires et colorectaux (Fearon *et al.*, 1988). Dans leur étude, malgré une dépense énergétique de repos identique, les patients cancéreux en perte de poids présentaient un turn-over protéique 50% à 70% supérieur à celui des patients cancéreux à poids stables. Dans notre étude, les patients en perte de poids présentent les signes d'inflammations systémiques les plus forts (CRP, haptoglobine, orosomucoïde). Nous en concluons que la dépense énergétique représentée par l'état inflammatoire ne suffit pas à faire varier la dépense énergétique de repos

de notre pool de patients cachectiques. Cependant, au sein des patients cachectiques, ceux dont l'état inflammatoire est plus marqué présentent une dépense énergétique normalisée accrue. Il est donc envisageable que plus l'état inflammatoire est fort et plus sa contribution à la dépense énergétique de repos est conséquente.

La perte de poids observée dans le groupe de patients cachectiques concerne essentiellement une fonte du tissu adipeux. Puisque la contribution de la masse maigre à la dépense énergétique est supérieure à celle de la masse grasse, il est plus judicieux de normaliser la dépense énergétique mesurée par la masse maigre que par le poids total. Lorsque la dépense énergétique de repos est calculée à partir des équations de Harris et Benedict, la dépense prédite pour le groupe cachectique est inférieure à celle prédite pour les non-cachectiques. Ceci s'explique par le fait que les patients cachectiques ont un poids légèrement inférieur à celui des non-cachectiques. Les formules prédictives prennent en compte le poids des patients mais pas leur composition corporelle. Toutefois, lorsque ces valeurs sont normalisées par la masse maigre des patients, aucune différence ne persiste entre les groupes. Les équations de Harris et Benedict tendent donc à sous-estimer la dépense énergétique de repos prédite pour des patients cachectiques si celle-ci n'est pas normalisée par la masse maigre. Malheureusement, en conditions hospitalières, la masse maigre est très rarement évaluée et seule la dépense énergétique prédite est prise en compte. Pour cette raison nous avons évalué à l'aide de la méthode de Bland et Altman (Bland et Altman, 1986) la concordance des prédictions de dépenses énergétiques (calculées soit avec les équations de Harris et Benedict soit avec une équation prenant en compte le caractère cachectique des patients) avec les valeurs mesurées.

Afin de corriger les dépenses prédites, nous avons affecté à chacun des groupes un facteur correctif prenant en compte l'écart entre la valeur mesurée et la valeur prédite de la dépense énergétique. Les valeurs prédites avec notre méthode permettent d'évaluer la dépense énergétique de patients cachectiques d'une façon plus précise qu'avec les équations de Harris et Benedict. Cependant, quelque soit la méthode, les prédictions individuelles ne sont pas assez précises.

Dans cet article, nous mettons en évidence que les patients cachectiques ont une dépense énergétique de repos identique à celle des patients cancéreux non-cachectiques. Cependant, ces deux populations présentent des troubles métaboliques différents plaçant les patients cachectiques dans une situation de perdre de poids et d'inflammation chronique. Il est clair que des altérations métaboliques telles que l'état inflammatoire, l'hypercatabolisme, les cycles futiles chez les patients cachectiques représentent un coût énergétique supplémentaire

pour l'organisme. Cependant, ce coût est certainement contre balancé par la réduction des dépenses énergétiques liées à d'autres voies métaboliques comme la réduction de synthèse de protéines anti-inflammatoires, de protéines négatives de l'inflammation ou encore de facteur de biogenèse tissulaire. La résultante de ces réactions peut conduire à un bilan énergétique identique à celui des patients cancéreux non-cachectiques. Il n'est pas exclu qu'au cours de la cachexie cancéreuse, l'intensité et le coût énergétique des troubles métaboliques augmentent et induisent un hypermétabolisme. Au stade de cachexie que nous avons étudié, nos résultats sont en accord avec ceux de Hansell *et al.*, Fearon *et al.*, Simons *et al.*, pour qui la dépense énergétique de repos contribue peu ou pas à la perte de poids du patient cancéreux cachectique (Hansell *et al.*, 1986-c ; Fearon *et al.*, 1988 ; Simons *et al.*, 1999).

Cancer cachexia: Measured and predicted resting energy expenditure
for the nutritional needs evaluation

Running Head: Resting energy expenditure in cancer cachexia

Gyasi Johnson ^a, MS, Agnès Sallé ^b, MD, Gérard Lorimier ^c, MD, Laurent Laccourreye ^d,
MD, Bernard Enon ^e, MD, Vincent Blin ^e, MD, Yann Jousset ^e, MD, Jean-Pierre Arnaud ^f,
MD, Yves Malthiery ^a, MD, Gilles Simard ^a, MD, Patrick Ritz, MD ^{ab}.

a: Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 694; Université d'Angers; and Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

b: Pôle des maladies métaboliques et médecine interne, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

c: Centre régional de lutte contre le cancer Paul PAPIN, Angers, France.

d: Pôles des spécialité et des neurosciences, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

e: Pôle Thorax -vaisseaux, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

f: Pôle digestif, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France.

Abstract

Cancer cachexia is associated with weight loss, poor nutritional status and systemic inflammation. Accurate nutritional support for patients is calculated upon resting energy expenditure (REE) measurement or prediction. Objective: The present study evaluated the agreement between measured and predicted REE and the influence of the inflammatory state on REE. Methods: Thirty six cancer patients were divided into two groups, weight stable (weight loss of less than 2%) and weight losing patients (weight loss of more than 5%). REE was measured by indirect calorimetry and adjusted for fat free mass (FFM). The Bland and Altman approach was used to assess the agreement between measured and predicted REE from the Harris and Benedict equations. Blood levels of C-reactive protein, haptoglobin and orosomucoid were assessed. A new method of REE prediction was evaluated. Results: There was no difference in measured REE between the groups, even when REE was adjusted for FFM. Predicted REE was significantly lower in cachectic patients, compared to non-cachectic patients ($p < 0.05$). However, adjustment for FFM removed this difference. The inflammatory state did not influence the REE of cachectic patients, compared to non-cachectic patients. The new method, using group specific factors was in better agreement with measured REE than the Harris and Benedict equations. Conclusion: Cachectic and non-cachectic cancer patients had similar REE but experienced different metabolic changes. In clinical context, classical predictive method tends to underestimate the cachectic group REE, when not adjusted to FFM.

Introduction

Cancer cachexia is a syndrome in which complex metabolism disorders occur. It appears in about half of cancer patients and is associated with a poor prognosis [1]. Cancer related cachexia is characterised by progressive weight loss from fat and skeletal muscle tissues, anorexia, asthenia, alteration of immune functions, and dysfunction of lipid, protein and carbohydrate metabolisms [2, 3]. Survival of patients with cancer cachexia is related to their metabolic abnormalities [4]. Cachexia leads to death in 10 to 20 % of cancer cases, death occurring owing to progressive nutritional status degradation [5-7].

During cancer cachexia, weight loss may occur even when anorexia is absent thus, it is admitted that the decrease of food intakes is not the sole cause of weight loss [8, 9]. Nevertheless, cachectic patients are malnourished and therefore at risk for nutrition-related problems [10-12].

Appropriate energy and nutritional support recommendations for cancer patients should be set upon energy expenditure evaluations. Since cancer and cachectic cancer patients are known to present disturbed metabolisms, it is of clinical importance to assess accurately their energy requirements to avoid negative outcomes due to over or underfeeding [13]. The calculation of total energy expenditure from the measurement of resting energy expenditure (REE), enables the calculation of energy requirement and the adjustment of nutritional support. Indirect calorimetry is the technique commonly used to assess REE [14, 15]. Unfortunately, for a clinical use, these methods are impractical because they are expensive, time and trained-technicians consuming. Therefore, prediction equations [16, 17] are useful to evaluate REE, from easily measurable clinical variables (weight, height, age, sex...). Some of these equations have been adjusted for particular illnesses known to increase energy expenditure (surgery, sepsis, trauma, burns...) by including injury (or stress) factors [18-22]. Furthermore, new equations have been developed for specific diseases [23, 24] but none for cancer related cachexia.

It is commonly held that cancer patients present an elevated energy expenditure compared to healthy persons [25-27]. Similarly, cancer related cachexia is widely thought to increase the REE [28-30]. Yet, few studies have evaluated the difference between cachectic and non-cachectic patients [31-33] in matter of weight loss related to REE and inflammatory state. Moreover, none of them has evaluated the accuracy of predictive equations to assess resting energy expenditure during cachexia.

The chronic inflammatory state of cachectic patients is thought to contribute to an enhanced REE [34], which is believed to promote weight loss [1, 30, 35]. Nevertheless these results were obtained by comparing cancer patients to non-cancer patients but not cachectic to non-cachectic patients.

Therefore, the aim of this study was to assess the agreement between predicted and measured-REE (mREE) for cachectic and non-cachectic patients. Predicted REE were calculated either from the Harris and Benedict equation [17] or from the use of group specific factors applied to the Harris and Benedict equation. Moreover, we evaluated the influence of weight loss and inflammatory state on mREE.

Materials and methods

Subjects

The study population consisted of 36 clinically-stable cancer patients referred to the Hospital of Angers for surgical tumor resection. According to "Union Internationale Contre le Cancer" criteria, all patients selected were at stage II of the disease (local spread). Half of the group (n=18) presented an early cancer-cachexia syndrome (cachectic patients: CP) and had lost 5 to 10% of their pre-illness body weight in the previous six months. Non-cachectic patients (NCP) had lost less than 2% of their pre-illness weight. Characteristic of patients are shown in table 1 and table 2. All patients underwent weight and height measurement, blood acute-phase proteins evaluation, body composition and REE assessments.

All patients gave written informed consent. The study was approved by the medical school ethical committee.

Measurement protocol

For each patient, height without shoes was measured to the nearest 0.1 cm and weight was measured to the nearest 0.1 kg wearing light clothing, on a weighing scale (SECA 901, Hamburg, Germany). REE was measured in a thermoneutral environment by indirect calorimetry (Vmax 229, SensorMedics; Yorba Linda, CA, USA) after a fasting period of at least 6 hours, using a ventilated-hood system. Patients had rested for 30 min prior to measurement. The system was calibrated prior to each assessment in accordance with manufacturer's instructions. With the patient in the supine position, whole-body oxygen consumption and carbon dioxide production were measured for at least 30 min (including a steady-state period of at least 10 min). The calorimetry procedure was identical for all patients.

Fat free mass (FFM) was assessed using bioelectrical impedance analysis with Bodystat Quadscan 4000 (Bodystat Ltd, Doubles, Isle of Man, UK). Total body water was calculated with equations from Segal et al [36]. FFM was estimated assuming a constant hydration level of 73.2% [37] since this equation was found to be acceptable for measuring body composition of groups of cancer patients [38]. Muscle mass was estimated according to the equation of Janssen et al [39]. Blood was obtained in the fasting state, immediately after REE measurement. Biochemical measurement on blood samples were performed by immunoturbimetric assays (Tina-quant®, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) on Hitachi-Modular system. Inflammatory state was screened through the measurement of blood

levels of positive acute phase-response proteins as C-reactive protein, haptoglobin, orosomucoid. The levels of albumin, transthyretin and transferrin as negative acute phase-response proteins were also assessed.

Predicted equations

Predicted energy expenditure (pREE) was estimated from the Harris and Benedict equations (HBE) [17] for both groups. An additional method (factor predicted resting energy expenditure: fpREE), for each group was used based on a 1.06 factor used for non-cachectic cancer patients and 1.11 for cachectic patients with the Harris and Benedict equations. These factors were calculated as the ratio of measured energy expenditure to the predicted energy expenditure using the Harris-Benedict equation [21]. Indeed, the energy cost of the disease theoretically consists of the difference between measured and predicted REE [19, 40].

Statistical analysis

All the measured variables were normally distributed and were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Independent-samples t-tests were used to assess differences between non-cachectic and cachectic patients. The comparison of mREE with pREE or fpREE, all adjusted for FFM were assessed by using an analysis of covariance (ANCOVA), which removes the effect of the covariate (FFM) on REE. Measured REE was also compared to pREE and fpREE using paired-samples t-tests. The Bland and Altman approach [41] was used to assess the agreement between mREE and pREE or fpREE. The trend in magnitude of the bias with increasing mREE was assessed with Pearson's correlation coefficients. We calculated the proportion of patient with predicted REE within clinical acceptance limits. A clinical acceptable discrepancy based on the assumption that mREE would fall within $\pm 10\%$ of predicted REE was defined [42] to compare mREE to pREE or fpREE. Data were analyzed with SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Thirty six cancer patients were studied, (28 males and 8 females), suffering from either lung (non-small cell), colon or head and neck cancer (table 1). None of them received chimio- or radio-therapy.

Although body weight and BMI tended to be lower in the cachectic patients, they were not statistically different compared to that of non-cachectic patients (table 2). Age and height were similar in both groups. The weight loss over the previous six months, as a percentage of

the pre-illness weight was greater for CP compared to NCP, who were weight-stable. There was no significant difference in fat free mass or skeletal muscle mass between both groups. For CP, acute phase protein levels were higher than the upper limits of normal ranges and were significantly higher than that of NCP (table 3). Plasma transthyretin was lower in CP compared to NCP and below the normal range, whereas albumin and transferrin levels were unchanged.

There was no significant difference between CP and NCP measured resting energy expenditures (mREE) (table 4). When adjusted for fat free mass (FFM), REE still remained similar between the two groups.

Predicted REE (pREE) calculated from the Harris and Benedict equations (Table 5) was significantly lower for CP compared to NCP. However, when adjusted for FFM, pREE did not differ when both groups were compared. Although means of pREE and mREE of non-cachectic patients were not significantly different (figure 1b), pREE of cachectic patients was significantly lower than their mREE (figure 1a).

When the Harris and Benedict equations were used with factors (1.06 for non-cachectic and 1.11 for cachectic patients) *i.e.* fpREE (Table 5), there was no difference between both groups (t-test; $p = 0.12$), nor when fpREE was adjusted for FFM (table 4). Moreover, mREE and fpREE were not statistically different in both groups (figure 1). Among cachectic patients, mREE of patients with a high acute phase response (CRP > 17 mg/l) was significantly greater (21%) than in those with a low APR (CRP < 17 mg/l), when mREE was adjusted for FFM (table 7).

The Bland and Altman approach [41] was used to assess the level of agreement between pREE, fpREE and mREE. Predicted REE, mean bias and limits of agreement are listed in table 6.

The factors method gave the smallest bias (4.2 kcal/day for non-cachectic and 1.4 kcal/day for cachectic patients). With this method, more pREE individual values were within clinical acceptable limits (mREE within $\pm 10\%$ of predicted values), for both groups. Nevertheless, the two predictive methods provided wide limits of agreement (>20%).

There was no significant trend in the spread of bias across the range of the measurements of REE, except for cachectic patients with the HBE alone ($r = 0.508$; $p = 0.031$).

Discussion

In this study, mREE of cancer-related cachectic patients was similar to that of non-cachectic cancer patients. Predicted REE from the Harris and Benedict equations was in good agreement with mREE only for non-cachectic patients. REE predicted with group specific factors was in better agreement with mREE, in both groups.

Inflammatory state

The combination of short half-life (CRP) and longer half-life (haptoglobin, orosomucoid) acute-phase proteins enabled us to accurately screen for inflammatory state [43, 44]. The role of CRP as survival predictor has been demonstrated for different tumor types [45]. Haptoglobin is a protein synthesized in the liver, adipose tissue and lung. It acts as an antioxidant and like orosomucoid, plays a role in modulating many aspects of the acute phase response [46, 47]. CRP, haptoglobin and orosomucoid plasma levels were higher in the cachectic group. Thus, early in the malignant disease course, the groups were distinct in term of inflammatory state, with weight loosing patients experiencing a higher chronic acute phase (table 3), as previously described for advanced cancer [45]. Furthermore, in inflammatory states, the increase of positive acute phase proteins is known to be correlated with the decrease of negative acute phase proteins [48]. Therefore we examined blood levels of albumin, transthyretin and transferrin as negative acute-phase response proteins [49]. Albumin and transferrin levels were not significantly affected for cachectic patients. On the other hand, transthyretin levels were lower for cachectic patients compared to non-cachectic patients. Albumin, transthyretin and transferrin are usually assessed as nutritional markers [50]. The half life of transthyretin (2days) is shorter than that of albumin (20 days) and transferrin (8 days). Transthyretin is more reactive to cancer-related physiological variations compared to both other proteins. Moreover, tryptophan is highly present in transthyretin amino-acid chain and is involved in the protein synthesis onset. Thus, this protein may be a better nutritional or inflammation marker than albumin or transferrin [51, 52]. Moreover, since cachectic patients were in an inflammatory state, their transthyretin mean level may reflect the severity of the disease more than a worst nutritional state [50].

Since cancer related cachexia occurs early in the development of the tumor [53-57], we examined cachexia at an early state *i.e.* patients were weight loosing (5 to 10% of weight loss) but did not had marked malnutrition characteristics observed in late cancer stages, like very low BMI, or significantly wasted body compartments. Nevertheless, our results agree with

previous studies since weight loss and systemic inflammatory response were correlated in cancer patients [35, 58, 59].

We observed that among weight losing cancer patients, those with a high acute phase response (APR) had a higher FFM-adjusted mREE, indicating that inflammatory response may contribute to a hypermetabolism in cachectic patients. This is in accordance with the study of Falconer and colleagues who found an elevated REE in cachectic cancer patients with an acute phase response, compared with cachectic cancer patients without APR [34]. Nevertheless, in our study, when all cachectic patients were pooled, the contribution of the inflammatory state to REE disappeared, compared with non-cachectic patients (table 4). This indicates that APR may increase REE only in some cachectic but not in all. Most studies use to compare cancer patients to healthy patients and observe a higher REE for the formers [25-30]. Thereby, according to our results, we hypothesize that chronic inflammatory state observed in cachectic patients had little to do with the difference of REE compared to healthy individuals.

Measured resting energy expenditure

Measured resting energy expenditure was similar in both groups of cancer patients. Despite their weight losing state, the mREE of cachectic patients, even when adjusted for FFM was not altered. Hence, the hypothesis that weight loss in cancer cachexia may be due to an elevated REE [25, 26, 28-30] may not be totally assumed. REE may not be the main factor involved in cachexia-related weight loss. Chronic inflammatory state, tumor's factors and metabolic abnormalities observed during cancer-cachexia are directly responsible for tissues breakdown and weight loss of cachectic patients as stated by Tisdale [60], with little effect on the overall mREE when compared to non-cancer patients. Cachectic cancer patients may have similar mREE as non-cachectic cancer patients but different metabolic regulations leading to tissues wasting. Another explanation can be supported by the fact that our weight losing patients were in an early cachexia state. Indeed, the duration of malignancy has an impact upon REE, with longer duration of disease correlating with hypermetabolism [61, 62]. Thus, the contribution of REE to weight loss may progressively increase along the disease course, being minimal for newly detected cancer patients and significant in advanced cancers. Nevertheless, REE seems to be unchanged in the late 62 months before the pre-terminal phase [63].

Our results agree with that of Fearon and colleagues who observed no difference of mREE between weight stable and weight losing cancer patients [32]. Moreover, in their study,

though mREE were similar, weight losing cancer patients had 50 to 70% higher rates of whole body protein turnover. Hence, in cancer, some metabolisms may be increased, like protein turn over, without affecting the mREE [64]. The overall mREE may result from energy consumption compensatory-mechanisms, with some energy costs being increased while others are decreased.

Whereas food-restriction induced weight loss leads to a decrease in REE [65-67], in cachectic patients, weight loss is not associated with such an adaptation. Indeed, in early cachexia, body changes seem to occur without REE adjustment. According to Hansell et al and Fearon and colleagues studies, REE of cachectic patients poorly contribute to weight loss or to the aetiology of cancer cachexia. [31, 32]. Thus, we demonstrated that REE measured in early cachectic patients had little to do with the fact that patients were losing weight and in a chronic inflammatory state.

Predicted REE

Predicted REE from the Harris and Benedict equations (HBE) was significantly higher for non-cachectic patients compared to cachectic patients, whereas mREE were identical in both groups. In our study, measured and predicted REE were adjusted for FFM since it is the main contributor to REE [68]. This adjustment compensates for the bias that weight and height may induce. Furthermore, since fat mass is depleted faster than FFM during cancer-cachexia [63], adjustment of REE for body mass would have led to an underestimation of REE. Hence, predicted REE from the HBE and measured REE, both adjusted for FFM were similar when comparing, non-cachectic to cachectic patients. Nevertheless, this adjustment of pREE for FFM is poorly transposable to the clinical context since FFM assessment is rarely available. Therefore we evaluated the agreement between mREE and pREE or REE predicted from our new method using HBE with group-specific factors.

Agreement

HBE were intended for assessing basal metabolic rates of healthy persons. Nevertheless, they were shown to overestimate their REE by 5-15% [69, 70] while underestimating malnourished patient REE [71]. However, HBE are routinely used for persons with different diseases [40]. Moreover, HBE were shown to underestimate REE of weight-stable and weight-losing cancer patients [72-74]. When used with an injury factor of 1.3 for cancer patients, HBE overestimated those patients REE. [42, 75].

Several studies have set disease-specific factors (or stress factors) for HBE to accurately evaluate patients REE [21, 22] but none was established for cancer-related cachectic patients. Nevertheless, HBE are the most widely used predictive equations [40, 76]. Moreover, in clinical and research settings, as soon as only age, sex, weight and height are available HBE are used to evaluate basal energy expenditure [75, 77].

In our study, we aimed at evaluating the accuracy of HBE alone and HBE used with factors to predict mREE. Good correspondence of a REE-predictive method with measured values is achieved when the bias is minimal, with 95 % of differences within limits of agreement and absence of correlation between difference and mean of measured and predicted REE. This was the case for the method using factors, for both non-cachectic and cachectic patients. This method provided the smallest bias and the largest proportion of values within clinical acceptable limits. Harris and Benedict equations failed in assuming these conditions as far as cachectic patients were concerned. At a group level, the method using factors had the best agreement with measured REE, as assessed with the Bland and Altman approach [41]. Furthermore, for both groups, the factors method provided more patient REE values within clinical acceptance compared to HBE, what also revealed a better correspondence with indirect calorimetry data.

Our results for predicted REE from the HBE alones were in accordance with those of previous studies as far as non-cachectic cancer patients were concerned [42, 75]. In aforesaid studies, limits of agreement were as wide (-28-20%) as ours (-28-17%). Unfortunately, as stated, HBE were not suitable at individual level nor was the method with factors. For an individual, HBE may predict REE as much as 28-37% less or 17% above measured REE whereas HBE used with factors may predict REE 24-26% less or 24-27% above measured REE. Indeed, individual responses in matter of REE to disease are highly variable.

In this study, we made the assumption that lean tissue hydration was constant at 73%. Nevertheless, changes in fluids distribution may occur in cancer patients and bias bioelectrical impedance analysis of body compartments [78]. Therefore, patients included had non clinical fluid abnormalities though this did not exclude subclinical fluid disorders, what could represent a limitation.

Accurate nutritional support for cancer and cancer-related cachectic patients is indispensable since the prevalence of malnutrition for those patients is high. Harris and Benedict equations tend to underestimate those patients REE. However, we demonstrated here that cachectic and non-cachectic cancer patients had the same level of REE. Weight loss and chronic

inflammatory state did not contributed to an elevation of REE of cachectic patients, compared to non-cachectic cancer patients.

Conclusion

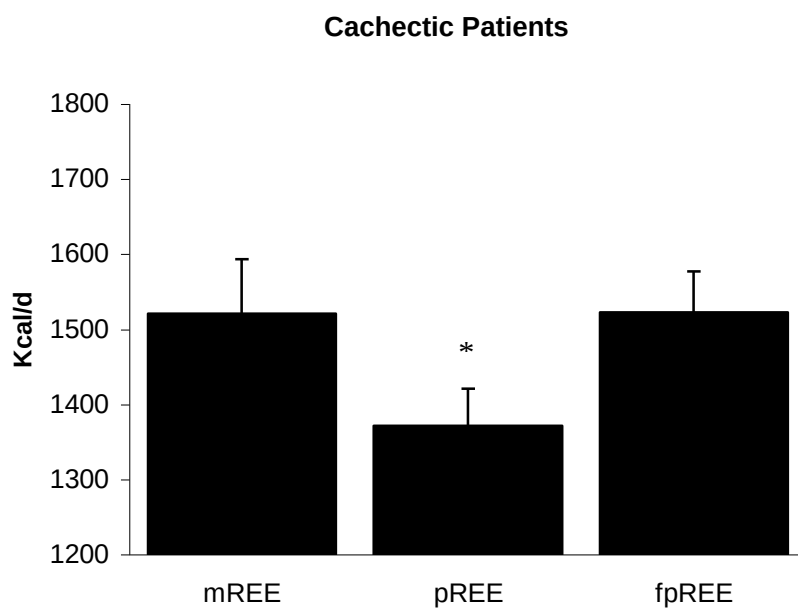
REE of non-cachectic and cachectic patients were similar, even when adjusted for FFM. Inflammatory state may not influence REE in the cachectic group. However, in clinical settings when FFM is not available, HBE tend to underestimate REE of cachectic patients while our new method was in better accordance with mREE.

Legends:

Figure 1: Comparison of resting energy expenditure either measured (mREE), predicted from the Harris and Benedict equations (pREE) or predicted from the group-specific factor method (fpREE), with * for p value < 0.01

Figure 1: Comparison of measured and predicted resting energy expenditure data

a



b

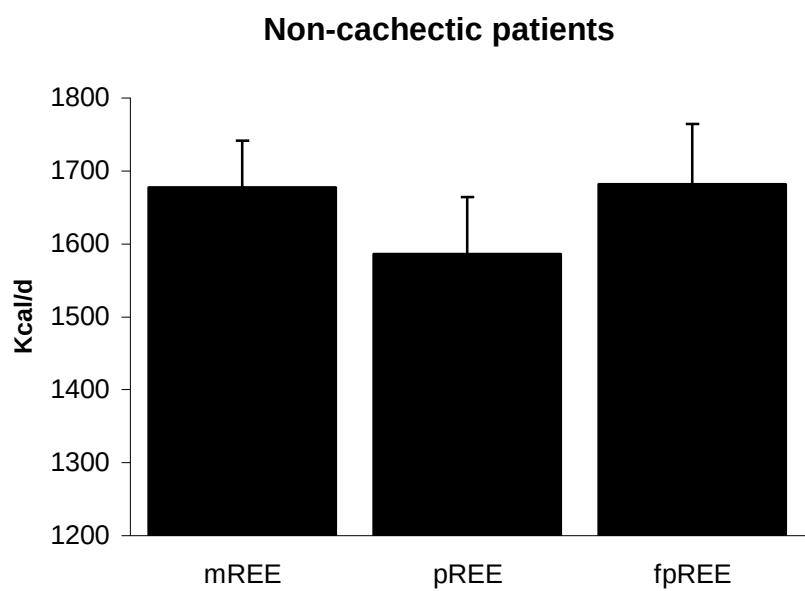


Table 1. Sites of tumors

	Patients	
	Non-cachectic patients (n = 18)	Cachectic patients (n = 18)
Tumor locations and types		
Lung (non small cell)	5	6
Gastrointestinal* (adenocarcinoma)	3	8
Head and neck (epidermoid carcinoma)	10	4

* All were colon adenocarcinoma except one cachectic who was a pancreatic adenocarcinoma

Table 2. Cancer patients group characteristics

	Patients		t-test* P value
	Non-cachectics (n=18)	Cachectics (n=18)	
Male : Female	17/1	11/7	
Age (y)	59.4 ± 12	61.2 ± 13	ns
Height (cm)	172 ± 15	170 ± 9	ns
Weight (kg)	77.2 ± 21	65.3 ± 14	0.058
BMI (kg/m ²)	26.6 ± 6	22.4 ± 5	0.055
FFM (%)	77.7 ± 8	80.5 ± 10	ns
Skeletal muscle mass (%)	37.3 ± 6	37.4 ± 9	ns
Weight loss % of pre- illness weight	<2	9.8 ± 3.1	

Values are means ± standard deviation (SD)

* Non-cachectic *versus* cachectic patients

Table 3. Acute phase markers

	Patients		Normal range
	Non-cachectics	Cachectics	
C-reactive Protein (CRP)	6.8 ± 6.5	32.7 ± 48†	< 10 mg/L
Haptoglobin (Hp)	1.6 ± 0.63	2.4 ± 1.1†	0.34 to 2.0 g/L
Orosomucoid (ORO)	0.9 ± 0.21	1.3 ± 0.49*	0.44 to 1.2 g/L
Albumin (Alb)	40.8 ± 3	37.9 ± 6	
transthyretin (Trt)	0.26 ± 0.08	0.18 ± 0.06*	0.20 to 0.4 g/l
Transferrin	2.3 ± 0.44	1.9 ± 0.51	

Values are means ± SD, † p<0.05 Cachectic versus Non-cachectic patients,

* p<0.01 Cachectic versus Non-cachectic patients

Table 4. Resting energy expenditure values

	Patients	
	Non-cachectics	Cachectics
mREE (kcal/d)	1677 ± 273	1521 ± 305
mREE adjusted for FFM (kcal/ kg/d)	1609 ± 53	1589 ± 53
pREE (kcal/d)	1586 ± 331	1372 ± 209†
pREE adjusted for FFM (kcal/kg/d)	1501 ± 31	1457 ± 31
fpREE (kcal/d)	1681±350	1522 ± 232
fpREE adjusted for FFM (kcal/kg/d)	1590 ±33	1614 ±33

Values are means ± SD; † p<0.05 Cachectic versus Non-cachectic patients

Table 5. Prediction equations for resting energy expenditure

Equation	Subjects	Formula
Harris and Benedict	Males	BMR (kcal/d) = 66.4730 + 13.7516 W + 5.0033H - 6.7550 A
	Female	BMR (kcal/d) = 66.4730 + 13.7516 W+ 5.0033 H - 6.7550 A
Harris and Benedict x 1.11 for cancer-cachectic patients	Males	BMR (kcal/d) = 1.11x[66.4730 + 13.7516 W + 5.0033H - 6.7550 A]
	Females	BMR (kcal/d) = 1.11x[66.4730 + 13.7516 W+ 5.0033 H - 6.7550 A]
Harris and Benedict x 1.06 for cancer patients	Males	BMR (kcal/d) = 1.06x[66.4730 + 13.7516 W + 5.0033H - 6.7550 A]
	Females	BMR (kcal/d) = 1.06x[66.4730 + 13.7516 W+ 5.0033 H - 6.7550 A]

Table 6. Bias and limits of agreement for predicted REE relative to measured REE in non-cachectics (1677 ± 273 kcal/day) and cachectics cancer patients (1521 ± 305 kcal/day).

		REE Predictive equations	
		Harris and Benedict	Harris and Benedict x factors
Bias (Kcal/day)	Non-cachectics	-91 ± 191	4.2 ± 203
	Cachectics	-150 ± 203	1.4 ± 202
Limit of agreement (± 2 SD) (Kcal/day)	Non-cachectics	-28-17 %	-24-24 %
	Cachectics	-37-17 %	-26-27 %
Patients (%) within clinical acceptable limits: $\pm 10\%$ of the prediction	Non-cachectics	55.6 %	61.1 %
	Cachectics	61.1 %	94.4 %

Values are Mean $\pm$ SD

Table 7. Measured REE of cachectic patients with low or high acute phase response (APR)

	Cachectic patients		t-test
			P value
	Hight APR n = 9	Low APR n = 9	
Serum C-reactive protein (mg/l)	57	<17	0.03
mREE (Kcal/day)	1624 ± 308	1418 ± 283	0.11
mREE ajusted for FFM (kcal/ kg/d)	1666 ± 64	1376 ± 64	0.006

Values are Mean $\pm$ SD

References

- [1.] Tisdale MJ. Biology of cachexia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89(23):1763-73.
- [2.] Tisdale MJ. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. *Nutrition* 1997;13(1):1-7.
- [3.] Gordon JN, Green SR, Goggin PM. Cancer cachexia. *Qjm* 2005;98(11):779-88.
- [4.] Bosaeus I, Daneryd P, Lundholm K. Dietary intake, resting energy expenditure, weight loss and survival in cancer patients. *J Nutr* 2002;132(11 Suppl):3465S-3466S.
- [5.] Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2002;2(11):862-71.
- [6.] Inagaki J, Rodriguez V, Bodey GP. Proceedings: Causes of death in cancer patients. *Cancer* 1974;33(2):568-73.
- [7.] Warren S. The immediate causes of death in cancer. *Am J Med Sci* 1932;184:610-615.
- [8.] Tisdale MJ. Pathogenesis of cancer cachexia. *J Support Oncol* 2003;1(3):159-68.
- [9.] Rubin H. Cancer cachexia: its correlations and causes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(9):5384-9.
- [10.] Hardy C, Wallace C, Khansur T, Vance RB, Thigpen JT, Balducci L. Nutrition, cancer, and aging: an annotated review. II. Cancer cachexia and aging. *J Am Geriatr Soc* 1986;34(3):219-28.
- [11.] Ottery FD. Cancer cachexia: prevention, early diagnosis, and management. *Cancer Pract* 1994;2(2):123-31.
- [12.] Finley JP. Management of cancer cachexia. *AACN Clin Issues* 2000;11(4):590-603.
- [13.] Gibney ER. Energy expenditure in disease: time to revisit? *Proc Nutr Soc* 2000;59(2):199-207.
- [14.] Ryan M, Salle A, Guilloteau G, Genaitay M, Livingstone MB, Ritz P. Resting energy expenditure is not increased in mildly hyperglycaemic obese diabetic patients. *Br J Nutr* 2006;96(5):945-8.

- [15.] Wooley JA. Indirect calorimetry: applications in practice. *Respir Care Clin N Am* 2006;12(4):619-33.
- [16.] Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1985;724:1-206.
- [17.] Harris JA, Benedict FG. A Biometric Study of Human Basal Metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1918;4(12):370-3.
- [18.] Douglas W. *The Metabolic Management of the Critically Ill*. New York: Plenum Publishing corporation; 1977.
- [19.] Long CL, Schaffel N, Geiger JW, Schiller WR, Blakemore WS. Metabolic response to injury and illness: estimation of energy and protein needs from indirect calorimetry and nitrogen balance. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1979;3(6):452-6.
- [20.] Mears E. Artificial nutritional support. *Med Int* 1990;82:3392-6.
- [21.] Barak N, Wall-Alonso E, Sitrin MD. Evaluation of stress factors and body weight adjustments currently used to estimate energy expenditure in hospitalized patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002;26(4):231-8.
- [22.] MacDonald A, Hildebrandt L. Comparison of formulaic equations to determine energy expenditure in the critically ill patient. *Nutrition* 2003;19(3):233-9.
- [23.] Ireton-Jones CS, Turner WW, Jr., Liepa GU, Baxter CR. Equations for the estimation of energy expenditures in patients with burns with special reference to ventilatory status. *J Burn Care Rehabil* 1992;13(3):330-3.
- [24.] White MS, Shepherd RW, McEniery JA. Energy expenditure in 100 ventilated, critically ill children: improving the accuracy of predictive equations. *Crit Care Med* 2000;28(7):2307-12.
- [25.] Waterhouse C, Fenninger LD, Keutmann EH. Nitrogen exchange and caloric expenditure in patients with malignant neoplasms. *Cancer* 1951;4(3):500-14.

- [26.] Macfie J, Burkinshaw L, Oxby C, Holmfield JH, Hill GL. The effect of gastrointestinal malignancy on resting metabolic expenditure. *Br J Surg* 1982;69(8):443-6.
- [27.] Arbeit JM, Lees DE, Corsey R, Brennan MF. Resting energy expenditure in controls and cancer patients with localized and diffuse disease. *Ann Surg* 1984;199(3):292-8.
- [28.] Warnold I, Lundholm K, Schersten T. Energy balance and body composition in cancer patients. *Cancer Res* 1978;38(6):1801-7.
- [29.] Bozzetti F, Pagnoni AM, Del Vecchio M. Excessive caloric expenditure as a cause of malnutrition in patients with cancer. *Surg Gynecol Obstet* 1980;150(2):229-34.
- [30.] Lindmark L, Bennegard K, Eden E, Ekman L, Schersten T, Svaninger G, et al. Resting energy expenditure in malnourished patients with and without cancer. *Gastroenterology* 1984;87(2):402-8.
- [31.] Hansell DT, Davies JW, Burns HJ. The relationship between resting energy expenditure and weight loss in benign and malignant disease. *Ann Surg* 1986;203(3):240-5.
- [32.] Fearon KC, Hansell DT, Preston T, Plumb JA, Davies J, Shapiro D, et al. Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer. *Cancer Res* 1988;48(9):2590-5.
- [33.] Weston PM, King RF, Goode AW, Williams NS. Diet-induced thermogenesis in patients with gastrointestinal cancer cachexia. *Clin Sci (Lond)* 1989;77(2):133-8.
- [34.] Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA, Carter DC. Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann Surg* 1994;219(4):325-31.
- [35.] McMillan DC, Scott HR, Watson WS, Preston T, Milroy R, McArdle CS. Longitudinal study of body cell mass depletion and the inflammatory response in cancer patients. *Nutr Cancer* 1998;31(2):101-5.

- [36.] Segal KR, Burastero S, Chun A, Coronel P, Pierson RN, Jr., Wang J. Estimation of extracellular and total body water by multiple-frequency bioelectrical-impedance measurement. *Am J Clin Nutr* 1991;54(1):26-9.
- [37.] Ritz P. Body water spaces and cellular hydration during healthy aging. *Ann N Y Acad Sci* 2000;904:474-83.
- [38.] Isenring E, Bauer J, Capra S, Davies PS. Evaluation of foot-to-foot bioelectrical impedance analysis for the prediction of total body water in oncology outpatients receiving radiotherapy. *Eur J Clin Nutr* 2004;58(1):46-51.
- [39.] Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc* 2002;50(5):889-96.
- [40.] Reeves MM, Capra S. Predicting energy requirements in the clinical setting: are current methods evidence based? *Nutr Rev* 2003;61(4):143-51.
- [41.] Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307-10.
- [42.] Reeves MM, Battistutta D, Capra S, Bauer J, Davies PS. Resting energy expenditure in patients with solid tumors undergoing anticancer therapy. *Nutrition* 2006;22(6):609-15.
- [43.] Calvin J, Neale G, Fotherby KJ, Price CP. The relative merits of acute phase proteins in the recognition of inflammatory conditions. *Ann Clin Biochem* 1988;25 (Pt 1):60-6.
- [44.] Sann L, Bienvenu F, Bienvenu J, Bourgeois J, Bethenod M. Evolution of serum prealbumin, C-reactive protein, and orosomucoid in neonates with bacterial infection. *J Pediatr* 1984;105(6):977-81.
- [45.] Mahmoud FA, Rivera NI. The role of C-reactive protein as a prognostic indicator in advanced cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4(3):250-5.

- [46.] Wassell J. Haptoglobin: function and polymorphism. Clin Lab 2000;46(11-12):547-52.
- [47.] Dobryszczyka W. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1997;35(9):647-54.
- [48.] Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid), alpha1-antitrypsin, and haptoglobin: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort. J Clin Lab Anal 2000;14(6):284-92.
- [49.] Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. J Clin Lab Anal 1999;13(6):273-9.
- [50.] Myron Johnson A, Merlini G, Sheldon J, Ichihara K. Clinical indications for plasma protein assays: transthyretin (prealbumin) in inflammation and malnutrition. Clin Chem Lab Med 2007;45(3):419-26.
- [51.] Mears E. Outcomes of continuous process improvement of a nutritional care program incorporating serum prealbumin measurements. Nutrition 1996;12(7-8):479-84.
- [52.] Mears E. Nutritional Assessment: An opportunity for laboratories to improve health care. Clin Lab News 2005;31((6)):12-16.
- [53.] Tessitore L, Bonelli G, Baccino FM. Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia. Biochem J 1987;241(1):153-9.
- [54.] Davis MP, Dickerson D. Cachexia and anorexia: cancer's covert killer. Support Care Cancer 2000;8(3):180-7.

- [55.] Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 2002;52(2):72-91.
- [56.] Zhou W, Jiang ZW, Tian J, Jiang J, Li N, Li JS. Role of NF-kappaB and cytokine in experimental cancer cachexia. *World J Gastroenterol* 2003;9(7):1567-70.
- [57.] Laviano A, Meguid MM, Inui A, Muscaritoli M, Rossi-Fanelli F. Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself. *Nat Clin Pract Oncol* 2005;2(3):158-65.
- [58.] Staal-van den Brekel AJ, Dentener MA, Schols AM, Buurman WA, Wouters EF. Increased resting energy expenditure and weight loss are related to a systemic inflammatory response in lung cancer patients. *J Clin Oncol* 1995;13(10):2600-5.
- [59.] Simons JP, Schols AM, Buurman WA, Wouters EF. Weight loss and low body cell mass in males with lung cancer: relationship with systemic inflammation, acute-phase response, resting energy expenditure, and catabolic and anabolic hormones. *Clin Sci (Lond)* 1999;97(2):215-23.
- [60.] Tisdale MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology (Bethesda)* 2005;20:340-8.
- [61.] Knox LS, Crosby LO, Feurer ID, Buzby GP, Miller CL, Mullen JL. Energy expenditure in malnourished cancer patients. *Ann Surg* 1983;197(2):152-62.
- [62.] Dempsey DT, Knox LS, Mullen JL, Miller C, Feurer ID, Buzby GP. Energy expenditure in malnourished patients with colorectal cancer. *Arch Surg* 1986;121(7):789-95.
- [63.] Fouladiun M, Korner U, Bosaeus I, Daneryd P, Hyltander A, Lundholm KG. Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer* 2005;103(10):2189-98.

- [64.] Melville S, McNurlan MA, Calder AG, Garlick PJ. Increased protein turnover despite normal energy metabolism and responses to feeding in patients with lung cancer. *Cancer Res* 1990;50(4):1125-31.
- [65.] Thompson JL, Manore MM, Thomas JR. Effects of diet and diet-plus-exercise programs on resting metabolic rate: a meta-analysis. *Int J Sport Nutr* 1996;6(1):41-61.
- [66.] Blanc S, Schoeller D, Kemnitz J, Weindruch R, Colman R, Newton W, et al. Energy expenditure of rhesus monkeys subjected to 11 years of dietary restriction. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(1):16-23.
- [67.] Ramsey JJ, Hagopian K. Energy expenditure and restriction of energy intake: could energy restriction alter energy expenditure in companion animals? *J Nutr* 2006;136(7 Suppl):1958S-1966S.
- [68.] Wilson MM, Morley JE. Invited review: Aging and energy balance. *J Appl Physiol* 2003;95(4):1728-36.
- [69.] Mifflin MD, St Jeor ST, Hill LA, Scott BJ, Daugherty SA, Koh YO. A new predictive equation for resting energy expenditure in healthy individuals. *Am J Clin Nutr* 1990;51(2):241-7.
- [70.] Daly JM, Heymsfield SB, Head CA, Harvey LP, Nixon DW, Katzeff H, et al. Human energy requirements: overestimation by widely used prediction equation. *Am J Clin Nutr* 1985;42(6):1170-4.
- [71.] Roza AM, Shizgal HM. The Harris Benedict equation reevaluated: resting energy requirements and the body cell mass. *Am J Clin Nutr* 1984;40(1):168-82.
- [72.] Sukkar SG, Bogdanovic A. Interrelationships between body composition and energy expenditure in cancer malnutrition. The role of bioimpedance assessment. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2003;49(3):195-200.

- [73.] Garcia-Peris P, Lozano MA, Velasco C, de La Cuerda C, Iriondo T, Breton I, et al. Prospective study of resting energy expenditure changes in head and neck cancer patients treated with chemoradiotherapy measured by indirect calorimetry. *Nutrition* 2005;21(11-12):1107-12.
- [74.] Dickerson RN, White KG, Curcillo PG, 2nd, King SA, Mullen JL. Resting energy expenditure of patients with gynecologic malignancies. *J Am Coll Nutr* 1995;14(5):448-54.
- [75.] Bauer J, Reeves MM, Capra S. The agreement between measured and predicted resting energy expenditure in patients with pancreatic cancer: a pilot study. *Jop* 2004;5(1):32-40.
- [76.] da Rocha EE, Alves VG, Silva MH, Chiesa CA, da Fonseca RB. Can measured resting energy expenditure be estimated by formulae in daily clinical nutrition practice? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005;8(3):319-28.
- [77.] Frankenfield DC, Muth ER, Rowe WA. The Harris-Benedict studies of human basal metabolism: history and limitations. *J Am Diet Assoc* 1998;98(4):439-45.
- [78.] Kushner RF, Gudivaka R, Schoeller DA. Clinical characteristics influencing bioelectrical impedance analysis measurements. *Am J Clin Nutr* 1996;64(3 Suppl):423S-427S.

4. Cachexie cancéreuse et métabolisme énergétique mitochondrial musculaire

4.1. Article 3

Mitochondrial energetic metabolism in skeletal muscle of cancer cachectic patients,

Gyasi Johnson, Damien Roussel, Matthieu Arvier, Gérard Lorimier, Laurent Laccourreye, Bernard Enon, Vincent Blin, Yann Jousset, Jean-Pierre Arnaud, Yves Malthiery, Gilles Simard, Patrick Ritz.

L'une des caractéristiques principales de la cachexie cancéreuse est la perte de poids progressive que subissent les patients. Cette perte de poids mobilise les réserves de l'organisme à savoir la masse grasse mais aussi le muscle squelettique (Fearon et Preston, 1990). Cette perte de poids est lourde de conséquences sur la physiologie, la qualité de vie, le traitement et le pronostic du patient (Tisdale, 2002). Les mécanismes mis en jeu lors de cette perte de poids ne sont pas totalement élucidés. Toutefois, une inefficacité du tissu musculaire squelettique à produire de l'énergie pourrait contraindre l'organisme à oxyder plus de substrats et donc à mobiliser ses réserves d'une façon exacerbée. Ce tissu représente près de 40% de la masse corporelle et donc une influence non négligeable sur l'énergétique du corps entier (Forbes, 1987). Bosaeus *et al.* montrent qu'au cours de la cachexie, les mécanismes de régulation de la prise alimentaire peuvent être altérés, ce qui pourrait expliquer que tout en maintenant une prise alimentaire constante, les patients cachectiques ne puissent pas ajuster leur apports alimentaires aux besoins énergétiques, s'ils sont accrus (Bosaeus *et al.*, 2001).

L'objectif de ce troisième article était d'évaluer la relation entre la cachexie cancéreuse et le métabolisme énergétique musculaire en comparant des patients cancéreux cachectiques à des patients cancéreux non-cachectiques. La mitochondrie étant le principal site de production d'énergie dans la cellule, nous nous sommes penchés sur sa capacité à oxyder des substrats, à coupler les oxydations aux phosphorylations et à son efficacité à produire de l'énergie. Les capacités enzymatiques maximales des complexes de la chaîne respiratoire ont été mesurées. Nous avons évalué la perméabilité de la membrane interne mitochondriale puisqu'elle conditionne le couplage des réactions d'oxydations à celles de phosphorylations.

Notre équipe a mis au point une puce à ADN dédiée à la mitochondrie : la Mitoligo. Son objectif est de permettre l'étude des régulations transcriptionnelles des fonctions énergétiques. Elle inclut les gènes du métabolisme mitochondrial mais aussi ceux de la glycolyse, la

glycogénolyse, la néoglucogenèse, la bêta-oxydation des acides gras, la protéolyse ubiquitine-dépendante et la lipogenèse. Elle intègre aussi les gènes des facteurs de transcriptions et des facteurs hormonaux associés au métabolisme énergétique. En effet, l'altération de la fonction mitochondriale peut stimuler une expression transcriptionnelle des gènes liés à la phosphorylation oxydative et au métabolisme énergétique ceci afin de réguler une déplétion énergétique (Heddi *et al.*, 1999) . Ainsi, la Mitoligo permet d'établir des profils transcriptionnels énergétiques et de comparer les statuts des patients cancéreux cachectiques et des patients cancéreux non-cachectiques.

L'inflammation systémique chronique observée au cours de la cachexie cancéreuse est susceptible d'inhiber la chaîne respiratoire (Brown, 2001). Plus encore, une réaction inflammatoire musculaire pourrait avoir un impact sur la fonction mitochondriale. Au cours de cette étude, nous voulions établir un profil transcriptionnel inflammatoire du muscle squelettique afin d'évaluer si une régulation locale de l'inflammation pouvait influencer sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Ainsi, les niveaux de transcription de cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6, IL8, TNF- α , IFN- γ) ont été comparés entre nos deux groupes afin d'évaluer leurs profils inflammatoires musculaires.

Résultats et discussion

Les mesures des taux respiratoires mitochondriaux révèlent que les mitochondries musculaires des patients cachectiques oxydent les substrats (Pyruvate, palmitoyl-carnitine, succinate) de la même façon que pour les patients cancéreux non-cachectiques. Cependant, les taux respiratoires relevés chez les patients cachectiques semblent légèrement inférieurs à ceux des patients cancéreux non-cachectiques et à ceux des patients contrôles. Toutefois, aucune différence significative n'apparaît entre les trois groupes. Les capacités enzymatiques maximales des complexes I et II, voies d'entrée des substrats dans la chaîne respiratoire, sont identiques quelque soit le statut des patients. De même, l'analyse des cinétiques de fuite de protons révèle que la perméabilité membranaire aux protons est identique, que les patients soient cachectiques ou non. L'efficacité mitochondriale à synthétiser de l'énergie, reflétée par le rapport ATP/O, n'est pas affectée par le statut cachectique des patients.

Ainsi, malgré un état inflammatoire systémique nettement marqué chez les patients cancéreux cachectiques en comparaison avec des patients cancéreux non-cachectiques, la fonction et l'efficacité mitochondriales musculaires ne sont pas affectées par la cachexie cancéreuse au stade où nous l'avons étudiée.

L'étude de profils transcriptionnels énergétiques réalisés grâce à la Mitoligo montre qu'à ce stade de la cachexie aucune régulation transcriptionnelle ne différencie les patients cancéreux cachectiques des patients cancéreux non-cachectiques au niveau du muscle. Enfin, nos deux groupes de patients ne diffèrent pas en matière de profil inflammatoire musculaire. En effet, aucune des cytokines pro-inflammatoires mesurées ne présente de variation de niveau d'expression transcriptionnelle selon le statut cachectique.

Les résultats de cette étude ne vont pas dans le sens de ceux observés dans la littérature, à savoir, une chute de la fonction mitochondriale (Ushmorov *et al.*, 1999), un impact sur l'expression de gènes liés au métabolisme énergétique (protéines découplantes) (Bing *et al.*, 2000 ; Collins *et al.*, 2002), sur le catabolisme musculaire (protéolyse ATP ubiquitine dépendante) (Dejong *et al.*, 2005 ; Khal *et al.*, 2005-b) ou l'inflammation musculaire (Lonnroth *et al.*, 1990 ; Catalano *et al.*, 2003 ; Figueras *et al.*, 2005).

Cependant, dans ces précédentes études, les stades cachectiques observés étaient plus avancés que celui décrit ici, avec une perte de poids plus importante chez l'homme (de l'ordre de 18% dans l'étude de Dejong *et al.*) et une fonte musculaire significative chez l'animal. Ainsi, nos résultats nous suggèrent que les modifications observées sur la fonction mitochondriale à des stades plus tardifs sont secondaires à une perte de poids conséquente impliquant la masse grasse et la masse maigre de l'hôte.

Il est donc peu probable que la mitochondrie participe à une déplétion énergétique initiale du patient au cours de la cachexie cancéreuse. De plus, l'état inflammatoire systémique ne semble pas affecter l'énergétique musculaire du patient à ce stade.

Mitochondrial energetic metabolism in skeletal muscle of cancer cachectic patients,

Gyasi Johnson, Damien Roussel, Matthieu Arvier, Gérard Lorimier, Laurent Laccourreye, Bernard Enon, Vincent Blin, Yann Jousset, Jean-Pierre Arnaud, Yves Malthiery, Gilles Simard, Patrick Ritz.

ABSTRACT

The development of a progressive weight loss is probably the most common manifestation of cancer cachexia. Moreover, chronic inflammatory state is frequently associated with this syndrome. Skeletal muscle mass account for up to 40% of whole body weight and its wastage is associated with a poor prognostic. Tumour cell are known to have a reduced mitochondrial oxidation rate in favour to glycolytic pathways. During cancer, if cachectic state affects non-neoplastic tissues is unclear. In the present study, we investigated the relation between weight loss and non-neoplastic skeletal muscle mitochondrial ability to produce energy, comparing cachectic to non-cachectic cancer patients. Weight loss and chronic inflammatory state were significantly marked in the cachectic group. However, mitochondrial respiratory rates with pyruvate, palmitoyl-carnitine or succinate as substrates and activities of mitochondrial respiratory chain complexes were not affected by the cachectic state. Mitochondrial proton leak and energy synthesis efficiency reflected by the ATP/O ratio were similar in both groups. Moreover, transcriptional profiles of energy metabolism linked genes, analyzed with an energy dedicated microarray (Mitoligo) failed to discriminate skeletal muscle gene expressions from cachectic or non-cachectic states. Non-neoplastic skeletal muscle abilities to produce energy were not affected by cancer cachexia. Weight loss observed at this stage of the syndrome has probably little to do with mitochondrial energy synthesis impairment.

INTRODUCTION

Cachexia is responsible for up to 20% of cancer patient death (Tisdale, 2002). This syndrome is mainly characterized by metabolic abnormalities and a marked progressive body weight loss affecting both fat mass and muscles (Fearon and preston, 1990, Argiles *et al.*, 2003). Skeletal muscle mass loss is highly deleterious for those patients since it reduces quality of life and may lead to death through a reduction of pulmonary functions (Tisdale, 2001). Specific cachectic factors like the proteolysis inducing factor (PIF), cytokines and synthesis-degradation balance were shown to be involved in skeletal muscle wastage (Baracos., 2000 ; Melstrom *et al.*, 2007). Moreover, studies have revealed an impact of cancer on skeletal muscle mitochondrial functions that could contribute to decrease this tissue ability to synthesize energy.

The impact of malignancy on mitochondrial functions was observed as early as 1930 when Otto Warburg made the hypothesis that impairments of tumor cell respiratory capacity were responsible for an increased rate of aerobic glycolysis (Warburg, 1930). Subsequently, studies were conducted to clarify malignancy impact on mitochondrial functions in cancer cell (Modica-Napolitano and Singh, 2004). Lichtor and Dohrmann observed a decrease in respiratory capacities in tumour cells mitochondria (Lichtor and Dohrmann, 1986). Respiratory and enzyme activity deficiencies were observed in isolated hepatoma mitochondria (Boitier *et al.*, 1995). More recently, Wu *et al.* demonstrated a close link between decreased mitochondrial bioenergetic functions and the glycolysis pathway activity (Wu *et al.*, 2007-a).

Nevertheless, few are studies that have investigated the impact of malignancy on mitochondrial functions in non-neoplastic tissues of cachectic patients. Some observations are available from animal models. In rats bearing the Walker 256 carcinoma, Cummings and colleagues reported an impaired mitochondrial respiration in skeletal muscle (Cummings *et al.*, 1984). In cachectic sarcoma-bearing rats, Schneeberger and colleagues observed an energy depletion in skeletal muscle cells reflected by the increase of inorganic phosphate to ATP concentration ratio ($[Pi]/[ATP]$) (Schneeberger *et al.*, 1989). This variation was present prior to the decline of food intake and was correlated with tumor burden increase. They concluded that energy depletion of host tissues occurs in tissues that contribute to gluconeogenesis. Indeed, muscle breakdown may provide amino-acids that could contribute to glucose synthesis in liver and feed the tumor (Schneeberger *et al.*, 1989). More recently, Ushmorov *et al.* reported abnormally low mitochondrial respiratory chain activity in skeletal

muscle of cachectic mice bearing the fibrosarcoma MCA-105 (Ushmorov *et al.*, 1999). They concluded that this alteration was due to tumour induced reactive oxygen species.

In human, Collins and colleagues reported that uncoupling protein 3 (UCP3) mRNA expression was increased in skeletal muscle from weight losing patient with gastrointestinal adenocarcinoma. This expression was lower in weight stable cancer patients and healthy controls and similar in those two groups (Collins *et al.*, 2002). According to them, this may enhance energy expenditure and contribute to tissue catabolism. On the other hand, DeJong *et al.* found no difference in UCP3 mRNA and protein expression between weight-losing pancreatic cancer patients and weight-stable non-cancer patients (DeJong *et al.*, 2005). The authors concluded for a tumour types and burdens specific effects when comparing their results to those of Collins and colleagues.

None of these studies have addressed the question of the difference in mitochondrial phenotype between cachectic and non-cachectic cancer patients. The aim of the present study was to investigate skeletal muscle mitochondrial functions and gene expression during cachexia. In order to elucidate the impact of sole cachexia, we compared weight losing cachectic patients to weight stable non-cachectic cancer patients. We made the hypothesis that mitochondrial dysfunction could contribute to the progressive weight loss seen in cachectic cancer patients. Moreover, since mitochondrial functions were found to be altered in inflammatory states (Brown, 2001 ; Boulos *et al.*, 2003 ; Hunter *et al.*, 2007), we compared inflammatory gene profiles between cachectic and non-cachectic cancer patients.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chemicals and reagents were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) except for Tris and Tris-HCl that were purchased from Eurobio (Les Ulis, France), nagarse and KCN that were purchased from Fluka (Saint Quentin Fallavier, France). Triphenylmethylphosphonium (TPMP⁺) was purchased from Merck (VWR International S.A.S., Strasbourg, France), BSA, NADH and triton 100X were purchased from Roche-Boehringer (Meylan, France) and the bicinchoninic acid Assay kit was purchased from Interchim (Montluçon, France).

Subjects

The study population consisted of 38 clinically-stable cancer patients referred to the Hospital of Angers for surgical tumour resection. According to "Union Internationale Contre le Cancer" criteria, all patients selected were at stage II of the disease (local spread).

Fourteen patients of the group presented an early cancer-cachexia syndrome (cachectic patients: CP) and had lost $9.7 \% \pm 0.8$ of their pre-illness body weight in the previous six months. This group was formed of colon patients (adenocarcinoma, $n = 6$), non-small cell lung cancer patients ($n = 5$) and head and neck cancer patients (epidermoïd carcinoma, $n = 3$). Mean age was 60.2 ± 4 years and mean weight was 66.7 ± 4 kg.

Eighteen non-cachectic weight-losing patients (NCP) had lost less than 2% of their pre-illness weight. This group was formed of colon cancer patients (adenocarcinoma, $n = 3$), non-small cell lung cancer patients ($n = 6$) and head and neck cancer patients (epidermoïd carcinoma, $n = 9$). Mean age was 61.1 ± 3 years and mean weight was 78.0 ± 5 kg.

Five non-cancer patients hospitalized for orthopedic surgery were included in a control group. Their mean age was 72.2 ± 3 years and mean weight was 78.8 ± 6 kg. All patients underwent blood C-reactive protein (CRP) evaluation before surgery.

All patients gave written informed consent. The study was approved by the medical school ethical committee.

Skeletal muscle mitochondria

Muscle samples were obtained by surgical biopsy from the *vastus lateralis* of quadriceps in all cases. Mitochondria were isolated as previously described (Roussel *et al.*, 2000). Biopsies were weighed and immediately placed in an ice-cold isolation medium consisting of 100 mM sucrose, 50 mM KCl, 50 mM Tris, 5 mM EGTA, pH 7.4. Muscles were minced with scissors and homogenized using a Potter-Elvehjem homogenizer (5 passages). The homogenates were treated with nagarse (1 mg/g muscle wet weight) for 5 min in an ice bath after homogenization. The mixtures were diluted 1:2, homogenized and then centrifuged at 1000 g for 10 min. The resulting supernatants were filtered through cheesecloth and centrifuged at 10,000 g for 10 min. The pellets were washed twice by resuspension in 10 ml of isolation medium and centrifugation at 10,000 g for 10 min. Finally, the resulting pellets containing mitochondria were stored in ice-cold isolation medium. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid assay kit with bovine serum albumin used as a standard.

Mitochondrial respiration

Oxygen was measured using a Clark oxygen electrode (Oxytherm respirometer; Hansatech), in a 1.0 ml volume glass cell, thermostatically controlled at 37°C, with constant stirring. Mitochondria (0.6 mg protein/ml) were incubated in a respiratory reaction medium, consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM Hepes pH 7.4 and supplemented with 0.3% (w/v) bovine serum albumin and saturated with room air. Substrate concentrations were 5 mM pyruvate + 2.5 mM malate, 40 µM palmitoyl-l-carnitine + 2.5 mM malate. The active state of respiration (state 3) was initiated by the addition of 500 µM ADP. The basal non-phosphorylating respiration rate (state 4-oligomycin) was obtained by adding 3.6 µg/ml of oligomycin (6 µg/mg of mitochondrial proteins). The uncoupled state of respiration was initiated by the addition of 2 µM of carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP).

Mitochondrial ATP synthesis

ADP-stimulated mitochondria ATP production rate was measured by exploiting a coupled-enzyme system linked to NADPH production as previously described by Cairns *et al.* (Cairns *et al.*, 1998). The coupled enzyme detection system (1 mM glucose, 0.5 mM NADP, 1 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase and 0.9 IU/ml hexokinase) was then combined with 10 mM succinate + 7.5 µM rotenone and respiratory reaction medium, consisting of 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 3 mM Hepes pH 7.4, 0.3% (w/v) bovine serum albumin. After the addition of 0.6 mg/ml of isolated mitochondria, the rate of NADPH formation in response to 5 mM ADP was measured at 37°C at 340 nm using a spectrophotometer (Beckman DU-640B). Parallel measurements were made with 3.6 µg/ml of oligomycin. The rate of ATP synthesis specifically from oxidative phosphorylation was then determined by subtracting the oligomycin-insensitive rate from the total rate. ATP/O was the ratio of ATP synthesis following the addition of ADP to the oxygen consumption rate under the same conditions.

Mitochondrial enzyme activities

Activities of citrate synthase and the electron transport chain complexes (complex I, II and IV) were measured spectrophotometrically (Beckman DU-640B) at 37°C in the muscle mitochondria suspensions through modified procedures of Malgat *et al.* (Malgat *et al.*, 1999) in agreement with the Mitochondrial Diseases group of the Association Française de Myopathie.

The activity of citrate synthase was measured in reaction medium consisting of 100 mM Tris/HCl, 40 µg/ml 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid), 1 mM oxaloacetate, 0.3 mM acetyl CoA and 4 % of Triton X 100, pH 8.1. After 3 min of incubation, the reaction was initiated by adding the biological material (10 µg proteins of isolated mitochondria suspensions) and the change in optical density at 412 nm was recorded over 1.5 min.

Complex I activity was measured in reaction medium containing 50 mM phosphate buffer, 3.75 mg/ml fatty acid free bovine serum albumin, 0.1 mM decylubiquinone with or without 0.01 mM rotenone and biological material (10 µg proteins of isolated mitochondria suspensions). After 3 min of incubation at 37°C, the reaction was initiated by adding 0.1 mM NADH. The activity was measured at 340 nm by monitoring the oxidation of NADH.

The activity of succinate dehydrogenase (complex II) was measured by following the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) in the presence of phenazine methosulfate (PMS) at 600 nm. Isolated mitochondria (5 µg proteins of isolated mitochondria suspensions) were pre-incubated in a buffer containing 50 mM KH₂PO₄, 16 mM succinate, 1.5 mM KCN, 100 µM PMS, pH 7.5 for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 103 µM DCPIP and the optical density was recorded for 1.5 min.

The activity of cytochrome-c oxidase (complex IV) was measured by monitoring the oxidation of reduced cytochrome c at 550 nm. A 50 µM solution of reduced cytochrome c (92 to 97% reduced using dithionite) in 10 mM KH₂PO₄, pH 7.0 was pre-incubated over 5 min. The reaction was initiated by adding the isolated mitochondria (5 µg proteins of isolated mitochondria suspensions) and the change in optical density was measured over 1.5 min.

Kinetic response of proton leak

Respiration rate and membrane potential were measured simultaneously using electrodes sensitive to oxygen and to the potential-dependent probe triphenylmethylphosphonium (TPMP⁺). Mitochondria (0.6 mg of protein/ml) were suspended in assay medium containing 120 mM KCl, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0.3% bovine serum albumin (w/v) and 3 mM Hepes, pH 7.4 and supplemented with 5 µM rotenone, 1 µg/ml oligomycin and 80 ng/ml nigericin. The TPMP electrode was calibrated by sequential 0.5 µM additions up to 2 µM TPMP⁺, and 4 mM succinate was added to start the reaction. Respiration and membrane potential were progressively inhibited through successive steady-states induced by the addition of malonate. After each run, 2 µM FCCP was added to dissipate the membrane potential and release all TPMP back into the medium for baseline correction. Membrane potentials were calculated as previously described by Brand (Brand, 1995), assuming a TPMP

binding correction of 0.35 ($\mu\text{l}/\text{mg protein}$)-1 for skeletal muscle mitochondria (Rolfe *et al.*, 1994). For the interpretation of these results, we will assume that no redox slip occurred in the mitochondrial electron transport chain under any of the experimental conditions that we examined, keeping in mind that if a slip in the proton pumps did occur, then although our results would remain valid, their underlying mechanism could be due in part to slip.

Transcriptional analysis

Total RNA extraction

Total RNA (tRNA) was extracted from 30 mg of tissues samples from cachectic, non-cachectic and control patients with the RNeasy® fibrous tissue mini kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

RT-PCR

Relative changes in RNA of pro-inflammatory cytokines IL1, IL6, IL8, TNF- α , IFN- γ among groups were examined by Real-time reverse transcriptase polymerase-chain reactions. Analyses were carried out by the "Service Commun de Cytométrie et d'Analyses Nucléotidiques" from Angers University, using a Chromo 4 tm (Bio-Rad) and SYBR® Green detection. Primers were designed using Primer3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). These analyses were made on 7 cachectic patients, 4 non-cachectic patients and 5 controls.

Microarray

Cy3- and Cy5-labelled (amplified) aRNA were prepared using the Amino Allyl Message AmpII aRNA Amplification Kit (Ambion). The reference sample consisted of a pool of equal amount of aRNA obtained after amplification of tRNA from each control patient and was labelled with Cy5 (Amersham). Within each group (including control group), two replicate tRNA-extractions per patient were prepared using the Amino Allyl MessageAmpII aRNA Amplification Kit (Ambion) and labeled individually with Cy3 (Amersham). Each Cy3-labeled sample was mixed with an equal amount of the Cy5- labeled reference sample, pre-incubated with yeast tRNA and polyA RNA, and hybridized to the microarrays. These analyses were made on 5 cachectic patients, 3 non-cachectic patients and 5 controls.

Genes expression measurements

Microarrays were prepared in-house from the “Plateforme Puces à ADN-Ouest Génopole, Nantes, France” using 50-mer oligonucleotides probes. Probes were diluted in spotting buffer-A (25 μ M in buffer A 1x, Ocimum) and spotted onto epoxysilane-coated glass slides (Slide E, Schott nexterion) using the Lucidea Array Spotter from Amersham. Immediately after spotting, slides were incubated at 42°C and 55% humidity for 12 h. Slides were washed once in 0.2% SDS, twice in water then incubated for 20 minutes in water at 50°C, dried by centrifugation (1000 rpm, 3 minutes, 20°C) and stored at 20°C.

The 600 genes that were represented on the microarray were selected for their involvement in the mitochondrial related metabolism. Each gene was spotted in triplicate on microarrays. Hybridized arrays were scanned at 10 μ m/pixel resolution by fluorescence confocal microscopy (Scanarray 3000, GSI-Lumonics). Signal intensities were extracted with Genepix Pro 5.1.0.19 image-analysis software (Axon Instruments, USA). Data were retained based on concordance between the measurements of different types of replicates: biological replicates, technical replicates and combined biological and technical replicates.

Microarray data analysis

Microarray raw data were analyzed using Genespring GX 7.0 (Agilent technologies). Data were normalized using Lowess normalization and per-chip median normalization. Normalized data were compared using ANOVA followed by student t-test. Microarray data are available in the GEO database under the accession number GSE9042.

Statistical analysis

Results were expressed as mean $\pm$ SE. The comparisons between CP and NCP were made using independent sample T-test. Comparisons of cancer patients with controls were made using a one-way ANOVA and using the Dunnett post-hoc test. A p value < 0.05 was considered significant in all cases. Analyses were performed using SPSS for Windows (version 13.0).

RESULTS

Table 1 reports the respiratory parameters of mitochondria isolated from skeletal muscles of cachectic and non-cachectic patients. The rates of oxygen consumption in mitochondria respiring on pyruvate/malate were similar in cachectic and non-cachectic patient groups. There were no statistical difference between cancer patients and controls. For cachectic

patients, the state 4 respiration rate of mitochondria respiring on palmitoyl-carnitine/malate was significantly decreased compared with non-cachectic patients. The other respiratory rates of mitochondria respiring on palmitoyl-carnitine/malate were not significantly different in both groups and were similar to the controls.

The oxygen consumptions of mitochondria respiring on succinate were identical for cachectic and non-cachectic patients (Table 2). The ATP/O ratios of both groups were similar. All the respiratory chain enzyme activities measured were statistically identical for cachectic and non-cachectic patients (Table3). NADH-ubiquinone reductase and succinate dehydrogenase activities were significantly lower in cancer patients compared to controls.

Figure 1 shows the kinetics of proton leak in skeletal muscle mitochondrial respiring on succinate from cachectic and non-cachectic skeletal muscles. The rates of proton leak of both groups were the same at any membrane potential value. Basal proton conductance did not differ between the two groups. Maximum leak dependent respirations (state 4) of mitochondria respiring on succinate were not significantly different when cachectic and non-cachectic patients were compared.

Although cachectic patients had higher blood CRP levels compared to non-cachectic patients (Table 4), no transcript level of genes related to inflammatory response differed between these two groups. Relative transcriptional levels of IL1, IL6, IL8, TNF- α , IFN- γ , were identical in both groups. Moreover, microarray analysis failed to show any discrepancy between cachectic and non-cachectic cancer patients in the expression of genes encoding for proteins involved in mitochondrial functions.

DISCUSSION

In the present study, we observed that although cachectic cancer patients did present a marked weight loss and inflammatory state, their skeletal muscle mitochondrial functions were not different from that of non-cachectic cancer patients. Both groups had similar substrate oxidation rates and their mitochondrial electron-transport chain (ETC) enzyme activities were reduced. Moreover, the coupling of oxidations to phosphorylations and the mitochondrial efficiency to produce energy were similar in both groups. Skeletal muscle transcriptional profiles of cachectic and non-cachectic cancer patients were similar.

Our results show that, during cachexia, the capacity to oxidize substrates was not altered in non-neoplastic skeletal muscle cells. This was observed either for maximal physiological respiration (state 3) or maximal non-physiological respiration (unc state3). Therefore, in our

context, weight loss observed during cancer cachexia has probably little to do with any mitochondrial inability or deficiency for substrate oxidations. The oxygen consumption rates measured in our control group were in accordance with previous studies (Ogasahara *et al.*, 1989 ; Scholte *et al.*, 1997 ; Boitier *et al.*, 1998). Therefore we concluded that the tumor impact on mitochondria respiration may be limited to the tumor area and was not extended to non-neoplastic skeletal muscle tissues, neither in cachectic nor in non-cachectic patients.

To investigate further the mitochondrial electron-transport chain function, we measured the enzyme activities of the substrate-entry complexes (Complex I and II) and the oxygen linked complex (Complex IV). Indeed, inhibition of these complexes up to a critical value could have been induced by cachectic or tumor factors without affecting the mitochondrial respiration as a biochemical threshold effect (Letellier *et al.*, 1993 ; Rossignol *et al.*, 2003). The mitochondrial contents, reflected by the citrate synthase activity were the same in all groups and were in accordance with previous studies (Hanna *et al.*, 1998 ; De Meirleir *et al.*, 2004). No specific effect of cachexia on skeletal muscle mitochondria ETC enzyme activities was observed. Nevertheless a cancer effect was noted as a significant reduction of complexes I and II activities was noted in cancer patients compared to non-cancer patients. Whereas moderate weight loss induces increase of oxidative capacity of skeletal muscle oxidative phosphorylations in obese adults (Menshikova *et al.*, 2007) cancer reduces these capacities. All, ETC enzyme activities we measured in both cachectic and non-cachectic patients seemed reduced compared to controls although only complexes I and II had significant activity decreases. This drop may reflect a reduction of the mitochondria density and or mitochondrial inner-membrane surface area. In this situation, the formation of mitochondrial complexes may be reduced. Complexes I and II are the substrates entry way to ETC and their reduction may represent a way of limiting oxidative phosphorylations during cancer. Nevertheless, the reduced activities of these two complexes did not affect mitochondrial respiratory capacities. According to a biochemical threshold effect, this drop in enzymes activities may not be sufficient to induce functional changes.

Since oxygen consumption is coupled to ATP synthesis in mitochondria, we investigated the mitochondrial efficiency to synthesize energy i.e. the ATP/O ratio. Mitochondrial efficiency ratio were identical for cachectic and non cachectic patients and they were consistent with that described previously i.e. 1.4 (Hinkle, 2005). Hence, skeletal muscle mitochondria of cachectic patients were as efficient as non-cachectic patients one to synthesize energy. In our study, no energy wastage in skeletal muscle mitochondria could account for weight loss in the cachectic state.

The mitochondrial inner membrane permeability to protons that conditioned the quality of oxidative phosphorylations coupling was similar for cachectic and non-cachectic cancer patients and revealed well coupled mitochondria in both groups. Maximal membrane potential (near 190 mV) was reached in the two groups. The overall inner mitochondrial membrane properties were unaffected by cachexia. Nevertheless, respiratory state 4 of mitochondria respiring on palmitoyl-carnitine/malate was reduced in the cachectic group compared to non-cachectic patients. This may represent an early step of minimizing inner mitochondrial membrane permeability to protons. This was not confirmed by proton leak kinetics.

Cancer cachexia is known to induce the expression of a variety of genes in skeletal muscle such as genes involved in proteolysis (Khal *et al.*, 2005 ; DeJong *et al.*, 2005), inflammation (Figueras *et al.*, 2005) and mitochondria functions (Collins *et al.*, 2002 ; Busquets *et al.*, 2005). As far as mitochondrial genes are concerned, cachexia is known to upregulate the expression of uncoupling proteins 2 and 3 in skeletal muscle (Collins *et al.*, 2002 ; Busquets *et al.*, 2005). Inflammatory state induced by cachexia increases the expression of pro-inflammatory cytokines like TNF α (Khal *et al.*, 2005). In our study, both mitochondrial and inflammatory genes expressions failed to discriminate the cachectic status from the non-cachectic one. Compared to previous studies, the lack of transcriptional discrepancy in our cancer patients set may be attributed mainly to tumour types and burden. Indeed, our groups were composed of different tumours types what could have interfered with genes expression levels. Moreover, severe cachexia like that seen in cancer end-stages may have provided a specific transcriptional profile but, at that stage no therapeutic intervention would have been conceivable. Dejong *et al.*, who proceeded with a single type of tumour (pancreatic cancers), found no difference in UCP2 and UCP3 expression between cachectic patients and controls (DeJong *et al.*, 2005). Transcriptional results observed with animals were obtained under a severe weight loss (Busquets *et al.*, 2005) which was not comparable with that reported in our study. Finally, our study compared cachectic to non-cachectic cancer patients where other studies compared cachectic patients to non-cancer patients or healthy controls. We found no transcriptional expression profile to distinguish the cancer cachexia state from the non-cachectic cancer state.

In the present study, early cachexia was not associated with skeletal muscle mitochondria dysfunctions and no relationship could be made between weight loss and mitochondria. Nevertheless, it can not be excluded that mitochondria may be implied in muscle wasting

mechanism through other functions and under the influence of cachectic factors like the proteolysis inducing factor.

PIF induces skeletal muscle proteolysis and its active glycosylated form was detected only in cachectic patients (Todorov *et al.*, 1996 ; Cariuk *et al.*, 1997 ; Wigmore *et al.*, 2000). Smith and Tisdale observed that PIF was able to induce apoptosis in muscular cells (Smith and Tisdale, 2003). Recently, Deans and colleagues demonstrated that expression of the core-protein mRNA of PIF was upregulated not only in tumor cells but also in adjacent normal tissues (Deans *et al.*, 2006). According to them, this upregulation may also concern distant tissues but the relevance of this expression remains unclear (Deans *et al.*, 2006). Moreover, Busquet and colleagues revealed that apoptosis was present in skeletal muscle of cachectic patients (Busquet *et al.*, 2007). We can thus hypothesise that skeletal muscle loss seen during cachexia might imply mitochondria as an apoptosis inducer.

The absence of difference in mitochondrial functions in non-neoplastic skeletal muscle mitochondria between cachectic and non-cachectic patients may be due to the early disease stage of our cachectic patients. Indeed, mitochondrial dysfunctions described in animal models were observed at severe stages of cachexia, when tumour weight could represent up to 12% of the animal body weight (Cummings *et al.*, 1984 ; Schneeberger *et al.*, 1989, Ushmorov *et al.*, 1999). Such dysfunction could be observed in advanced stages of cachexia in human but this remains to be demonstrated. It is probable that skeletal muscle wasting in cachexia may involve mitochondria bioenergetics impairments and mitochondria apoptosis functions since apoptosis was found to be preceded by mitochondrial membranes permeability deficiency and mitochondrial respiratory-enzyme activity impairments (Wu *et al.*, 2007 (b)). If so, it would be possible boost mitochondria functions by providing it with limiting elements (as coenzyme Q10) and thus limit body tissues wastage.

In the present study we observed that early cachectic status of cancer patients was not associated with mitochondrial dysfunctions or specific transcriptional profile in non-neoplastic skeletal muscle compared to non-cachectic cancer patients. Hence mitochondria may not contribute to weight loss at this early stage of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Laurence Preisser and Marie-Hélène Guilleux from Service Commun de Cytométrie et d'Analyses Nucléotidiques from Institut Fédératif de Recherche 132 and the for their assistance for RT-PCR quantification. We wish to thank the "Plateforme Puces à ADN-Ouest Génopole", Nantes, France for their technical support for the microarray technology.

TABLES AND FIGURES

Figure 1: Effect of cancer cachexia on kinetics of proton leak in skeletal muscle mitochondria. The kinetics of proton leak were measured in mitochondria respiring on 4 mM succinate from cachectic and non-cachectic patient skeletal muscles. Proton leak kinetics were measured with succinate and oligomycin and titrated with malonate. The conditions used for these measurements are described in the experimental section.

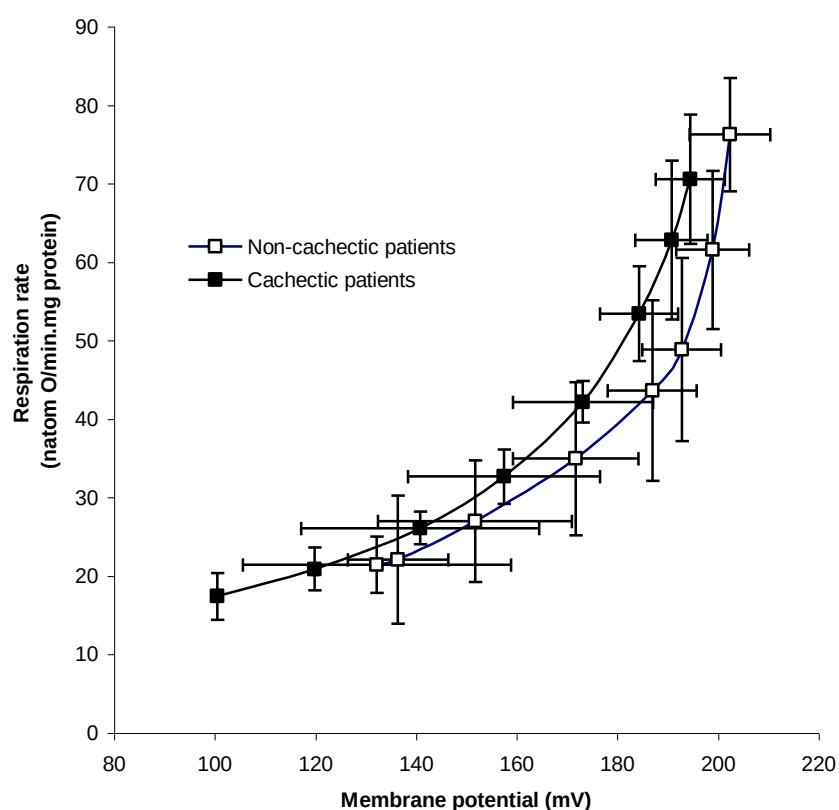


Table 1: Effect of cancer cachexia on skeletal muscle mitochondria respiration rates with pyruvate/malate or palmitoyl-carnitine/malate as substrate.

	Patients		
Respiratory substrates	Cachectics	Non-cachectics	Controls
Pyruvate/malate			
State 3	105 ± 13	137 ± 19	129 ± 16
State 4	28 ± 6	45 ± 10	33 ± 5
State 3unc	172 ± 20	183 ± 25	226 ± 58
RCR	3.8 ± 0.6	3.0 ± 1.4	3.9 ± 0.74
Palmitoyl-carnitine/malate			
State 3	97 ± 14	153 ± 23	190 ± 42
State 4	21 ± 3†	48 ± 8	43.9 ± 10
State 3unc	143 ± 19	207 ± 26	244 ± 55
RCR	4.6 ± 0.6	3.1 ± 0.4	4.4 ± 0.4

Values are expressed as means ± SE; respiration rates are expressed as nmol O/mg protein-1.

†P< 0.01 vs non-cachectic patients.

Table 2: Effect of cancer cachexia on ATP/O ratio of skeletal muscle mitochondria with succinate + rotenone as substrate.

	Patients	
	Cachectics	Non-cachectics
Succinate + rotenone	120 ± 5	165 ± 11
ATP/O	1.38 ± 0.09	1.35 ± 0.06

Values are expressed as means ± SE; respiration rates are expressed as nmol O/mg protein-1.

Table 3: Effect of cancer cachexia on skeletal muscle mitochondria enzymatic activities.

Enzyme activities	Patients		Controls
	Cachectics	Non-cachectics	
NADH-ubiquinone reductase	80 ± 10*	78 ± 8*	149 ± 50
Succinate dehydrogenase	118 ± 24†	119 ± 22†	278 ± 60
Cytochrome-c oxydase	778 ± 180	717 ± 147	1168 ± 114
Citrate synthase	913 ± 113	1053 ± 186	1322 ± 134

Values are expressed as means ± SE; enzymatic activities are expressed as nmol/min mg protein-1. *P< 0.05 vs. controls, †P< 0.01 vs. controls

Table 4: Effect of cancer cachexia on C-Reactive Protein levels.

	Patients		Controls
	Cachectics	Non-cachectics	
C-Reactive Protein (mg/L)	23.8 ± 5.3	7.8 ± 1.7†	2.8 ± 0.5†

Values are expressed as means ± SE; †P< 0.01 vs. cachectic patients.

REFERENCES

- Argiles JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, Busquets S, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003 Apr;35(4):405-9. Review.
- Baracos VE. Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia. *Nutrition.* 2000 Oct;16(10):1015-8. Review.
- Boitier E, Merad-Boudia M, Guguen-Guillouzo C, Defer N, Ceballos-Picot I, Leroux JP, Marsac C. Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radicals. *Cancer Res.* 1995 Jul 15;55(14):3028-35.
- Boitier E, Degoul F, Desguerre I, Charpentier C, Francois D, Ponsot G, Diry M, Rustin P, Marsac C. A case of mitochondrial encephalomyopathy associated with a muscle coenzyme Q10 deficiency. *J Neurol Sci.* 1998;156(1):41-6.
- Boulos M, Astiz ME, Barua RS, Osman M. Impaired mitochondrial function induced by serum from septic shock patients is attenuated by inhibition of nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) synthase. *Crit Care Med.* 2003 Feb;31(2):353-8.
- Brand M. Measurement of mitochondrial protonmotive force. In: *Bioenergetics - a Practical Approach.* Oxford: IRL Press, 1995.
- Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Mar 1;1504(1):46-57. Review.
- Busquets S, Almendro V, Barreiro E, Figueras M, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Activation of UCPs gene expression in skeletal muscle can be independent on both circulating fatty acids and food intake. Involvement of ROS in a model of mouse cancer cachexia. *FEBS Lett.* 2005 Jan 31;579(3):717-22.
- Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, Lopez-Soriano FJ, Fearon KC, Argiles JM. Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clin Nutr.* 2007 Aug 2; [Epub ahead of print]

Cairns CB, Walther J, Harken AH, Banerjee A. Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. *Am J Physiol.* 1998 May;274(5 Pt 2):R1376-83.

Cariuk P, Lorite MJ, Todorov PT, Field WN, Wigmore SJ, Tisdale MJ. Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients. *Br J Cancer.* 1997;76(5):606-13.

Collins P, Bing C, McCulloch P, Williams G. Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans. *Br J Cancer.* 2002 Feb 1;86(3):372-5.

Cummings J, Willmott N, Calman KC. Effect of a subcutaneously growing Walker 256 carcinosarcoma on host tissue mitochondrial function and magnesium content. *Cancer Res.* 1984 Apr;44(4):1333-6.

De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, De Clercq I, Eyskens F, Gerlo E, Smet J, Van Coster R. Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet.* 2004 Feb;41(2):120-4.

Deans DA, Wigmore SJ, Gilmour H, Tisdale MJ, Fearon KC, Ross JA. Expression of the proteolysis-inducing factor core peptide mRNA is upregulated in both tumour and adjacent normal tissue in gastro-oesophageal malignancy. *Br J Cancer.* 2006 Mar 13;94(5):731-6.

DeJong CH, Busquets S, Moses AG, Schrauwen P, Ross JA, Argiles JM, Fearon KC. Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. *Oncol Rep.* 2005 Jul;14(1):257-63.

Fearon KC, Preston T. Body composition in cancer cachexia. *Infusionstherapie.* 1990 Apr;17 Suppl 3:63-6.

Figueras M, Busquets S, Carbo N, Almendro V, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia results in an increase in TNF-alpha receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue. *Int J Oncol.* 2005 Sep;27(3):855-60.

Hanna MG, Nelson IP, Rahman S, Lane RJ, Land J, Heales S, Cooper MJ, Schapira AH, Morgan-Hughes JA, Wood NW. Cytochrome c oxidase deficiency associated with the first stop-codon point mutation in human mtDNA. *Am J Hum Genet.* 1998 Jul;63(1):29-36.

Hinkle PC. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Jan 7;1706(1-2):1-11. Review.

Hunter RL, Dragicevic N, Seifert K, Choi DY, Liu M, Kim HC, Cass WA, Sullivan PG, Bing G. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. *J Neurochem.* 2007 Mar;100(5):1375-86.

Khal J, Wyke SM, Russell ST, Hine AV, Tisdale MJ. Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia. *Br J Cancer.* 2005 Oct 3;93(7):774-80.

Letellier T, Malgat M, Mazat JP. Control of oxidative phosphorylation in rat muscle mitochondria: implications for mitochondrial myopathies. *Biochim Biophys Acta.* 1993 Feb 8;1141(1):58-64.

Lichter T, Dohrmann GJ. Respiratory patterns in human brain tumors. *Neurosurgery.* 1986 Dec;19(6):896-9.

Malgat M LT, Durrieu G, Mazat JP. Enzymatic and polarographic measurements of the respiratory chain complexes. In: *Mitochondrial diseases.* Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1999.

Melstrom LG, Melstrom KA Jr, Ding XZ, Adrian TE. Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia. *Histol Histopathol.* 2007 Jul;22(7):805-14. Review.

Menshikova EV, Ritov VB, Ferrell RE, Azuma K, Goodpaster BH, Kelley DE. Characteristics of skeletal muscle mitochondrial biogenesis induced by moderate-intensity exercise and weight loss in obesity. *J Appl Physiol.* 2007 Jul;103(1):21-7.

Modica-Napolitano JS, Singh KK. Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*. 2004 Sep;4(5-6):755-62.

Ogasahara S, Engel AG, Frens D, Mack D. Muscle coenzyme Q deficiency in familial mitochondrial encephalomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2379-82.

Rolfe DF, Hulbert AJ, Brand MD. Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Dec 30;1188(3):405-16.

Rossignol R, Faustin B, Rocher C, Malgat M, Mazat JP, Letellier T. Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*. 2003 Mar 15;370(Pt 3):751-62. Review.

Roussel D, Lhenry F, Ecochard L, Sempore B, Rouanet JL, Favier R. Differential effects of endurance training and creatine depletion on regional mitochondrial adaptations in rat skeletal muscle. *Biochem J*. 2000 Sep 1;350 Pt 2:547-53.

Schneeberger AL, Thompson RT, Driedger AA, Finley RJ, Inculet RI. Effect of cancer on the in vivo energy state of rat liver and skeletal muscle. *Cancer Res*. 1989 Mar 1;49(5):1160-4.

Scholte HR, Yu Y, Ross JD, Oosterkamp II, Boonman AM, Busch HF. Rapid isolation of muscle and heart mitochondria, the lability of oxidative phosphorylation and attempts to stabilize the process in vitro by taurine, carnitine and other compounds. *Mol Cell Biochem*. 1997 Sep ;174(1-2):61-6.

Smith HJ, Tisdale MJ. Induction of apoptosis by a cachectic-factor in murine myotubes and inhibition by eicosapentaenoic acid. *Apoptosis*. 2003 Mar;8(2):161-9.

Tisdale MJ. Loss of skeletal muscle in cancer: biochemical mechanisms. *Front Biosci*. 2001 Feb 1;6:D164-74. Review.

Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. 2002 Nov;2(11):862-71. Review.

Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K, Tisdale M. Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature*. 1996 Feb 22;379(6567):739-42.

Ushmorov A, Hack V, Droge W. Differential reconstitution of mitochondrial respiratory chain activity and plasma redox state by cysteine and ornithine in a model of cancer cachexia. *Cancer Res*. 1999 Jul 15;59(14):3527-34.

Warburg, O., 1930 *Metabolism of tumors*, Arnold Constable, London.

Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ, Fearon KC. Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *Br J Surg*. 2000 Jan;87(1):53-8.

Wu M (a) , Neilson A, Swift AL, Moran R, Tamagnine J, Parslow D, Armistead S, Lemire K, Orrell J, Teich J, Chomicz S, Ferrick DA. Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007 Jan;292(1):C125-36.

Wu KL (b), Hsu C, Chan JY. Impairment of the mitochondrial respiratory enzyme activity triggers sequential activation of apoptosis-inducing factor-dependent and caspase-dependent signalling pathways to induce apoptosis after spinal cord injury. *J Neurochem*. 2007 Jun;101(6):1552-66.

5. Conclusion et perspectives

La perte de poids observée au cours de la cachexie cancéreuse est multifactorielle et met en cause une augmentation des cytokines circulantes, ainsi que de nombreux troubles métaboliques (Tisdale *et al.*, 1996). Les premières études se sont focalisées sur la supplémentation alimentaire et l'apport hypercalorique comme moyens de limiter la perte de poids observée au cours de la cachexie. Cependant, ces études révèlent que dans ces conditions, seules la masse grasse et la teneur en eau des patients sont augmentées lorsqu'une prise de poids est observée avec peu ou pas d'effets sur la masse maigre (Kotler, 2000 ; Simons *et al.*, 1998). Ces résultats ont permis d'affirmer que la prise alimentaire avait peu ou pas d'incidence sur la perte de poids chez le patient cachectique, d'autant plus que certains présentent une perte de poids malgré des apports alimentaires inchangés (Bosaeus *et al.*, 2001).

L'équilibre énergétique de l'organisme résulte du bilan entre les entrées et les sorties. Pour cette raison, de nombreuses études se sont penchées sur la mesure de la dépense énergétique de repos chez les patients cancéreux cachectiques. Effectivement, une augmentation des dépenses énergétiques de repos de ces patients pourrait expliquer une fonte des réserves de l'organisme. Cette augmentation pourrait aussi expliquer que, malgré une prise alimentaire inchangée chez certains patients, cette dernière ne correspond plus aux dépenses que l'état cachectique impose. La dépense énergétique de repos est principalement dépendante de la masse maigre et peu de la masse grasse. Effectivement, la variation de masse maigre explique 60 à 85% de la variation de la dépense énergétique de repos (Cunningham, 1991 ; Bosy-Westphal *et al.*, 2004). Ainsi, lorsque les résultats sont normalisés par la masse maigre, les dépenses énergétiques de repos mesurées ne sont pas systématiquement augmentées par l'état cachectique (Hansell *et al.*, 1986-c). Il semble donc que le syndrome cachectique observé au cours du cancer ne puisse pas être caractérisé par une augmentation de la dépense énergétique de repos puisque celle-ci n'est pas systématique. Néanmoins, dans certains types de cancers (pulmonaires par exemple) (Jebb *et al.*, 1994) ou à des stades avancés de cancer, elle peut expliquer une part de la perte de poids.

Les observations faites sur les tissus cancéreux en matière d'efficacité mitochondriale (Lo *et al.*, 1968 ; Pedersen *et al.*, 1971 ; Boitier *et al.*, 1995 ; Wu *et al.*, 2007) ont initié de nombreuses investigations sur l'efficacité du métabolisme énergétique mitochondrial de tissus non-tumoraux au cours de la cachexie cancéreuse (Cummings *et al.*, 1984 ; Isidoro *et al.*, 2004; Perumal *et al.*, 2005; Kuhnt *et al.*, 2007). En effet, une chute de la capacité de l'organisme à produire de l'énergie à partir de substrats issus de l'alimentation, conjuguée à une demande accrue en énergie de la tumeur pourrait conduire à une fonte drastique des

réserve énergétique de l'hôte. Plus encore, cette situation pourrait contribuer, associée aux facteurs cachectiques, à faire du muscle squelettique une source de combustible en matière d'acides aminés pour la néoglucogenèse hépatique.

Les études sur l'animal plaident en faveur d'une diminution des capacités oxydatives des mitochondries au cours de la cachexie dans le muscle (Cummings *et al.*, 1984 ; Ushmorov *et al.*, 1999). Comme dans les tissus tumoraux, les cellules musculaires semblent s'orienter vers un métabolisme glycolytique, énergétiquement peu rentable au détriment des fonctions d'oxydations phosphorylantes mitochondriales. Toutefois, les études portant sur le métabolisme énergétique mitochondrial au cours de la cachexie cancéreuse au sein du muscle squelettique sont peu nombreuses.

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes assurés que l'impact d'une restriction alimentaire sur le métabolisme énergétique mitochondrial (Article 1) ne serait pas un biais dans notre analyse chez l'homme. Nous avons observé que la restriction calorique a une influence sur la mitochondrie à court terme en fonction du degré de cette restriction. Cet impact est significatif à 50% de restriction mais n'affecte pas le couplage entre les oxydations et les phosphorylations. Il induit une chute de la consommation mitochondriale d'oxygène et de la fuite basale de protons. Cette étude montre qu'une régulation du métabolisme énergétique mitochondrial musculaire est possible malgré un poids de muscle constant lors de la perte de poids. Ainsi, dès 3 jours de restriction, le muscle est capable de participer à la réduction du métabolisme de base. Cependant, cette adaptation mitochondriale n'est pas proportionnelle à l'intensité de la restriction comme nous pouvions présumer. Toutefois, la chute de la consommation en oxygène, de la fuite basale de protons ainsi que l'augmentation de l'activité enzymatique du complexe IV suggèrent que dès 3 jours de restriction alimentaire, des mécanismes de lutte ou de limitation de la production de radicaux libres oxygénés soient mis en place.

Les patients inclus dans notre étude ne présentaient peu ou pas de chute de leur prise alimentaire. Ceci nous a conforté dans l'idée que notre analyse du métabolisme énergétique ne serait pas biaisée par une restriction calorique.

Notre deuxième étude visait à mesurer le retentissement de la cachexie cancéreuse sur la dépense énergétique de repos des patients. Pour cette raison nous avons comparé des patients cancéreux cachectiques à des patients cancéreux non cachectiques. Plus encore, nous nous sommes penchés sur la précision des équations prédictives à calculer une dépense énergétique

de repos chez le patient cachectique. Cette étude (article 2) révèle que les patients cachectiques ont une dépense énergétique comparable à celle des patients cancéreux non-cachectiques malgré une perte de poids nette. Cette perte de poids concerne principalement la masse grasse des patients, compartiment corporel dont la participation à la dépense énergétique de base est faible (Bosy-Westphal *et al.*, 2004). Cependant, les troubles métaboliques qui accompagnent la cachexie cancéreuse tels que la lipolyse du tissu adipeux et l'inflammation chronique, ne contribuent pas à une élévation de la dépense énergétique de repos. Nous émettons l'hypothèse qu'au stade de cachexie cancéreuse observé, la dépense énergétique de repos mesurée résulte d'une compensation des dépenses énergétiques de différentes voies métaboliques. En effet, au cours de la cachexie cancéreuse de nombreuses voies métaboliques sont exacerbées telles la protéolyse, la lipolyse, la production de protéines pro-inflammatoires, la glycolyse anaérobie. Ces dysfonctionnements génèrent un coût énergétique important d'autant plus qu'ils échappent aux régulations habituelles. Cependant, l'augmentation de ces voies métaboliques se fait au détriment d'autres voies dont le coût énergétique est par conséquent réduit. Au cours de la cachexie cancéreuse la protéosynthèse musculaire et la lipogenèse sont fortement réduites (Lelbach *et al.*, 2007). Il en est de même pour la synthèse de protéines anti-inflammatoires et les protéines nutritionnelles. Il est possible qu'en regard d'un coût énergétique augmenté pour certaines voies, d'autres dépenses soient minimisées. Un tel équilibre tendrait petit à petit vers un hypermétabolisme au cours de la maladie. Les équipes de Weston et de Zyllicz *et al.* observent chez le rat Walker 256 qu'au cours de la cachexie cancéreuse, la thermogenèse induite par l'alimentation est réduite alors que la dépense énergétique de repos est augmentée (Weston *et al.*, 1989 ; Zyllicz *et al.*, 1990). Ainsi, même au-delà de la dépense énergétique de repos, certaines dépenses semblent réduites. Les premières études réalisées sur la cachexie cancéreuse portaient principalement sur des patients en stades avancés de la maladie (Warren, 1932). Chez ces patients, la fonte des tissus musculaires et adipeux était forte et la dépense énergétique de repos probablement augmentée par des facteurs de complication de la cachexie. Les études récentes se sont penchées sur des stades de plus en plus précoces de la maladie afin d'observer les mécanismes initiaux et d'intervenir au plus tôt sur la perte de poids. De ce fait, les variations de la dépense énergétique de repos rapportées dans ces études sont beaucoup moins nettes que celles observées aux stades plus tardifs (Ravasco *et al.*, 2007).

L'utilisation d'équations prédictives pour calculer la dépense énergétique de repos de patients cachectiques souffre de l'absence de données sur la composition corporelle de ces patients. Effectivement, lorsque la dépense énergétique de repos prédite n'est pas normalisée, cette

prédiction tend à sous-estimer le résultat. La prise en compte du compartiment le plus contributeur à la dépense énergétique de repos (la masse maigre) permet d'avoir une estimation plus fine. Lorsque la prédiction est faite à partir des équations de Harris et Benedict (Harris et Benedict, 1918), l'utilisation de facteurs correctifs tel que nous l'avons fait (article 2) permet d'avoir des prédictions non-normalisées plus proches des valeurs mesurées et donc plus utiles en milieu clinique où l'évaluation des différents compartiments corporels est rare. Toutefois, ces deux méthodes ne peuvent pas prédire avec précision la dépense énergétique individuelle des patients cachectiques. Elles induisent un biais sur l'estimation individuelle dont l'importance clinique est non négligeable ($\pm 25\%$ par rapport à la valeur mesurée). La meilleure solution est encore de mesurer cette dépense énergétique de repos. Malheureusement, cette mesure, associée à l'évaluation de la composition corporelle du patient implique un coût (financier et en personnel) qui limite encore son application.

Dans une situation pathologique où la demande en énergie de la tumeur impose ses priorités au métabolisme de l'hôte, une chute de l'efficacité de production d'énergie peut représenter un handicap majeur pour le maintien de l'intégrité corporelle. La mitochondrie est un organite dynamique qui joue un rôle central dans le métabolisme cellulaire. Sa fonction principale est la fourniture d'énergie cellulaire grâce à des réactions qui couplent l'oxydation des substrats à la phosphorylation d'ADP en ATP. Ainsi, l'altération de l'efficacité de la mitochondrie à fournir de l'énergie peut participer à un déficit énergétique et à une perte de poids en mobilisant les réserves de l'organisme. Une telle éventualité dans le muscle squelettique représente un déficit énergétique important compte tenu de la part pondérale et métabolique de ce tissu (Forbes, 1987).

L'analyse du métabolisme énergétique mitochondrial au sein du muscle squelettique que nous avons menée (article 3) révèle qu'au cours de la cachexie cancéreuse, la fonction mitochondriale n'est pas altérée au regard de celle de patients cancéreux non-cachectiques. Il en est de même pour le couplage entre les réactions d'oxydations et de phosphorylations et pour l'efficacité de la mitochondrie à synthétiser de l'énergie. Ces résultats suggèrent qu'aux stades précoces de la cachexie cancéreuse, l'implication de la mitochondrie dans un déficit énergétique est minime puisque ces capacités semblent maintenues.

Nous n'avons pas observé de différence en matière de profils d'expression transcriptionnelle entre nos patients cachectiques et ceux non-cachectiques. L'expression des gènes mitochondriaux est identique dans les deux groupes. Etant donné l'absence d'incidence de la cachexie sur la fonction et l'efficacité mitochondriale, si toutefois des régulations ont lieu,

elles sont post-transcriptionnelles. Cependant, bien que les patients cachectiques présentent un état inflammatoire plus marqué que ceux non-cachectiques, leurs profils d'expressions inflammatoires ne diffèrent pas dans le muscle. Chez les patients cachectiques, l'inflammation systémique n'est pas associée à une régulation transcriptionnelle inflammatoire musculaire comme elle peut l'être à d'autres stades ou dans d'autres situations (Frost et Lang, 2005). Une inflammation musculaire aurait probablement un effet sur la fonction mitochondriale.

La place de la mitochondrie dans le mécanisme de perte de poids au cours de la cachexie cancéreuse, dans les conditions où nous l'avons observée semble minime. Le muscle squelettique, en particulier le quadriceps, à un métabolisme énergétique mitochondrial peu ou pas altéré en comparaison à des patients cancéreux non-cachectiques. Toutefois, en émettant l'hypothèse qu'au cours d'une cachexie plus avancée des altérations mitochondriales sont susceptibles d'être plus nettes, il serait intéressant de compléter cette étude par d'autres mesures. Effectivement, l'activité enzymatique du complexe III de la chaîne respiratoire ainsi que celle de l'ATP synthase permettraient d'avoir une vue globale de la capacité maximale de la chaîne respiratoire entière. De même, l'étude de la composition des lipides membranaires mitochondriaux pourrait renseigner sur la fluidité membranaire et la stabilité d'ancrage des complexes de la chaîne respiratoire. Puisque le nombre de copies d'ADN mitochondrial est fonction du besoin énergétique cellulaire (Wu *et al.*, 2005), l'évaluation du contenu en ADN mitochondrial musculaire pourrait être informatif du statut énergétique musculaire chez le patient cachectique.

Il est envisageable que l'influence de la tumeur sur le métabolisme mitochondrial musculaire soit loco-régionale. Cette hypothèse implique un gradient d'influence de la tumeur sur le tissu musculaire squelettique en fonction de son éloignement. Des biopsies musculaires péri-tumorales prélevées sur des patients cancéreux cachectiques et non-cachectiques sont actuellement à l'étude afin de déterminer l'influence de la proximité tumorale sur le métabolisme énergétique mitochondrial.

6. Bibliographie

Akerblom, I. and L. Murry (1998). Human cachexia associated protein. P. A. Incyte Pharmaceuticals Inc., CA. USA. 628413 (5,834,192).

Al-Majid, S. And D.O. McCarthy (2001). "Cancer-induced fatigue and skeletal muscle wasting: the role of exercise." *Biol Res Nurs* 2(3): 186-97.

Aleman, M.R., F. Santolaria, N. Batista, M. de La Vega, E. Gonzalez-Reimers, A. Milena, M. Llanos and J.L. Gomez-Sirvent (2002). "Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition?" *Cytokine* 19(1): 21-6.

Amalric, F. (2007), *Analyse économique des coûts du cancer en France. Etudes et expertises*, Institut national du cancer.

Andreyev, H.J., A.R. Norman, J. Oates and D. Cunningham (1998). "Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies?" *Eur J Cancer* 34(4): 503-9.

Arbeit, J.M., D. E. Lees, R. Corsey and M. F. Brennan (1984). "Resting energy expenditure in controls and cancer patients with localized and diffuse disease." *Ann Surg* 199(3): 292-8.

Ardawi, M.S., M.F. Majzoub, I. M. Masoud and E.A. Newsholme (1989). "Enzymic and metabolic adaptations in the gastrocnemius, plantaris and soleus muscles of hypocaloric rats." *Biochem J* 261(1): 219-25.

Argiles, J.M., S. Busquets and F.J. Lopez-Soriano (2003-a). "Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6(4): 401-6.

Argiles, J.M., S. Busquets and F.J. Lopez-Soriano (2005). "The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer." *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 2036-46.

Argiles, J.M., S. Busquets, F.J. Lopez-Soriano and M. Figueras (2006). "[Pathophysiology of neoplastic cachexia]." *Nutr Hosp* 21 Suppl 3: 4-9.

Argiles, J.M. and F.J. Lopez-Soriano (1999). "The role of cytokines in cancer cachexia." *Med Res Rev* 19(3): 223-48.

Argiles, J.M., R. Moore-Carrasco, S. Busquets and F.J. Lopez-Soriano (2003-b). "Catabolic mediators as targets for cancer cachexia." *Drug Discov Today* 8(18): 838-44.

Asakawa, A., A. Inui, T. Kaga, H. Yuzuriha, T. Nagata, N. Ueno, S. Makino, M. Fujimiya, A. Niijima, M.A. Fujino and M. Kasuga (2001). "Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin." *Gastroenterology* 120(2): 337-45.

Attaix, D., E. Aurousseau, L. Combaret, A. Kee, D. Larbaud, C. Ralliere, B. Souweine, D. Taillandier and T. Tilignac (1998). "Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in skeletal muscle." *Reprod Nutr Dev* 38(2): 153-65.

Bachmann, P. (2004). Le patient cancéreux a-t-il des besoins nutritionnels spécifiques? Specific nutritional needs of patient with cancer. *Médecine et nutrition - Micronutriments*. Joué-les-Tours, France. 40: 129-134.

Bao, Y., C. Bing, L. Hunter, J.R. Jenkins, M. Wabitsch and P. Trayhurn (2005). "Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes." *FEBS Lett* 579(1): 41-7.

Baracos, V.E. (2000). "Regulation of skeletal-muscle-protein turnover in cancer-associated cachexia." *Nutrition* 16(10): 1015-8.

Baracos, V.E. (2006). "Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms." *Annu Rev Nutr* 26: 435-61.

Barber, M.D., D.C. McMillan, A.M. Wallace, J.A. Ross, T. Preston and K.C. Fearon (2004). "The response of leptin, interleukin-6 and fat oxidation to feeding in weight-losing patients with pancreatic cancer." *Br J Cancer* 90(6): 1129-32.

- Barber, M.D., J.J. Powell, S.F. Lynch, N.J. Gough, K.C. Fearon and J.A. Ross (1999-b). "Two polymorphisms of the tumour necrosis factor gene do not influence survival in pancreatic cancer." *Clin Exp Immunol* 117(3): 425-9.
- Barber, M.D., J.A. Ross and K.C. Fearon (1999-a). "Changes in nutritional, functional, and inflammatory markers in advanced pancreatic cancer." *Nutr Cancer* 35(2): 106-10.
- Baumann, H. and J. Gauldie (1994). "The acute phase response." *Immunol Today* 15(2): 74-80.
- Baumgartner, R.N., K.M. Koehler, L. Romero and P.J. Garry (1996). "Serum albumin is associated with skeletal muscle in elderly men and women." *Am J Clin Nutr* 64(4): 552-8.
- Beck, S.A., P. Groundwater, C. Barton and M.J. Tisdale (1990). "Alterations in serum lipolytic activity of cancer patients with response to therapy." *Br J Cancer* 62(5): 822-5.
- Bevilacqua L., J.J. Ramsey, K. Hagopian, R. Weindruch, M.E. Harper (2004). "Effects of short- and medium-term calorie restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production". *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 286(5):E852-61.
- Bevilacqua L., J.J. Ramsey, K. Hagopian, R. Weindruch, M.E. Harper (2005). "Long-term caloric restriction increases UCP3 content but decreases proton leak and reactive oxygen species production in rat skeletal muscle mitochondria". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(3):E429-38.
- Bibby, M.C., J.A. Double, S.A. Ali, K.C. Fearon, R.A. Brennan and M.J. Tisdale (1987). "Characterization of a transplantable adenocarcinoma of the mouse colon producing cachexia in recipient animals." *J Natl Cancer Inst* 78(3): 539-46.

- Bing, C., M. Brown, P. King, P. Collins, M.J. Tisdale and G. Williams (2000). "Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia." *Cancer Res* 60(9): 2405-10.
- Bing, C., S.T. Russell, E.E. Beckett, P. Collins, S. Taylor, R. Barraclough, M.J. Tisdale and G. Williams (2002). "Expression of uncoupling proteins-1, -2 and -3 mRNA is induced by an adenocarcinoma-derived lipid-mobilizing factor." *Br J Cancer* 86(4): 612-8.
- Bing, C., S. Taylor, M.J. Tisdale and G. Williams (2001). "Cachexia in MAC16 adenocarcinoma: suppression of hunger despite normal regulation of leptin, insulin and hypothalamic neuropeptide Y." *J Neurochem* 79(5): 1004-12.
- Bland J.M. and D.G. Altman (1986). "Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement". *Lancet*. 8;1(8476):307-10.
- Bodine, S.C., E. Latres, S. Baumhueter, V.K. Lai, L. Nunez, B.A. Clarke, W.T. Poueymirou, F.J. Panaro, E. Na, K. Dharmarajan, Z.Q. Pan, D.M. Valenzuela, T.M. DeChiara, T.N. Stitt, G. D. Yancopoulos and D.J. Glass (2001). "Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy." *Science* 294(5547): 1704-8.
- Boitier, E., M. Merad-Boudia, C. Guguen-Guillouzo, N. Defer, I. Ceballos-Picot, J.P. Leroux and C. Marsac (1995). "Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radicals." *Cancer Res* 55(14): 3028-35.
- Bosaeus, I., P. Daneryd and K. Lundholm (2002). "Dietary intake, resting energy expenditure, weight loss and survival in cancer patients." *J Nutr* 132(11 Suppl): 3465S-3466S.
- Bosaeus, I., P. Daneryd, E. Svanberg and K. Lundholm (2001). "Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients." *Int J Cancer* 93(3): 380-3.

- Bossola, M., M. Muscaritoli, P. Costelli, R. Bellantone, F. Pacelli, S. Busquets, J. Argiles, F.J. Lopez-Soriano, I. M. Civello, F.M. Baccino, F. Rossi Fanelli and G. B. Doglietto (2001). "Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(5): R1518-23.
- Bossola, M., M. Muscaritoli, P. Costelli, G. Grieco, G. Bonelli, F. Pacelli, F. Rossi Fanelli, G.B. Doglietto and F.M. Baccino (2003). "Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients." *Ann Surg* 237(3): 384-9.
- Bossola, M., F. Pacelli, A. Tortorelli and G.B. Doglietto (2007). "Cancer cachexia: it's time for more clinical trials." *Ann Surg Oncol* 14(2): 276-85.
- Bosy-Westphal A., U. Reinecke, T. Schlorke, K. Illner, D. Kutzner, M. Heller, M.J. Muller (2004). "Effect of organ and tissue masses on resting energy expenditure in underweight, normal weight and obese adults". *Int J Obes Relat Metab Disord*. 28(1):72-9.
- Bouffet, E., T. Philip, C. Negrier, M. French, D. Frappaz, O. Gentilhomme, A. Gianella-Borradori, M. Brunat-Mentigny and J.Y. Blay (1997). "Phase I study of interleukin-6 in children with solid tumours in relapse." *Eur J Cancer* 33(10): 1620-6.
- Boulier, A., A.L. Thomasset and M. Apfelbaum (1992). "Bioelectrical-impedance measurement of body water." *Am J Clin Nutr* 55(3): 761-2.
- Boulos, M., M.E. Astiz, R.S. Barua and M. Osman (2003). "Impaired mitochondrial function induced by serum from septic shock patients is attenuated by inhibition of nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) synthase." *Crit Care Med* 31(2): 353-8.
- Boveris, A., S. Alvarez and A. Navarro (2002). "The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock." *Free Radic Biol Med* 33(9): 1186-93.
- Bozzetti F., A.M. Pagnoni, M. Del Vecchio (1980). "Excessive caloric expenditure as a cause of malnutrition in patients with cancer". *Surg Gynecol Obstet*. 150(2):229-34.

- Brand, M. (1994). "The stoichiometry of proton pumping and ATP synthesis in mitochondria." *The Biochemist* 16: 20-24.
- Brand, M. (1995). *Measurement of mitochondrial protonmotive force. Bioenergetics: A Practical Approach.*, Oxford.
- Brennan, M.F. (1977). "Uncomplicated starvation versus cancer cachexia." *Cancer Res* 37(7 Pt 2): 2359-64.
- Brink, M., A. Anwar and P. Delafontaine (2002). "Neurohormonal factors in the development of catabolic/anabolic imbalance and cachexia." *Int J Cardiol* 85(1): 111-21, discussion 121-4.
- Brown, D.R., D.E. Berkowitz and M.J. Breslow (2001-b). "Weight loss is not associated with hyperleptinemia in humans with pancreatic cancer." *J Clin Endocrinol Metab* 86(1): 162-6.
- Brown, G.C. (2001-a). "Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase." *Biochim Biophys Acta* 1504(1): 46-57.
- Brownlee M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." *Nature*. 13;414(6865):813-20.
- Burt, M.E., S.F. Lowry, C. Gorschboth and M.F. Brennan (1981). "Metabolic alterations in a noncachectic animal tumor system." *Cancer* 47(9): 2138-46.
- Busquets, S., V. Almendro, E. Barreiro, M. Figueras, J.M. Argiles and F.J. Lopez-Soriano (2005-b). "Activation of UCPs gene expression in skeletal muscle can be independent on both circulating fatty acids and food intake. Involvement of ROS in a model of mouse cancer cachexia." *FEBS Lett* 579(3): 717-22.
- Busquets, S., N. Carbo, V. Almendro, M. Figueras, F.J. Lopez-Soriano and J.M. Argiles (2001). "Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia?" *FEBS Lett* 505(2): 255-8.

- Busquets, S., C. Deans, M. Figueras, R. Moore-Carrasco, F.J. Lopez-Soriano, K.C. Fearon and J.M. Argiles (2007). "Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastrointestinal cancer patients." *Clin Nutr*.
- Busquets, S., M.T. Figueras, S. Meijnsing, N. Carbo, L.S. Quinn, V. Almendro, J.M. Argiles and F.J. Lopez-Soriano (2005-a). "Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: a direct effect." *Int J Mol Med* 16(3): 471-6.
- Busquets, S., D. Sanchis, B. Alvarez, D. Ricquier, F.J. Lopez-Soriano and J.M. Argiles (1998). "In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis?" *FEBS Lett* 440(3): 348-50.
- Cabal-Manzano, R., P. Bhargava, A. Torres-Duarte, J. Marshall and I.W. Wainer (2001). "Proteolysis-inducing factor is expressed in tumours of patients with gastrointestinal cancers and correlates with weight loss." *Br J Cancer* 84(12): 1599-601.
- Cairns, C.B., J. Walther, A.H. Harken and A. Banerjee (1998). "Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles." *Am J Physiol* 274(5 Pt 2): R1376-83.
- Callahan, L.A., D.A. Stofan, L.I. Szweda, D.E. Nethery and G.S. Supinski (2001). "Free radicals alter maximal diaphragmatic mitochondrial oxygen consumption in endotoxin-induced sepsis." *Free Radic Biol Med* 30(1): 129-38.
- Cariuk, P., M.J. Lorite, P.T. Todorov, W.N. Field, S.J. Wigmore and M.J. Tisdale (1997). "Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients." *Br J Cancer* 76(5): 606-13.
- Catalano M.G., N. Fortunati, K. Arena, P. Costelli, M. Aragno, O. Danni, G. Boccuzzi (2003). "Selective up-regulation of tumor necrosis factor receptor I in tumor-bearing rats with cancer-related cachexia". *Int J Oncol*. 23(2):429-36.

- Collins, P., C. Bing, P. McCulloch and G. Williams (2002). "Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans." *Br J Cancer* 86(3): 372-5.
- Cori, C. and G. Cori (1925). "The carbohydrate metabolism of tumors. I. The free sugar, lactic acid, and glycogen content of malignant tumors." *Journal of Biological Chemistry*. 64(1): 11-22.
- Costa, G. (1977). "Cachexia, the metabolic component of neoplastic diseases." *Cancer Res* 37(7 Pt 2): 2327-35.
- Costa, G., P. Bewley, M. Aragon and J. Siebold (1981). "Anorexia and weight loss in cancer patients." *Cancer Treat Rep* 65 Suppl 5: 3-7.
- Costelli, P. and F.M. Baccino (2003). "Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6(4): 407-12.
- Costelli, P., M. Bossola, M. Muscaritoli, G. Grieco, G. Bonelli, R. Bellantone, G.B. Doglietto, F.M. Baccino and F. Rossi Fanelli (2002). "Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca(2+)-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats." *Cytokine* 19(1): 1-5.
- Costelli, P., M. Muscaritoli, M. Bossola, R. Moore-Carrasco, S. Crepaldi, G. Grieco, R. Autelli, G. Bonelli, F. Pacelli, F.J. Lopez-Soriano, J.M. Argiles, G.B. Doglietto, F.M. Baccino and F. Rossi Fanelli (2005). "Skeletal muscle wasting in tumor-bearing rats is associated with MyoD down-regulation." *Int J Oncol* 26(6): 1663-8.
- Costelli, P., M. Muscaritoli, M. Bossola, F. Penna, P. Reffo, A. Bonetto, S. Busquets, G. Bonelli, F.J. Lopez-Soriano, G.B. Doglietto, J.M. Argiles, F.M. Baccino and F.R. Fanelli (2006). "IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291(3): R674-83.

- Costelli, P., R.D. Tullio, F.M. Baccino and E. Melloni (2001). "Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia." *Br J Cancer* 84(7): 946-50.
- Crouser, E.D., M.W. Julian, D.V. Blaho and D.R. Pfeiffer (2002). "Endotoxin-induced mitochondrial damage correlates with impaired respiratory activity." *Crit Care Med* 30(2): 276-84.
- Cummings, J., N. Willmott and K.C. Calman (1984). "Effect of a subcutaneously growing Walker 256 carcinosarcoma on host tissue mitochondrial function and magnesium content." *Cancer Res* 44(4): 1333-6.
- Cunningham, C.C., C.R. Malloy and G.K. Radda (1986). "Effect of fasting and acute ethanol administration on the energy state of in vivo liver as measured by ³¹P-NMR spectroscopy." *Biochim Biophys Acta* 885(1): 12-22.
- Cunningham, J.J. (1991). "Body composition as a determinant of energy expenditure: a synthetic review and a proposed general prediction equation." *Am J Clin Nutr* 54(6): 963-9.
- Cunningham, T.J., L. Hodge, D. Speicher, D. Reim, C. Tyler-Polsz, P. Levitt, K. Eagleson, S. Kennedy and Y. Wang (1998). "Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin." *J Neurosci* 18(18): 7047-60.
- Dalgleish, A.G. and K.J. O'Byrne (2002). "Chronic immune activation and inflammation in the pathogenesis of AIDS and cancer." *Adv Cancer Res* 84: 231-76.
- De Blaauw, I., N.E. Deutz and M.F. Von Meyenfeldt (1997). "Metabolic changes in cancer cachexia--first of two parts." *Clin Nutr* 16(4): 169-76.
- De Lima, T.M., M.M. Lima, D.C. Almeida, J.R. Mendonca and R. Curi (2005). "Cachexia induced by Walker 256 tumor growth causes rat lymphocyte death." *Cancer Immunol Immunother* 54(2): 179-86.

- Deans, C. and S.J. Wigmore (2005). "Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(3): 265-9.
- Deans, D.A., A. Davies, I. Penman, J. Plevris, D. Patel, A.C. de Beaux and S. Paterson-Brown (2004). "Value of endoscopic ultrasonography as a predictor of long-term survival in oesophageal carcinoma (Br J Surg 2003; 90: 1367-1372)." *Br J Surg* 91(2): 252.
- Deans, D.A., S.J. Wigmore, H. Gilmour, S. Paterson-Brown, J.A. Ross and K.C. Fearon (2006). "Elevated tumour interleukin-1beta is associated with systemic inflammation: A marker of reduced survival in gastro-oesophageal cancer." *Br J Cancer* 95(11): 1568-75.
- DeJong, C.H., S. Busquets, A.G. Moses, P. Schrauwen, J.A. Ross, J.M. Argiles and K.C. Fearon (2005). "Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia." *Oncol Rep* 14(1): 257-63.
- Dempsey, D.T., I.D. Feurer, L.S. Knox, L.O. Crosby, G.P. Buzby and J.L. Mullen (1984). "Energy expenditure in malnourished gastrointestinal cancer patients." *Cancer* 53(6): 1265-73.
- Dewhirst, M.W., D. Thrall and E. MacEwen (2002). Spontaneous pet animal cancers. *Tumor Models in Cancer Research.*, Teicher B. A. Humana Press, Totowa, NJ.
- Dewys, W.D. (1979). "Anorexia as a general effect of cancer." *Cancer* 43(5 Suppl): 2013-9.
- Dewys, W.D., C. Begg, P.T. Lavin, P.R. Band, J.M. Bennett, J.R. Bertino, M.H. Cohen, H.O. Douglass Jr., P.F. Engstrom, E.Z. Ezdinli, J. Horton, G.J. Johnson, C.G. Moertel, M.M. Oken, C. Perlia, C. Rosenbaum, M.N. Silverstein, R.T. Skeel, R.W. Sponzo and D.C. Tormey (1980). "Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group." *Am J Med* 69(4): 491-7.

- Dixit, V.D., E.M. Schaffer, R.S. Pyle, G.D. Collins, S.K. Sakthivel, R. Palaniappan, J.W. Lillard Jr. and D.D. Taub (2004). "Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells." *J Clin Invest* 114(1): 57-66.
- Double, J.A. and M.C. Bibby (1989). "Therapeutic index: a vital component in selection of anticancer agents for clinical trial." *J Natl Cancer Inst* 81(13): 988-94.
- Duffield, J.S. (2003). "The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde." *Clin Sci (Lond)* 104(1): 27-38.
- Dulloo A.G and L. Girardier (1993) "24 hour energy expenditure several months after weight loss in the underfed rat: evidence for a chronic increase in whole-body metabolic efficiency". *Int J Obes Relat Metab Disord* 17(2):115-23.
- Dumas J.F., D. Roussel, G. Simard, O. Douay, F. Foussard, Y. Malthiery, P. Ritz (2004). "Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria." *Biochim Biophys Acta* 1670(2):126-31.
- Dworzak, F., P. Ferrari, C. Gavazzi, C. Maiorana and F. Bozzetti (1998). "Effects of cachexia due to cancer on whole body and skeletal muscle protein turnover." *Cancer* 82(1): 42-8.
- Eden, E., S. Edstrom, K. Bennegard, T. Schersten and K. Lundholm (1984). "Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding." *Cancer Res* 44(4): 1718-24.
- Edstrom, S., L.G. Kindblom, L. Lindmark and K. Lundholm (1986). "Metabolic and morphologic changes in brown adipose tissue from non-growing mice with an isogeneic sarcoma. Evaluation with respect to development of cachexia." *Int J Cancer* 37(5): 753-60.

- Elborn, J.S., S.M. Cordon, P.J. Western, I.A. Macdonald and D.J. Shale (1993). "Tumour necrosis factor-alpha, resting energy expenditure and cachexia in cystic fibrosis." *Clin Sci (Lond)* 85(5): 563-8.
- Emery, P.W. (1999). "Cachexia in experimental models." *Nutrition* 15(7-8): 600-3.
- Espat, N.J., T. Auffenberg, J.J. Rosenberg, M. Rogy, D. Martin, C.H. Fang, P.O. Hasselgren, E.M. Copeland and L.L. Moldawer (1996). "Ciliary neurotrophic factor is catabolic and shares with IL-6 the capacity to induce an acute phase response." *Am J Physiol* 271(1 Pt 2): R185-90.
- Falconer, J.S., K.C. Fearon, C.E. Plester, J.A. Ross and D.C. Carter (1994). "Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer." *Ann Surg* 219(4): 325-31.
- Falconer, J.S., K.C. Fearon, J.A. Ross, R. Elton, S.J. Wigmore, O.J. Garden and D.C. Carter (1995). "Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer." *Cancer* 75(8): 2077-82.
- Fearon, K.C. (1992). "The Sir David Cuthbertson Medal Lecture 1991. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer." *Proc Nutr Soc* 51(2): 251-65.
- Fearon, K.C., J.S. Falconer, C. Slater, D.C. McMillan, J.A. Ross and T. Preston (1998). "Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response." *Ann Surg* 227(2): 249-54.
- Fearon, K.C., D.T. Hansell, T. Preston, J.A. Plumb, J. Davies, D. Shapiro, A. Shenkin, K.C. Calman and H.J. Burns (1988). "Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer." *Cancer Res* 48(9): 2590-5.
- Fearon, K.C., D.C. McMillan, T. Preston, F.P. Winstanley, A.M. Cruickshank and A. Shenkin (1991). "Elevated circulating interleukin-6 is associated with an acute-phase response but reduced fixed hepatic protein synthesis in patients with cancer." *Ann Surg* 213(1): 26-31.

Fearon, K.C. and A.G. Moses (2002). "Cancer cachexia." *Int J Cardiol* 85(1): 73-81.

Fearon, K.C. and T. Preston (1990). "Body composition in cancer cachexia." *Infusionstherapie* 17 Suppl 3: 63-6.

Fein, R., D.P. Kelsen, N. Geller, M. Bains, P. McCormack and M.F. Brennan (1985). "Adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. Prognostic factors and results of therapy." *Cancer* 56(10): 2512-8.

Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet and P. Boyle (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." *Ann Oncol* 18(3): 581-92.

Figueras M., S. Busquets, N. Carbo, V. Almendro, J.M. Argiles, F.J. Lopez-Soriano (2005). "Cancer cachexia results in an increase in TNF-alpha receptor gene expression in both skeletal muscle and adipose tissue". *Int J Oncol.* 27(3):855-60.

Flier, J.S. (1998). "Clinical review 94: What's in a name? In search of leptin's physiologic role." *J Clin Endocrinol Metab* 83(5): 1407-13.

Foltz, A.T., G. Gaines and M. Gullatte (1996). "Recalled side effects and self-care actions of patients receiving inpatient chemotherapy." *Oncol Nurs Forum* 23(4): 679-83.

Forbes G. B. (1987). "Human Body Composition: Growth, Aging, Nutrition, and Activity". Springer-Verlag.

Forrest, L.M., D.C. McMillan, C.S. McArdle, W.J. Angerson and D.J. Dunlop (2004). "Comparison of an inflammation-based prognostic score (GPS) with performance status (ECOG) in patients receiving platinum-based chemotherapy for inoperable non-small-cell lung cancer." *Br J Cancer* 90(9): 1704-6.

Foubert, J. (2006). "Cancer-related anaemia and fatigue: assessment and treatment." *Nurs Stand* 20(36): 50-7.

- Fouladiun, M., U. Korner, I. Bosaeus, P. Daneryd, A. Hylander and K.G. Lundholm (2005). "Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones." *Cancer* 103(10): 2189-98.
- Fredrix, E.W., P.B. Soeters, M.J. Rouflart, M.F. von Meyenfeldt and W.H. Saris (1991-c). "Resting energy expenditure in patients with newly detected gastric and colorectal cancers." *Am J Clin Nutr* 53(5): 1318-22.
- Fredrix, E.W., P.B. Soeters, E.F. Wouters, I.M. Deerenberg, M.F. von Meyenfeldt and W.H. Saris (1991-a). "Effect of different tumor types on resting energy expenditure." *Cancer Res* 51(22): 6138-41.
- Fredrix, E.W., E.F. Wouters, P.B. Soeters, A.C. van der Aalst, A.D. Kester, M.F. von Meyenfeldt and W.H. Saris (1991-b). "Resting energy expenditure in patients with non-small cell lung cancer." *Cancer* 68(7): 1616-21.
- Friedman, J.M. and J.L. Halaas (1998). "Leptin and the regulation of body weight in mammals." *Nature* 395(6704): 763-70.
- Frost R.A. and C.H. Lang (2005). "Skeletal muscle cytokines: regulation by pathogen-associated molecules and catabolic hormones". *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 8(3):255-63. Review.
- Fuhrman, M.P., P. Charney and C.M. Mueller (2004). "Hepatic proteins and nutrition assessment." *J Am Diet Assoc* 104(8): 1258-64.
- Fujimoto-Ouchi, K., S. Tamura, K. Mori, Y. Tanaka and H. Ishitsuka (1995). "Establishment and characterization of cachexia-inducing and -non-inducing clones of murine colon 26 carcinoma." *Int J Cancer* 61(4): 522-8.
- Garcia-Martinez, C., F.J. Lopez-Soriano and J.M. Argiles (1993). "Acute treatment with tumour necrosis factor-alpha induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle." *Mol Cell Biochem* 125(1): 11-8.

- Garcia-Martinez, C., F.J. Lopez-Soriano and J.M. Argiles (1994). "Interleukin-6 does not activate protein breakdown in rat skeletal muscle." *Cancer Lett* 76(1): 1-4.
- Garcia, J.M., M. Garcia-Touza, R.A. Hijazi, G. Taffet, D. Epner, D. Mann, R.G. Smith, G.R. Cunningham and M. Marcelli (2005). "Active ghrelin levels and active to total ghrelin ratio in cancer-induced cachexia." *J Clin Endocrinol Metab* 90(5): 2920-6.
- Gibney, E., M. Elia, S.A. Jebb, P. Murgatroyd and G. Jennings (1997). "Total energy expenditure in patients with small-cell lung cancer: results of a validated study using the bicarbonate-urea method." *Metabolism* 46(12): 1412-7.
- Gomes, M.D., S.H. Lecker, R.T. Jagoe, A. Navon and A.L. Goldberg (2001). "Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(25): 14440-5.
- Gonzales-Pacheco D.M., W.C. Buss, K.M. Koehler, W.F. Woodside, S.S. Alpert (1993). "Energy restriction reduces metabolic rate in adult male Fisher-344 rats". *J Nutr.* 123(1):90-7.
- Goran, M.I., E.T. Poehlman and E. Danforth Jr. (1994). "Experimental reliability of the doubly labeled water technique." *Am J Physiol* 266(3 Pt 1): E510-5.
- Gordon, J.N., S.R. Green and P.M. Goggin (2005). "Cancer cachexia." *Qjm* 98(11): 779-88.
- Grecu, I., I. Grintescu and D. Tulbure (2007). "[Disease-related malnutrition and its influence on perioperative outcome]." *Chirurgia (Bucur)* 102(1): 11-7.
- Greene, A.A. (1960). "Oxidative phosphorylation in liver mitochondria of the rat bearing Walker carcinoma 256." *Cancer Res* 20: 233-6.
- Greene, A.A. and F. L. Haven (1957). "Cytochrome oxidase in the liver of the rat bearing Walker carcinoma 256." *Cancer Res* 17(6): 613-7.

- Groundwater, P., S.A. Beck, C. Barton, C. Adamson, I.N. Ferrier and M.J. Tisdale (1990). "Alteration of serum and urinary lipolytic activity with weight loss in cachectic cancer patients." *Br J Cancer* 62(5): 816-21.
- Guaitani, A., M. Recchia, M. Carli, M. Rocchetti, I. Bartosek and S. Garattini (1982). "Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia." *Oncology* 39(3): 173-8.
- Guttridge, D.C., M.W. Mayo, L.V. Madrid, C.Y. Wang and A.S. Baldwin Jr. (2000). "NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia." *Science* 289(5488): 2363-6.
- Hanada, T., K. Toshinai, Y. Date, N. Kajimura, T. Tsukada, Y. Hayashi, K. Kangawa and M. Nakazato (2004). "Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells." *Metabolism* 53(1): 84-8.
- Hansell, D.T., J.W. Davies, A. Shenkin and H.J. Burns (1986-a). "The oxidation of body fuel stores in cancer patients." *Ann Surg* 204(6): 637-42.
- Hansell, D.T., J.W. Davies and H.J. Burns (1986-b). "The effects on resting energy expenditure of different tumor types." *Cancer* 58(8): 1739-44.
- Hansell D.T., J.W. Davies, H.J. Burns (1986-c). "The relationship between resting energy expenditure and weight loss in benign and malignant disease". *Ann Surg*. 203(3):240-5.
- Hansen-Smith, F.M., M.G. Maksud and D.L. Van Horn (1977). "Effect of dietary protein restriction or food restriction on oxygen consumption and mitochondrial distribution in cardiac and red and white skeletal muscle of rats." *J Nutr* 107(4): 525-33.
- Harris, J.A. and F.G. Benedict (1918). "A Biometric Study of Human Basal Metabolism." *Proc Natl Acad Sci U S A* 4(12): 370-3.

- Heber, D., L.O. Byerley, J. Chi, M. Grosvenor, R.N. Bergman, M. Coleman and R.T. Chlebowski (1986). "Pathophysiology of malnutrition in the adult cancer patient." *Cancer* 58(8 Suppl): 1867-73.
- Heber, D., L.O. Byerley and N.S. Tchekmedyian (1992). "Hormonal and metabolic abnormalities in the malnourished cancer patient: effects on host-tumor interaction." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 16(6 Suppl): 60S-64S.
- Heddi A., G. Stepien, P.J. Benke, D.C. Wallace (1999). "Coordinate induction of energy gene expression in tissues of mitochondrial disease patients". *J Biol Chem.* 274(33):22968-76.
- Hinkle, P.C. (2005). "P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* 1706(1-2): 1-11.
- Hirai, K., H.J. Hussey, M.D. Barber, S.A. Price and M.J. Tisdale (1998). "Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients." *Cancer Res* 58(11): 2359-65.
- Holroyde, C.P., T.G. Gabuzda, R.C. Putnam, P. Paul and G.A. Reichard (1975). "Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma." *Cancer Res* 35(12): 3710-4.
- Hunter, R.L., N. Dragicevic, K. Seifert, D.Y. Choi, M. Liu, H.C. Kim, W.A. Cass, P.G. Sullivan and G. Bing (2007). "Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system." *J Neurochem* 100(5): 1375-86.
- Hyltander, A., C. Drott, U. Korner, R. Sandstrom and K. Lundholm (1991). "Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours." *Eur J Cancer* 27(1): 9-15.
- Inagaki, J., V. Rodriguez and G.P. Bodey (1974). "Proceedings: Causes of death in cancer patients." *Cancer* 33(2): 568-73.

- Inui, A. (1999-b). "Cancer anorexia-cachexia syndrome: are neuropeptides the key?" *Cancer Res* 59(18): 4493-501.
- Inui, A. (1999-a). "Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides-mediation of the actions of leptin." *Trends Neurosci* 22(2): 62-7.
- Inui, A. (1999-c). "Neuropeptide Y: a key molecule in anorexia and cachexia in wasting disorders?" *Mol Med Today* 5(2): 79-85.
- Inui, A. (2001). "Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach." *Nat Rev Neurosci* 2(8): 551-60.
- Inui, A. (2002). "Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management." *CA Cancer J Clin* 52(2): 72-91.
- Isidoro A., M. Martinez, P.L. Fernandez, A.D. Ortega, G. Santamaria, M. Chamorro, J.C. Reed, J.M. Cuezva (2004). "Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer". *Biochem J.* 378(Pt 1):17-20.
- Jagoe, R.T., T.H. Goodship and G.J. Gibson (2001). "The influence of nutritional status on complications after operations for lung cancer." *Ann Thorac Surg* 71(3): 936-43.
- Jatoi, A., B.D. Daly, V.A. Hughes, G.E. Dallal, J. Kehayias and R. Roubenoff (2001). "Do patients with nonmetastatic non-small cell lung cancer demonstrate altered resting energy expenditure?" *Ann Thorac Surg* 72(2): 348-51.
- Jebb S.A., R.J. Osborne, A.K. Dixon, N.M. Bleehen, M. Elia (1994). "Measurements of resting energy expenditure and body composition before and after treatment of small cell lung cancer". *Ann Oncol.* 5(10):915-9.
- Kaminsky, P., M. Klein, B. Robin-Lherbier, P.M. Walker, M.L. Duc, J.M. Escanye and M. Duc (1992). "[Mitochondrial disorder secondary to inflammation in polymyositis. Two cases]." *Presse Med* 21(27): 1279-82.

Kerbel, R.S. (1998). "What is the optimal rodent model for anti-tumor drug testing?" *Cancer Metastasis Rev* 17(3): 301-4.

Khal, J., A.V. Hine, K.C. Fearon, C.H. Dejong and M.J. Tisdale (2005-a). "Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss." *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 2196-206.

Khal J., S.M. Wyke, S.T. Russell, A.V. Hine, M.J. Tisdale (2005-b). "Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia". *Br J Cancer*. 93(7):774-80.

Khanna, C., K. Lindblad-Toh, D. Vail, C. London, P. Bergman, L. Barber, M. Breen, B. Kitchell, E. McNeil, J.F. Modiano, S. Niemi, K.E. Comstock, E. Ostrander, S. Westmoreland and S. Withrow (2006). "The dog as a cancer model." *Nat Biotechnol* 24(9): 1065-6.

Knox, L.S., L.O. Crosby, I.D. Feurer, G.P. Buzby, C.L. Miller and J.L. Mullen (1983). "Energy expenditure in malnourished cancer patients." *Ann Surg* 197(2): 152-62.

Kotler, D.P. (2000). "Cachexia." *Ann Intern Med* 133(8): 622-34.

Kruizenga, H.M., M.W. Van Tulder, J.C. Seidell, A. Thijs, H.J. Ader and M.A. Van Bokhorst-de van der Schueren (2005). "Effectiveness and cost-effectiveness of early screening and treatment of malnourished patients." *Am J Clin Nutr* 82(5): 1082-9.

Kubota, A., M.M. Meguid and D.C. Hitch (1992). "Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors." *Cancer* 69(9): 2343-8.

Kuhnt T., T. Pelz, X. Qu, G. Hansgen, J. Dunst, F.N. Gellerich (2007). "Mitochondrial OXPHOS functions in R1H rhabdomyosarcoma and skeletal muscles of the rat". *Neurochem Res*. 32(6):973-80.

- Kurzer, M., J. Janiszewski and M.M. Meguid (1988). "Amino acid profiles in tumor-bearing and pair-fed nontumor-bearing malnourished rats." *Cancer* 62(8): 1492-6.
- Lal, S.B., J.J. Ramsey, S. Monemdjou, R. Weindruch and M.E. Harper (2001). "Effects of caloric restriction on skeletal muscle mitochondrial proton leak in aging rats." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56(3): B116-22.
- Laviano, A. and M.M. Meguid (1996). "Nutritional issues in cancer management." *Nutrition* 12(5): 358-71.
- Laviano, A., M.M. Meguid and F. Rossi-Fanelli (2003). "Cancer anorexia: clinical implications, pathogenesis, and therapeutic strategies." *Lancet Oncol* 4(11): 686-94.
- Lawson, D.H., A. Richmond, D.W. Nixon and D. Rudman (1982). "Metabolic approaches to cancer cachexia." *Annu Rev Nutr* 2: 277-301.
- Lecker, S.H., R.T. Jagoe, A. Gilbert, M. Gomes, V. Baracos, J. Bailey, S.R. Price, W.E. Mitch and A.L. Goldberg (2004). "Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression." *Faseb J* 18(1): 39-51.
- Lecker, S.H., V. Solomon, W.E. Mitch and A.L. Goldberg (1999). "Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states." *J Nutr* 129(1S Suppl): 227S-237S.
- Lees, J. (1999). "Incidence of weight loss in head and neck cancer patients on commencing radiotherapy treatment at a regional oncology centre." *Eur J Cancer Care (Engl)* 8(3): 133-6.
- Lelbach A., G. Muzes, J. Feher (2007). "Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia". *Med Sci Monit.* 13(9):RA168-173.
- Leverve, X., J. Cosnes, P. Erny and M. Hasselmann (1998). *La Société Francophone de Nutrition Entérale et Parentérale*, Paris.

- Lichtor, T. And G.J. Dohrmann (1986). "Respiratory patterns in human brain tumors." *Neurosurgery* 19(6): 896-9.
- Lindmark, L., K. Bennegard, E. Eden, L. Ekman, T. Schersten, G. Svaninger and K. Lundholm (1984). "Resting energy expenditure in malnourished patients with and without cancer." *Gastroenterology* 87(2): 402-8.
- Lindmark, L., S. Edstrom, L. Ekman, I. Karlberg and K. Lundholm (1983). "Energy metabolism in nongrowing mice with sarcoma." *Cancer Res* 43(8): 3649-54.
- Lindsey, A.M. (1986). "Cancer cachexia: effects of the disease and its treatment." *Semin Oncol Nurs* 2(1): 19-29.
- Llovera, M., C. Garcia-Martinez, J. Lopez-Soriano, N. Agell, F.J. Lopez-Soriano, I. Garcia and J.M. Argiles (1998). "Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1." *Cancer Lett* 130(1-2): 19-27.
- Lo C., V.J. Cristofalo, H.P. Morris, S. Weinhouse (1968). "Studies on respiration and glycolysis in transplanted hepatic tumors of the rat". *Cancer Res.* 28(1):1-10.
- Lobato-Mendizabal, E., B. Lopez-Martinez and G.J. Ruiz-Arguelles (2003). "A critical review of the prognostic value of the nutritional status at diagnosis in the outcome of therapy of children with acute lymphoblastic leukemia." *Rev Invest Clin* 55(1): 31-5.
- Lonnroth C., L.L. Moldawer, J. Gelin, L. Kindblom, B. Sherry, K. Lundholm (1990). "Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha production in cachectic, tumor-bearing mice". *Int J Cancer.* 46(5):889-96.
- Lopez-Soriano, J., N. Carbo, L. Tessitore, F.J. Lopez-Soriano and J.M. Argiles (1999). "Leptin and tumor growth in rats." *Int J Cancer* 81(5): 726-9.
- Lorite, M.J., P. Cariuk and M.J. Tisdale (1997). "Induction of muscle protein degradation by a tumour factor." *Br J Cancer* 76(8): 1035-40.

- Lorite, M.J., H.J. Smith, J.A. Arnold, A. Morris, M.G. Thompson and M.J. Tisdale (2001). "Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF)." *Br J Cancer* 85(2): 297-302.
- Lowrie, A.G., S.J. Wigmore, D.J. Wright, I.D. Waddell and J.A. Ross (2006). "Dermcidin expression in hepatic cells improves survival without N-glycosylation, but requires asparagine residues." *Br J Cancer* 94(11): 1663-71.
- Lugarini, F., B.J. Hrupka, G.J. Schwartz, C.R. Plata-Salaman and W. Langhans (2005). "Acute and chronic administration of immunomodulators induces anorexia in Zucker rats." *Physiol Behav* 84(1): 165-73.
- Lundholm, K., S. Edstrom, L. Ekman, I. Karlberg, A.C. Bylund and T. Schersten (1978). "A comparative study of the influence of malignant tumor on host metabolism in mice and man: evaluation of an experimental model." *Cancer* 42(2): 453-61.
- Lundholm, K., S. Edstrom, I. Karlberg, L. Ekman and T. Schersten (1980). "Relationship of food intake, body composition, and tumor growth to host metabolism in nongrowing mice with sarcoma." *Cancer Res* 40(7): 2516-22.
- MacDonald, N. (2007). "Cancer cachexia and targeting chronic inflammation: a unified approach to cancer treatment and palliative/supportive care." *J Support Oncol* 5(4): 157-62; discussion 164-6, 183.
- MacDonald, N., A.M. Easson, V.C. Mazurak, G.P. Dunn and V.E. Baracos (2003). "Understanding and managing cancer cachexia." *J Am Coll Surg* 197(1): 143-61.
- Macfie J., L. Burkinshaw, C. Oxby, J.H. Holmfield, G.L. Hill (1982). "The effect of gastrointestinal malignancy on resting metabolic expenditure". *Br J Surg.* 69(8):443-6.

- Machado, A.P., L.F. Costa Rosa and M.C. Seelaender (2004). "Adipose tissue in Walker 256 tumour-induced cachexia: possible association between decreased leptin concentration and mononuclear cell infiltration." *Cell Tissue Res* 318(3): 503-14.
- Madapallimattam, A.G., L. Law and K.N. Jeejeebhoy (2002). "Effect of hypoenergetic feeding on muscle oxidative phosphorylation and mitochondrial complex I-IV activities in rats." *Am J Clin Nutr* 76(5): 1031-9.
- Malgat, M., T. Letellier, G. Durrieu and J.P. Mazat (1999). "Enzymatic and polarographic measurement of the respiratory chain complexes". In: P. Lestienne (1999). "Mitochondrial diseases". Ed. Springer. p357-377.
- Mantovani, G., A. Maccio, E. Massa and C. Madeddu (2001). "Managing cancer-related anorexia/cachexia." *Drugs* 61(4): 499-514.
- Mantovani, G., A. Maccio, L. Mura, E. Massa, M.C. Mudu, C. Mulas, M.R. Lusso, C. Madeddu and A. Dessi (2000). "Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites." *J Mol Med* 78(10): 554-61.
- Masaki, T., H. Yoshimatsu, S. Chiba, S. Hidaka, D. Tajima, T. Kakuma, M. Kurokawa and T. Sakata (1999). "Tumor necrosis factor-alpha regulates in vivo expression of the rat UCP family differentially." *Biochim Biophys Acta* 1436(3): 585-92.
- Matthys, P., H. Heremans, G. Opdenakker and A. Billiau (1991). "Anti-interferon-gamma antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia." *Eur J Cancer* 27(2): 182-7.
- McDevitt, T.M., P.T. Todorov, S.A. Beck, S.H. Khan and M.J. Tisdale (1995). "Purification and characterization of a lipid-mobilizing factor associated with cachexia-inducing tumors in mice and humans." *Cancer Res* 55(7): 1458-63.
- McKechnie, A., R.A. Robins and O. Eremin (2004). "Immunological aspects of head and neck cancer: biology, pathophysiology and therapeutic mechanisms." *Surgeon* 2(4): 187-207.

- McMillan, D.C., H.R. Scott, W.S. Watson, T. Preston, R. Milroy and C.S. McArdle (1998). "Longitudinal study of body cell mass depletion and the inflammatory response in cancer patients." *Nutr Cancer* 31(2): 101-5.
- Mears, E. (1996). "Outcomes of continuous process improvement of a nutritional care program incorporating serum prealbumin measurements." *Nutrition* 12(7-8): 479-84.
- Mears, E. (2005). "Nutritional Assessment: An opportunity for laboratories to improve health care." *Clin Lab News* 31(6): 12-16.
- Meguid, M.M., M.M. Mughal, D. Debonis, V. Meguid and J.J. Terz (1986). "Influence of nutritional status on the resumption of adequate food intake in patients recovering from colorectal cancer operations." *Surg Clin North Am* 66(6): 1167-76.
- Meguid, M.M., M. Muscaritoli, J.L. Beverly, Z.J. Yang, C. Cangiano and F. Rossi-Fanelli (1992). "The early cancer anorexia paradigm: changes in plasma free tryptophan and feeding indexes." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 16(6 Suppl): 56S-59S.
- Melchior, J.C. and F. Thuiller (1998), Evaluation de l'état nutritionnel, in : traité de nutrition artificielle de l'adulte, Ed. Nutrition entérale et parentérale, p. 415-432.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." *Nature* 191: 144-8.
- Monitto, C.L., S.M. Dong, J. Jen and D. Sidransky (2004). "Characterization of a human homologue of proteolysis-inducing factor and its role in cancer cachexia." *Clin Cancer Res* 10(17): 5862-9.
- Morozkina, T.S. and V.S. Shapot (1976). "[Concentration of adenylic nucleotides and respiratory phosphorylation in the mitochondria of rats with transplanted tumors]." *Biull Eksp Biol Med* 81(6): 727-9.

- Morrison, S.D., J.F. Moley and J.A. Norton (1984). "Contribution of inert mass to experimental cancer cachexia in rats." *J Natl Cancer Inst* 73(4): 991-8.
- Moses, A.W., C. Slater, T. Preston, M.D. Barber and K.C. Fearon (2004). "Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids." *Br J Cancer* 90(5): 996-1002.
- Muscaritoli, M., M.M. Meguid, J.L. Beverly, Z.J. Yang, C. Cangiano and F. Rossi-Fanelli (1996). "Mechanism of early tumor anorexia." *J Surg Res* 60(2): 389-97.
- Myron Johnson, A., G. Merlini, J. Sheldon and K. Ichihara (2007). "Clinical indications for plasma protein assays: transthyretin (prealbumin) in inflammation and malnutrition." *Clin Chem Lab Med* 45(3): 419-26.
- Naber, T.H., T. Schermer, A. de Bree, K. Nusteling, L. Eggink, J.W. Kruimel, J. Bakkeren, H. van Heereveld and M.B. Katan (1997). "Prevalence of malnutrition in nonsurgical hospitalized patients and its association with disease complications." *Am J Clin Nutr* 66(5): 1232-9.
- Neary, N.M., C.J. Small, A.M. Wren, J.L. Lee, M.R. Druce, C. Palmieri, G.S. Frost, M.A. Ghatei, R.C. Coombes and S.R. Bloom (2004). "Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2832-6.
- Nelson, K.M., R.L. Weinsier, C.L. Long and Y. Schutz (1992). "Prediction of resting energy expenditure from fat-free mass and fat mass." *Am J Clin Nutr* 56(5): 848-56.
- Nguyen, L.T., M. Bedu, D. Caillaud, B. Beaufrere, G. Beaujon, M. Vasson, J. Coudert and P. Ritz (1999). "Increased resting energy expenditure is related to plasma TNF-alpha concentration in stable COPD patients." *Clin Nutr* 18(5): 269-74.
- Nitenberg, G., B. Raynard and S. Antoun (1997). Physiopathologie de la dénutrition chez le cancéreux: Prise en charge nutritionnelle du patient cancéreux (Pathophysiological

mechanisms of cancer cachexia). Journées Francophones de Nutrition, Paris - La Villette, France.

Nixon, D.W., S.B. Heymsfield, A.E. Cohen, M.H. Kutner, J. Ansley, D.H. Lawson and D. Rudman (1980). "Protein-calorie undernutrition in hospitalized cancer patients." *Am J Med* 68(5): 683-90.

Nixon, D.W., M. Kutner, S. Heymsfield, A.T. Foltz, C. Carty, S. Seitz, K. Casper, W.K. Evans, K.N. Jeejeebhoy, J.M. Daly *et al.* (1988). "Resting energy expenditure in lung and colon cancer." *Metabolism* 37(11): 1059-64.

Nixon, D.W. and D.H. Lawson (1983). "Nutritional support of the cancer patient." *Hosp Formul* 18(6): 616-9.

Noble, F., E. Rubira, M. Boulanouar, B. Palmier, M. Plotkine, J.M. Warnet, C. Marchand-Leroux and F. Massicot (2007). "Acute systemic inflammation induces central mitochondrial damage and mnesic deficit in adult Swiss mice." *Neurosci Lett* 424(2): 106-110.

Noguchi, Y., N.A. Vydelingum, R.N. Younes, S.K. Fried and M.F. Brennan (1991). "Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein lipase activity and mRNA levels." *Cancer Res* 51(3): 863-9.

Norton, J.A., J.F. Moley, M.V. Green, R.E. Carson and S.D. Morrison (1985). "Parabiotic transfer of cancer anorexia/cachexia in male rats." *Cancer Res* 45(11 Pt 1): 5547-52.

Norton, J.A., J.L. Peacock and S.D. Morrison (1987). "Cancer cachexia." *Crit Rev Oncol Hematol* 7(4): 289-327.

Norton, J.A., R. Shamberger, T.P. Stein, G.W. Milne and M.F. Brennan (1981). "The influence of tumor-bearing on protein metabolism in the rat." *J Surg Res* 30(5): 456-62.

- O'Byrne, K.J. and A.G. Dalglish (2001). "Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy." *Br J Cancer* 85(4): 473-83.
- O'Gorman, P., D.C. McMillan and C.S. McArdle (1998). "Impact of weight loss, appetite, and the inflammatory response on quality of life in gastrointestinal cancer patients." *Nutr Cancer* 32(2): 76-80.
- O'Riordain, M.G., J.S. Falconer, J. Maingay, K.C. Fearon and J.A. Ross (1999). "Peripheral blood cells from weight-losing cancer patients control the hepatic acute phase response by a primarily interleukin-6 dependent mechanism." *Int J Oncol* 15(4): 823-7.
- Ottery, F.D. (1995). "Supportive nutrition to prevent cachexia and improve quality of life." *Semin Oncol* 22(2 Suppl 3): 98-111.
- Ovesen, L., J. Hannibal and E.L. Mortensen (1993). "The interrelationship of weight loss, dietary intake, and quality of life in ambulatory patients with cancer of the lung, breast, and ovary." *Nutr Cancer* 19(2): 159-67.
- Palesty, J.A. and S.J. Dudrick (2003). "What we have learned about cachexia in gastrointestinal cancer." *Dig Dis* 21(3): 198-213.
- Pavey, S.J., G.A. Hawson and N.A. Marsh (2001). "Impact of the fibrinolytic enzyme system on prognosis and survival associated with non-small cell lung carcinoma." *Blood Coagul Fibrinolysis* 12(1): 51-8.
- Pedersen P.L., T. Eska, H.P. Morris, W.A. Catterall (1971). "Deficiency of uncoupler-stimulated adenosine triphosphatase activity in tightly coupled hepatoma mitochondria". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 68(5):1079-82.
- Perboni, S. and A. Inui (2006). "Anorexia in cancer: role of feeding-regulatory peptides." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1471): 1281-9.

- Persson, C. and B. Glimelius (2002). "The relevance of weight loss for survival and quality of life in patients with advanced gastrointestinal cancer treated with palliative chemotherapy." *Anticancer Res* 22(6B): 3661-8.
- Perumal, S.S., P. Shanthi and P. Sachdanandam (2005). "Energy-modulating vitamins--a new combinatorial therapy prevents cancer cachexia in rat mammary carcinoma." *Br J Nutr* 93(6): 901-9.
- Plata-Salaman, C.R. (2000). "Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome." *Nutrition* 16(10): 1009-12.
- Porter, D., S. Weremowicz, K. Chin, P. Seth, A. Keshaviah, J. Lahti-Domenici, Y.K. Bae, C.L. Monitto, A. Merlos-Suarez, J. Chan, C.M. Hulette, A. Richardson, C.C. Morton, J. Marks, M. Duyao, R. Hruban, E. Gabrielson, R. Gelman and K. Polyak (2003). "A neural survival factor is a candidate oncogene in breast cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10931-6.
- Porter R.K. and M.D. Brand (1993). "Body mass dependance of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate". *Nature* 362: 628–630.
- Preston, T., C. Slater, D.C. McMillan, J.S. Falconer, A. Shenkin and K.C. Fearon (1998). "Fibrinogen synthesis is elevated in fasting cancer patients with an acute phase response." *J Nutr* 128(8): 1355-60.
- Raiten, D.J. (1999). "Introduction." *J Nutr* 129(1S Suppl): 223S-4S.
- Ramos, E.J., M.M. Meguid, A.C. Campos and J.C. Coelho (2005). "Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation." *Nutrition* 21(2): 269-79.
- Ramsey J.J., M.E. Harper, R. Weindruch (2000). "Restriction of energy intake, energy expenditure and aging". *Free Radic Biol Med* 29: 946–968.

- Ravasco, P., I. Monteiro-Grillo and M. Camilo (2007). "Colorectal cancer: intrinsic characteristics modulate cancer energy expenditure and the risk of cachexia." *Cancer Invest* 25(5): 308-14.
- Ravussin, E. and C. Bogardus (1989). "Relationship of genetics, age, and physical fitness to daily energy expenditure and fuel utilization." *Am J Clin Nutr* 49(5 Suppl): 968-75.
- Ravussin, E., S. Lillioja, T.E. Anderson, L. Christin and C. Bogardus (1986). "Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber." *J Clin Invest* 78(6): 1568-78.
- Reeds, P.J., C.R. Fjeld and F. Jahoor (1994). "Do the differences between the amino acid compositions of acute-phase and muscle proteins have a bearing on nitrogen loss in traumatic states?" *J Nutr* 124(6): 906-10.
- Reilly, J.J. Jr., S.F. Hull, N. Albert, A. Waller and S. Bringardener (1988). "Economic impact of malnutrition: a model system for hospitalized patients." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 12(4): 371-6.
- Remontet, L., A. Buemi, M. Velten, E. Jouglu and J. Estève (2002), "Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000."
- Rennie, M.J., R.H. Edwards, P.W. Emery, D. Halliday, K. Lundholm and D.J. Millward (1983). "Depressed protein synthesis is the dominant characteristic of muscle wasting and cachexia." *Clin Physiol* 3(5): 387-98.
- Rey-Ferro, M., R. Castano, O. Orozco, A. Serna and A. Moreno (1997). "Nutritional and immunologic evaluation of patients with gastric cancer before and after surgery." *Nutrition* 13(10): 878-81.
- Robinson, G., M. Goldstein and G.M. Levine (1987). "Impact of nutritional status on DRG length of stay." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 11(1): 49-51.

- Rolfe, D.F. and G.C. Brown (1997). "Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals." *Physiol Rev* 77(3): 731-58.
- Ross, P.J., S. Ashley, A. Norton, K. Priest, J.S. Waters, T. Eisen, I.E. Smith and M.E. O'Brien (2004). "Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers?" *Br J Cancer* 90(10): 1905-11.
- Roza, A.M., D. Tuitt and H.M. Shizgal (1984). "Transferrin--a poor measure of nutritional status." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 8(5): 523-8.
- Sanchis, D., S. Busquets, B. Alvarez, D. Ricquier, F.J. Lopez-Soriano and J.M. Argiles (1998). "Skeletal muscle UCP2 and UCP3 gene expression in a rat cancer cachexia model." *FEBS Lett* 436(3): 415-8.
- Sanders, P.M. and M.J. Tisdale (2004). "Role of lipid-mobilising factor (LMF) in protecting tumour cells from oxidative damage." *Br J Cancer* 90(6): 1274-8.
- Schitteck, B., R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner and C. Garbe (2001). "Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands." *Nat Immunol* 2(12): 1133-7.
- Schneeberger, A.L., R.T. Thompson, A.A. Driedger, R.J. Finley and R.I. Inculet (1989). "Effect of cancer on the in vivo energy state of rat liver and skeletal muscle." *Cancer Res* 49(5): 1160-4.
- Schneider, S.M., P. Veyres, X. Pivot, A.M. Soummer, P. Jambou, J. Filippi, E. van Obberghen and X. Hebuterne (2004). "Malnutrition is an independent factor associated with nosocomial infections." *Br J Nutr* 92(1): 105-11.
- Segal, K.R., M. Van Loan, P.I. Fitzgerald, J.A. Hodgdon and T.B. Van Itallie (1988). "Lean body mass estimation by bioelectrical impedance analysis: a four-site cross-validation study." *Am J Clin Nutr* 47(1): 7-14.

- Sharma, R.A., A.G. Dalglish, W.P. Steward and K.J. O'Byrne (2003). "Angiogenesis and the immune response as targets for the prevention and treatment of colorectal cancer (review)." *Oncol Rep* 10(5): 1625-31.
- Shaw, J.H. and R.R. Wolfe (1987). "Fatty acid and glycerol kinetics in septic patients and in patients with gastrointestinal cancer. The response to glucose infusion and parenteral feeding." *Ann Surg* 205(4): 368-76.
- Shenkin, A. (2006). "Serum prealbumin: Is it a marker of nutritional status or of risk of malnutrition?" *Clin Chem* 52(12): 2177-9.
- Shimizu, Y., N. Nagaya, T. Isobe, M. Imazu, H. Okumura, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa and N. Kohno (2003). "Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia." *Clin Cancer Res* 9(2): 774-8.
- Simons, J.P., A.M. Schols, L.A. Campfield, E.F. Wouters and W.H. Saris (1997). "Plasma concentration of total leptin and human lung-cancer-associated cachexia." *Clin Sci (Lond)* 93(3): 273-7.
- Simons J.P., A.M. Schols, J.M. Hoefnagels, K.R. Westerterp, G.P. ten Velde, E.F. Wouters (1998). "Effects of medroxyprogesterone acetate on food intake, body composition, and resting energy expenditure in patients with advanced, nonhormone-sensitive cancer: a randomized, placebo-controlled trial". *Cancer*. 82(3):553-60.
- Simons J.P., A.M. Schols, W.A. Buurman, E.F. Wouters (1999). "Weight loss and low body cell mass in males with lung cancer: relationship with systemic inflammation, acute-phase response, resting energy expenditure, and catabolic and anabolic hormones". *Clin Sci (Lond)*. 97(2):215-23.
- Simonson, S.G., K. Welty-Wolf, Y.T. Huang, J.A. Griebel, M.S. Caplan, P.J. Fracica and C.A. Piantadosi (1994). "Altered mitochondrial redox responses in gram negative septic shock in primates." *Circ Shock* 43(1): 34-43.

- Simpson S.J., D. Raubenheimer (2007). "Caloric restriction and aging revisited: the need for a geometric analysis of the nutritional bases of aging." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 62(7):707-13. Review.
- Sjodin, A.M., A.B. Andersson, J.M. Hogberg and K.R. Westerterp (1994). "Energy balance in cross-country skiers: a study using doubly labeled water." *Med Sci Sports Exerc* 26(6): 720-4.
- Skipworth, R.J., G.D. Stewart, C.H. Dejong, T. Preston and K.C. Fearon (2007). "Pathophysiology of cancer cachexia: Much more than host-tumour interaction?" *Clin Nutr.*
- Slaviero, K.A., S.J. Clarke and L.P. Rivory (2003). "Inflammatory response: an unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy." *Lancet Oncol* 4(4): 224-32.
- Smith, H.J., M.J. Lorite and M.J. Tisdale (1999). "Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: modulation by eicosapentaenoic acid." *Cancer Res* 59(21): 5507-13.
- Smith, H.J. and M.J. Tisdale (2003). "Induction of apoptosis by a cachectic-factor in murine myotubes and inhibition by eicosapentaenoic acid." *Apoptosis* 8(2): 161-9.
- Smith, H.J., S.M. Wyke and M.J. Tisdale (2004). "Role of protein kinase C and NF-kappaB in proteolysis-inducing factor-induced proteasome expression in C(2)C(12) myotubes." *Br J Cancer* 90(9): 1850-7.
- Sohal R.S., R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging". *Science.* 5;273(5271):59-63. Review.
- Somasundar, P., D.W. McFadden, S.M. Hileman and L. Vona-Davis (2004). "Leptin is a growth factor in cancer." *J Surg Res* 116(2): 337-49.

- Staal-van den Brekel, A.J., A.M. Schols, M.A. Dentener, G.P. ten Velde, W.A. Buurman and E.F. Wouters (1997). "Metabolism in patients with small cell lung carcinoma compared with patients with non-small cell lung carcinoma and healthy controls." *Thorax* 52(4): 338-41.
- Stone, P., M. Richards and J. Hardy (1998). "Fatigue in patients with cancer." *Eur J Cancer* 34(11): 1670-6.
- Strain, A.J. (1979). "Cancer cachexia in man: a review." *Invest Cell Pathol* 2(3): 181-93.
- Strassmann, G., M. Fong, J.S. Kenney and C.O. Jacob (1992). "Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia." *J Clin Invest* 89(5): 1681-4.
- Strassmann, G., Y. Masui, R. Chizzonite and M. Fong (1993). "Mechanisms of experimental cancer cachexia. Local involvement of IL-1 in colon-26 tumor." *J Immunol* 150(6): 2341-5.
- Stratton, R.J. and M. Elia (2007). "Who benefits from nutritional support: what is the evidence?" *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19(5): 353-8.
- Sugiura, K. and C.C. Stock (1955). "Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors." *Cancer Res* 15(1): 38-51.
- Tada, T., I. Ohkubo, M. Niwa, M. Sasaki, H. Tateyama and T. Eimoto (1991). "Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues." *J Histochem Cytochem* 39(9): 1221-6.
- Tanaka, Y., H. Eda, T. Tanaka, T. Udagawa, T. Ishikawa, I. Horii, H. Ishitsuka, T. Kataoka and T. Taguchi (1990). "Experimental cancer cachexia induced by transplantable colon 26 adenocarcinoma in mice." *Cancer Res* 50(8): 2290-5.
- Tayek, J.A. (1992). "A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer." *J Am Coll Nutr* 11(4): 445-56.

Tchekmedyan, N.S., D. Zahyna, C. Halpert and D. Heber (1992). "Clinical aspects of nutrition in advanced cancer." *Oncology* 49 Suppl 2: 3-7.

Teicher, B.A. (2002). *Tumor models in cancer research*. Totowa, N.J., Humana Press.

Teicher, B.A. (2006). "Tumor models for efficacy determination." *Mol Cancer Ther* 5(10): 2435-43.

Tessitore, L., G. Bonelli and F.M. Baccino (1987). "Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia." *Biochem J* 241(1): 153-9.

Tessitore, L., P. Costelli and F.M. Baccino (1993). "Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats." *Br J Cancer* 67(1): 15-23.

Tintignac, L.A., J. Lagirand, S. Batonnet, V. Sirri, M.P. Leibovitch and S.A. Leibovitch (2005). "Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase." *J Biol Chem* 280(4): 2847-56.

Tisdale, M.J. (1993-a). "Mechanism of lipid mobilization associated with cancer cachexia: interaction between the polyunsaturated fatty acid, eicosapentaenoic acid, and inhibitory guanine nucleotide-regulatory protein." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 48(1): 105-9.

Tisdale, M.J. (1993-b). "Cancer cachexia." *Anticancer Drugs* 4(2): 115-25.

Tisdale M.J., T.M. McDevitt, P.T. Todorov, P. Cariuk (1996). "Catabolic factors in cancer cachexia". *In Vivo*. 10(2):131-6.

Tisdale, M.J. (1999). "Wasting in cancer." *J Nutr* 129(1S Suppl): 243S-246S.

Tisdale, M.J. (2000). "Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia." *Nutrition* 16(10): 1013-4.

Tisdale, M.J. (2001-a). "Loss of skeletal muscle in cancer: biochemical mechanisms." *Front Biosci* 6: D164-74.

Tisdale, M.J. (2001-b). "Cancer anorexia and cachexia." *Nutrition* 17(5): 438-42.

Tisdale, M.J. (2002). "Cachexia in cancer patients." *Nat Rev Cancer* 2(11): 862-71.

Tisdale, M.J. (2003). "Pathogenesis of cancer cachexia." *J Support Oncol* 1(3): 159-68.

Tisdale, M.J. (2005). "Molecular pathways leading to cancer cachexia." *Physiology (Bethesda)* 20: 340-8.

Todorov, P., P. Cariuk, T. McDevitt, B. Coles, K. Fearon and M.J. Tisdale (1996). "Characterization of a cancer cachectic factor." *Nature* 379(6567): 739-42.

Todorov, P.T., M. Deacon and M.J. Tisdale (1997). "Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation." *J Biol Chem* 272(19): 12279-88.

Todorov, P.T., T.M. McDevitt, D.J. Meyer, H. Ueyama, I. Ohkubo and M.J. Tisdale (1998). "Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor." *Cancer Res* 58(11): 2353-8.

Tomatis, L., A. Aitio and International Agency for Research on Cancer. (1990). *Cancer: causes, occurrence, and control*. Lyon New-York, International Agency for Research on Cancer; Distributed in the USA by Oxford University Press.

Toth, M.J. (1999). "Energy expenditure in wasting diseases: current concepts and measurement techniques." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2(6): 445-51.

Tsuburaya, A., D. Blumberg, M. Burt and M.F. Brennan (1995). "Energy depletion in the liver and in isolated hepatocytes of tumor-bearing animals." *J Surg Res* 59(4): 421-7.

- Ushmorov, A., V. Hack and W. Droge (1999). "Differential reconstitution of mitochondrial respiratory chain activity and plasma redox state by cysteine and ornithine in a model of cancer cachexia." *Cancer Res* 59(14): 3527-34.
- Uyemura, S.A., M.C. Jordani, A.C. Polizello and C. Curti (1996). "Heart FoF1-ATPase changes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats." *Mol Cell Biochem* 165(2): 127-33.
- van Bokhorst-de van der Schuer, S., P.A. van Leeuwen, D.J. Kuik, W.M. Klop, H.P. Sauerwein, G.B. Snow and J.J. Quak (1999). "The impact of nutritional status on the prognoses of patients with advanced head and neck cancer." *Cancer* 86(3): 519-27.
- van Bokhorst-de van der Schuer, M.A., S.I. Langendoen, H. Vondeling, D.J. Kuik, J.J. Quak and P.A. van Leeuwen (2000). "Perioperative enteral nutrition and quality of life of severely malnourished head and neck cancer patients: a randomized clinical trial." *Clin Nutr* 19(6): 437-44.
- van Cutsem, E. and J. Arends (2005). "The causes and consequences of cancer-associated malnutrition." *Eur J Oncol Nurs* 9 Suppl 2: S51-63.
- van Royen, M., N. Carbo, S. Busquets, B. Alvarez, L.S. Quinn, F.J. Lopez-Soriano and J.M. Argiles (2000). "DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia?" *Biochem Biophys Res Commun* 270(2): 533-7.
- Vlassara, H., R.J. Spiegel, D. San Doval and A. Cerami (1986). "Reduced plasma lipoprotein lipase activity in patients with malignancy-associated weight loss." *Horm Metab Res* 18(10): 698-703.
- Wallace, A.M., N. Sattar and D.C. McMillan (1998). "Effect of weight loss and the inflammatory response on leptin concentrations in gastrointestinal cancer patients." *Clin Cancer Res* 4(12): 2977-9.
- Wang, Z., E. Corey, G.M. Hass, C.S. Higano, L.D. True, D. Wallace Jr., M.J. Tisdale and R.L. Vessella (2003). "Expression of the human cachexia-associated protein (HCAP)

in prostate cancer and in a prostate cancer animal model of cachexia." *Int J Cancer* 105(1): 123-9.

Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* 123(3191): 309-14.

Warnold I., K. Lundholm, T. Scherstén (1978). "Energy balance and body composition in cancer patients". *Cancer Res.* 38(6):1801-7.

Warren (1932). "Immediate cause of death in cancer." *American Journal of medical Sciences*(184): 610-615.

Warren, R.S., M. Jeevanandam and M.F. Brennan (1985). "Protein synthesis in the tumor-influenced hepatocyte." *Surgery* 98(2): 275-82.

Watchorn, T.M., I. Waddell, N. Dowidar and J.A. Ross (2001). "Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF-(kappa)B and STAT3." *Faseb J* 15(3): 562-4.

Weinhouse, S. (1973). "Metabolism and isoenzyme alterations in experimental hepatomas." *Fed Proc* 32(12): 2162-7.

Welty-Wolf, K.E., S.G. Simonson, Y.C. Huang, P.J. Fracica, J.W. Patterson and C.A. Piantadosi (1996). "Ultrastructural changes in skeletal muscle mitochondria in gram-negative sepsis." *Shock* 5(5): 378-84.

Weston P.M., R.F. King, A.W. Goode, N.S. Williams (1989). "Diet-induced thermogenesis in patients with gastrointestinal cancer cachexia". *Clin Sci (Lond)*. 77(2):133-8.

Whitehouse, A.S., H.J. Smith, J.L. Drake and M.J. Tisdale (2001). "Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid." *Cancer Res* 61(9): 3604-9.

- Whitehouse, A.S. and M.J. Tisdale (2003). "Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kappaB." *Br J Cancer* 89(6): 1116-22.
- Wigmore, S.J., M.D. Barber, J.A. Ross, M.J. Tisdale and K.C. Fearon (2000). "Effect of oral eicosapentaenoic acid on weight loss in patients with pancreatic cancer." *Nutr Cancer* 36(2): 177-84.
- Wigmore, S.J., K.C. Fearon, J.P. Maingay, O.J. Garden and J.A. Ross (2002-a). "Effect of interleukin-2 on peripheral blood mononuclear cell cytokine production and the hepatic acute phase protein response." *Clin Immunol* 104(2): 174-82.
- Wigmore, S.J., K.C. Fearon, K. Sangster, J.P. Maingay, O.J. Garden and J.A. Ross (2002-b). "Cytokine regulation of constitutive production of interleukin-8 and -6 by human pancreatic cancer cell lines and serum cytokine concentrations in patients with pancreatic cancer." *Int J Oncol* 21(4): 881-6.
- Wigmore, S.J., C.E. Plester, R.A. Richardson and K.C. Fearon (1997-a). "Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer." *Br J Cancer* 75(1): 106-9.
- Wigmore, S.J., C.E. Plester, J.A. Ross and K.C. Fearon (1997). "Contribution of anorexia and hypermetabolism to weight loss in anicteric patients with pancreatic cancer." *Br J Surg* 84(2): 196-7.
- Williams, P.D., U. Piamjariyakul, K. Ducey, J. Badura, K.D. Boltz, K. Olberding, A. Wingate and A.R. Williams (2006). "Cancer treatment, symptom monitoring, and self-care in adults: pilot study." *Cancer Nurs* 29(5): 347-55.
- Wilmanns, C., D. Fan, C.A. O'Brian, C.D. Bucana and I.J. Fidler (1992). "Orthotopic and ectopic organ environments differentially influence the sensitivity of murine colon carcinoma cells to doxorubicin and 5-fluorouracil." *Int J Cancer* 52(1): 98-104.

- Windsor, J.A. and G.L. Hill (1988). "Weight loss with physiologic impairment. A basic indicator of surgical risk." *Ann Surg* 207(3): 290-6.
- Wu C.W., P.H. Yin, W.Y. Hung, A.F. Li, S.H. Li, C.W. Chi, Y.H. Wei, H.C. Lee (2005). "Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer". *Genes Chromosomes Cancer*. 44(1):19-28.
- Wu, M., A. Neilson, A.L. Swift, R. Moran, J. Tamagnine, D. Parslow, S. Armistead, K. Lemire, J. Orrell, J. Teich, S. Chomicz and D.A. Ferrick (2007). "Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C125-36.
- Yoshida, T., H. Sato and T. Aruji (1952). "[Experimental production of the ascites hepatoma.]." *Gan* 43(2-3): 128-30.
- Yoshikawa, T., Y. Noguchi and A. Matsumoto (1994). "Effects of tumor removal and body weight loss on insulin resistance in patients with cancer." *Surgery* 116(1): 62-6.
- Younes, R.N. and Y. Noguchi (2000). "Pathophysiology of cancer cachexia." *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 55(5): 181-93.
- Younes, R.N., N.A. Vydelingum, Y. Noguchi and M.F. Brennan (1990). "Lipid kinetic alterations in tumor-bearing rats: reversal by tumor excision." *J Surg Res* 48(4): 324-8.
- Zang, Q., D.L. Maass, S.J. Tsai and J.W. Horton (2007). "Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis." *Surg Infect (Larchmt)* 8(1): 41-54.
- Zeiderman, M.R. and M.J. McMahon (1989). "The role of objective measurement of skeletal muscle function in the pre-operative patient." *Clin Nutr* 8(3): 161-6.
- Zhang, H.H., M. Halbleib, F. Ahmad, V.C. Manganiello and A.S. Greenberg (2002). "Tumor necrosis factor-alpha stimulates lipolysis in differentiated human adipocytes through

activation of extracellular signal-related kinase and elevation of intracellular cAMP." Diabetes 51(10): 2929-35.

Zigman, J.M. and J.K. Elmquist (2003). "Minireview: From anorexia to obesity--the yin and yang of body weight control." Endocrinology 144(9): 3749-56.

Zittoun, R. and M. Ruzsniowski (1988-a). "[Psychological implications of cancer. I. Psychological consequences of the disease]." Bull Cancer 75(10): 943-8.

Zittoun, R. and M. Ruzsniowski (1988-b). "[Psychological implications of cancer. II. Consequences of treatment and modality of adaptation]." Bull Cancer 75(10): 949-55.

Zylicz Z., O. Schwantje, D.J. Wagener, H.T. Folgering (1990). "Metabolic response to enteral food in different phases of cancer cachexia in rats". Oncology.;47(1):87-91.

7. Annexes

7.1. Fiches techniques

Fiche technique n°1 : Isolement de mitochondries de muscle squelettique.

L'isolement est réalisé à 4°C.

La biopsie musculaire, fraîchement prélevée, est immergée dans un volume minimum de tampon d'isolement et conservée dans la glace. Elle est débarrassée de tous éléments fibreux ou graisseux.

La biopsie est émincée dans du tampon d'isolement (10ml/g de tissu musculaire) puis homogénéisée au Potter (5 allers-retours, 1000 g).

La nagarase (1 mg/g de tissu musculaire) est ajoutée à l'homogénat, le tout est incubé 5 min à 4°C sous agitation régulière.

La nagarase est diluée en rajoutant 10ml de tampon d'isolement/g de tissu musculaire. Le tout est homogénéisé au Potter (3 allers-retours, 1000 g).

- Centrifuger à 1000 g pendant 10 min à + 4°C.
- Filtrer le surnageant sur une couche de gaze.
- Centrifuger à 10000 g pendant 10 min et à +4°C.
- Eliminer le surnageant, et reprendre le culot avec 10 ml de tampon d'isolement.
- Centrifuger à 10000 g pendant 10 min et à +4°C.
- Eliminer le surnageant, et reprendre le culot avec 10 ml de tampon d'isolement.
- Centrifuger à 10000 g pendant 10 min et à +4°C.
- Reprendre le culot dans un minimum de tampon d'isolement et conserver dans la glace.

Réactifs :

Tampon d'isolement :

Saccharose (100 mM)	34,23 g
KCL (50mM)	3,73 g
Tris/HCL (50mM)	7,88 g
EGTA (5 mM)	1,90 g
Eau distillée	qsp 1000ml
Ajuster le pH à 7,4 avec du KOH 5N	

Fiche technique n°2 : Détermination de la consommation en oxygène mitochondriale : utilisation d'une électrode sensible à l'oxygène

Le but de cette technique est d'évaluer la fonctionnalité des mitochondries. La consommation d'oxygène des mitochondries isolées de muscle squelettique est déterminée par oxygraphie (oxygraphes Hansatech et Oroboros) à l'aide d'une électrode sensible à l'oxygène. Toutes les mesures sont effectuées à 37°C. Elles indiquent des vitesses de consommation d'oxygène par unité de temps et par mg de protéines mitochondriales.

La consommation d'oxygène est déterminée avec différents substrats (selon leur voie d'entrée dans la chaîne respiratoire) et sous différents états (contrôle et stimulation de la respiration différents).

Ainsi, l'addition d'ADP induit une forte consommation d'oxygène (respiration à l'état 3) dépendante de l'utilisation de la force proton-motrice par l'ATP-synthétase pour la phosphorylation de l'ADP, et contrôlée par le système phosphorylant (activité de l'ATP-synthétase, transport de l'ADP et de l'ATP...), par le système d'oxydation (activité des complexes de la chaîne respiratoire, transport des substrats, efficacité du pompage des protons) et par la fuite de protons (perméabilité membranaire, protéines découplantes...). L'ajout d'oligomycine (qui inhibe l'activité de l'ATP-synthétase) induit un ralentissement de la respiration (respiration à l'état 4-oligomycine) qui est dépendante de l'utilisation de la force proton-motrice par la fuite de protons et sous le contrôle du système de la fuite de protons et du système d'oxydation. Enfin, l'ajout d'une concentration saturante de FCCP (molécule qui dissipe la force proton-motrice) induit une consommation d'oxygène maximale (respiration à l'état découplé) contrôlée par le système d'oxydation.

Le rapport des taux de consommation d'oxygène état 3 / état 4-oligomycine définit le contrôle de la phosphorylation sur la consommation d'oxygène et est utilisé comme un indicateur de la qualité de la préparation des mitochondries.

Technique

Dans la cuve de mesure le volume final est de 1 ml (tampon de respiration en qsp 1 ml). Les mitochondries sont à la concentration finale de 0.6 mg/ml.

Les combinaisons de substrats et d'inhibiteurs sont (concentrations finales):

Substrat du complexe I (et II) : malate (2,5 mM) + pyruvate (5 mM)

malate (2,5 mM) + palmitoyl-l-carnitine (40µM)

Substrat du complexe IV : ascorbate (8mM) + TMPD (0,5 mM) + myxothiazole (3 µM)

- Stimuler la respiration par l'ajout de 0,5 mM d'ADP (état 3).
- Inhiber par l'ajout de 1µg/ml d'oligomycine (état 4-oligomycine).
- Stimuler la respiration par l'ajout de 2 µM de FCCP (état découplé).

Réactifs

Tampon de respiration

KCl (120mM): 895 mg

KH₂PO₄ (5mM): 68 mg

HEPES (3 mM): 71 mg

EGTA (1 mM): 38 mg

MgCl₂ (2 mM) 41 mg

Sérum albumine : 300 mg

Eau distillée : qsp 100 ml

Ajuster le pH à 7,4

ADP (100 mM) :

ADP : 10,68 mg

Eau distillée : qsp 250 µl

Ascorbate (0,5 M) :

Acide ascorbique : 880 mg

Tampon respiration : qsp 10 ml

Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.

Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP; 2 mM) :

FCCP : 0,5 mg

Ethanol : qsp 1 ml

Malate (0,5 M) :

Acide malique : 670 mg

Tampon de respiration : qsp 10 ml

Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.

Myxothiazole (3 mM) :

Myxothiazole : 1,46 mg

Ethanol : qsp 1 ml

N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD; 100 mM) :

TMPD : 8,21mg

Ethanol : 0,5 ml

Oligomycine (1 mg/ml éthanol)

Palmitoyl-l-carnitine (16 mM) :

Palmitoyl-l-carnitine : 1,74 mg

Ethanol : qsp 250µl

Pyruvate (0,5 M) :

Acide pyruvique : 550 mg

Tampon de respiration : qsp 10 ml

Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.

Fiche technique n°3 : Mesure de la cinétique de fuite de protons en conditions non-phosphorylantes.

La consommation d'oxygène et le potentiel de membrane sont déterminés en parallèle, dans la même cuve de mesure, grâce à l'utilisation de deux électrodes différentes, l'une sensible à l'oxygène et l'autre au triphényl-méthyl-phosphonium (TPMP).

En condition non-phosphorylante (état 4, en présence d'oligomycine) la consommation mitochondriale en oxygène et le potentiel de membrane sont inhibés progressivement par des concentrations croissantes et non-saturantes de malonate (inhibiteur de l'utilisation du succinate par la chaîne respiratoire). Dans ces conditions la consommation d'oxygène est dépendante de l'utilisation de la force proton-motrice par la fuite de protons et est contrôlée par la fuite de protons et le système d'oxydation. Les différents points obtenus correspondent donc à la consommation d'oxygène nécessaire pour le maintien d'un potentiel de membrane donné et décrivent ainsi une cinétique indicative de l'efficacité de l'utilisation de l'énergie rédox (fuite de protons et efficacité de pompage des protons) de la mitochondrie.

Fiche technique n°4 : Mesure du potentiel de membrane de mitochondries isolées par une électrode sensible au TPMP.

Cette mesure, réalisée en parallèle de la mesure de consommation d'oxygène est faite selon la technique de Brand *et al.* (Brand *et al.*, 1995). Son principe repose sur l'équilibration, de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, d'une molécule-sonde chargée positivement (TPMP⁺). Le TPMP⁺, molécule lipophile, diffuse passivement vers la matrice en fonction du potentiel de membrane jusqu'à atteindre un équilibre comme décrit par l'équation de Nernst :

$$\Delta\Psi = 2,3 (RT/F) \log ([TPMP^+]_{in}/[TPMP^+]_{out})$$

L'accumulation du TPMP⁺ est mesurée indirectement en déterminant sa concentration extra-mitochondriale à l'aide d'une électrode sensible au TPMP. Cependant la force proton-motrice (Δp) est l'addition du potentiel de membrane ($\Delta\Psi$; différence de charge électrique de part et d'autre de la membrane interne) et du gradient de protons (ΔpH ; différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane interne) :

$$\Delta p = \Delta\Psi - 2,3 RT \Delta pH$$

L'ajout de nigéricine (catalyseur de l'antiport K⁺/H⁺) dissipe le ΔpH et le transforme en potentiel électrique. Ainsi, la force proton-motrice est directement proportionnelle au potentiel de membrane.

Technique

Dans la cuve de mesure :

	Volume (μl)	Concentrations finales
Tampon de respiration	qsp 2000	
Nigéricine	2	80ng/ml
Mitochondries isolées		0,6 mg/ml
Roténone	4	5 μM

- Immerger l'électrode sensible au TPMP dans la cuve de mesure.
- Calibrer l'électrode par 4 additions successives de 0,5 μM de TPMP⁺.
- Attendre la stabilisation des tracés entre chaque addition.
- Démarrer la mesure par l'ajout de 5 mM de succinate.
- Ajouter 0,5mM d'ADP (état 3)
- Etablir l'état 4 en ajoutant 1 $\mu\text{g/ml}$ d'oligomycine
- Inhiber progressivement la respiration par addition de malonate en concentration croissante et non-saturante (0-3mM)
- Dissiper le potentiel électrique par l'ajout de 5 μM de FCCP.

Réactifs

Tampon de respiration

KCl (120mM):	895 mg
KH ₂ PO ₄ (5mM):	68 mg
HEPES (3 mM):	71 mg
EGTA (1 mM):	38 mg
MgCl ₂ (2 mM)	41 mg
Sérum albumine :	300 mg
Eau distillée : qsp	100 ml
Ajuster le pH à 7,4.	

ADP (100 mM) :

ADP :	10,68 mg
Eau distillée :	qsp 250 μl

Carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP; 2 mM) :

FCCP :	0,5 mg
Ethanol :	qsp 1 ml

Malonate (500 mM) :

Acide malonique	521 mg
Tampon de respiration	qsp 10ml
Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.	

Nigéricine (80 $\mu\text{g/ml}$ éthanol)

Oligomycine (1 mg/ml éthanol)

Roténone (2,5 mM):

Roténone :	1 mg
Ethanol/DMSO (volume/volume) :	1 ml

Succinate (0,5 M):

Acide succinique : 590. mg
Eau distillée : qsp 10 ml
Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.

Triphenylmethylphosphonium (TPMP; 0,5mM) :

TPMP : 1,8 mg
Eau distillée : qsp 10 ml

Fiche technique n°5 : Détermination du rapport ATP/O par spectrophotométrie

En dosant sur un même échantillon de mitochondries, le taux de synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène correspondante cette mesure vise à déterminer l'efficacité de la phosphorylation oxydative. Cette mesure est effectuée en présence d'une concentration saturante d'ADP (état 3). La consommation en oxygène est mesurée par une électrode sensible à l'oxygène.

Technique

Dans la cuve de mesure :

	Volume (µl)	Concentrations finales
Tampon de respiration	qsp 1000	
Mitochondries isolées		0,6 mg/ml
Succinate	10	10 mM
Roténone	3	7,5 µM

- Démarrer la mesure par l'ajout de 5 mM d'ADP
- Dès la stabilisation du tracé, prélever 200µl de milieu de réaction toutes les 30 secondes à t₀, t₃₀, t₆₀, t₉₀.
- Précipiter chaque aliquot dans 200 µl d'acide perchlorique 7 % (centrifugation 8000 g, 10 min). Neutraliser le surnageant et congeler à – 80°C.

Réactifs

ADP (200 mM):

ADP : 21,4 mg
Eau distillée : qsp 250 µl

Succinate (1 M):

Acide succinique : 1,18g
Eau distillée : qsp 10 ml
Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.

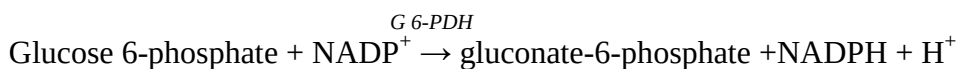
Roténone (2,5 mM) :

Roténone : 1 mg

Ethanol/DMSO (volume/volume) : 1 ml

Acide perchlorique 7 %

La détermination de la synthèse d'ATP est réalisée par spectrophotométrie, selon la technique de Cairns *et al.* (Cairns *et al.*, 1998). Le principe du dosage repose sur la transformation de l'ATP produit par la mitochondrie en NADPH par l'utilisation d'un système d'enzymes.



Les variations d'absorbance du NADPH, mesurés au spectrophotomètre (Beckman DU640 B), sont directement proportionnelles au taux de synthèse d'ATP.

Technique

Dans un tube à hémolyse :

	Volume (µl)	Concentrations finales
Tampon de respiration	qsp 1000	
Glucose	2	1 mM
NADP	71	0,5 mM
Mitochondries isolées		300µg/ml
Hexokinase	180	0,9 UI
G6-PDH	40	0,1 UI

- Lire au spectrophotomètre la densité optique à 334nm (DO₀).
- Démarrer la réaction en ajoutant 0,1 U de G6-PDH.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Lire la DO₁ au spectrophotomètre.

ε NADPH = 6220 M-1. cm-1

Réactifs

Tampon de respiration

KCl (120mM):	895 mg
KH ₂ PO ₄ (5mM):	68 mg
HEPES (3 mM):	71 mg
EGTA (1 mM):	38 mg
MgCl ₂ (2 mM)	41 mg
Sérum albumine :	300 mg
Eau distillée : qsp	100 ml
Ajuster le pH à 7,4.	

Glucose (0,5 mM) :

Glucose	90 mg
Eau distillée	qsp 1 ml

NADP (7 mM) :

NADP	5 mg
Eau distillée	qsp 1 ml

Hexokinase : 5U/ml d'eau distillée

Glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6-PDH) : 2,5 U/ml

Fiche technique n°6 : Dosage protéique par spectrophotométrie, méthode de l'acide bicinchoninique

Ce dosage, effectué en présence d'un détergent, le dodécyl sulfate de sodium (SDS), est adapté au dosage de protéines membranaires. Il s'agit d'un dosage colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique (Kit BCA de Sigma).

Le principe du dosage repose sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{+} par les liaisons peptidiques des protéines. L'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^{+} avec une très forte spécificité et forme un complexe soluble coloré en violet. L'absorbance à 562 nm est directement proportionnelle à la concentration protéique, calculée à l'aide d'une courbe référence obtenue pour l'albumine.

Technique

Préparer la solution de travail :

1 volume de réactif B

49 volumes de réactif A

Préparer un Blanc (tampon d'isolement) :

30 μl

600 μl solution travail

Préparer un point de gamme étalon 0,25 mg/ml :

30 μl sérum albumine 0,25 mg/ml

600 μl solution travail

Préparer un point de gamme étalon 0,5 mg/ml :

30 μl sérum albumine 0,5 mg/ml

600 μl solution travail,

Préparer l'échantillon :

30 μl échantillon (mitochondries isolées) dilué pour être dans la gamme étalon (faire 2 dilutions différentes)

600 μl solution travail

Incuber 30 min à 37°C

Lire l'absorbance à 562 nm (Beckman DU640 B).

Fiche technique n°7 : Mesure de composition corporelle

In vivo, les mesures de composition corporelle sont toujours indirectes. Elles reposent sur un ou plusieurs postulats concernant la nature des constituants de la masse grasse et de la masse maigre incluant l'eau, les protéines et l'os. Le modèle à deux compartiments est basé sur le postulat que la masse maigre est constituée d'une quantité fixe d'eau.

Principe de l'impédancemétrie bioélectrique

Il s'agit d'une technique simple, sûre et non coûteuse permettant d'estimer les espaces hydriques. Elle est fondée sur l'hypothèse que l'impédance du corps humain à un courant électrique externe dépend de la taille du corps et du ratio masse grasse/masse maigre. Elle est également basée sur les différentes capacités de conduction des tissus en fonction de leur composition, en sachant que les tissus contenant beaucoup d'eau et d'électrolytes sont de bons conducteurs, alors que l'air, la masse grasse et l'os sont de mauvais conducteurs. A basse fréquence (5 kHz), le courant est incapable de traverser la membrane cellulaire et la résistance est reliée négativement aux fluides extracellulaires. A haute fréquence (50-200 kHz), le courant est capable de traverser la membrane cellulaire et la résistance mesurée reflète l'eau corporelle totale. Les valeurs de résistances mesurées à haute (50-200 kHz) et basse fréquence (5 kHz) sont utilisées pour calculer l'eau corporelle totale et l'eau extracellulaire à partir d'équations publiées. Ces deux compartiments sont utilisés à leur tour pour calculer la masse grasse et la masse maigre en utilisant d'autres équations. Cette méthode repose sur l'hypothèse que l'hydratation et la densité de la masse maigre sont constantes respectivement de 72 à 73 % et de 1,1 g/ml. La composition corporelle est estimée à partir des données de l'impédancemétrie en utilisant le plus souvent l'équation de Segal (Segal *et al.*, 1988):

Pour les hommes :

$$\text{Masse maigre (kg)} = (0,00132 \times \text{taille}^2) - (0,0439 \times R) - (0,305 \times \text{poids}) - (0,168 \times \text{âge}) + 22,67.$$

Pour les femmes :

$$\text{Masse maigre (kg)} = (0,00108 \times \text{taille}^2) - (0,0209 \times R) - (0,232 \times \text{poids}) - (0,0678 \times \text{âge}) + 14,59.$$

La taille est exprimée en cm et R est la résistance à 50 kHz.

Mesure d'impédancemétrie bioélectrique

La mesure est réalisée sur un patient au repos en décubitus dorsal depuis au moins 30 minutes, ayant quitté chaussures et chaussettes et ne portant pas de bijoux. Pendant la mesure les bras et les jambes doivent être étendus de part et d'autre du corps et les mains ne doivent pas être en contact avec le tronc. Les électrodes émettrices de l'impédancemètre (Bodystat® QuadScan 4000) sont placées pour l'une sur la face dorsale de la main droite entre la 2ème et la 3ème articulation métacarpo-phalangienne, et pour l'autre, sur la face dorsale du pied droit entre la 1ère et la 2ème articulation métatarso-phalangienne. Les électrodes réceptrices sont placées en regard, l'une étant fixée sur le poignet entre les styloïdes radiale et cubitale et l'autre étant fixée sur la cheville entre les deux malléoles. Un courant de 800µA est introduit par les électrodes distales à différentes fréquences (5, 50 et 100 kHz) et la diminution du voltage après traversée du patient est détectée avec les électrodes proximales.

Taille et poids

La taille est mesurée avec une précision de 0,1 cm, chez un patient en sous-vêtements, dont les talons joints sont en contact avec la base de la toise verticale (SECA, Hamburg, Germany). Le poids est mesuré avec une précision de 0,01 kg, après le petit déjeuner, alors que le patient est en sous-vêtements, en utilisant la balance du pléthysmographe qui est calibrée avant chaque mesure.

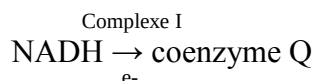
Fiche technique n°8 : Dosages enzymatiques des complexes de la chaîne respiratoire par spectrophotométrie

Ces dosages résultent d'une adaptation de la technique de Malgat *et al.* (Malgat *et al.*, 1999) et de la technique de consensus de la réunion AFM de janvier 2004.

Le principe des dosages repose sur le transfert d'électrons de donneurs (c'est à dire de substrats) à un accepteur. Les dosages permettent la mesure par spectrophotométrie du taux d'apparition de l'accepteur réduit ou du taux de disparition du donneur oxydé.

Dosage de la NADH Ubiquinone C Réductase (complexe I)

Ce dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH :



Le complexe I permet le transfert des électrons de NADH au coenzyme Q, remplacé dans le dosage par un analogue : la décylubiquinone. Cependant NADH peut aussi être oxydé par le cytochrome b5 réductase de la membrane mitochondriale externe. Le dosage est donc aussi effectué en présence de roténone (inhibiteur du complexe I) pour permettre la quantification de l'activité non sensible à la roténone et donc indépendante du complexe I.

Technique

Dans un tube à hémolyse :

	Concentrations solutions stocks (m mol/l)	Volumes (µl)	Concentrations finales (mM)
Tampon phosphate pH 7,5	100	500	50
Sérum albumine sans acides gras libres	50 mg/ml	75	3,75 mg/ml
Décylubiquinone	25	4	0,1
Mitochondries		10	10 µg de protéines
Eau ppi		400	
Chauffer à 37°C 3 minutes			
Démarrer par NADH	10	10	0,1

- Suivre la variation d'absorbance à 340 nm et à 37°C.
- Faire le même dosage avec 5 µl de roténone dans le milieu réactionnel.

ϵ NADH = 6220 M⁻¹. cm⁻¹

Réactifs

Tampon phosphate (pH 7,5 – 100 mM) :

Phosphate monopotassique : 1,36 g
Eau distillée : qsp 100 ml
Ajuster à pH 7,5 avec du KOH 5N.

Sérum albumine sans acides gras (50 mg/ml) :

Sérum albumine : 125 mg
Eau distillée : qsp 2,5 ml

Décylubiquinone (25 mM) :

Dissoudre 10 mg de Décylubiquinone dans 1,25 ml de DMSO.

Roténone (2,5 mM):

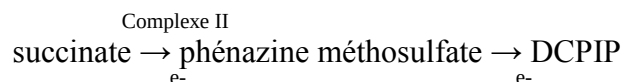
1 mg/ml dans un mélange (volume/volume) éthanol/DMSO

NADH (10 mM):

NADH : 7,2 mg
Eau distillée : qsp 1 ml

Dosage de la Succinate Déshydrogénase (complexe II)

Ce dosage consiste à mesurer la réduction du dichlorophénol-indophénol (DCPIP):



	Volumes (µl)	Concentrations finales (mM)
Tampon phosphate pH 7,5	500	50
Succinate	160	30
KCN	150	1,5
Phénazine méthosulfate	50	0,1
Mitochondries isolées		3 µg de protéines

- Incuber 3 minutes à 37°C.
- Démarrer la réaction en ajoutant 200 µl de DCPIP.
- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C.

ϵ DCPIP = 21000 M⁻¹. Cm⁻¹

Réactifs

Tampon phosphate (pH 7,5 – 100 mM) :

Phosphate monopotassique : 1,36 g
Eau distillée : qsp 100 ml
Ajuster à pH 7,5 avec du KOH 5N.

Succinate (200 mM) :

Acide succinique : 118 mg
Eau distillée : qsp 5 ml
Ajuster à pH 7,4 avec du KOH 5N.

KCN (10 mM) :

KCN : 6,4 mg
Eau distillée : qsp 10 ml
Neutraliser par de l'HCl 6N

Phénazine méthosulfate (20 mM) : à préparer extemporanément, très sensible à la lumière.

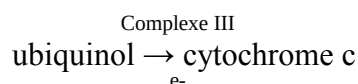
Phénazine méthosulfate : 6,1 mg
Eau distillée : qsp 1 ml

DCPIP (dichlorophénol-indophénol à 150 mg/l) : à préparer extemporanément.

Dichlorophénol-indophénol : 3,7 mg
Eau distillée : qsp 25 ml
Tiédir à 37°C avant usage.

Dosage de l'Ubiquinone Cytochrome C Réductase (Complexe III)

Ce dosage consiste à mesurer la réduction du cytochrome c :



Le complexe III permet le transfert des électrons du coenzyme Q réduit (ubiquinol), remplacé dans le dosage par un analogue : le décylubiquinol, au cytochrome c. Le dosage est aussi effectué en présence d'antimycine (inhibiteur du complexe III) pour quantifier la réduction du cytochrome c indépendante du complexe III.

	Volumes (µl)	Concentrations finales (mM)
Tampon phosphate pH 7,5	500	50
Sérum albumine sans acides gras libres	20	1mg/ml
KCN	100	1
Cytochrome C oxydé	100	0,1
Roténone	5	0,0125
EDTA	50	0,625
Eau ppi	230	
Mitochondries isolées		10 µg de protéines

- Incuber 30 secondes à 37°C.
- Démarrer la réaction en ajoutant 100 µM de Décylubiquinol.
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C.
- Faire le même dosage avec 10 µl Antimycine dans le milieu réactionnel.

$\epsilon_{\text{cyt c}} = 18500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Réactifs

Tampon phosphate (pH 7,5 – 100 mM) :

Phosphate monopotassique : 1,36 g
 Eau distillée : qsp 100 ml
 Ajuster à pH 7,5 avec du KOH 5N.

Sérum albumine sans acides gras (50 mg/ml) :

Sérum albumine : 125 mg
 Eau distillée : qsp 2,5 ml

KCN (10 mM) :

KCN : 6,4 mg
 Eau distillée : qsp 10 ml
 Neutraliser par de l'HCl 6N

EDTA (12,5 mM)

EDTA : 4,65 mg
 Eau distillée : qsp 1 ml

Antimycine A : 1 mg/ml H₂O

Cytochrome C oxydé (1 mM)

Cyt c : 13,0 mg
 Eau distillée : qsp 1 ml

Roténone : 1 mg/ml dans un mélange (volume/volume) Ethanol/DMSO

Décylubiquinol :

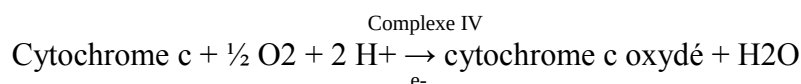
Cette préparation se fait dans la mesure du possible à l'abri de la lumière (papier aluminium).

- Préparer une solution de décylubiquinone à 13 mM (20 mg dans 4.8 ml d'éthanol).
- Prendre le spectre de la solution oxydée (1 µl dans 1 ml d'éthanol) et noter le pic d'absorbance à 275 nm.
- Ajouter quelques cristaux de borohydrure de sodium ou de dithionite de sodium et agiter.
- Acidifier avec du HCl 3M (quelques ml) jusqu'à décoloration de la solution en jaune pâle.
- Prendre le spectre de la solution réduite (1 µl dans 1 ml d'éthanol) et noter le pic d'absorbance à 285 nm.
- Ajouter 4 ml de tampon (KH₂PO₄ 0,1 M; Sorbitol 0,25 M; pH 7,4), puis 2 ml de cyclohexane.

- Agiter fortement pendant 5 min (agitateur mécanique).
- Laisser décanter (quelques secondes).
- Extraire la phase organique (pipette pasteur) et la récupérer dans un tube en verre.
- Faire plusieurs extractions au cyclohexane (2 à 3 fois) et rassembler les phases organiques.
- Evaporer le cyclohexane sous courant d'azote (plus rapide que sous vide, évite donc la réoxydation de la solution).
- Reprendre le résidu dans la même quantité d'éthanol mise au départ soit 4.8 ml.
- Faire des aliquots de 100 µl dans des tubes eppendorf (perforer les capuchons).
- Evaporer sous vide (Speed-vaac) et conserver à -80°C.
- Pour vérifier la concentration du décylubiquinol ajouter à un des aliquots 100 µl d'éthanol et prendre le spectre d'absorption.
- Conserver au congélateur -80°C.

Dosage de la Cytochrome C Oxydase (Complexe IV).

Ce dosage consiste à mesurer l'oxydation du cytochrome c :



Technique

- Incuber 990 µl de solution de cytochrome c réduit 2 minutes à 37°C.
- Démarrer la mesure par l'ajout de 5 µg de protéines mitochondriales isolées (10-50 µg protéines homogénat).
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C.

Le complexe IV permet le transfert des électrons du cytochrome c au dioxygène (O₂).

$$\epsilon_{\text{cyt c}} = 18500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

Réactifs

Tampon phosphate (pH 7,0 – 50 mM) :

phosphate monopotassique : 680 mg
 eau distillée : qsp 100 ml
 Ajuster à pH 7,0 avec du KOH 5N.

Cytochrome c réduit (80 µM) :

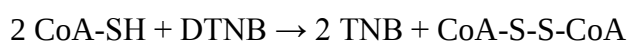
- Diluer la solution de Cytochrome C (13,0 mg/ml H₂O) oxydé : 0,8 ml + 9,2 ml de tampon pH 7,0.
- Oxyder 1 ml de cette solution (Oxy) par quelques cristaux de Ferricyanure de Potassium.
- Réduire 1 ml de cette solution (Red) par quelques cristaux de Dithionite de Sodium.
- Mesurer le rapport de D.O. (550/560 nm) des différentes solutions.

Le rapport sera : proche de 1,1 pour le 0% de réduction et supérieur à 7 pour le 100% de réduction.

- Ajouter par fractions de 20 µl le Cytochrome C réduit obtenu précédemment (Red) aux 8 ml de Cytochrome C oxydé (C) restant et mesurer le rapport de façon à être à 92-97% de réduction [D.O. 550 nm solution C - D.O. 550 nm solution Oxy = 0.92 à 0.97 x (D.O. 550 nm solution Red - D.O. 550 nm solution Oxy)].

Dosage de la Citrate Synthase (CS)

Ce dosage consiste à mesurer la formation du trinitrobenzène (TNB) :



Technique

	Volumes (µl)	Concentrations finales (mM)
DTNB/Tampon	100	100
Acide oxaloacétique	100	1
Acétyl Co A	30	0,03
Triton X 100 à 10%	400	4%
Eau ppi	360	

- Incuber 3 minutes à 37°C.
- Démarrer la réaction en ajoutant 10 µg de protéines de mitochondries isolées (10-50 µg pour homogénat).
- Suivre la variation d'absorbance à 412 nm et à 37°C.
- Faire le même dosage avec 10 µl Antimycine dans le milieu réactionnel.

ε TNB = 13600 M⁻¹. Cm⁻¹

Réactifs

Tampon pour le DTNB :

Tris M : 6,05 g
Eau distillée : qsp 50 ml
Ajuster à pH 8,1 avec de l'HCl 6N.

DTNB/tampon (1 mM) : à préparer extemporanément.

Dinitrobenzène (DTNB) : 1 mg
Tampon : qsp 2,5 ml

Acétyl Co A (10 mM) :

Acetyl-Co-A : 10 mg
Eau distillée : qsp 1,2 ml

Acide oxaloacétique (10 mM) : à préparer extemporanément.

Acide oxaloacétique : 3,3 mg
Eau distillée : qsp 2,5 ml
Ajuster à pH 7 avec KOH 5N.

Fiche technique n°9 : Mesure de la dépense énergétique de repos par calorimétrie indirecte

Cette méthode repose sur l'équivalence entre l'énergie utilisée dans l'organisme et celle convertie à partir de l'oxydation des nutriments. Il est donc possible d'utiliser la consommation globale d'oxygène comme témoin de la dépense d'énergie. La mesure des échanges gazeux respiratoires (consommation d'oxygène, et production de gaz carbonique) nécessite une enceinte de taille réduite et hermétique, une bulle ventilée en plexiglas. Les échanges gazeux respiratoires sont couramment mesurés; la dépense énergétique de repos peut être évaluée ainsi.

Le patient est à jeun depuis 6 heures. Il reste allongé pendant toute la mesure et ne doit pas dormir. La bulle de plexiglas transparente recouvre la tête et le thorax. C'est au travers de ce volume de 40 litres que sont mesurées les concentrations en O₂ et CO₂. L'air est brassé et renouvelé à un débit déterminé. Le calorimètre, qui analyse des concentrations en gaz est connecté à un ordinateur qui calcule automatiquement la dépense d'énergie. C'est un appareil portable (Vmax SPECTRA 29n, Yorba Linda, CA) qui peut être installé dans la chambre du patient. La mesure dure 30-40 minutes.

Fiche technique n°10 : Extraction d'ARN avec le kit Qiagen « RNeasy fibrous tissue kit »

Pour une biopsie de 30 mg :

- Ajouter 300µl de tampon RLT
- Homogénéiser au polytron 20 à 40 secondes
- Ajouter 590µl d'eau RNase free à l'homogénat
- Ajouter 10µl de protéinase K
- Mixer délicatement par pipetage
- Incuber 10 minutes à 55°C
- Centrifuger 3 minutes à 10.000 g à 20-25°C
- Transférer le surnageant (environ 900µl) dans un eppendorf de 1,5 ou 2 ml.
- Ajouter 0.5 volumes (450µl) d'éthanol absolu au surnageant
- Transférer 700µl du mélange (incluant l'éventuel précipité) dans une colonne, dans un tube collecteur de 2 ml.
- Centrifuger 15 secondes à plus de 8000g puis éliminer l'éluat.
- Ajouter 350 µl de tampon RW1 dans la colonne.
- Centrifuger 15 secondes à plus de 8000g pour laver puis éliminer l'éluat.
- Ajouter 10µl de DNaseI à 70µl de tampon RDD, mixer par inversion.
- Ajouter les 80 µl de mix à la colonne
- Incuber 15 minutes à température ambiante.
- Ajouter 350µl de RW1 à la colonne.
- Centrifuger 15 secondes à plus de 8000g puis éliminé l'éluat.
- Transférer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml.
- Ajouter 500µl de tampon RPE à la colonne
- Fermer le tube et centrifuger 2 minutes à plus de 8000g pour sécher la membrane.
- Enlever le tube collecteur sans que la colonne ne le touche afin d'éviter le contact avec l'éthanol.
- Placer la colonne dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et de centrifuger à vitesse maximale (<16000g) pour sécher la membrane.
- Transférer la colonne dans un tube collecteur de 1,5 ml.
- Ajouter 30 à 50 µl d'eau RNase free à la colonne.
- Fermer le tube et centrifuger 1 minute à plus de 8000g pour éluer.
- Si l'éluat contient plus de 30µg d'ARN, éluer de nouveau avec de l'eau RNase free

7.2. Les modèles expérimentaux de cachexie cancéreuse

Chez l'homme, la variabilité de la réponse à la tumeur ainsi que la présence d'éléments cliniques confondants compliquent souvent l'évaluation de la cachexie cancéreuse. La conduite d'études cliniques nécessite la constitution de groupes homogènes. Pour cette raison, il est nécessaire d'inclure un grand nombre de personnes pour chaque groupe d'étude. De plus, lorsqu'un traitement est proposé, il est important de prévoir le taux de non-observance de celui-ci ainsi que les sorties prématurées de protocole. Les études cliniques sont donc souvent longues et coûteuses.

Les modèles animaux de cachexie présentent un certain nombre d'avantages. En effet, ils favorisent la constitution de groupes homogènes d'animaux. Ceci assure une intervention expérimentale contrôlée, moins longue et hautement reproductible. Par ailleurs, le choix de traitements est beaucoup plus large. Il est également possible de modifier durablement l'alimentation d'un groupe, d'initier ou de greffer des tumeurs. Il est aussi plus facile de mesurer finement la prise alimentaire et par conséquent de mettre en place des groupes "pair-fed". De même l'historique de la cachexie (survenue et développement) et l'évolution de la masse tumorale sont mieux suivis. Enfin, ces modèles animaux autorisent des prélèvements multiples (organes, biopsies, sang...) afin de mesurer de nombreux marqueurs à différents sites et d'étudier les mécanismes de la réponse de l'hôte à la tumeur.

Il existe de nombreux modèles d'animaux porteurs de tumeurs spontanées, ou induites soit chimiquement, soit par des oncogènes ou par infection virale. Le développement de ces tumeurs implique une latence dans l'établissement du modèle qui rend ce dernier peu pratique pour la mise en place d'études pré-cliniques. Néanmoins ces modèles permettent d'établir des lignées cellulaires qui seront utilisées in vitro ou in vivo. Inoculées à des animaux ces cellules provoquent le développement de tumeurs de même nature que la tumeur d'origine. De même, l'inoculation de fragments tumoraux de cette nouvelle tumeur induira chez un animal hôte le développement d'une tumeur identique. Il est donc possible de transplanter une tumeur d'un hôte à l'autre et ainsi établir un modèle animal caractérisé. Néanmoins, afin de s'affranchir des problèmes de réponse immune de l'hôte, réponse susceptible d'influer sur les résultats, il est préférable de choisir un transplant et un hôte de même nature. Ainsi, les tumeurs induites

chez une espèce sont transplantées à des animaux de la même espèce possédant le même patrimoine génétique (souches consanguines).

Les modèles expérimentaux de cachexie cancéreuse sont essentiellement des modèles murins porteurs de tumeurs transplantables (Emery, 1999). En établissant les caractéristiques d'un modèle (nature du transplant et de l'hôte, site d'inoculation, courbe de croissance tumorale, évolution de la prise alimentaire et du poids, espérance de vie, sensibilité de la tumeur à différents agents, données biochimiques de l'hôte...) il est possible de standardiser les conditions d'études. Ces données permettent de s'assurer de l'intégrité d'un modèle lorsqu'une tumeur est induite à partir d'échantillons stocks congelés ou frais. Néanmoins il n'existe pas de modèle idéal et les observations faites sur l'un ne sont pas toujours transposables aux autres modèles. Il importe donc de bien choisir un modèle en fonction de la problématique à résoudre.

7.2.1. Quelques modèles animaux de cachexie cancéreuse

Le tableau suivant présente les modèles de tumeurs transplantables et leurs hôtes les plus utilisées pour l'étude de la cachexie cancéreuse.

Tumeurs	Histopathologie	Hôtes
Colon-26	Carcinome colique	Souris BALB/c
MAC-16	Adénocarcinome colique	Souris NMRI
Yoshida AH-130	Tumeur Hépatique	Rats wistar
Walker-256	Carcinome	Rats spragues dawley
Lewis lung carcinoma	Carcinome pulmonaire	Souris C57BL/6
MCA	Sarcome	Rats Fischer F344
MCG-101	Sarcome	Souris C57BL/6J

7.2.2. Les tumeurs transplantables

7.2.2.1. Le carcinome Colon 26

Le carcinome murin Colon-26 est une tumeur non différenciée de colon de souris, induit par un carcinogène, le N-nitroso-N-méthylurethane. L'injection en sous-cutané de cellules colon-26 à des souris BALB/c induit le développement d'une tumeur et d'une cachexie (Tanaka *et al.*, 1990). La prise alimentaire de ces souris est identique à celle des souris contrôles¹. La perte de poids² est significative dès le 15^{ème} jour après l'inoculation. Le poids chute progressivement jusqu'au 28^{ème} jour où il est réduit de 15% par rapport à sa valeur initiale et de 41% par rapport au groupe contrôle. La réduction du poids concerne le tissu adipeux et le tissu musculaire. La masse tumorale passe de 6% au 15^{ème} jour à 16% au 28^{ème} jour. La mort survient vers le 45^{ème} jour (Tanaka *et al.*, 1990; Fujimoto-Ouchi *et al.*, 1995).

Un variant de ce modèle est souvent rencontré. La tumeur est induite de la même façon par injection de cellules clones du carcinome colon-26, le colon-26 clone 20. Les caractéristiques de ce dernier diffèrent du modèle original. La chute de poids survient plus tôt, dès 8 jours après l'inoculation. La masse tumorale ne représente alors que 1,5% du poids total de l'animal. Au 24^{ème} jour, la tumeur représente 2% du poids total. A ce stade, 50% des souris sont déjà mortes (Fujimoto-Ouchi *et al.*, 1995). Les cellules de carcinome colon-26 clone 20 sont plus efficaces que les cellules originales quand à l'induction d'une cachexie.

7.2.2.2. L'adénocarcinome MAC 16

L'adénocarcinome murin MAC16 est une tumeur différenciée de colon de souris, induite par administration chronique d'un carcinogène, le 1,2 diméthylhydrazine. Implantées en sous-cutané à des souris NMRI, ses cellules induisent une tumeur dont le temps de doublement (en volume) est d'environ 6 jours. La prise alimentaire de ces souris n'est pas affectée. La perte de poids apparaît dès le 14^{ème} jour après l'inoculation. Elle est progressive et représente au

¹ Les animaux du groupe contrôle sont nourris ad libitum.

² Le poids de l'animal est calculé en retranchant le poids de la tumeur au poids total de l'animal.

30^{ème} jour, une chute de 11% par rapport au poids initial et de 20% par rapport au groupe contrôle. Cette perte concerne aussi bien le tissu adipeux que le tissu musculaire. La masse tumorale augmente progressivement et correspond au 14^{ème} jour à moins de 1% du poids total de l'animal pour atteindre 10% au 30^{ème} jour. L'exérèse de la tumeur induit une reprise de poids (Bibby *et al.*, 1987).

7.2.2.3. L'hépatome ascitique Yoshida AH-130

L'hépatome ascitique Yoshida AH-130 est une tumeur induite chez le rat par un carcinogène, le diaminoazobenzène (Yoshida *et al.*, 1952). Injectées en intrapéritonéal à des rats Wistar, ses cellules induisent une tumeur à croissance rapide. La prise alimentaire de ces rats chute progressivement après l'inoculation. Elle passe de 18g/jour avant implantation, à 10g/jour au 10^{ème} jour après l'inoculation puis est réduite à néant au 14^{ème} jour (Tessitore *et al.*, 1993). La perte de poids est progressive. L'écart de poids entre les rats témoins et les rats porteurs de tumeurs est significatif dès le 4^{ème} jour. Au 10^{ème} jour, le poids est réduit de 30% par rapport à sa valeur initiale et de 50% par rapport au poids des rats témoins. Les premières manifestations de fonte tissulaire (dont le muscle) sont notées dès que la tumeur représente 0,1% du poids de l'animal (jour 2). La cachexie est nettement marquée au 10^{ème} jour. La masse tumorale correspond alors à 5% du poids total de l'animal. Ces animaux meurent vers le 15^{ème} jour (Tessitore *et al.*, 1987).

7.2.2.4. Le carcinosarcome Walker-256

Le carcinome Walker-256 est une tumeur dérivée d'un adenocarcinome mammaire spontané de rat. Injectées en sous-cutané à des rats Spragues-Dawley, ses cellules se développent en une tumeur à croissance rapide. La prise alimentaire est réduite dès le 6^{ème} jour après inoculation. Au 14^{ème} jour, elle est diminuée de 40%. La cachexie est la plus sévère à ce stade avec une perte de poids significative de 7% par rapport au poids initial et de 19% par rapport au poids des rats témoins. Cette perte concerne le muscle et le tissu adipeux (Guaitani *et al.*, 1982). La masse tumorale représente alors 10% du poids de l'animal. L'espérance de vie est de 14+/-1 jours (Guaitani *et al.*, 1982).

7.2.2.5. Le carcinome pulmonaire de Lewis (LLC)

Le LLC est issu du développement spontané de carcinome pulmonaire chez des souris C57BL au laboratoire du Dr. Margaret Lewis en 1951 au Wistar Institute (Sugiura et Stock, 1955). Les cellules de ce carcinome sont fréquemment utilisées pour les modèles de métastases. A partir de la tumeur primaire, elles métastasent vers les poumons. La croissance tumorale est rapide, avec un temps de doublement de 2,5 jours (Teicher, 2002). Bien que la prise alimentaire ne soit pas affectée par le développement tumoral, la perte de poids total, au 15^{ème} jour après l'inoculation, est d'environ 18% par rapport au groupe contrôle. Elle concerne aussi bien le tissu musculaire (-22%) que le tissu adipeux (Lloveraet *et al.*, 1998). La masse tumorale représente alors 20% du poids total de l'animal. L'espérance de vie des souris est de 21 à 25 jours.

7.2.2.6. Le sarcome MCA

Ce sarcome est induit par injection sous-cutanée d'un carcinogène, le methylcholantrene, à des rats Fischer (F344). Cette tumeur est caractérisée par une croissance rapide, une invasion des tissus voisins, et un faible pouvoir métastatique. L'injection sous-cutanée de ses cellules induit une tumeur palpable 10 à 12 jours après l'inoculation (Burt *et al.*, 1981). Au 30^{ème} jour, la masse tumorale représente 30% du poids total de l'animal (Kurzer *et al.*, 1988). La prise alimentaire des animaux chute dès le 14^{ème} jour. Elle est significativement différente de celle du groupe témoin au 21^{ème} jour, puis décline progressivement jusqu'à zéro. Le poids de l'animal chute relativement tôt après l'inoculation. Au 30^{ème} jour, les rats ont un poids 30% inférieur à celui du groupe contrôle (Kurzer *et al.*, 1988). Le tissu musculaire et le tissu adipeux sont significativement réduits lorsque la masse tumorale représente 20% du poids total de l'animal (Noguchi *et al.*, 1991). L'espérance de vie des rats est d'environ 5 semaines.

7.2.2.7. Le sarcome MCG 101

Ce sarcome est induit par injection de methylcholantrene à des souris C57BL/6J. Après injection sous-cutanée de cellule MCG 101, la tumeur qui se développe est palpable vers le

6^{ème} jour. Elle se développe sans métastase (Lundholm *et al.*, 1978). A ce stade, la prise alimentaire décline pour être réduite de 50 à 60% au 11^{ème} jour (Lundholm *et al.*, 1980). Le poids total n'est pas affecté. Néanmoins, le poids sec des animaux porteurs de tumeur est réduit de 19%. La quantité d'eau corporelle de ces animaux est supérieure à celle des animaux contrôles. Au 14^{ème} jour, la fonte musculaire représente une perte de 56% par rapport aux souris témoins (Lundholm *et al.*, 1978). L'espérance de vie moyenne de ces animaux est de 14 jours, avec une charge tumorale correspondant à 15% du poids total (Edstrom *et al.*, 1986).

7.2.3. Les limites des modèles expérimentaux de cachexie cancéreuse

Il est possible d'observer une modification des caractéristiques d'un modèle animal. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette déviance : l'âge des animaux au moment des observations, la qualité des transplants, les conditions de culture des cellules tumorales, le nombre de cellules ou la taille des fragments tumoraux implantés, le site d'inoculation, les conditions sanitaires et environnementales d'élevage des animaux, la saison à laquelle l'expérimentation est réalisée... Il est donc important de s'assurer de l'intégrité d'un modèle avant de le mettre en œuvre.

Ces modèles présentent quelques limites. Un bon modèle de cachexie doit reproduire les signes du syndrome tels qu'ils se manifestent chez l'homme. La perte de poids, la prise alimentaire et l'évolution tumorale sont les premiers facteurs caractéristiques d'un modèle de cachexie. Selon les modèles, ces critères sont plus ou moins présents.

7.2.3.1. Le développement tumoral

Chez l'homme, la masse tumorale représente en moyenne 0,7% de la masse corporelle totale au moment du diagnostic. Chez l'animal, la plupart des modèles consistent en une transplantation chez un rongeur d'implants dont l'évolution conduit à une masse tumorale de dimensions importantes. Généralement, ces tumeurs induisent une cachexie dès que leurs masses atteignent environ 10% de la masse totale de l'animal, soit un rapport bien plus élevé

que chez l'homme (Norton *et al.*, 1987). Chez ce dernier, la tumeur excède rarement 5% du poids total de l'individu (Strain, 1979). En revanche, elle représente jusqu'à 30% du poids total chez les rats porteurs de tumeur MCA (Kurzer *et al.*, 1988), 20% chez les souris LLC (Llovera *et al.*, 1998), 16 % chez les souris-Colon-26 (Tanaka *et al.*, 1990). L'étude de Morrison *et al.* montre que près de 30 % de la perte de poids et de la déplétion de muscle squelettique observée ainsi que 20% de la chute de prise alimentaire seraient dues à la masse tumorale disproportionnée mise en œuvre dans ces modèles animaux (Morrison *et al.*, 1984). La plupart des tumeurs transplantables sont implantées en sous-cutané, ce qui conduit au développement de tumeurs ectopiques. La réponse physiologique ainsi induite peut différer de celle provoquée par le développement d'une même tumeur implantée dans un organe cible (Wilmanns *et al.*, 1992 ; Kerbel, 1998). Bien que le développement de tumeurs sous-cutanées ne puisse refléter toutes les situations cliniques, cela reste le mode le plus pratique d'inoculation et de suivi des tumeurs (Teicher, 2006). Néanmoins, le taux de croissance de ces tumeurs reste élevé avec un temps de doublement de l'ordre du jour. Chez l'homme, la croissance tumorale est plus lente (de l'ordre du mois ou de l'année).

7.2.3.2. La prise alimentaire

La réduction de la prise alimentaire induite par la cachexie cancéreuse diffère de celle provoquée par une restriction alimentaire. En effet, cette chute est liée à des changements métaboliques différents de ceux observés lors d'une simple restriction (Kurzer *et al.*, 1988). Chez l'homme les mesures de prise alimentaire effectuées chez des patients cachectiques fournissent des résultats fluctuants. L'anorexie est présente à des degrés variables. Selon une étude de Costa *et al.*, les patients atteints de cancer consomment environ 13 % d'énergie en moins que des sujets sains (Costa *et al.*, 1981). Chez l'animal, la réduction de la prise alimentaire varie selon le modèle. Les rats porteurs de tumeurs Yoshida HA-130 réduisent progressivement jusqu'à zéro leur prise alimentaire (Tessitore *et al.*, 1993), alors qu'elle n'est pas affectée chez les souris porteuses de carcinome Colon-26 (Tanaka *et al.*, 1990) ni pour celles porteuses de tumeur MAC-16 (Bibby *et al.*, 1987). Ceci implique pour l'expérimentateur, un choix éclairé du modèle en fonction de la situation clinique envisagée.

7.2.3.3. La perte de poids

De même que la prise alimentaire, la perte de poids chez les patients cachectiques est variable selon le type de cancer (Dewys *et al.*, 1980). Il est donc important de choisir le modèle animal dont la cinétique de perte de poids correspond à la problématique clinique considérée.

7.2.4. Conclusions

Les modèles animaux de tumeurs transplantables ont fortement contribué à mieux comprendre le syndrome de cachexie cancéreuse. Ils permettent une étude méthodique de ce syndrome grâce à la mise en place d'études cohérentes, reproductibles et peu coûteuses. Ils facilitent l'obtention d'informations spécifiques à partir de groupes homogènes d'animaux. Ces modèles favorisent l'étude de points précis du mécanisme de réponse de l'hôte face à la tumeur. De plus, ils contribuent à l'évaluation de traitements potentiels contre la cachexie cancéreuse. Compte tenu de la diversité, les différents modèles génèrent des résultats qui ne sont pas toujours transposables les uns aux autres. Ils représentent néanmoins, une bonne approche pré-clinique de problèmes bien ciblés.

Les petits rongeurs (rats et souris principalement) font des modèles de tumeurs de choix compte tenu de leur taille, leur faible coût (à l'exception des animaux transgéniques), leur fécondité, leur lignage et la disponibilité d'information biologique les concernant. Néanmoins, il existe aussi des modèles de tumeur chez les animaux de compagnie (Dewhirst *et al.*, 2002). En effet, contrairement à certains animaux domestiques (poulet, cochon...) les animaux de compagnie (chiens, chats) sont l'objet de soins à long terme qui permettent d'observer, au moment où les risques sont forts, l'apparition de tumeurs spontanées. Il existe de grandes similitudes entre le chien et l'homme dans le développement tumoral et la réponse à la tumeur (Khanna *et al.*, 2006).