UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM UMR 1069 « Nutrition, Croissance et Cancer »

THÈSE présentée par :

Adeline DOLLY

Soutenue le : **13 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie et de la Santé

CACHEXIE CANCEREUSE : COMPOSITION CORPORELLE, STRUCTURE ET METABOLISME DU MUSCLE SQUELETTIQUE

THÈSE dirigée par :

M SERVAIS Stéphane	Professeur des Universités, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme REBILLARD Amélie	Professeur des Universités, Université de Rennes 2
M SENESSE Pierre	Praticien Hospitalier, Institut du Cancer, Montpellier

---

JURY :

M ANDRES Christian	Professeur des Universités - Praticien Hospitalier, Université de Tours, Président du Jury
Mme BARACOS Vickie	Professeur des Universités, Université d'Alberta, Canada
M DUMAS Jean-François	Maître de conférences, HDR, Université de Tours
Mme REBILLARD Amélie	Professeur des Universités, Université de Rennes 2
M SENESSE Pierre	Praticien Hospitalier, Institut du Cancer, Montpellier
M SERVAIS Stéphane	Professeur des Universités, Université de Tours

Dès le début de ma thèse, sans savoir où je m'engageais, tu avais prédit que cela allait être difficile, qu'il allait falloir que je m'accroche, mais qu'à la fin, ça aboutirait sur de belles choses et que ça en vaudrait la peine. J'aurais tant aimé que tu sois là, que tu puisses voir à quel point tu avais raison.

A Mamie Lili

A ma famille que j'aime tant.

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury. Christian Andres, merci beaucoup d'avoir accepté de remplacer Emmanuel Moyse en qualité d'examinateur. Monsieur Moyse, je sais que vous auriez voulu être présent le jour de ma soutenance, et je vous remercie pour votre soutien et vos conseils qui m'ont beaucoup apporté depuis mon Master 2. J'espère vous rendre fier à travers l'aboutissement de ce travail. Un grand merci à Amélie Rebillard et Pierre Senesse, rapporteurs de ma thèse, qui ont accepté de relire ce manuscrit ; et à Vickie Baracos, examinatrice de mon travail, qui a été d'une aide plus que précieuse durant cette thèse. Vickie, c'est pour moi une chance inestimable de t'avoir rencontrée, d'avoir pu être formée au métier de chercheur grâce à ton œil critique et ton expertise sur le sujet. Merci infiniment pour le temps que tu m'as consacré, pour ton écoute patiente et toujours si amicale, et les nombreuses discussions enrichissantes que nous avons partagées.

Je remercie également Stephan Chevalier, Christophe Vandier et Gaëlle Fromont, Directeurs successifs du laboratoire, de m'avoir accueillie au sein de l'unité. Merci d'avoir été là pour moi quand j'en ai eu besoin.

Je remercie bien évidemment mes Directeurs de thèse, Stéphane Servais et Jean-François Dumas. Stéphane, je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Tu m'as accordé confiance et complète autonomie sur ce projet que j'ai pu m'approprier avec passion. Si tu n'avais pas été tel que tu es, je ne serais pas devenue celle que je suis.
Jean-François, quelques phrases ne sauraient suffire pour exprimer à quel point je te suis reconnaissante pour ton soutien indéfectible à travers toutes les difficultés humaines et scientifiques auxquelles j'ai eu à faire face au cours de ces quatre années. Tu as toujours su être à l'écoute et de très bon conseil. Ne doute jamais de la qualité de ton encadrement.

Je tiens à remercier Lobna Ouldamer et Caroline Goupille pour leur co-encadrement sur le protocole clinique METERMUS-IMC. Il est difficile de résumer tout ce pour quoi j'aimerais vous remercier. Lobna, tu es pour moi source d'inspiration et d'admiration. J'ai beaucoup appris à tes côtés, que ce soit au bloc en assistant à tes chirurgies, ou tout simplement en échangeant. Tu m'as aidée à prendre du recul sur mon travail et à ne pas oublier les raisons pour lesquelles

je souhaite exercer ce métier, pour les patients et la passion de la recherche. Karo, ton soutien généreux et ta bienveillance ont particulièrement contribué à la bonne réussite de ce travail. Notre routine de dissection des biopsies accompagnée de discussions et ponctuée de fous rires va terriblement me manquer. Mais tel un vrai post-it, je resterai collée à toi !

Un grand merci à la Julie Dartier du début de thèse qui m'a prise sous son aile et m'a transmis son savoir sur la mitochondrie. J'espère avoir fait honneur à notre groupe. Un autre grand merci à la Julie Dartier de la fin de thèse, ma pompom-girl, pour ton soutien et tous ces bons moments de détente et de rire passés en salle de sport et ailleurs.
Je remercie chaleureusement Julie Cournet, ma technicienne de compétition, pour toute l'aide que tu m'as apportée pendant deux années ; Elsa Lemaître, pour ton aide sur les manips lorsque j'étais un bébé doctorant.
Je remercie également Lucie Brisson, post-doctorante à mon arrivée, chercheuse à mon départ. Ton amitié, ton aide, ta rigueur et tes précieux conseils m'auront permis d'évoluer tout au long de ces années.

Je remercie également Thierry Lecomte. Ce fut un réel plaisir pour moi de collaborer avec vous sur l'étude STIC-Avastin et le protocole METERMUCADIG.
Merci à Yoann Desvignes, pour t'être assuré du bon déroulement des deux protocoles cliniques, on se sera quand même arraché pas mal de cheveux au passage ; Elodie Roy, Claire Jollivet et Sophie Gounin, ARC expertes sur METERMUCADIG.

Je remercie à nouveau Gaëlle Fromont, pour votre expertise, et Roseline Guibon, pour la prise en charge des biopsies sur la partie immunohistochimie de ce travail. Roseline, mon havre de paix dans cette effervescence de stress. Toujours le sourire aux lèvres et des anecdotes à partager (on doit en être au tome 4 à présent). Je te remercie infiniment pour tout ce que tu nous as apporté.
Merci à Julien, pour ton aide et ta gentillesse, et à toute l'équipe du département des Microscopies du CHRU de Tours pour votre accueil chaleureux. Merci à Rustem pour m'avoir donné de votre temps et de votre disponibilité pour la microscopie électronique.

Je tiens à remercier Catherine et Isabelle, les deux piliers de ce laboratoire qui s'effondrerait littéralement sans vous, votre travail est indispensable pour nous ; Romain, toujours volontaire

et prêt à aider lorsqu'une doctorante en a besoin ; les titulaires du labo, Pierre, Marie, Aurélie, Karine, Michelle, Violetta, Günther, Philippe, Fabio, Bruno, en espérant n'avoir oublié personne. Merci à Aurore pour ton aide précieuse lors des congrès.
Merci à Cyrille pour ton éternelle gentillesse et toute l'attention dont tu as fait preuve envers moi.

Je remercie bien évidemment les thésards et stagiaires, anciens et actuels. Ma très chère Lucile, ma bouée de sauvetage, mon binôme pendant cette épreuve, merci très sincèrement et tout simplement d'avoir été là ; Delphine, un soutien inépuisable, tous nos petits moments ensemble m'auront été d'un grand secours et réconfort. Merci à Sana, pour ta bonne humeur que rien ne saurait corrompre ; Nastaran, nouvelle représentante de la mitochondrie, pour ta gentillesse et ta douceur, puisses-tu t'épanouir en tant que maman ; Chahrazed, la première du groupe à être passée au barbecue en septembre dernier, pour ton humour et ton écoute, comment aurais-je pu survivre sans nos sorties triple cheese ; Céline, mon coach de vie, pour ton amitié et nos discussions existentielles ; Céline Junior, pour ta présence dans les bons comme dans les mauvais moments ; Adélaïde, pour ta gentillesse et nos échanges truffés de fous rires.
Il est difficile de résumer en quelques mots ce que je ressens pour chacune d'entre vous. Sans vous, cette thèse aurait été bien différente. On est d'accord, si les mitochondries, canaux ioniques et autres LL-37 et cholestérol n'existaient pas, nous aurions été bien plus tranquilles !
Merci également à Fanny, Sandy, Fred, Emeline et Yann. Je vous souhaite sincèrement à tous et toutes le meilleur pour la suite.

Mes derniers remerciements vont pour mes parents, mes deux petites sœurs dont je suis tellement fière, et toute ma famille, le socle de ma vie. C'est à vous que je dois cet accomplissement. Je remercie mes amies de toujours Anne-Claire, Julie, Laura et Elise. Et enfin, merci à David, mon filou, ma bouffée d'air frais, l'instigateur de la densité osseuse.

Résumé

La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel caractérisé notamment par une perte progressive du muscle squelettique, qui entraîne une diminution de la qualité de vie, de la réponse aux traitements anticancéreux, et de la survie des patients. De par la complexité physiopathologique de ce syndrome clinique, il n'existe pour le moment aucun traitement curatif. Malgré de récentes découvertes, les mécanismes à l'origine de la fonte musculaire squelettique ne sont pas clairement élucidés. Les résultats des études précliniques et cliniques suggèrent de possibles altérations des métabolismes mitochondrial et lipidique, et un stress du réticulum endoplasmique (RE)/sarcoplasmique (RS). De plus, si la composition corporelle est affectée par la tumeur, elle l'est aussi par les traitements anti-cancéreux.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donnés comme objectifs :

i) D'évaluer l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur l'évolution simultanée de trois paramètres de la composition corporelle (masse maigre, masse grasse, et densité osseuse) dans une population de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique traités par une chimiothérapie à base de bévacizumab (STIC-Avastin - NCT00489697) ;

ii) D'étudier la structure du muscle squelettique, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, les vacuoles lipidiques, et le RE / RS dans le muscle squelettique chez des patients cachectiques porteurs d'une part d'un cancer colorectal ou pancréatique (METERMUCADIG - NCT02573974), et d'autre part d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre (METERMUS-IMC - NCT03027479) ;

iii) D'étudier le brunissement du tissu adipeux sous-cutané dans le contexte de la cachexie cancéreuse et d'évaluer l'impact de l'obésité sur tous ces paramètres (METERMUS-IMC).

L'analyse prospective des données de l'étude clinique STIC-Avastin nous a permis de montrer qu'une chimiothérapie cytotoxique à base de bévacizumab était associée à des modifications de la composition corporelle dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Nos résultats mettent en évidence une variation interindividuelle considérable avec des pertes substantielles et simultanées de muscle squelettique, de masse grasse et de densité osseuse chez certains individus. Notre étude atteste également qu'il est possible d'utiliser les CT-Scanners de routine pour extraire les données de densité osseuse, en plus de la masse musculaire squelettique et des tissus adipeux totaux, permettant d'obtenir une vue d'ensemble plus complète de la composition corporelle. Nos résultats sur le protocole clinique METERMUCADIG montrent une corrélation

positive entre la surface médiane des fibres musculaires squelettiques et l'index de masse musculaire des patients, ce qui suggère que la fonte musculaire caractéristique de la cachexie cancéreuse pourrait être expliquée par une diminution de la surface des fibres musculaires squelettiques. En revanche, nous n'avons pas observé d'altération du métabolisme mitochondrial, d'accumulation de vacuoles lipidiques, ou de stress du RE / RS dans le muscle squelettique des patients avec une faible masse musculaire et porteurs d'un cancer digestif avancé (METERMUCADIG) ou d'un cancer gynécologique (METERMUS-IMC). Nous n'avons pas non plus observé de brunissement du tissu adipeux sous-cutané chez ces patients, ni trouvé d'impact de l'obésité sur tous ces paramètres dans le cadre du protocole METERMUS-IMC. Ces résultats originaux devront toutefois être confirmés par des analyses supplémentaires. Un autre point important suggéré par nos travaux est l'absolue nécessité d'avoir des recommandations précises par les instances scientifiques pour la réalisation de protocoles cliniques sur la cachexie cancéreuse. Parmi les recommandations, une répartition homogène hommes / femmes au sein des groupes de patients (sauf cancer spécifique à un genre) et des critères de discrimination des patients dénutris ou non sont très importants pour rendre plus efficace la recherche dans ce domaine.

Mots-clés : Cachexie cancéreuse, composition corporelle, muscle squelettique, études cliniques, sarcopénie

Résumé en anglais

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome characterized by progressive loss of skeletal muscle, leading to decreased quality of life, response to cancer treatments, and patient survival. Due to the physio pathological complexity of this clinical syndrome, there is currently no cure to cancer cachexia. Despite recent discoveries, the mechanisms underlying skeletal muscle wasting are not clearly understood. Recent preclinical and clinical studies highlighted possible alterations in mitochondrial and lipid metabolism, and endoplasmic (ER)/sarcoplasmic (SR) reticulum stress. Furthermore, body composition could be affected not only by the tumor, but also by anti-cancer treatments.

During this PhD, the aims were :

i) To evaluate the impact of chemotherapy treatment on the simultaneous evolution of three parameters of body composition (lean mass, fat mass, and bone mineral density) in a population of patients with metastatic colorectal cancer treated by bevacizumab-based chemotherapy (STIC-Avastin - NCT00489697);

ii) To study skeletal muscle structure, mitochondrial energy metabolism and dynamics, lipid droplets, and ER / SR in skeletal muscle in cachectic patients with colorectal or pancreatic cancer (METERMUCADIG) - NCT02573974), or with ovarian or endometrial cancer (METERMUS-IMC - NCT03027479);

iii) To study the browning of subcutaneous adipose tissue in the context of cancer cachexia and to evaluate the impact of obesity on all these parameters (METERMUS-IMC).

Prospective analysis of the STIC-Avastin clinical trial data showed that bevacizumab-based cytotoxic chemotherapy was associated with changes in body composition during treatment of metastatic colorectal cancer. Our results show considerable interindividual variation with substantial and simultaneous losses of skeletal muscle, fat mass and bone mineral density in some patients. We demonstrated that lumbar trabecular bone mineral density data could be extracted from standard oncologic CT images and that combined with measures of skeletal muscle area and total adipose tissue area, it could give us a more complete view of patients' body composition. Our results on the METERMUCADIG clinical protocol show a positive correlation between the median surface of the skeletal muscle fibers and patients' skeletal muscle index, suggesting that muscle wasting in cancer cachexia could be explained by a decrease in fibers' surface area. However, we did not observe any alteration of mitochondrial

metabolism, accumulation of lipid droplets, or ER / SR stress in patients with low muscle mass, with advanced gastrointestinal cancer (METERMUCADIG) or gynecological cancer (METERMUS-IMC). We did not observe any browning of subcutaneous adipose tissue in patients with low muscle mass and did not find any impact of obesity on all these parameters (METERMUS-IMC). These original results will however have to be confirmed by additional analyzes. Another important point suggested by this work is the absolute necessity of having precise recommendations by the scientific authorities for the realization of clinical protocols on cancer cachexia. Among the recommendations, an homogeneous male / female distribution within the patients groups (except for a gender-specific cancer) and the criteria of discrimination of cachectic or non-cachectic patients are very important to make research in this area more efficient.

Keywords: Cancer cachexia, body composition, skeletal muscle, clinical studies, sarcopenia

Table des matières

Remerciements 2
Résumé 5
Résumé en anglais 7
Table des matières 9
Liste des tableaux 13
Liste des figures 14
Liste des annexes 16
Préambule 17
Chapitre I : Introduction 21
Partie 1 : Le muscle strié squelettique 22
I. Structure du muscle strié squelettique 22
a. Aspect du muscle strié squelettique au microscope 23
b. Les différents types de fibres musculaires squelettiques 26
II. Organisation intracellulaire de la cellule musculaire squelettique 27
a. Structure et fonctions physiologiques du réticulum sarcoplasmique 27
b. Le stress du réticulum endo/sarcoplasmique 29
c. Les membranes du RE associées aux mitochondries 31
III. Les voies de la protéolyse musculaire 32
IV. Les glycogénoses musculaires 33
Partie 2 : Métabolismes mitochondrial et lipidique 34
I. La mitochondrie 34
a. Structure de la mitochondrie 34
b. L'ADN mitochondrial 35
c. La fission, fusion et biogenèse mitochondriales 37
d. Le métabolisme énergétique mitochondrial 40
II. Le métabolisme lipidique 43
a. Homéostasie des lipides 43
b. Les gouttelettes lipidiques, lieu de stockage des lipides 45
III. Relations entre les métabolismes mitochondrial et lipidique 48
Partie 3 : Les cancers gastriques et gynécologiques 49
I. Les cancers pancréatique et colorectal 50
II. Les tumeurs gynécologiques 52

a. Les cancers de l'ovaire et de l'endomètre 52
b. Les tumeurs borderlines de l'ovaire 52
Partie 4 : La cachexie cancéreuse 54
I. Généralités sur la cachexie cancéreuse 54
a. Définition 54
b. Diagnostic et classification 55
c. Epidémiologie 56
d. Prise en charge clinique 57
II. Biomarqueurs sanguins de la cachexie cancéreuse 59
III. Altérations du muscle squelettique 64
a. Structure et typage des fibres musculaires 72
b. Protéolyse musculaire et synthèse protéique 73
c. Métabolisme lipidique 75
d. Métabolisme mitochondrial 76
e. Stress du RE 77
IV. Altérations du tissu adipeux 80
a. Atrophie adipocytaire 80
b. Détérioration de l'adipogenèse *de novo* 80
c. Inflammation tissulaire 81
d. Fibrose tissulaire 81
e. Brunissement du TA blanc 82
f. Lien entre la fonte musculaire squelettique et les altérations du TA 84
V. Altérations des autres tissus 84
VI. Obésité sarcopénique 85
Partie 5 : Cachexie cancéreuse et chimiothérapie 86
a. Masse musculaire squelettique 86
b. Densité osseuse 86
c. Tissu adipeux 87
Partie 6 : Problématique, hypothèses et objectifs de la thèse 94
I. Objectif général 94
II. Etude clinique STIC-Avastin (NCT00489697) 94
III. Protocoles cliniques pilotes METERMUCADIG (NCT02573974) et METERMUS-IMC (NCT03027479) 94

Chapitre II : Patients, Matériel & Méthodes 96
Partie 1 : Design des études cliniques 97
I. Etude clinique pilote METERMUCADIG (NCT02573974) 97
II. Etude clinique pilote METERMUS-IMC (NCT03027479) 98
Partie 2 : Traitement et analyses des biopsies 100
I. Mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène 101
a. Principe 101
b. Préparation des échantillons 101
c. Appareil 102
d. Mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène 103
II. Microscopie 106
a. Microscopie optique / électronique 106
b. Immuno-histochimie et coloration histologique 106
III. Etude de l'expression génique par (RT-)qPCR 107
a. Principe 107
b. Broyage des échantillons et extraction des acides nucléiques 107
c. Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires (ADNc) 108
d. Conception des amorces de qPCR 108
e. Protocole de qPCR 110
f. Validation de la qPCR 111
g. Analyse des données 112
Partie 3 : Analyses statistiques 113
Chapitre III : Résultats 114
Partie 1 : Article - Pertes simultanées de tissu musculaire squelettique, de tissu adipeux, et de densité osseuse pendant un traitement chimiothérapeutique associé au bévacizumab chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique - Etude clinique STIC-Avastin (NCT00489697) ..... - 115
Partie 2 : Etude de la structure et du métabolisme des fibres musculaires squelettiques chez des patients atteints d'un cancer pancréatique ou colorectal dans le contexte de la cachexie cancéreuse - Protocole clinique METERMUCADIG (NCT02573974) 150
I. Hypothèses et objectifs 151
II. Résultats 153
III. Discussion et perspectives 166

Partie 3 : Etude de la structure et du métabolisme des fibres musculaires squelettiques chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre dans le contexte de la cachexie cancéreuse - Impact de l'obésité - Protocole clinique METERMUS-IMC (NCT03027479) 173
I. Hypothèses et objectifs 174
II. Résultats 176
III. Discussion et perspectives 185
Chapitre IV : Conclusion et perspectives générales 187
Bibliographie 191
Annexes 220

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux types de fibres musculaires squelettiques 27
Tableau 2 : Caractéristiques des périlipines et leurs rôles dans le muscle squelettique..... 47
Tableau 3 : Prévalence de la cachexie dans plusieurs types de cancers communs. 57
Tableau 4 : Etudes cliniques récentes ayant recherché de potentiels biomarqueurs de la cachexie cancéreuse 62
Tableau 5 : Etudes cliniques recherchant des altérations liées à la cachexie cancéreuse sur des biopsies musculaires squelettiques..... 66
Tableau 6 : Etudes cliniques décrivant l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur la masse musculaire squelettique et le tissu adipeux, chez des patients porteurs d'un cancer gastro-intestinal ou pulmonaire..... 89
Tableau 7 : Etudes cliniques décrivant l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur la masse musculaire squelettique et le tissu adipeux, chez des patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique..... 91
Tableau 8 : Etudes cliniques décrivant l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur la densité osseuse, chez des patientes porteuses d'un cancer gynécologique ou du sein..... 92
Tableau 9 : Composition du tampon de transport des biopsies musculaires squelettiques.... 100
Tableau 10 : Composition du tampon de lavage et de mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène des biopsies musculaires squelettiques. 102
Tableau 11 : Réactifs utilisés pour la mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène et des différents états respiratoires 105
Tableau 12 : Réactifs utilisés pour la rétrotranscription 108
Tableau 13 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR sur échantillons d'ADN 109
Tableau 14 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR sur échantillons d'ADNc 110
Tableau 15 : Protocole de qPCR 111
Tableau 16 : Caractéristiques cliniques des patients des tertiles 1 et 3 de SMI, en fonction du sexe..... 156
Tableau 17 : Caractéristiques cliniques des patientes en fonction de leur IMC et SMI 178

Liste des figures

Figure 1 : Structure du muscle squelettique. 23
Figure 2 : Coupes longitudinale (à gauche) et transversale (à droite) de fibres musculaires squelettiques humaines, en MO. 24
Figure 3 : Structure microscopique des fibres musculaires squelettiques 25
Figure 4 : Coupes longitudinale (à gauche) et transversale (à droite) de fibres musculaires squelettiques humaines, en MET. 25
Figure 5 : Coloration de l'ATPase de la myosine dans des fibres musculaires squelettiques humaines 26
Figure 6 : Structure du réticulum sarcoplasmique et des tubules transverses 28
Figure 7 : Les voies de signalisation de la réponse UPR au stress du RE / RS 30
Figure 8 : Glycogénose musculaire chez la souris. 33
Figure 9 : Structure de la mitochondrie 35
Figure 10 : L'ADN mitochondrial humain 36
Figure 11 : Protéines impliquées dans la fusion et fission mitochondriales 39
Figure 12 : Principales voies du métabolisme énergétique mitochondrial 40
Figure 13 : Fonctionnement de la phosphorylation oxydative 42
Figure 14 : Homéostasie des acides gras dans le muscle squelettique 44
Figure 15 : Distribution des 10 cancers les plus répandus dans le monde en 2018, selon leur taux d'incidence et de mortalité, par sexe 50
Figure 16 : Approche multimodale dans la prise en charge de la cachexie cancéreuse 59
Figure 17 : Voies de signalisation intracellulaires induisant une atrophie musculaire. 74
Figure 18 : L'accumulation de vacuoles lipidiques intra-myocellulaires est associée à la perte de poids chez les patients cancéreux cachectiques. 75
Figure 19 : La cachexie cancéreuse induit une surexpression du collagène et de la fibronectine dans le TA sous-cutané de patients. 82
Figure 20 : Brunissement du TA viscéral chez des patients cancéreux cachectiques 83
Figure 21 : Illustrations d'un Port-a-Cath et du muscle squelettique *pectoralis major* 98
Figure 22 : Illustrations du muscle squelettique *rectus abdominis* et du tissu adipeux sous-cutané profond 99
Figure 23 : Illustrations d'une biopsie musculaire squelettique avant et pendant dissection 101
Figure 24 : Substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale 104

Figure 25 : Schéma des hypothèses concernant les dysfonctions métaboliques et structurelles induisant une fonte musculaire squelettique chez les patients cachectiques. 152
Figure 26 : Répartition des patients en tertiles de SMI 154
Figure 27 : Structure des fibres musculaires squelettiques 158
Figure 28 : Métabolisme, dynamique et structure de la mitochondrie 160
Figure 29 : Expression de marqueurs des vacuoles lipidiques. 162
Figure 30 : Expression de gènes du stress du RE / RS. 163
Figure 31 : Analyse du glycogène musculaire squelettique. 165
Figure 32 : Schéma des hypothèses de l'étude concernant les dysfonctions métaboliques et structurelles induisant une fonte musculaire squelettique chez les patients cachectiques, et du rôle aggravateur de l'obésité. 175
Figure 33 : Répartition des patientes en fonction de leur IMC et SMI. 177
Figure 34 : Marqueurs de l'atrophie musculaire. 179
Figure 35 : Métabolisme, dynamique et structure de la mitochondrie 182
Figure 36 : Expression de marqueurs des vacuoles lipidiques. 183
Figure 37 : Expression de gènes du stress du RE / RS. 184

Liste des annexes

Annexe 1 : Communications 220

Préambule

La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel caractérisé par une perte progressive du muscle squelettique et parfois aussi du tissu adipeux, qui entraîne une diminution de la qualité de vie, de la réponse aux traitements anticancéreux, et de la survie des patients. De par la complexité physiopathologique de ce syndrome clinique, il n'existe pour le moment aucun traitement curatif contre la cachexie cancéreuse.

Malgré de récentes découvertes, les mécanismes à l'origine de la fonte musculaire squelettique ne sont pas clairement élucidés. Jusqu'à présent, une trentaine d'études cliniques ont analysé des biopsies musculaires squelettiques pour explorer les mécanismes sous-jacents à la fonte musculaire caractéristique de la cachexie cancéreuse (Anoveros-Barrera *et al.*, 2019). La grande majorité de ces études a inclus des patients atteints de cancers gastro-intestinaux, et leurs résultats soulignent de possibles altérations de la structure des fibres musculaires (Ebhardt *et al.*, 2017; Schmitt *et al.*, 2007), des voies de la protéolyse (de Castro *et al.*, 2019; Aversa *et al.*, 2016; Khal *et al.*, 2005; Bossola *et al.*, 2003) et de la synthèse protéique (Schmitt *et al.*, 2007), ainsi que des métabolismes mitochondrial (de Castro *et al.*, 2019; Marzetti *et al.*, 2017) et lipidique (Stephens *et al.*, 2011). Cependant, pour la plupart des paramètres étudiés, les résultats des études cliniques sont contradictoires, du fait de l'absence de critères de diagnostic uniformes de la cachexie cancéreuse, de l'hétérogénéité des cohortes, des biopsies prélevées dans différents muscles squelettiques, des méthodes d'analyse, ou encore des effectifs souvent très faibles. **Des études cliniques supplémentaires sont nécessaires pour comprendre les altérations structurelles et métaboliques sous-jacentes à la fonte musculaire squelettique caractéristique de la cachexie cancéreuse.** D'autre part, il a été montré que le tissu adipeux pouvait être affecté durant le développement de la cachexie cancéreuse, d'un point de vue morphologique et métabolique (Alves *et al.*, 2017; Henriques *et al.*, 2017; Silvério *et al.*, 2017; Petruzzelli *et al.*, 2014). Mais les études cliniques sur le sujet sont peu nombreuses. **De plus amples recherches sont nécessaires pour permettre une caractérisation de ces altérations.**

La prévalence accrue de l'obésité observée au cours des dernières décennies a fait émerger un nouveau concept d'obésité sarcopénique. Chez les patients obèses, la sarcopénie est masquée par l'accumulation de graisse, ce qui rend le dépistage de la pathologie plus difficile. L'obésité sarcopénique fait l'objet de débats dans la communauté scientifique, quand certains parlent de l'effet paradoxalement protecteur de l'obésité notamment grâce à des réserves adipeuses plus importantes, alors que d'autres pointent du doigt la dangerosité de la fonte musculaire masquée (Prado *et al.*, 2016). Mais à notre connaissance, **aucune étude clinique n'a étudié l'impact de**

l'obésité sur la structure et le métabolisme musculaire squelettique, chez des patients avec une faible masse musculaire.

En plus de la tumeur, les traitements anticancéreux, en particulier la chimiothérapie, peuvent également aggraver l'état nutritionnel du patient. Chez les patients atteints d'un cancer, l'accès aux scanners de diagnostic et de suivi de la pathologie, a permis la mise en place de très nombreuses études cliniques rétrospectives et prospectives d'évaluation de la composition corporelle en lien avec les traitements chimio thérapeutiques et la cachexie cancéreuse.
L'utilisation de ces CT-Scanners a permis d'évaluer les effets propres d'agents chimio thérapeutiques sur différents paramètres de la composition corporelle, tels que la masse musculaire squelettique (« Lean Body Mass », LBM) (Hopkins and Sawyer, 2018), la densité osseuse (« Bone Mineral Density », BMD) (Lee *et al.*, 2016; Oostra *et al.*, 2015; Cameron *et al.*, 2010; Hui *et al.*, 2010; Hadji *et al.*, 2009) et les Tissus Adipeux Totaux (TAT) (Kazemi-Bajestani *et al.*, 2019a; Daly *et al.*, 2018; Nattenmüller *et al.*, 2017; Palmela *et al.*, 2017; Awad *et al.*, 2012). Ainsi, la chimiothérapie a été associée à des modifications de la composition corporelle dans divers cancers, en fonction du type de tumeur, du type de médicament et de la dose. **Mais aucune étude clinique n'a apporté de données sur l'évolution simultanée des LBM, BMD et TAT.**

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donnés comme objectifs :

i) D'évaluer l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur l'évolution simultanée de trois paramètres de la composition corporelle (masse maigre, masse grasse, et densité osseuse) dans une population de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique traités par une chimiothérapie à base de bévacizumab (STIC-Avastin - NCT00489697) ;

ii) D'étudier la structure du muscle squelettique, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, les vacuoles lipidiques, et le réticulum endoplasmique (RE)/sarcoplasmique (RS) dans le muscle squelettique chez des patients cachectiques porteurs d'une part d'un cancer colorectal ou pancréatique (METERMUCADIG - NCT02573974), et d'autre part d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre (METERMUS-IMC - NCT03027479) ;

iii) D'étudier le brunissement du tissu adipeux sous-cutané dans le contexte de la cachexie cancéreuse et d'évaluer l'impact de l'obésité sur tous ces paramètres (METERMUS-IMC).

Le premier chapitre de mon manuscrit consiste en une étude bibliographique. i) Les deux premières parties décrivent la structure et le métabolisme du muscle strié squelettique, avec une attention toute particulière portée sur le RE/RS, le stress du RE/RS, une brève description de la protéolyse musculaire via la voie ubiquitine-protéasome, et des pathologies liées au glycogène musculaire, et enfin les métabolismes mitochondrial et lipidique. ii) La troisième partie décrit succinctement les quatre cancers inclus dans les protocoles cliniques de la thèse : cancers pancréatique, colorectal, ovarien et de l'endomètre. iii) La quatrième partie détaille l'état actuel des connaissances sur la cachexie cancéreuse, et tout particulièrement les possibles altérations du muscle squelettique et du tissu adipeux en lien avec la fonte de ces tissus. iv) La cinquième partie aborde les liens qui ont été décrits jusqu'à présent entre traitements chimio thérapeutiques et composition corporelle. v) En fin d'introduction, les hypothèses et objectifs généraux et spécifiques aux trois protocoles cliniques sont exposés.

Le chapitre suivant décrit les patients inclus, et le matériel et les méthodes utilisés dans le cadre des protocoles cliniques. Le chapitre qui suit expose les résultats de mes recherches et est divisé en trois parties :

i) une première partie sous forme d'un article en révision mineure dans « Clinical Nutrition » : « **Concurrent losses of skeletal muscle mass, adipose tissue and bone mineral density during** bévacizumab **/ cytotoxic chemotherapy treatment for metastatic colorectal cancer** » qui étudie l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur l'évolution simultanée de trois paramètres de la composition corporelle (masse maigre, masse grasse, et densité osseuse) ;

iii) une seconde partie sous format académique qui décrit les analyses de **la structure du muscle, du métabolisme énergétique et de la dynamique mitochondriales, de la quantité de vacuoles lipidiques et du RE/RS dans le muscle squelettique** de patients atteints d'un cancer colorectal ou pancréatique en fonction de leur index musculaire squelettique (SMI) ;

iv) et une troisième partie, elle aussi sous format académique, qui présente les résultats d'analyses de **l'impact de l'obésité sur ces paramètres musculaires et sur le brunissement du tissu adipeux sous-cutané** chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre, en fonction de leur SMI.

Enfin, une conclusion générale et des perspectives viennent clore ce manuscrit.

Chapitre I : Introduction

Partie 1 : Le muscle strié squelettique

Le tissu musculaire est une association de cellules différenciées appelées fibres musculaires, regroupées en structure spécialisée en vue d'assurer la fonction contractile du tissu. On distingue trois types de tissu musculaire : lisse, cardiaque et strié squelettique. C'est sur ce dernier que nous nous focaliserons dans ce manuscrit.

I. Structure du muscle strié squelettique

Le muscle squelettique est l'un des tissus les plus dynamiques du corps humain. Chez une personne en bonne santé, il représente à lui seul environ 30 à 40% du poids corporel et contient 50 à 75% des protéines globales. Sa masse et sa répartition dans le corps sont cependant soumises à une variabilité interindividuelle, dépendant du sexe, de l'âge et de la pratique d'activités physiques.

Le muscle squelettique est composé principalement d'eau (~75%), de protéines (~20%, contractiles, régulatrices et du cytosquelette) et d'autres éléments tels que des lipides (~3%, triglycérides, phospholipides, cholestérol), des carbohydrates (~1%, le glycogène par exemple) et des composants inorganiques et minéraux.

D'un point de vue cellulaire, un muscle squelettique est un faisceau de longues cellules, aussi appelées fibres musculaires ou rhabdomyocytes (**Figure 1**). Cylindriques, leur diamètre peut varier de 10 à 100 µm pour une longueur de 1 à 40 mm. Ces cellules ont la particularité d'être multi nucléées, suite à la fusion de leurs précurseurs, les myoblastes, pendant leur différenciation ; et post-mitotiques, c'est-à-dire que leurs noyaux ne se divisent plus. Chaque fibre est un assemblage de myofibrilles, qui comprennent elles-mêmes deux types de myofilaments : fins d'actine et épais de myosine. L'ensemble des filaments constitue jusque 80 à 90 % du volume musculaire, le reste étant composé de tissus adipeux et conjonctif. Le tissu conjonctif dans le muscle squelettique se subdivise en épimysium, qui recouvre l'ensemble du muscle ; périmysium, qui entoure chaque faisceau de fibres musculaires ; et endomysium, qui sépare les fibres, dont chacune est recouverte d'une membrane plasmique, autrement appelée sarcolemme.

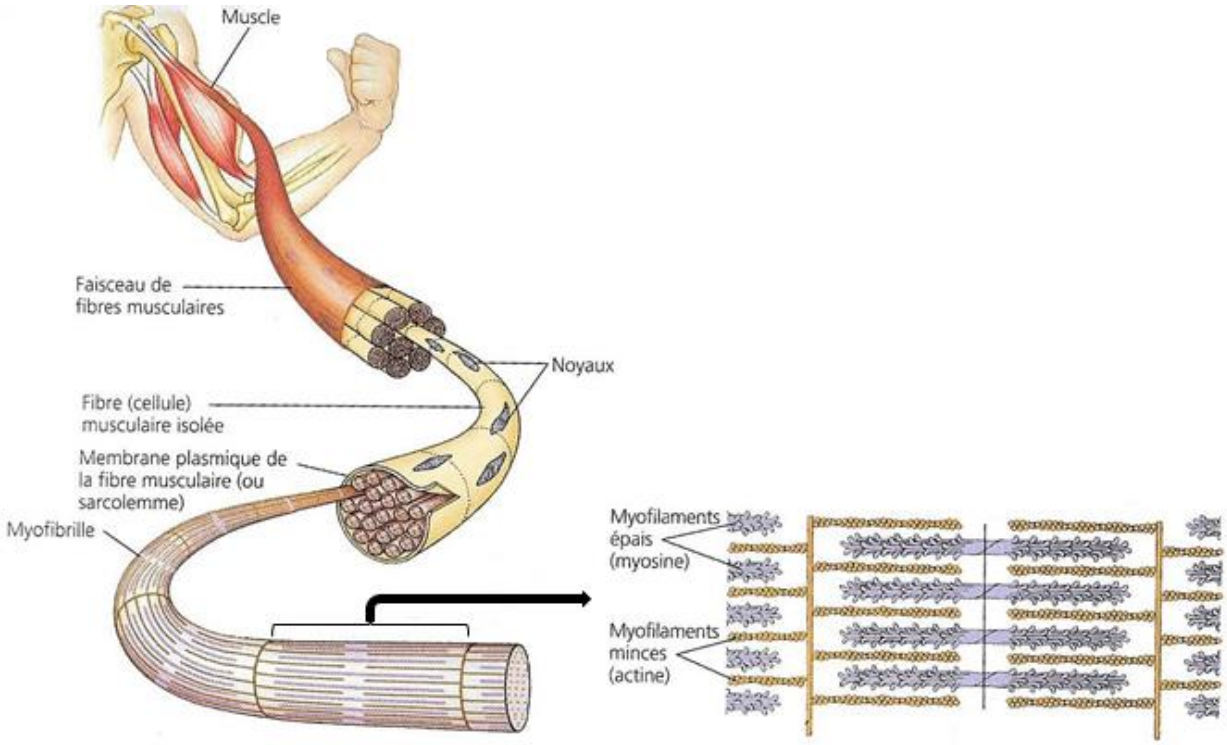


Figure 1 : Structure du muscle squelettique.
Modifié d'après Biologie 7ème édition, N. Campbell & J. Reece, Pearson Education

a. Aspect du muscle strié squelettique au microscope

i) En microscopie optique (MO)

Que ce soit en coupe longitudinale ou transversale, on peut observer l'organisation des myofibrilles, qui occupent l'essentiel du cytoplasme (**Figure 2**). Les noyaux (dont le nombre peut aller jusqu'à 100) sont situés en périphérie de la cellule, sous la membrane plasmique. En fonction de l'état de la biopsie, il est également parfois possible de voir du tissu conjonctif et/ou des vaisseaux sanguins.

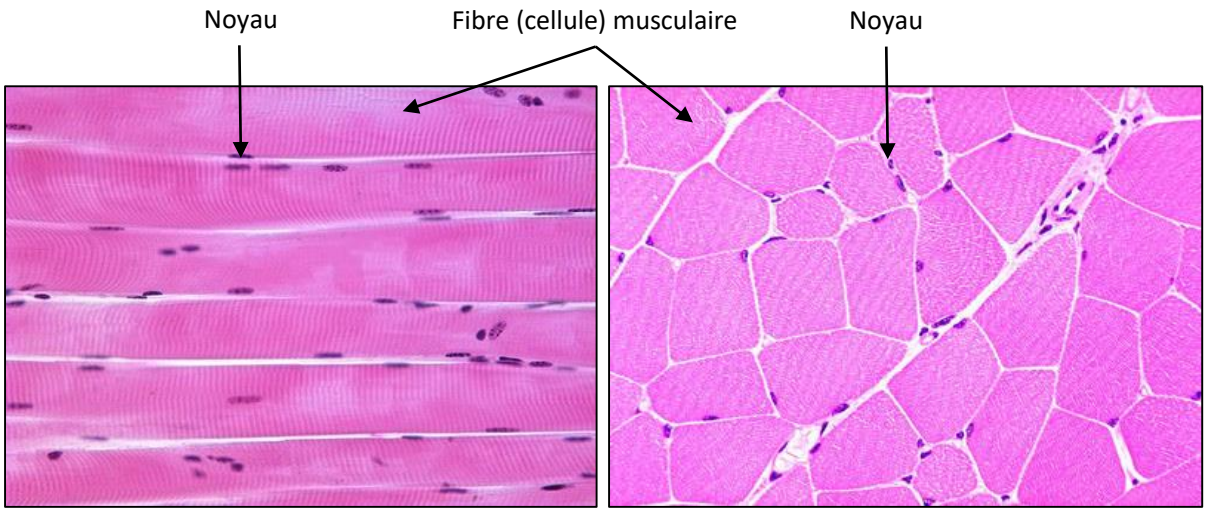


Figure 2 : Coupes longitudinale (à gauche) et transversale (à droite) de fibres musculaires squelettiques humaines, en MO.

Coloration hématoxyline éosine safran (HES). Sources : Site internet de l'Université du Colorado et cours d'histologie de l'Université de Yale.

ii) En microscopie électronique (MET)

Les muscles squelettiques sont caractérisés par la présence au niveau microscopique, de stries, en raison de la disposition régulière des myofilaments (**Figure 3**). Lorsque la fibre est relâchée, on peut observer l'alternance de bandes claires et foncées, qui forment des motifs, les sarcomères (2,5µm du muscle au repos et 1,6µm lors de la contraction).

On nomme strie I (isotrope - bande claire), la partie située au bord du sarcomère, jusqu'à la ligne Z, son extrémité. Elle ne comprend que des myofilaments fins. La strie A (anisotrope - bande foncée) est la large région où se superposent myofilaments fins et épais. Elle est traversée en son centre par la strie H, qui ne contient que des myofilaments épais ; et au centre de celle-ci, on trouve la ligne M, constituée de brins de myosine, qui sert de jonction entre les myofilaments épais parallèles. Lors de la contraction musculaire, les filaments fins progressent le long des filaments épais.

Les myofibrilles sont distinguables sur coupe transversale en microscopie électronique (**Figure 4**). On peut également observer des organites cellulaires (mitochondries, triade du réticulum sarcoplasmique), le sarcoplasme contenant des granules de glycogène, et des vacuoles lipidiques intracellulaires, que ce soit sur coupe longitudinale ou transversale.

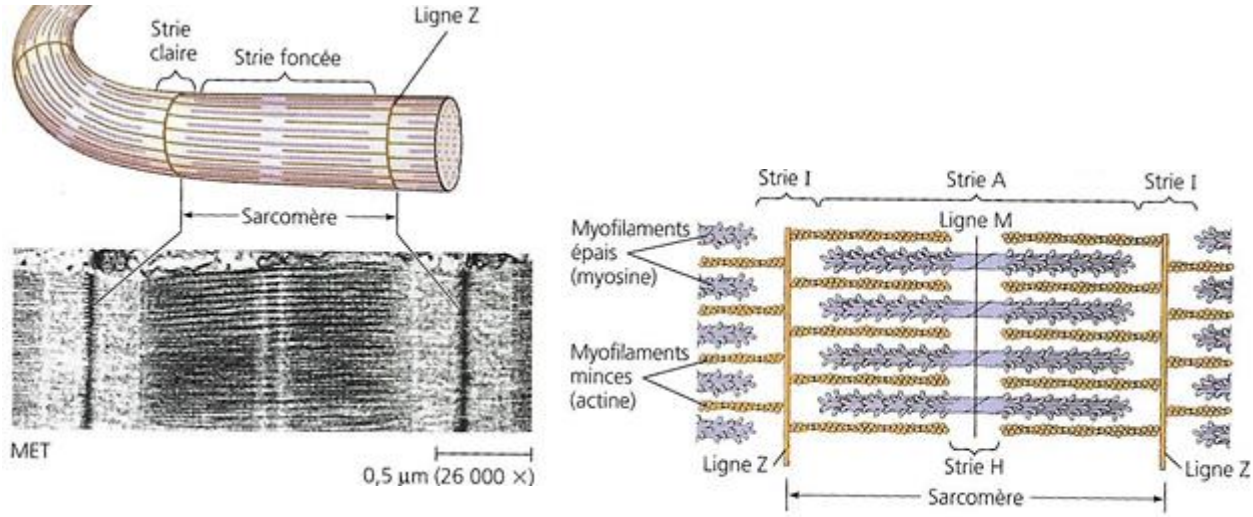


Figure 3 : Structure microscopique des fibres musculaires squelettiques

Modifié d'après Biologie 7ème édition, N. Campbell & J. Reece, Pearson Education

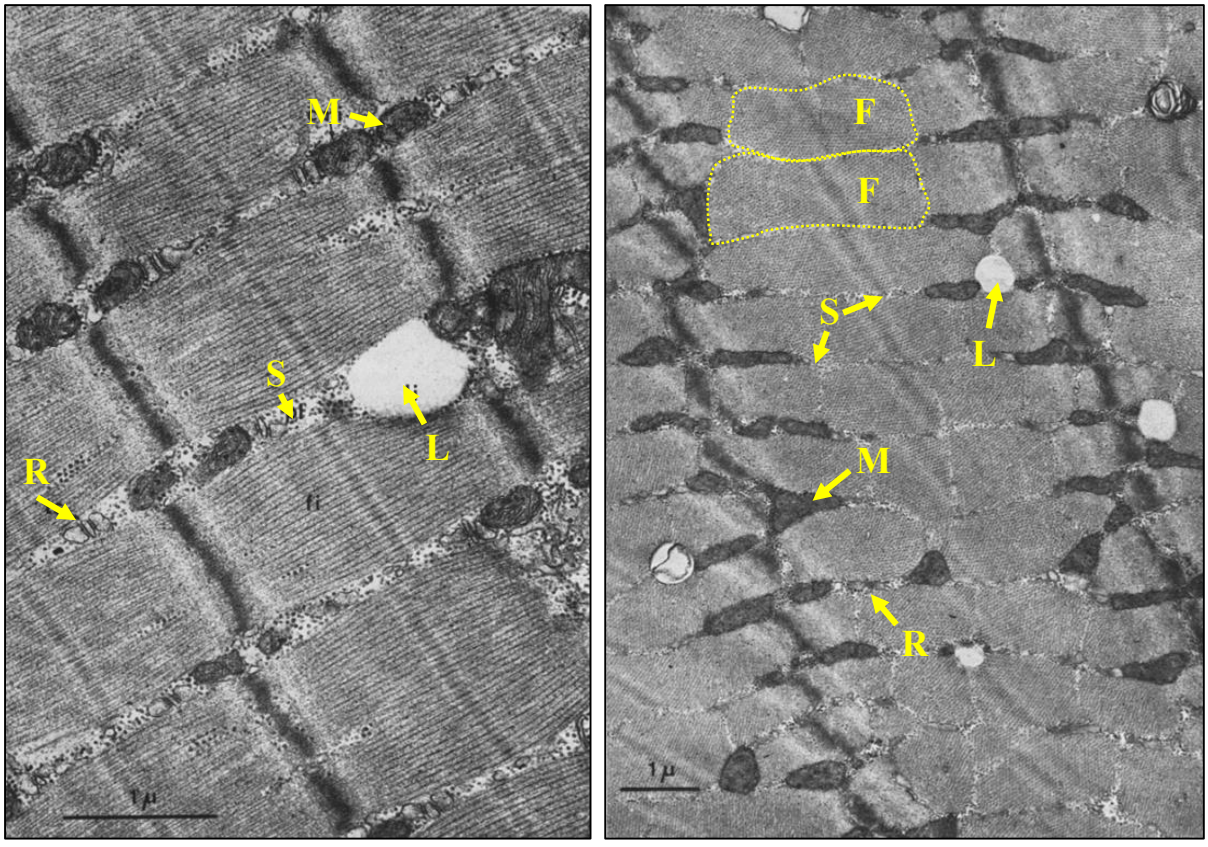


Figure 4 : Coupes longitudinale (à gauche) et transversale (à droite) de fibres musculaires squelettiques humaines, en MET.

L : Gouttelette lipidique ; M : Mitochondrie ; R : Triade du Réticulum Sarcoplasmique ; S : Sarcoplasme avec granules de glycogène ; F : Myofibrilles. Modifié d'après : (Hoppeler *et al.*, 1973)

b. Les différents types de fibres musculaires squelettiques

Il existe une hétérogénéité phénotypique dans le muscle squelettique humain adulte, caractérisée par la présence de fibres musculaires aux propriétés fonctionnelles différentes. On distingue les fibres musculaires à contraction lente, qui peuvent soutenir une contraction peu intense mais prolongée (on les retrouve en particulier dans les muscles posturaux) ; de celles à contraction rapide, qui servent aux contractions soudaines et puissantes (muscles des yeux et de la main par exemple). Une autre distinction peut aussi se faire au niveau métabolique, suivant la voie que les fibres empruntent pour produire de l'ATP : on oppose ainsi les fibres oxydatives, qui utilisent la respiration aérobie ; aux fibres glycolytiques, qui font intervenir surtout la glycolyse. En plus de ces critères de rapidité de contraction et de voie de synthèse d'ATP, d'autres caractéristiques peuvent être utilisées pour classifier les fibres musculaires squelettiques :

- La vitesse d'apparition de la fatigue musculaire, lors d'un effort soutenu ;
- La teneur en myoglobine, qui donne aux fibres une couleur rouge ou blanche ;
- La réaction à certaines colorations enzymatiques-histochimiques, telles que celle qui quantifie l'activité ATPasique de la myosine (**Figure 5**) ;
- L'expression d'isoformes protéiques, les plus connus étant les chaînes lourdes de la myosine (dont MyHC I, IIa et IIb).

Ainsi, les trois principaux types de fibres sont celles de type I, de type IIa et de type IIb (ou IIx) (**Tableau 1**).

La plupart des muscles squelettiques humains contiennent les trois types de fibres, avec des prédominances différentes. C'est cette diversité de propriétés physiologiques qui permet au muscle de participer et de s'adapter à des activités, aux besoins mécaniques et métaboliques variés.

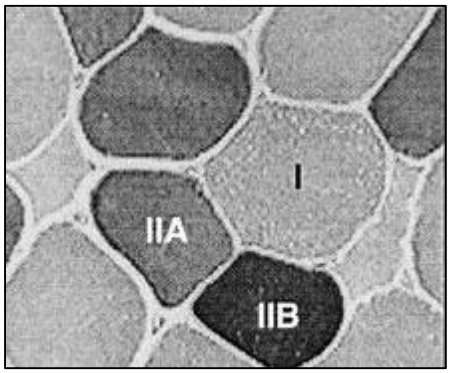


Figure 5 : Coloration de l'ATPase de la myosine dans des fibres musculaires squelettiques humaines
Aperçu des types de fibres I, IIa et IIb.
Source : (Malenfant *et al.*, 2001)

Tableau 1 : Principaux types de fibres musculaires squelettiques

Caractéristiques	Fibres de type I	Fibres de type IIa	Fibres de type IIb / IIx
Vitesse de contraction	Lente	Rapide	Rapide
Principale voie pour la synthèse d'ATP	Oxydative	Oxydative	Glycolytique
Vitesse d'apparition de la fatigue	Lente	Intermédiaire	Rapide
Diamètre	Petit	Intermédiaire	Grand
Teneur en myoglobine	Elevée	Elevée	Faible
ATPase de la myosine	+	++	+++
Volume mitochondrial	+++	++	+

II. Organisation intracellulaire de la cellule musculaire squelettique

Les myofibrilles occupent environ 80% du volume intracellulaire, ne laissant que peu de place aux mitochondries, réticulum sarcoplasmique, vacuoles lipidiques et autres organites, tandis que les noyaux sont poussés à la périphérie, juste sous le sarcolemne.

a. Structure et fonctions physiologiques du réticulum sarcoplasmique

On nomme réticulum sarcoplasmique (RS), le réticulum endoplasmique (RE) lisse spécialisé et retrouvé tout particulièrement dans les muscles striés squelettiques. Ce réseau complexe de tubules et citernes est le site de stockage intracellulaire du calcium, nécessaire à l'induction de la contraction musculaire. Chaque fibre musculaire communique avec un neurone moteur via une synapse (**Figure 6**). Le stimulus qui provoque la contraction de la fibre musculaire squelettique est un potentiel d'action provenant du neurone moteur, suite à un signal d'origine nerveuse. La conduction du potentiel d'action vers l'intérieur de la cellule se fait grâce à des protéines sensibles au voltage présentes sur les tubules T, des invaginations membranaires

régulières du sarcolemme (Jayasinghe and Launikonis, 2013). Ces tubules T entrent alors en contact avec le RS et le potentiel d'action entraîne l'ouverture des canaux calciques présents sur le RS, comme les récepteurs à la ryanodine (RyR) (Fill and Copello, 2002). Le calcium pénètre transitoirement dans le cytosol, stimulant le glissement des myofilaments fins et épais, qui consomme de l'ATP, et initiant la contraction simultanée de chaque myofibrille. Le calcium est ensuite en grande partie renvoyé vers la lumière du RS par des pompes à calcium (dépendantes elles aussi de l'ATP) situées sur la membrane du RS, telles que les pompes SERCA (« Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase ») (Primeau *et al.*, 2018). La diminution de la concentration cytoplasmique de calcium libre met alors fin à la contraction musculaire (Carafoli and Krebs, 2016). Entre chaque contraction, le calcium est entreposé dans les citernes terminales du RS, qui sont en contact étroit avec les tubules T. Les tubules T et les deux citernes terminales du RS se trouvant de part et d'autre, forment une triade, observable en MET (**Figure 4**).

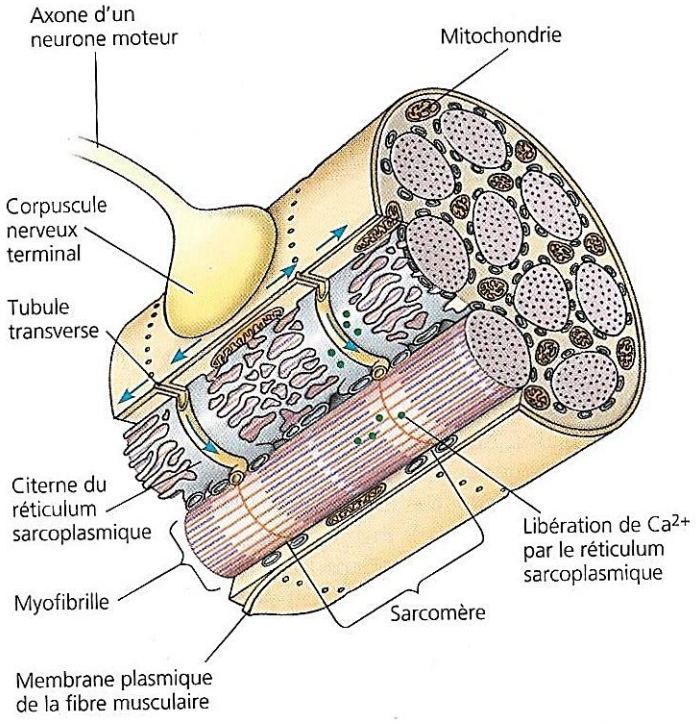


Figure 6 : Structure du réticulum sarcoplasmique et des tubules transverses

Source : Biologie 7ème édition, N. Campbell & J. Reece, Pearson Education

b. Le stress du réticulum endo/sarcoplasmique

En plus d'être spécifiquement responsable du stockage, de la libération et du repompage du calcium, le RS doit également remplir certaines fonctions classiques du RE, telles que la translocation, la glycosylation et l'assemblage des protéines. L'homéostasie du RE / RS peut être interrompue par différents facteurs physiologiques et pathologiques, tels qu'une synthèse protéique augmentée, l'expression de protéines mutées, un déséquilibre des niveaux calciques, une déprivation en oxygène ou énergie, une infection virale, des cytokines inflammatoires ou des toxines environnementales. Ces perturbations entraînent une accumulation de protéines non ou mal conformées dans la lumière du RE / RS. Pour rétablir l'homéostasie, le RE / RS possède un mécanisme adaptatif : « the unfolded protein response » ou réponse UPR.

La réponse UPR est caractérisée par l'activation de trois senseurs principaux, trois protéines transmembranaires qui peuvent détecter un stress dans la lumière du RE / RS : IRE1α (« Inositol-Requiring Protein 1α ») ; PERK (« Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase ») ; and ATF6α (« Activating Transcription Factor 6α »). Chacune déclenche une voie de signalisation, toutes détaillées dans la **Figure 7**, avec pour but : i) l'augmentation de la synthèse de protéines chaperonnes afin d'optimiser le repliement des protéines ; ii) la diminution de la traduction protéique générale afin de prévenir une accumulation supplémentaire de protéines mal conformées ; iii) l'augmentation de la traduction d'éléments impliqués dans la machinerie de dégradation de protéines associées au RE (ERAD), tel que EDEM (« ER-degradation-enhancing-α-mannidose-like protein »), afin de désengorger le RE / RS (Oslowski and Urano, 2011). Une boucle d'autorégulation négative est également mise en place afin d'éviter une hyper activation de la réponse UPR. Le facteur de transcription CHOP (« CCAAT-enhancer-binding protein Homologous Protein ») peut par exemple indirectement entraîner une rétro-inhibition de la phosphorylation de eIF2α (« eukaryotic Initiation Factor 2α ») médiée par PERK, permettant une reprise de la traduction protéique (**Figure 7**). S'il en résulte que le stress du RE / RS ne peut être maîtrisé, des mécanismes d'induction de mort cellulaire par apoptose et autophagie sont alors mis en place afin de restaurer l'homéostasie. En conditions normales, les trois senseurs du stress du RE / RS sont maintenus sous forme inactive par la protéine chaperonne BiP (pour « immunoglobin Binding Protein », aussi appelée GRP78). Lors d'un stress du RE / RS, GRP78 se dissocie des trois senseurs transmembranaires, entraînant l'induction des voies de la réponse UPR.

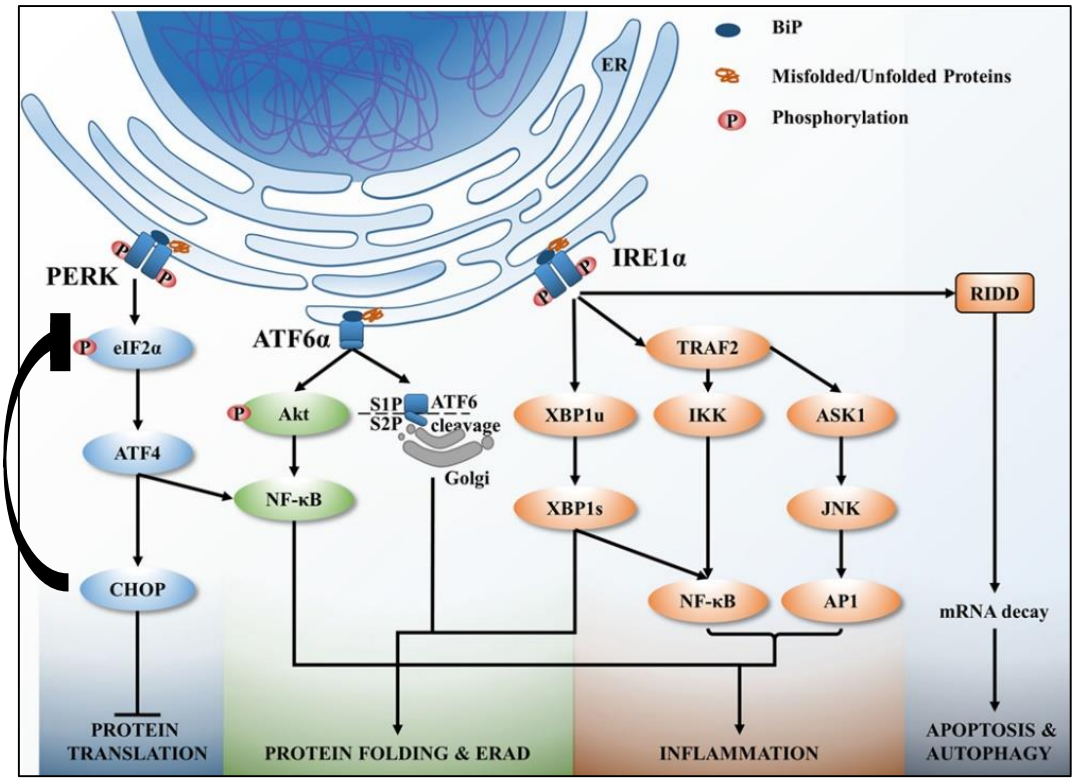


Figure 7 : Les voies de signalisation de la réponse UPR au stress du RE / RS

Il existe trois voies principales de signalisation de la réponse UPR, chacune déclenchée par un des trois senseurs transmembranaires du stress du RE / RS : PERK, ATF6 et IRE1α.

Modifié d'après : (Pathinayake *et al.*, 2018)

Plusieurs études ont démontré l'implication des voies de réponse au stress du RE / RS dans des états pathologiques, tels que l'obésité, le diabète (Hetz *et al.*, 2011; Hotamisligil, 2010), ainsi que des myopathies (Deldicque *et al.*, 2012; Ikezoe *et al.*, 2003, 2007; Nagaraju *et al.*, 2005; Vattemi *et al.*, 2004).

c. Les membranes du RE associées aux mitochondries

Les MAM (« Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membranes ») sont des microdomaines spécialisés de la membrane du RE qui régulent les communications avec les mitochondries. Ces sites de contact de 10 à 25 nm de largeur (Csordás *et al.*, 2006) sont biochimiquement distincts du reste des membranes du RE et de la mitochondrie. Ce sont des régions enrichies en protéines (Vance, 2014; Fujimoto and Hayashi, 2011) telles que :

- ATG14 (« Autophagy protein ») ;
- la calnexine, une protéine chaperonne participant au repliement des protéines ;
- les protéines kinases Akt et mTOR (« mammalian Target Of Rapamycin »), jouant un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire ;
- DRP1 (« Dynamin-Related Protein 1 ») et Mfn2 (« Mitofusin 2 »), impliquées respectivement dans la fission et la fusion mitochondriales ;
- IP3R (« Inositol tris-Phosphate Receptor ») et VDAC1 (« Voltage-Dependent Anion Channel »), des régulateurs de l'homéostasie calcique mitochondriale.

Ces domaines seraient ainsi nécessaires pour certains processus cellulaires clés, comme la formation des autophagosomes, la régulation de la morphologie, de la fusion et fission, et des fonctions mitochondriales, le transport du calcium du RE à la mitochondrie, la synthèse et le transport lipidiques, la protéolyse, ainsi que la mort cellulaire (Vance, 2014; Fujimoto and Hayashi, 2011).

Des altérations au niveau des MAM seraient retrouvées impliquées dans les maladies neurodégénératives de Charcot, de Parkinson et d'Alzheimer (Paillusson *et al.*, 2016; Fujimoto and Hayashi, 2011) mais aussi dans le développement des métastases cancéreuses (Morciano *et al.*, 2018).

III. Les voies de la protéolyse musculaire

Il existe un équilibre dynamique entre synthèse protéique et protéolyse qui permet un maintien de la masse protéique. Plusieurs facteurs endogènes et exogènes peuvent jouer sur cette balance (Anthony, 2016) :

i) en stimulant la synthèse protéique, c'est le cas de signaux qui reflètent le statut nutritionnel et hormonal (insuline, IGF-1 pour « Insulin-like Growth Factor-1 »), le statut énergétique et l'activité physique (acide phosphatidique, acides aminés) ;
ii) en stimulant la protéolyse, ce que font certains médiateurs de stress environnemental (glucocorticoïdes, cytokines) et d'autres facteurs tels que l'adénosine monophosphate (AMP) kinase et la myostatine. L'état de jeûne favorise également la protéolyse.

(Magkos *et al.*, 2010; Béchet *et al.*, 2005; Reid, 2005)

Quatre systèmes majeurs contrôlent la protéolyse du muscle squelettique : le système autophagique-lysosomal, les calpaïnes calcium-dépendantes, les caspases-protéases à cystéine, et le système ubiquitine-protéasome (UPS) (Scicchitano *et al.*, 2016; Pasiakos and Carbone, 2014). Ces 4 systèmes fonctionnent de concert afin de fournir les acides aminés qui seraient nécessaires à une nouvelle synthèse protéique ou qui seront dégradés pour fournir de l'énergie. L'UPS est continuellement actif dans le muscle, afin de réguler le « turnover » protéique. Cette voie implique une cascade enzymatique où les segments protéiques destinés à être hydrolysés, sont taggés à plusieurs reprises par des E3-ubiquitin-ligases spécifiques au muscle : MAFbx (« Atrogin-1b ») et MuRF1 (« Muscle RING Finger-1 »). Ces réactions utilisent de l'énergie par hydrolyse de l'ATP. Les protéines ainsi poly-ubiquitinylées sont ensuite dégradées par hydrolyse d'acides aminés dans le protéasome 26S de l'UPS. L'UPS a été retrouvé suractivé dans certaines conditions cataboliques associées à une fonte musculaire : jeûne, traitement aux glucocorticoïdes, état septique, acidose, cancer, cachexie cancéreuse (Bossola *et al.*, 2003; Mitch and Price, 2003; Jagoe *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 1999; Zamir *et al.*, 1992).

IV. Les glycogénoses musculaires

Le sarcoplasme contient une grande quantité de glycogène, la forme de stockage du glucose, afin de pouvoir répondre aux besoins énergétiques de la cellule. Des déficiences enzymatiques dans la synthèse ou la dégradation du glycogène peuvent entraîner un stockage ou une utilisation anormalement élevés du glycogène, menant au développement de pathologies glycogéniques (« Glycogen-Storage Disease » - GSD). Les glycogénoses musculaires sont cliniquement caractérisées par une fatigue musculaire et des épisodes de rhabdomyolyse (destruction rapide et massive de fibres musculaires et libération de composants intracellulaires dans la circulation sanguine). Les autres symptômes dépendent de l'enzyme concernée et de la sévérité de la déficience (Laforêt *et al.*, 2017; Moses, 1990). Cette accumulation ou réduction de glycogène peut s'observer sur biopsies musculaires squelettiques par microscopie électronique ou grâce à des colorations histochimiques, notamment le « Periodic-Acid Schiff » (PAS) (**Figure 8**).

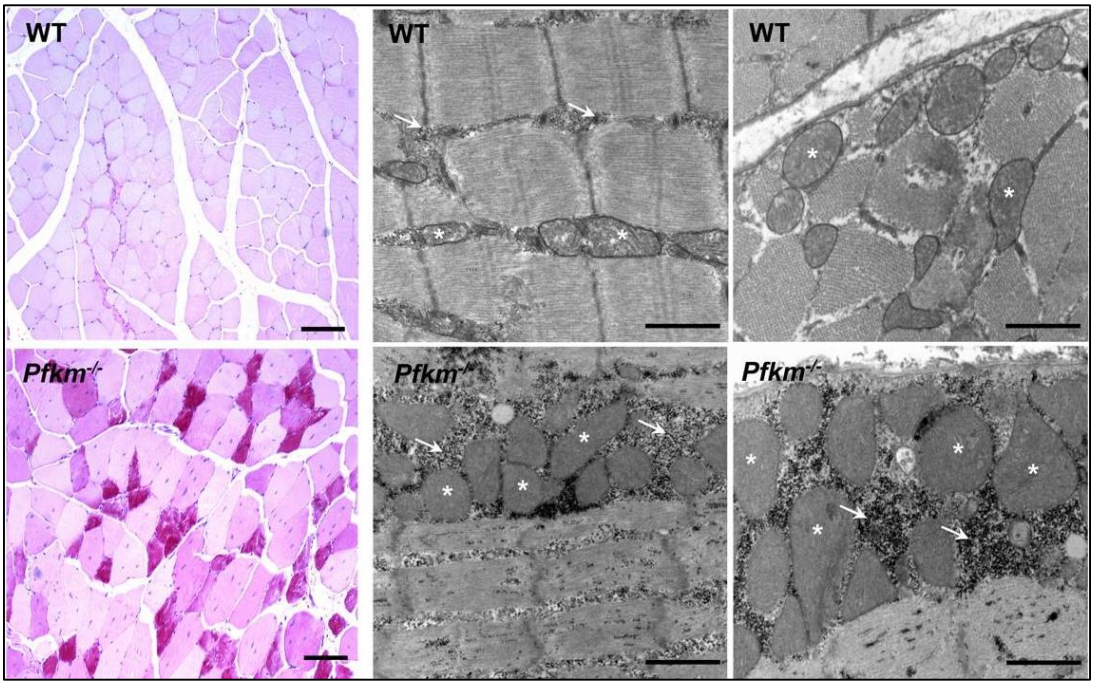


Figure 8 : Glycogénose musculaire chez la souris.

Stockage anormal de glycogène dans les fibres musculaires squelettiques, mis en évidence par comparaison entre souris normale (WT) et souris mutée pour un gène codant une enzyme impliquée dans la glycolyse (« phosphofructo-1-kinase » - pfk). Chez la souris mutée, la coloration PAS (à gauche) est plus intense, et on observe une accumulation anormale de granules de glycogène (flèches blanches) dans les fibres musculaires en MET (à droite).

Source : (García *et al.*, 2009)

Partie 2 : Métabolismes mitochondrial et lipidique

I. La mitochondrie

Les mitochondries forment un réseau tridimensionnel dynamique à travers la cellule. Ces organelles multifonctionnelles sont des régulateurs majeurs du métabolisme cellulaire. Il est important de maintenir en permanence une quantité et une qualité de mitochondries suffisamment importantes pour répondre efficacement et rapidement aux besoins des cellules.

a. Structure de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organites mobiles et maléables, de taille variable (comprise entre 0,75 et 3µm^2) et dont la forme change constamment. Chaque mitochondrie est enveloppée par deux bicouches riches en protéines et en phospholipides (Daum and Vance, 1997), hautement spécialisées et aux fonctions très différentes (**Figure 9**) :

- La membrane mitochondriale externe (MME) contient une grande quantité de protéines de transport, dont celles retrouvées au niveau des MAM, la translocase TOM (« Translocase Outer Membrane ») responsable du transport de la majorité des protéines mitochondriales d'origine cytosolique, et les porines, une protéine de transport qui rend la membrane perméable à toutes les molécules de moins de 5 kDa ;
- La membrane mitochondriale interne (MMI) est bien plus imperméable aux ions, de par sa composition particulière en cardiolipines, un phospholipide formé de 4 acides gras ; et en protéines de transport qui ne laissent principalement passer que les petites molécules nécessaires aux enzymes mitochondriales. Elle contient également les complexes protéiques de la chaîne respiratoire. Contrairement à la MME qui est lisse, la MMI forme des repliements internes, qui dessinent des crêtes. Ces crêtes augmentent considérablement la surface de la MMI et par conséquent, la surface dédiée aux complexes protéiques de la chaîne respiratoire. Ainsi, dans les fibres musculaires, le nombre de crêtes est particulièrement important, pour répondre à la forte demande en ATP des cellules. La MMI délimite deux compartiments aqueux : l'espace inter membranaire, chimiquement équivalent au cytosol du point de vue des petites molécules qu'il contient ; et la matrice mitochondriale où se concentrent diverses enzymes de voies

métaboliques, comme le cycle de Krebs et la β-oxydation, l'ADN et les ribosomes mitochondriaux.

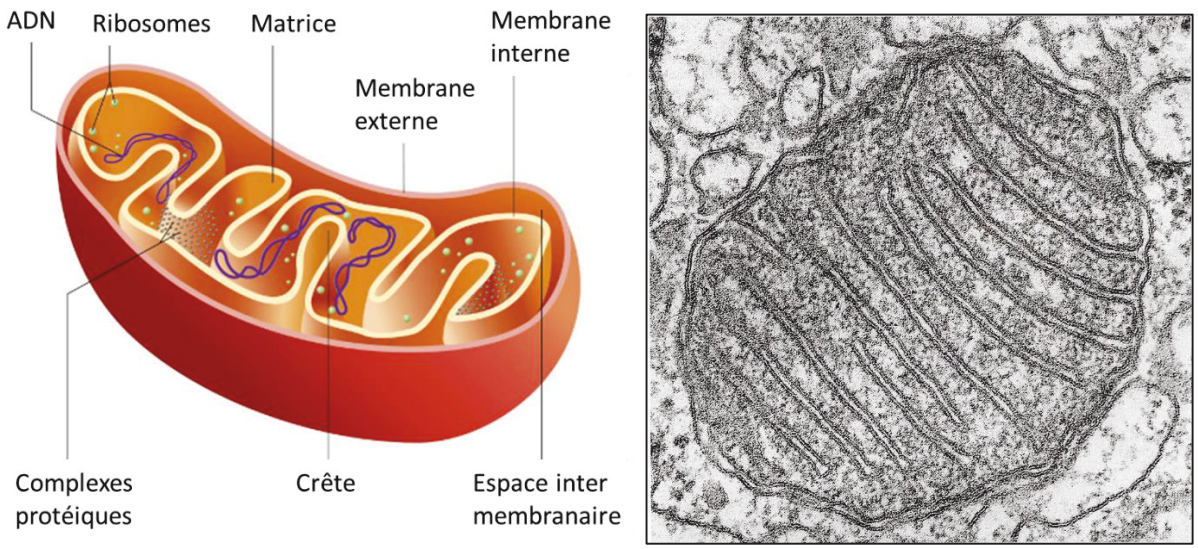


Figure 9 : Structure de la mitochondrie

A gauche, schéma de la structure mitochondriale, modifié d'après : (Biologywise)

A droite, observation d'une mitochondrie en MET, source : Daniel S. Friend

Dans le muscle squelettique, certaines mitochondries sont localisées près du sarcolemme, pour avoir un accès facile à l'oxygène transporté par les capillaires, en particulier pendant un exercice aérobie ou d'endurance, qui nécessite beaucoup d'oxygène. D'autres mitochondries sont localisées dans l'espace inter-myofibrillaire, sans différence phénotypique.

b. L'ADN mitochondrial

Selon la théorie endosymbiotique (Gray, 2017; Sagan, 1967), les mitochondries proviendraient de la symbiose de deux procaryotes aérobie et anaérobie, ce qui leur aurait procuré leur propre génome et la capacité d'autoréplication. Ainsi, les mitochondries sont des organelles partiellement autonomes : elles possèdent leur propre ADN et une machinerie pour synthétiser ARN et protéines. Mais seulement 1% de leurs protéines est constitué sur les ribosomes contenus dans la matrice mitochondriale, le reste étant encodé par des gènes nucléaires avant d'être importé dans la mitochondrie (Perocchi *et al.*, 2006; Sickmann *et al.*, 2003).

L'ADN mitochondrial (ADNmt) humain est une petite molécule circulaire à double brin de 16,569 paires de bases (Taanman, 1999). Il représente moins de 1% de l'ADN total de la cellule.

Il est compacté en nucléoïdes mitochondriaux d'une taille moyenne de 110nm, souvent associés à la membrane interne mitochondriale (Dlasková *et al.*, 2018; Brown *et al.*, 2011; Kukat *et al.*, 2011). Il contient 37 gènes (**Figure 10**) codant pour :

- 13 polypeptides, qui constituent 13 sous-unités des complexes protéiques de la phosphorylation oxydative, à l'exception du complexe II (ADN génomique) ;
- 22 ARN de transfert (ARNt) et 2 ARN ribosomiques (ARNr), nécessaires à la traduction des polypeptides dans la matrice mitochondriale.

La boucle D (pour « displacement ») est une région non-codante de contrôle de la réplication et de la transcription, qui comporte deux promoteurs de la transcription et une origine de réplication.

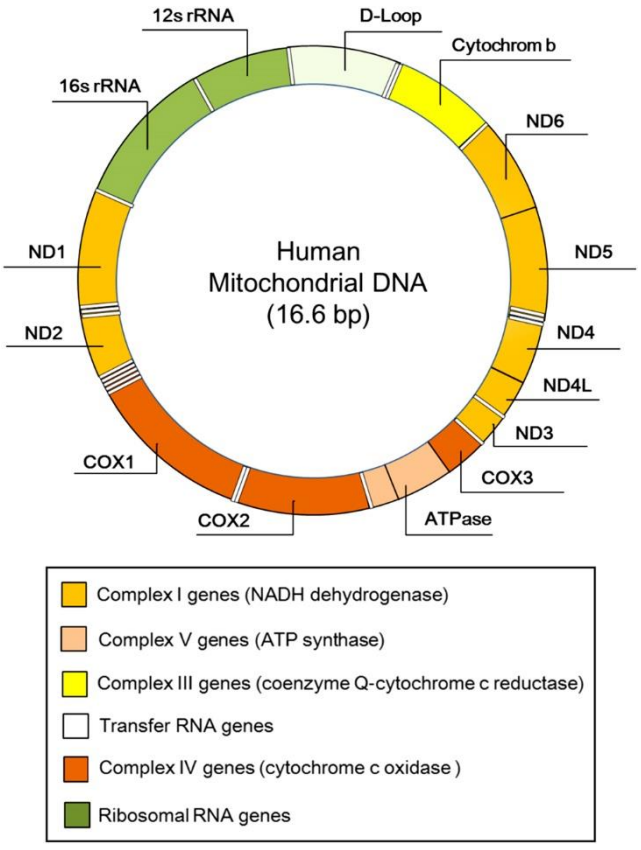


Figure 10 : L'ADN mitochondrial humain

Il est composé de 37 gènes codant pour 13 sous-unités des complexes I, III, IV et V du système mitochondrial de la phosphorylation oxydative, 22 ARNt de tranfert et 2 ARNr ribosomiques. Source : (Kim and Seli, 2019)

La fréquence des mutations est ~10 fois supérieure dans l'ADNmt par rapport à l'ADN génomique. Les causes les plus probables seraient l'exposition constante aux espèces réactives

de l'oxygène (ROS) générées par la phosphorylation oxydative et l'absence d'histones protectrices. La boucle D est particulièrement sujette à ces altérations de l'ADN, et est ainsi très souvent utilisée pour le diagnostic médical et l'identification médico-légale (Levin *et al.*, 1999). Ces mutations de l'ADNmt ont été retrouvées associées à des myopathies et la sarcopénie liées à l'âge (Herbst *et al.*, 2007; Wanagat *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Cooper *et al.*, 1992), des troubles neurologiques ou métaboliques (Armstrong *et al.*, 2000; Gerbitz *et al.*, 1995; Wallace, 1992), ainsi que des cancers, en particulier les cancers gastriques (Sharma *et al.*, 2005; Habano *et al.*, 2000; Fliss *et al.*, 2000; Habano *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 1997; Burgart *et al.*, 1995).

c. La fission, fusion et biogenèse mitochondriales

Le réseau mitochondrial subit continuellement des évènements coordonnés de fusion et fission. Cela permet non seulement le partage de certains éléments, tel que des métabolites, protéines et de l'ADN mitochondrial, mais également la dégradation et le retrait de composants endommagés grâce à des processus de mitophagie. Les changements de taille et nombre de mitochondries sont contrôlés par ces deux processus opposés. En outre, un équilibre permanent entre biogenèse mitochondriale (synthèse) et dégradation par mitophagie, aide à conserver une densité volumique mitochondriale constante. Il a été démontré que des exercices d'endurance peuvent réguler ces quatre processus (biogenèse, fusion, fission, mitophagie) pour s'assurer du bon déroulement des fonctions contractile et métabolique du muscle squelettique (Yan *et al.*, 2012).

i) Le processus de fission implique la division d'une mitochondrie en au moins deux organelles « filles ». Elle nécessite la séparation des deux membranes mitochondriales, puis leurs corrects réalignements, en évitant toute perte trop conséquente de protéines solubles de la matrice mitochondriale ou de l'espace inter membranaire. La bonne transmission des protéines et de l'ADN mitochondriaux à chaque organelle « fille » est également importante.
Trois protéines en particulier contrôlent ce mécanisme de fission (**Figure 11**) :
- Drp1 (« Dynamin-related protein 1 »), une protéine GTPase cytosolique. Elle forme de larges complexes homo-multimériques en forme de spirales, qui encerclent puis se resserrent autour la mitochondrie jusqu'au fractionnement de celle-ci ;

- Fis1 (« mitochondrial Fission protein 1 ») et Mff (« Mitochondrial fission factor »), deux protéines adaptatrices de la MME, qui aident au recrutement de Drp1 du cytoplasme à la surface mitochondriale (Lackner and Nunnari, 2009; Gandre-Babbe and van der Bliek, 2008; Mozdy *et al.*, 2000).

Récemment, deux nouvelles protéines adaptatrices ont été proposées comme pouvant participer à la machinerie de fission mitochondriale, bien que leurs rôles exacts nécessitent d'être déterminés : MiD49 et MiD51 (« Mitochondrial Dynamics proteins of 49 kDa and 51 kDa ») (Palmer *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). De plus, il semblerait que le RE jouerait un rôle dans la division mitochondriale. Celle-ci aurait lieu aux points de contact établis par le RE avec la surface mitochondriale (Friedman *et al.*, 2011).

ii) Lors de la fusion mitochondriale, une mitochondrie est formée à partir de plusieurs structures indépendantes. Ce processus est aussi dépendant de GTPases (**Figure 11**) :

- Mfn 1 et Mfn 2 (« Mitofusins »), deux protéines transmembranaires ancrées dans la MME. Elles s'associent pour permettre l'accolement puis la fusion des membranes externes de deux mitochondries adjacentes (Santel and Fuller, 2001) ;
- OPA1 (« Optic Atrophy 1 ») prend ensuite en charge la fusion des membranes mitochondriales internes. Cette protéine est retrouvée dans l'espace inter-membranaire mitochondrial ou associée avec la membrane interne. Sa présence n'est requise que sur une seule des deux mitochondries en fusion (Olichon *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2009).

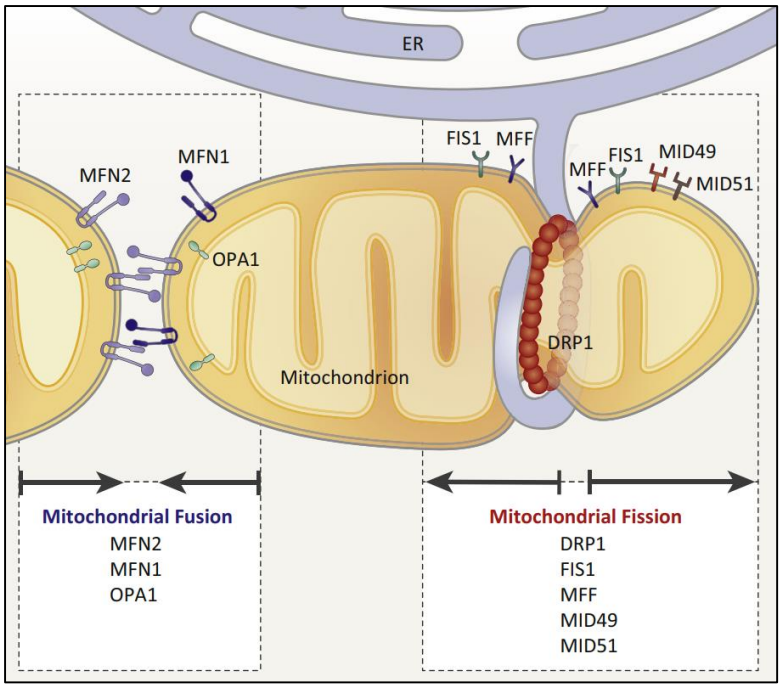


Figure 11 : Protéines impliquées dans la fusion et fission mitochondriales
Mfn1, Mfn2 et OPA1 sont des protéines-clés impliquées dans la fusion mitochondriale, tandis que Drp1, Fis1, Mff, MiD49 et MiD51 jouent un rôle important dans la fission mitochondriale. Source : (Sebastián *et al.*, 2017)

iii) La biogenèse mitochondriale requiert la coordination des génomes nucléaire et mitochondrial. Une biogenèse réussie repose sur la synthèse et l'import dans la mitochondrie d'un millier de protéines encodées par le génome nucléaire. Elle s'accompagne de modifications du nombre de mitochondries et de la taille mitochondriale. L'acteur majeur de cette machinerie est PGC1α (« Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) Gamma Coactivator 1α »). Il coactive divers facteurs de transcription, dont NRF1 et NRF2 (« Nuclear Respiratory Factors »). Ceux-ci induisent à leur tour l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales, le plus connu étant TFAM (« Transcription Factor A of Mitochondria »), qui aide à la coordination des génomes (Scarpulla, 2011; Virbasius and Scarpulla, 1994). PGC1α coactive également sa propre expression génique dans une boucle de rétrocontrôle positif (Amat *et al.*, 2009; Handschin *et al.*, 2003).
Certains stress environnementaux peuvent induire une biogenèse mitochondriale : exercice physique (Baar *et al.*, 2002), exposition au froid (Puigserver *et al.*, 2001), restriction calorique (Civitarese *et al.*, 2007), stress oxydatif (Irrcher *et al.*, 2009; Nisoli *et al.*, 2004). PGC1α jouerait un rôle important dans les changements phénotypiques musculaires et la performance aérobie (Lin *et al.*, 2002).

Chez l'homme, des mutations de certains acteurs des machineries de fusion, fission et biogenèse mitochondriales ont été associées à des pathologies telles que l'obésité (Bach *et al.*, 2003), la sarcopénie liée à l'âge (Marzetti *et al.*, 2016), des pathologies cardiaques (Chen *et al.*, 2009; Finck and Kelly, 2007), les maladies neurodégénératives d'Alzheimer (Manczak *et al.*, 2011) et de Huntington (Shirendeb *et al.*, 2011; Taherzadeh-Fard *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010).

d. Le métabolisme énergétique mitochondrial

Les mitochondries sont les sites majeurs de la production d'énergie dans les cellules. Elles synthétisent de l'ATP, nécessaire à la contraction des fibres musculaires et autres fonctions cellulaires, suite à la dégradation de combustibles organiques (glucides, lipides, protéines) (**Figure 12**).

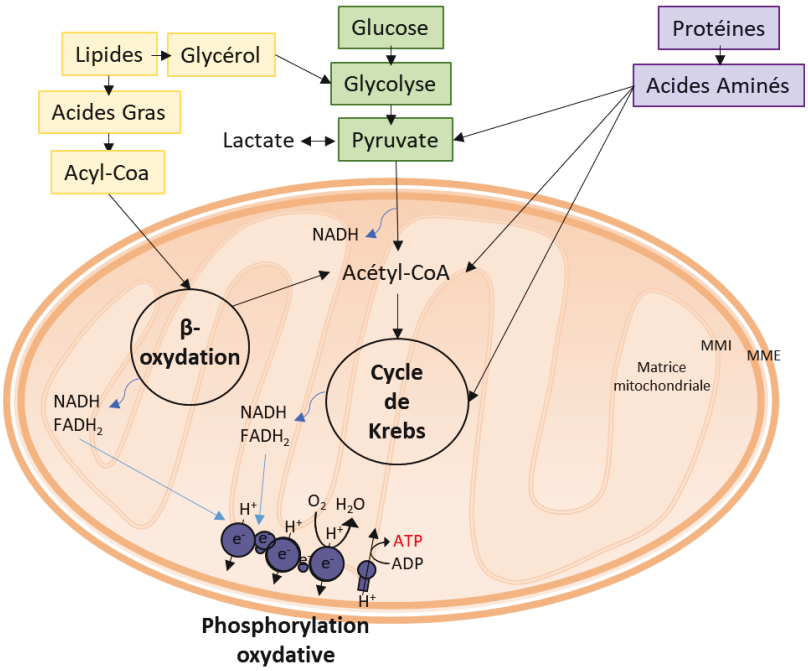


Figure 12 : Principales voies du métabolisme énergétique mitochondrial

L'énergie issue de la dégradation des combustibles organiques (lipides, glucose et protéines) est exploitée par le système de phosphorylation oxydative pour produire l'ATP nécessaire aux fonctions cellulaires.

MMI et MME, membranes mitochondriales interne et externe, respectivement.

Presque toute l'énergie issue du catabolisme de ces combustibles est initialement transformée en électrons transportés par les deux cofacteurs réduits, NADH et $FADH_2$, vers la chaîne respiratoire. Dès lors, une série de réactions d'oxydo-réductions vont permettre de réduire l'oxygène en molécules d'eau. La grande quantité d'énergie libérée est utilisée pour phosphoryler de l'ADP en ATP, d'où le terme donné au système de la phosphorylation oxydative.

La chaîne de transport d'électrons (CTE) est constituée de plusieurs complexes protéiques situés au niveau de la membrane interne mitochondriale (**Figure 13**) :

- Les complexes I (ou NADH-ubiquinone oxydoréductase) et II (ou succinate-ubiquinone-oxydoréductase) sont les accepteurs d'électrons de NADH et $FADH_2$ respectivement. C'est là que se fait l'entrée des électrons dans la CTE. Tous les deux catalysent le transfert de ces électrons au coenzyme Q, qui va lui-même les transporter jusqu'au complexe III ;
- Le complexe III (ou ubiquinone-cytochrome c-réductase) permet le passage des électrons au cytochrome c, une petite protéine associée à la MIM. Ce dernier catalyse le transfert des électrons au complexe IV ;
- Le complexe IV (ou cytochrome c oxydase) transmet enfin les électrons à l'accepteur final : l'O_2, qui sera réduit en H_2O.

Le transfert des électrons le long de la CTE est couplé au pompage de protons H^+ au travers de la membrane interne, de la matrice mitochondriale vers l'espace inter membranaire, via les complexes I, III et IV. Ce mouvement de protons engendre un gradient de pH et de voltage (potentiel membranaire) à travers la MIM, qui forment à eux deux un gradient électrochimique de protons (Mitchell, 1961). Cette force protonmotrice sert à transmettre assez de force cinétique au rotor de l'ATP synthase, complexe protéique situé à la membrane interne mitochondriale, afin de pouvoir former une molécule d'ATP (**Figure 13**). Les protons peuvent traverser l'enzyme et induire la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). La majeure partie de l'ATP cellulaire est produite grâce à cette réaction.

Cette force protonmotrice sert également au transport de molécules du cytosol à la matrice mitochondriale, telles que le pyruvate, ADP et Pi, co-transportés avec H^+ via des protéines de transport.

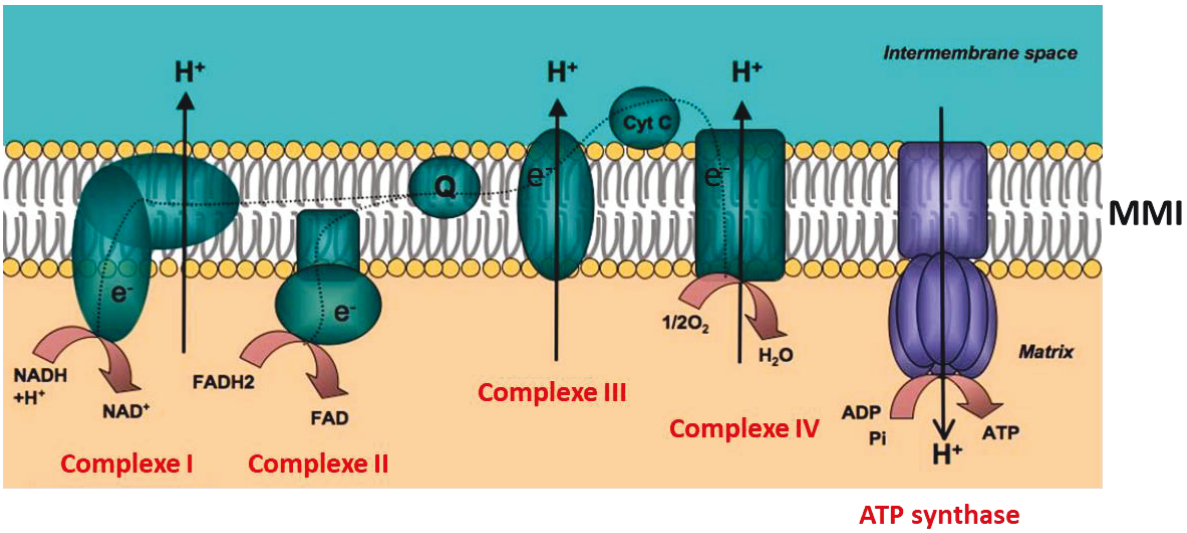


Figure 13 : Fonctionnement de la phosphorylation oxydative

Le transfert des électrons des cofacteurs réduits (NADH et $FADH_2$) à l'oxygène se fait par une série de réactions d'oxydo-réduction impliquant plusieurs couples redox ordonnés dans la chaîne respiratoire mitochondriale : les complexes I et II utilisent respectivement le $NADH+H^+$ et le $FADH_2$. Les électrons libérés passent alors du complexe I ou II au complexe III puis IV jusqu'à l'accepteur final : l'oxygène. Ce transfert est couplé à un pompage de protons (H^+) au niveau des complexes I, III et IV depuis la matrice jusqu'à l'espace intermembranaire. Ce flux génère un gradient électrochimique de protons appelé force protonmotrice, dont l'énergie est utilisée par l'ATP synthase pour permettre la synthèse d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) à partir de l'Adénosine Di-Phosphate (ADP) et du Phosphate inorganique (Pi).

Source : modifié d'après (Nadege, 2009)

La quantité, ou densité volumique, intra-fibrillaire de mitochondries est deux à trois plus importante dans les fibres de type I, dans lesquelles la synthèse d'ATP se fait principalement par voie oxydative, que dans les autres types de fibres. En outre, des études ont démontré que d'autres différences pouvaient exister au niveau du métabolisme des ROS et de la régulation du port de transition de perméabilité (PTP) par le calcium, indiquant une importante spécialisation phénotypique mitochondriale entre les types de fibres musculaires squelettiques (Picard *et al.*, 2011, 2008; Anderson and Neufer, 2006).

II. Le métabolisme lipidique

a. Homéostasie des lipides

Les acides gras (AG) plasmatiques issus de la lipolyse des adipocytes et transportés sous forme de lipoprotéines ou liés à l'albumine, peuvent entrer dans les fibres musculaires squelettiques grâce à des protéines de liaison ou de transport, telles que FAT/CD36 (« Fatty Acid Translocase/Cluster of Differenciation 36 ») et FATP1/4 (« Fatty Acid Transport Proteins 1/4 ») (Kazantzis and Stahl, 2012; Nickerson *et al.*, 2009) (**Figure 14**). Ces protéines sont soumises à des stimuli tels que les contractions musculaires, l'insuline ou un régime alimentaire riche en lipides, qui vont influencer leurs localisation et expression protéique (Bonen *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2012). Une fois à l'intérieur de la cellule, les acides gras sont pris en charge par la protéine chaperonne FABPc (« cytoplasmic Fatty Acid-Binding Protein ») et couplés à un coenzyme A (CoA) par l'acyl-CoA synthétase. Ils peuvent alors être stockés sous forme de triacylglycérols (TAG) dans des gouttelettes lipidiques ; transportés dans les mitochondries pour être oxydés (β-oxydation) ; ou encore utilisés pour la synthèse de lipides neutres ou membranaires, en fonction des besoins métaboliques des cellules. Chez l'homme, à leur entrée dans les fibres musculaires squelettiques, plus de 50% des acides gras extracellulaires sont estérifiés sous forme de TAG, et 40% sont oxydés dans les 10h qui suivent (Sacchetti *et al.*, 2004).

Les AG peuvent aussi être synthétisés *de novo* au sein du muscle squelettique mais ce mécanisme ne contribue que très peu au contenu en AG intra-myocellulaire (Summermatter *et al.*, 2010; Aas *et al.*, 2004). Tous ces mécanismes sont inter-régulés. Il a par exemple été montré qu'une altération de l'expression de CD36 peut entraîner une modulation de la β-oxydation dans la mitochondrie (McFarlan *et al.*, 2012).

La CPT1 (« Carnitine Palmitoyltransferase 1 ») permet le transport des acides gras à longue chaîne au travers de la membrane externe mitochondriale, en catalysant le transfert d'une carnitine sur le groupement acyl des acyl-coenzyme A (CoA). Il a été montré que FAT/CD36 et FATP1 pourraient intéragir avec CPT1 dans les cellules musculaires squelettiques pour contribuer à cette importation des acides gras dans la mitochondrie (Sebastián *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2004). Les acides gras traversent ensuite la membrane interne mitochondriale via des translocases, telle que CACT (« Carnitine-Acylcarnitine Translocase »). La CPT2 retire la carnitine et permet la reformation de l'acyl-CoA dans la matrice mitochondriale afin qu'il puisse être métabolisé en acétyl-CoA via la β-oxydation.

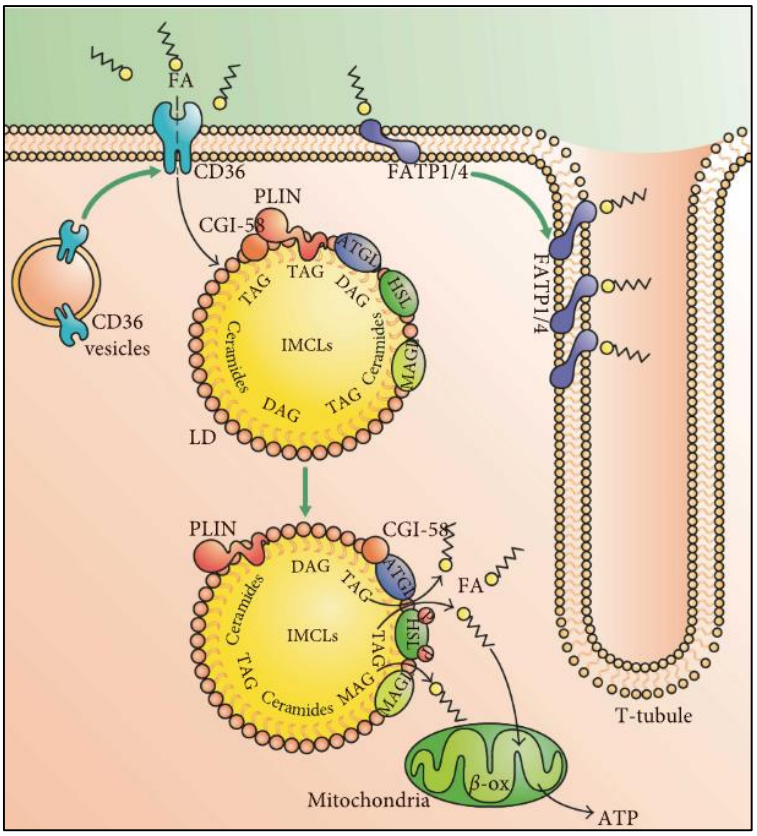


Figure 14 : Homéostasie des acides gras dans le muscle squelettique

L'entrée des acides gras (AG) dans les fibres musculaires squelettiques se fait grâce aux protéines de liaison CD36 et de transport FATP1/4. Une fois à l'intérieur de la cellule, les AG peuvent être stockés sous forme d'acylglycérides (TAG, DAG) dans les gouttelettes lipidiques (GL). Les périlipines sont les protéines les plus abondantes qui recouvrent la membrane de ces GL, avec les lipases ATGL et HSL et le coactivateur CGI-58. En réponse à une contraction (flèche verte), l'activité d'ATGL augmente de par sa dissociation avec les périlipines, celle d'HSL est activée par phosphorylation dépendante d'une protéine kinase (PKA). Les acylglycérides sont dégradés en AG libres qui seront transportés vers les mitochondries pour être oxydés ou vers le cytosol en fonction des besoins de la cellule.

ATGL : « Adipose Triglyceride Lipase » ; **ATP** : Adénosine Triphosphate ; **β-ox** : β-oxydation ; **CD36** : « Cluster of Differenciation 36 » ; **CGI-58** : « Comparative Gene Identification-58 » ; **DAG** : Diacylglycérol ; **FA** : Acide Gras ; **FATBP1/4** : « Fatty Acid Transport Proteins 1/4 » ; **HSL** : « Hormone-Sensitive Lipase » ; **IMCLs** : Lipides Intra-Myocellulaires ; **MAG** : Monoacylglycerol ; **MAGL** : « Monoacylglycerol Lipase » ; **PLIN** : Périlipine ; **TAG** : Triacylglycerol.

Source : modifié d'après (Morales *et al.*, 2017)

Une augmentation des besoins cellulaires en AG, par exemple lors d'un exercice d'endurance, va stimuler la lipolyse dans le muscle squelettique. Trois lipases sont responsables de la dégradation des TAG en acides gras libres dans les gouttelettes lipidiques (Zechner *et al.*, 2009) (**Figure 14**) :

- L'Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) catalyse la première étape de la lipolyse du TAG, qui va générer un diacylglycérol (DAG) et une molécule d'AG libre. Elle est activée par CGI-58 (« Comparative Gene Identification-58 »), une protéine localisée à la surface des gouttelettes lipidiques.
- L'Hormone-Sensitive Lipase (HSL) dégrade ensuite chaque DAG en monoacylglycérol (MAG) + une molécule d'AG libre. Elle est cependant moins spécifique que l'ATGL et peut hydrolyser d'autres substrats, incluant les TAG et certaines classes d'esters de cholestérol.
- La Monoacylglycerol Lipase (MAGL) catalyse la dernière étape de la lipolyse : elle hydrolyse les MAG en glycérols + acides gras libres.

ATGL et HSL sont, à elles deux, responsables de l'hydrolyse de 95% des TAG. Leur expression est plus importante dans les fibres musculaires de type I et leur activation est particulièrement stimulée par les contractions musculaires et exercices d'endurance (Turnbull *et al.*, 2016; Langfort *et al.*, 2000). A l'inverse, la sarcopénie liée à l'âge a été retrouvée associée à une diminution de l'expression de l'enzyme ATGL dans le muscle squelettique (Aquilano *et al.*, 2016).

b. Les gouttelettes lipidiques, lieu de stockage des lipides

Les TAG intra-myocellulaires sont stockés dans des gouttelettes lipidiques (GL). Ces organelles sont des réserves énergétiques localisées près du RE, où les TAG sont estérifiés ; et près des mitochondries, où les AG sont oxydés (Shaw *et al.*, 2008; Stein and Stein, 1968). Elles sont entourées d'une monocouche de phospholipides et d'esters de stérols, où sont ancrées des protéines impliquées notamment dans les processus de lipolyse et d'estérification (Zhang *et al.*, 2011; Bartz *et al.*, 2007). Cette composition est similaire à celle de la membrane du RE, d'où l'hypothèse que les gouttelettes lipidiques en seraient un domaine spécialisé, accessibles aux protéines du cytosol et de la lumière du RE (Mishra *et al.*, 2016).

Les périlipines (PLIN) sont les protéines les plus abondantes qui recouvrent les gouttelettes lipidiques. Cinq membres composent la famille des périlipines : PLIN 1 à 5, numérotées dans l'ordre de leur découverte (Kimmel *et al.*, 2010). La PLIN 1 est la seule à ne pas être exprimée

dans le muscle squelettique, elle est plutôt retrouvée dans les adipocytes des tissus adipeux blanc et brun. Le **tableau 2** résume les principales caractéristiques des 4 autres périlipines dans le muscle squelettique.

Le métabolisme des AG requiert un équilibre strict entre les voies d'entrée/synthèse et d'utilisation/dégradation pour éviter l'accumulation d'intermédiaires lipidiques toxiques, tels que les céramides et DAG. Il a été montré qu'une accumulation de ces intermédiaires intra-myocellulaires pourrait entraîner une résistance à l'insuline, caractéristique du diabète de type II (Amati *et al.*, 2011). De manière intéressante, le contenu en TAG représente habituellement 0,5% de la densité musculaire chez un individu à l'IMC normal. Ce volume peut augmenter pour atteindre 3,5% chez un individu obèse (Watt and Hoy, 2011). A noter qu'il existe cependant ce qu'on appelle le « paradoxe de l'athlète », qui décrit une sensibilité particulière à l'insuline malgré une augmentation du contenu en TAG dans le muscle squelettique d'athlètes d'endurance (Goodpaster *et al.*, 2001).

Tableau 2 : Caractéristiques des périlipines et leurs rôles dans le muscle squelettique

Périlipines	Localisation tissulaire	Localisation cellulaire	Particularités / Rôles dans le muscle squelettique
PLIN 2	Ubiquitaire	Exclusivement associée aux vacuoles lipidiques	Essentielle au stockage lipidique et à la stabilisation des GL dans le muscle squelettique, pour prévenir toute lipotoxicité (Bosma *et al.*, 2012). L'augmentation de son expression est associée à la sarcopénie liée à l'âge et à une diminution de la force musculaire (Conte *et al.*, 2013).
PLIN 3		Forment des petits clusters dans le cytoplasme ou sont associées aux vacuoles lipidiques	Retrouvée au niveau des sites de contact avec la mitochondrie, elle y favorise le transfert des AG et régule leur oxydation (Covington *et al.*, 2015).
PLIN 4	Tissu adipeux blanc Muscles squelettique et cardiaque (moins exprimée)		Particulièrement exprimée sur les GL contenant des esters de cholestérol (Hsieh *et al.*, 2012). Son expression est plus importante dans les muscles à fibres lentes (Pourteymour *et al.*, 2015).
PLIN 5	Tissu adipeux brun Muscles squelettique et cardiaque Foie (moins exprimée)		Tout comme la PLIN 3, elle favorise la communication entre les GL et les mitochondries. Sa surexpression induit une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale, l'oxydation des AG et les complexes protéiques de la phosphorylation oxydative (Bosma *et al.*, 2013).

AG : Acide Gras ; GL : Gouttelette Lipidique

III. Relations entre les métabolismes mitochondrial et lipidique

Le turnover lipidique est étroitement lié à la fonction mitochondriale.

La mitochondrie régule le transport et l'oxydation des AG libres, tandis que des AG gras à longue chaîne, tels que le palmitate et l'acide arachidonique, peuvent avoir un effet inhibiteur spécifique de complexes du système mitochondrial de la phosphorylation oxydative (Loskovich *et al.*, 2005), et altérer le potentiel membranaire mitochondrial en intéragissant physiquement avec la membrane interne mitochondriale et en induisant une ouverture du pore de transition de perméabilité (Bernardi *et al.*, 2002; Scorrano *et al.*, 2001).

La résistance à l'insuline observée dans le muscle squelettique suite à une lipolyse excessive et à une accumulation d'intermédiaires lipotoxiques cytoplasmiques, s'explique également par une surcharge lipidique dans la mitochondrie stimulant une intense production de ROS mitochondriales (Muoio and Neufer, 2012).

Enfin, des dysfonctions mitochondriales ont aussi pu être observées dans le muscle squelettique de patients atteints de pathologies liées à des troubles du stockage des lipides (LSD, « Lipid Storage Disease ») (Debashree *et al.*, 2018).

Partie 3 : Les cancers gastriques et gynécologiques

Sources principales de cette section : (Bray *et al.*, 2018) et le site web de l'INCa, visité en août 2019 (Institut National du Cancer)

Selon des estimations de l'OMS (« Organisation Mondiale de la Santé »), en 2015, le cancer était la 1ère ou 2nde cause de décès avant l'âge de 70 ans, dans 91 pays sur 172. L'incidence et la mortalité liées au cancer augmente très rapidement à l'échelle mondiale, en particulier dans les pays industrialisés, de par la croissance et le vieillissement de la population.
On estime à 18,1 millions le nombre de nouveaux cas de cancers en 2018, et 9,6 millions le nombre de décès liés au cancer, avec une nette hétérogénéité selon les pays, dépendamment de leur situation économique et sociale.

Chez l'homme, le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent et la principale cause de décès par cancer. Il est suivi par les cancers prostatique et colorectal, pour l'incidence ; et les cancers hépatique et gastrique pour la mortalité (**Figure 15**).
Chez la femme, le cancer du sein est le cancer avec les taux d'incidence et de mortalité les plus importants. Il est suivi par les cancers colorectal et pulmonaire pour l'incidence ; et inversement pour la mortalité (**Figure 15**).
De meilleures prises en charge et un dépistage non seulement plus performant, mais aussi plus précoce du cancer, participent à l'augmentation de l'incidence et la diminution de la mortalité observées ces dernières années pour certains cancers, tel que le cancer colorectal.

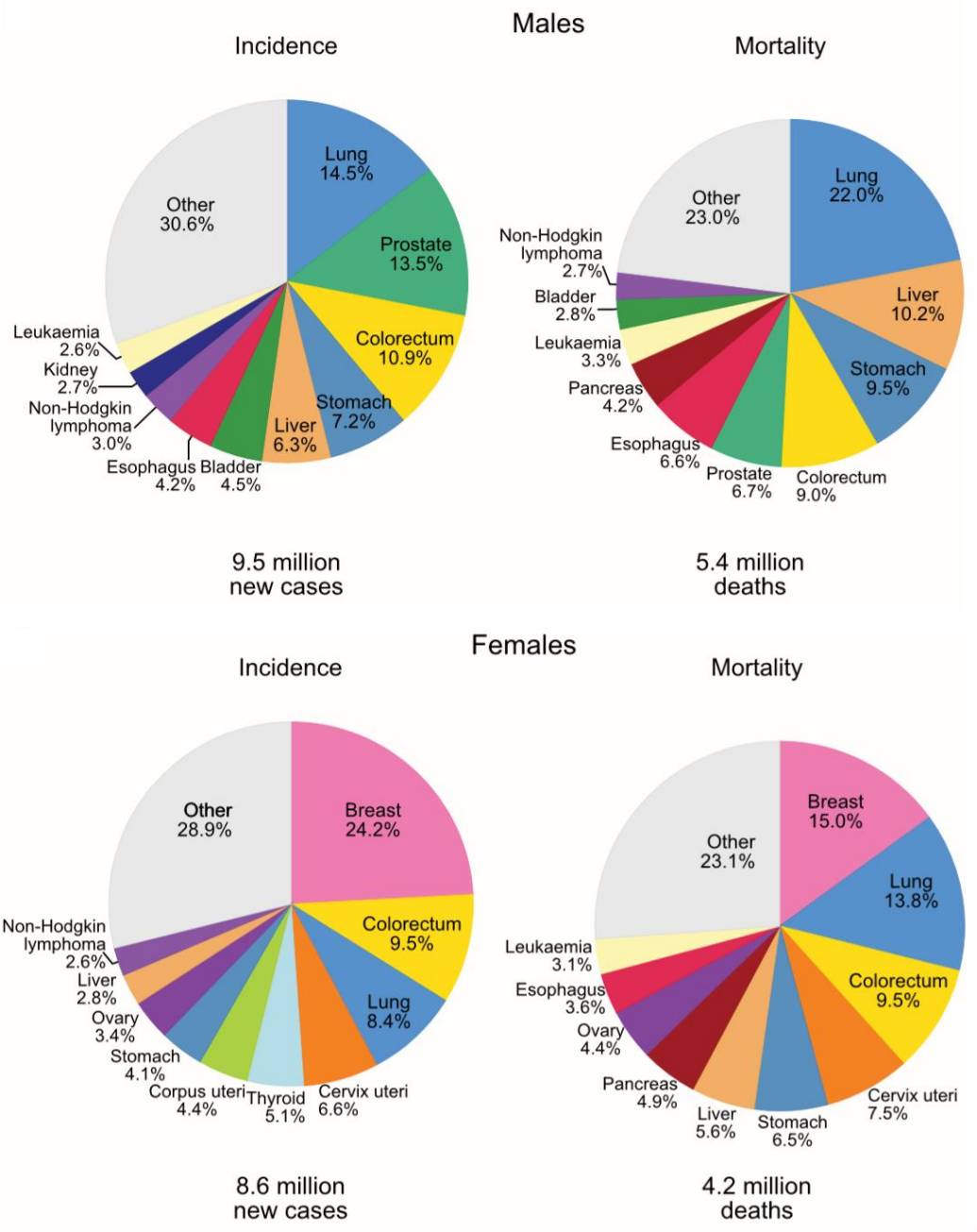


Figure 15 : Distribution des 10 cancers les plus répandus dans le monde en 2018, selon leur taux d'incidence et de mortalité, par sexe

Source : (Bray *et al.*, 2018)

I. Les cancers pancréatique et colorectal

La plupart des tumeurs du pancréas se situent sur la tête de l'organe, qui est la partie la plus proche de l'intestin. Bien que le cancer du pancréas ne fasse pas partie des 10 cancers les plus

répandus dans le monde, il serait responsable, tous sexes confondus, de 4% des décès par cancer en 2018, le classant ainsi comme le 7ème cancer en terme de mortalité.

Le cancer colorectal se développe à partir des cellules qui tapissent la paroi interne du côlon ou du rectum. Dans plus de 80 % des cas, il provient d'une tumeur bénigne qui évolue lentement et finit par devenir cancéreuse. Tous sexes confondus, il représente le 3ème cancer le plus répandu dans le monde et le 2nd cancer le plus mortel, avec ~10% des nouveaux cas et des décès par cancer en 2018.

Ces cancers gastro-intestinaux se développent la plupart du temps de manière asymptomatique et sont par conséquent, très souvent détectés tardivement. Cependant, certains signes peuvent être révélateurs tels que des troubles de la digestion, ou des saignements dans les selles pour le cancer colorectal.

De manière générale, l'âge, certaines habitudes de vie et les prédispositions génétiques peuvent augmenter le risque d'avoir un cancer. Le tabac et le surpoids ou l'obésité sont des facteurs de risque identifiés de ces cancers gastro-intestinaux (Ben *et al.*, 2019; Jochem and Leitzmann, 2016; Michaud, 2016). De plus, les personnes atteintes de maladie inflammatoire chronique, telle que la maladie de Crohn, sont également à risque très élevé de cancer colorectal (Dulai *et al.*, 2016).

Tous stades confondus, le cancer du pancréas est associé à un mauvais pronostic avec une survie à 1 an de ~18% et de seulement ~4% à 5 ans (Hidalgo *et al.*, 2015). La survie des patients atteints d'un cancer colorectal serait de ~90% à 1 an et ~75% à 5 ans. Elle diminue cependant considérablement pour les stades les plus avancés : entre ~40 et 65% à 1 an, et ~10% à 5 ans (Crooke *et al.*, 2018).

Différents types de traitement peuvent être utilisés pour traiter ces cancers : la chirurgie (particulièrement utile lorsqu'il n'y a pas de métastase), la chimiothérapie, la radiothérapie et les thérapies ciblées. Ils ont pour objectifs une guérison complète, ou la limitation de son développement et de sa propagation, la réduction du risque de récidive et l'amélioration, du mieux possible, de la qualité de vie du patient. Le choix du ou des traitements se fait en fonction du type et du stade du cancer.

II. Les tumeurs gynécologiques

a. Les cancers de l'ovaire et de l'endomètre

Le cancer ovarien se développe dans 90% des cas à partir des cellules épithéliales de l'ovaire. On parle d'adénocarcinome épithélial ovarien. Il représentait ~4% des nouveaux cas et des décès par cancer chez les femmes dans le monde en 2018, faisant de lui le 8ème cancer le plus diagnostiqué et la 8ème cause de mortalité par cancer chez la femme. La survie à 5 ans des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire, tous stades confondus, serait inférieure à 45% (Webb and Jordan, 2017). Généralement asymptomatique, il est souvent diagnostiqué à un stade avancé, après l'apparition de métastases. Une gêne, des douleurs abdominales et/ou une constipation chronique, peuvent être des signes de la présence du cancer. Dans 10% des cas, la cause du cancer de l'ovaire serait génétique (La Vecchia, 2017).

Le cancer de l'endomètre, ou cancer du corps utérin, est le 6ème cancer le plus répandu chez la femme avec ~4.4% des nouveaux cas en 2018 dans le monde. Il serait responsable de 2% des décès par cancer. La survie à 5 ans des patientes atteintes d'un cancer du corps utérin serait supérieure à 80% pour les stades précoces et inférieure à 20% pour les stades avancés (Morice *et al.*, 2016). Les principaux symptômes de ces cancers sont des saignements vaginaux et des douleurs abdominales. En plus de l'âge et des prédispositions génétiques, l'obésité serait un des principaux facteurs de risque du cancer de l'endomètre (Shaw *et al.*, 2016; Ali, 2013). Une patiente obèse aurait 2,6 fois plus de risque de développer un cancer de l'endomètre. Ce risque serait de 4,7 fois en cas d'obésité morbide (Shaw *et al.*, 2016).

Le choix des traitements est là aussi adapté à chaque situation, suivant le type et le stade du cancer. La chirurgie est le traitement principal, et est souvent suivie ou précédée d'une chimiothérapie pour le cancer de l'ovaire, et d'une radiothérapie/curiethérapie +/- chimiothérapie adjuvante pour le cancer de l'endomètre.

b. Les tumeurs borderlines de l'ovaire

Les tumeurs prolifératives atypiques de l'ovaire, ou tumeurs à faible potentiel de malignité, ou encore tumeurs borderlines de l'ovaire (Taylor, 1929; Scully, 1982), présentent des caractéristiques histologiques propres, intermédiaires entre celles des tumeurs bénignes et malignes. Ce ne sont pas des carcinomes. Leur diagnostic repose sur l'association de quatre critères histologiques (Scully, 1982; Hart and Norris, 1973) : pluristratification et

bourgeonnement épithélial ; une augmentation variable de l'activité mitotique ; des atypies cytonucléaires (diagnostic différentiel avec les tumeurs bénignes) ; et une absence d'invasion stromale (diagnostic différentiel des tumeurs malignes). Cependant un certain degré de micro invasion peut être toléré. Il s'agit donc d'un groupe hétérogène de tumeurs pouvant prendre aussi bien un aspect de kyste bénin qu'avoir un comportement agressif sur le plan clinique à l'instar d'un carcinome invasif et avoir un potentiel d'extension extra-ovarien et de récurrence aggravant le pronostic. Les tumeurs prolifératives atypiques de l'ovaire représenteraient 10 à 20% de toutes les tumeurs épithéliales de l'ovaire (Lenhard *et al.*, 2009) et se différencient des cancers de l'ovaire par : leur âge de survenue, en moyenne plus précoce de 10 ans ; et ensuite leur pronostic, bien meilleur que celui des carcinomes ovariens, avec une survie, tous stades confondus, de 95% à 5 ans et 90% à 10 ans. En France, il n'y a pas de donnée épidémiologique précise concernant l'incidence/prévalence de ces tumeurs borderlines de l'ovaire.

Partie 4 : La cachexie cancéreuse

I. Généralités sur la cachexie cancéreuse

a. Définition

La cachexie, ou dénutrition, est un syndrome multifactoriel complexe. Elle est retrouvée associée à de nombreuses pathologies chroniques (Taylor and Pendleton, 2016; Yoshida and Delafontaine, 2015), plus fréquemment à des stades avancés, telles que :

- l'insuffisance cardiaque congestive (Suzuki *et al.*, 2018; Clark *et al.*, 2017; Gaggin *et al.*, 2016) ;
- l'insuffisance rénale chronique (Gołębiewska *et al.*, 2012; Rammohan *et al.*, 2005; Lien and Ruffenach, 1996) ;
- la pneumopathie chronique obstructive (Fekete *et al.*, 2019; McDonald *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2019; Remels *et al.*, 2013) ;
- la tuberculose pulmonaire (Ben Saad *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2013) ;
- le syndrome d'immunodéficience acquise (Mwamburi *et al.*, 2004; Graham *et al.*, 1994; Von Roenn *et al.*, 1990) ;
- la maladie de Crohn (Burnham *et al.*, 2005) ;
- le cancer (Fearon *et al.*, 2011).

Ce trouble du métabolisme se caractérise par une perte de poids involontaire et pathologique, principalement due à une fonte musculaire squelettique, aussi appelée sarcopénie. Les patients ont un état nutritionnel altéré qui conduit à un affaiblissement profond de l'organisme, la formation d'œdèmes, une perte d'appétit (ou anorexie), une fatigue persistante, qui diminuent considérablement leur qualité de vie et leur survie.

Mes travaux de thèse portent sur la cachexie associée au cancer, ou cachexie cancéreuse. En 2011, un consensus d'experts internationaux a défini la cachexie cancéreuse comme étant caractérisée par une perte progressive de la masse musculaire squelettique, avec ou sans perte de la masse adipeuse, qui ne peut être pleinement prise en charge par un soutien nutritionnel conventionnel et qui conduit peu à peu à une déficience fonctionnelle (Fearon *et al.*, 2011).

b. Diagnostic et classification

Bien que les connaissances sur la cachexie cancéreuse se soient enrichies au cours des dernières années, l'absence de critères de diagnostic standardisés représente un challenge pour les études cliniques et le développement d'agents thérapeutiques. L'hétérogénéité des critères de constitution des groupes de patients cachectiques dans les essais cliniques influe drastiquement sur la robustesse des conclusions.

La définition clinique établie par Fearon *et al.*, a permis la mise en place de premiers critères de diagnostic de référence (Fearon *et al.*, 2011). La cachexie cancéreuse y a été décrite comme étant un continuum comportant 3 stades de diagnostic :

- Pré-cachexie, marquée par une perte de poids ≤ 5%, une anorexie et des changements métaboliques, telle qu'une intolérance au glucose ;
- Cachexie, où un patient est considéré comme cachectique s'il présente l'un des critères suivants :
    i. Une perte de poids > 5% en 6 mois (sans qu'il y ait privation alimentaire) ;
    ii. Une perte de poids > 2% lorsque l'IMC est < 20 ;
    iii. Une sarcopénie (indice de masse musculaire squelettique appendiculaire < 7,26 kg/m² pour les hommes et < 5,45 kg/m² pour les femmes) et une perte de poids supérieure à 2%.
- Cachexie réfractaire, avec des degrés divers de cachexie. A ce stade, le cancer ne répond pas aux traitements et le patient présente un indice de performance de grade OMS bas (3 ou 4), ainsi qu'une espérance de vie inférieure à 3 mois.



Le risque de progression dépend du stade et du type de tumeur, de la présence d'une inflammation systémique, de la réponse au traitement anti tumoral, ainsi que des variations interindividuelles telles que la prédisposition génétique, la composition corporelle, l'apport alimentaire, l'activité physique et les comorbidités (Johns *et al.*, 2013; Fearon *et al.*, 2012). Il est cependant intéressant de noter que la sévérité de la cachexie ne semble pas corréler avec la taille de la tumeur (Fearon and Moses, 2002).

Cette manière de distinguer les patients cachectiques des patients non cachectiques, basée sur la perte de poids et l'IMC, a par la suite été validée dans une étude multicentrique internationale incluant 861 patients (Blum *et al.*, 2014). Cependant, des études récentes ont démontré

l'importance de continuer à développer et mettre à jour ces critères cliniques, en prenant en compte l'évolution de la prévalence du surpoids et de l'obésité, en particulier dans les populations occidentales (Martin *et al.*, 2015), ou l'âge avancé de la plupart des patients cachectiques (Cederholm *et al.*, 2015).

La classification, en particulier le stade de pré-cachexie, est aussi sujet à débat. Ce concept de stade précoce de la cachexie est remis en cause de par ses critères de diagnostic jugés insuffisants et inadéquats pour permettre une bonne distinction des patients pré-cachectiques et non cachectiques. Dans leur étude, Blum *et al.* ont établi un groupe de patients pré-cachectiques basés sur le critère de la perte de poids > 1 kg et < 5% en 6 mois (Blum *et al.*, 2014). Ils ont démontré la nécessité d'ajouter des facteurs de discrimination supplémentaires, telles que la perte d'appétit et l'inflammation. Blauwhoff-Buskermolen *et al.* se sont basés sur ces résultats pour constituer leur groupe de patients pré-cachectiques et ont conclu à une très faible prévalence (0,5 à 2%) de la pré-cachexie chez les 200 patients inclus dans leur étude et porteurs d'un cancer pulmonaire, colorectal, prostatique ou du sein (Blauwhoff-Buskermolen *et al.*, 2014). Se pose alors la question de la pertinence clinique de la pré-cachexie chez les patients cancéreux, telle qu'elle est définie actuellement. De nouveaux essais cliniques sont donc nécessaires pour valider ce statut.

c. Epidémiologie

En se basant sur les critères de poids et d'IMC du consensus de 2011, on estime que la prévalence de la cachexie chez les patients atteints d'un cancer serait de ~35% (Sun *et al.*, 2015). Elle peut atteindre ~80 à 90% pour les cancers gastriques et pancréatiques et est particulièrement élevée aux stades avancés (Vagnildhaug *et al.*, 2018; von Haehling and Anker, 2010). Elle serait de ~33% pour les cancers gynécologiques (Sun *et al.*, 2015) (**Tableau 3**).
La cachexie cancéreuse serait la cause du décès de 20 à 25% des patients (Warren, 1932) en plus d'être une comorbidité importante affectant significativement leur survie moyenne. Sans compter l'incidence de la masse tumorale, les patients cancéreux cachectiques décèdent soit d'un arrêt cardio-respiratoire, d'une thromboembolie, d'une insuffisance rénale ou d'une immunosuppression (Argilés *et al.*, 2014; Ambrus *et al.*, 1975).

Tableau 3 : Prévalence de la cachexie dans plusieurs types de cancers communs.

Localisation du cancer	Prévalence de la cachexie	Localisation du cancer	Prévalence de la cachexie
Pancréas	88,9%	Cervical	36,4%
Estomac	76,5%	Ovaire	33,3%
Œsophage	52,9%	Nasopharynx	31,8%
Foie	50,0%	Poumon	25,8%
Sarcome osseux ou des tissus mous	42,9%	Sein	2,9%
Colo rectum	42,0%	Lymphome	0,0%

Modifié à partir de (Sun *et al.*, 2015). Etude menée sur 390 patients présentant un cancer à un stade avancé. La cachexie cancéreuse a été diagnostiquée en utilisant les critères de Fearon *et al.* (Fearon *et al.*, 2011).

d. Prise en charge clinique

De par la complexité physiopathologique et les caractéristiques multifactorielles de ce syndrome clinique, il n'existe pour le moment aucun traitement contre la cachexie cancéreuse. Les recherches actuelles se concentrent sur une approche multimodale (Madeddu *et al.*, 2012) (**Figure 16**) incluant :

- Un traitement anti tumoral plus adapté. Il a en effet été montré que les agents chimio thérapeutiques sont responsables de certaines des altérations observées dans la cachexie cancéreuse, en particulier la perte de muscle squelettique (Coletti, 2018; Damrauer *et al.*, 2018; Hopkins and Sawyer, 2018).
- Une prise en charge pharmacologique. Plusieurs traitements ont été testés dans des essais cliniques (Sadeghi *et al.*, 2018; Anderson *et al.*, 2017). Ils visent en particulier à réduire l'inflammation systémique, contrecarrer l'état hyper catabolique des patients et/ou à stimuler leur appétit. Cependant, bien qu'un effet positif sur l'appétit ait été généralement observé, leur efficacité à maintenir le poids et la masse musculaire du patient est très variable et reste encore à confirmer. De plus, les effets secondaires de ces traitements se sont parfois révélés très importants, réduisant drastiquement leur tolérance. Intégrer ces agents pharmaco thérapeutiques dans une approche multimodale pourrait améliorer leur efficacité.
- Un support nutritionnel, de l'activité physique adaptée, et une prise en charge psychosociologique.

La prise en charge nutritionnelle doit avoir lieu suffisamment tôt pour anticiper l'apparition de la dénutrition chez les patients atteints d'un cancer. Des régimes riches en calories et en protéines et le fractionnement des prises alimentaires sont recommandés (Arends *et al.*, 2017). Lorsque le patient ne peut couvrir la totalité de ses besoins alimentaires, des supplémentations orales, en acides gras par exemple, sont proposées. Des études récentes ont démontré l'effet positif de ces compléments nutritionnels oraux chez les patients cachectiques (Fitschen *et al.*, 2013; Kraft *et al.*, 2012; Ries *et al.*, 2012; Murphy *et al.*, 2011; Weed *et al.*, 2011). En cas d'échec de cette alimentation enrichie et fractionnée, une alimentation artificielle (entérale ou parentérale) devient nécessaire (Cotogni, 2016).

Maintenir une activité physique permet de préserver la masse et la fonctionnalité du muscle, et d'atténuer les effets de la cachexie (Maddocks *et al.*, 2013; Stene *et al.*, 2013; Oldervoll *et al.*, 2011). Les effets positifs d'entraînements aérobies et/ou de résistance, par exemple sur l'inflammation (Petersen and Pedersen, 2005) et la sensibilité à l'insuline (Gould *et al.*, 2013), ont pu être observés, en particulier à des stades précoces du cancer. Cependant, à des stades avancés, où la cachexie est souvent bien présente, les patients souffrent de fatigue chronique et d'anémie, diminuant leur capacité à suivre les programmes proposés. Les données sont actuellement insuffisantes pour interpréter les effets d'exercices physiques comme approche thérapeutique lorsque le cancer est à un stade avancé (Navigante and Morgado, 2016; Argilés *et al.*, 2012; Maddocks *et al.*, 2011).

Enfin, le cancer et la cachexie cancéreuse ont un impact très important sur la sphère psychosociologique du patient et de son entourage. Cet aspect doit également être considéré dans la prise en charge clinique du patient (Reid, 2014; Hudson and Payne, 2011).

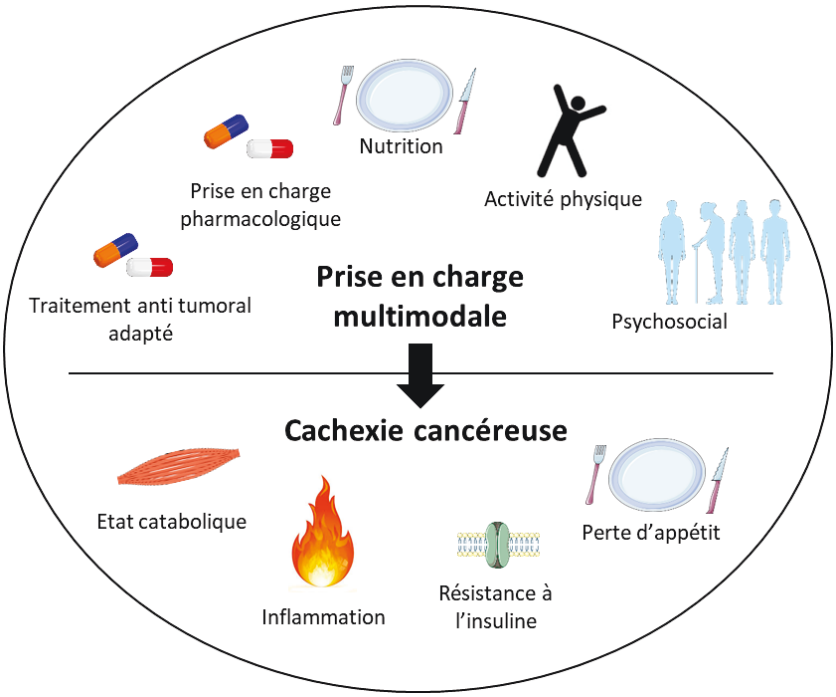


Figure 16 : Approche multimodale dans la prise en charge de la cachexie cancéreuse

Il n'existe pour le moment aucun traitement contre la cachexie cancéreuse. Les recherches actuelles se concentrent sur une approche multimodale incluant un traitement anti-tumoral adapté, une prise en charge pharmacologique supplémentaire, un support nutritionnel, des activités physiques, et une prise en charge psychosociologique, pour essayer de contrecarrer l'état catabolique, l'inflammation systémique, la résistance à l'insuline et la perte d'appétit des patients cancéreux cachectiques.

II. Biomarqueurs sanguins de la cachexie cancéreuse

Plusieurs composants sanguins ont été proposés pour aider au diagnostic de la dénutrition/cachexie cancéreuse chez les patients. De multiples études cliniques récentes ont pu observer une association entre les composants listés ci-après et l'état cachectique des patients (**Tableau 4**) :

- Marqueurs de l'inflammation : CRP (« C-Reactive Protein »), les interleukines IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN-γ (Interféron-γ), TNF-α (« Tumor Necrosis Factor-α ») ;
- Membres de la famille TGF-β (« Transforming Growth Factor-β ») : Myostatine, Activine A, GDF-15 (« Growth and Differentiation Factor 15 ») ;

- Facteurs dérivés de la tumeur : ZAG (« Zinc-α2-Glycoprotein », ou LMF, « Lipidmobilizing Factor »), VEGF (« Vascular Endothelial Growth Factor »), Midkine ;
- Marqueurs de la lipolyse du tissu adipeux : Leptine, Adiponectine, Résistine, Acides gras libres, Glycérol ;
- Autres : Ghréline, IGF-1 (« Insulin-like Growth Factor-1 »), Albumine, Angiotensine II.

Certaines études ont essayé d'utiliser ces facteurs pour distinguer les différents états de la cachexie cancéreuse (Lerner *et al.*, 2016; Penafuerte *et al.*, 2016; Bilir *et al.*, 2015). D'autres facteurs ont également été étudiés, tels que le PIF (« Proteolysis Inducing Factor »), dosé dans l'urine (Wigmore *et al.*, 2000) ; des marqueurs de la dégradation musculaire : 3-Méthylhistidine, fragments de titine, fragments de collagène (Loumaye and Thissen, 2017), difficiles à doser dans le sang et avec des dosages souvent contaminés par des produits de dégradation de protéines non-musculaires ; la testostérone, comme paramètre hormonal (Bilir *et al.*, 2015) ; la PTHrP (« Parathyroid-Hormone-related Protein ») (Hong *et al.*, 2016). Mais il y a pour le moment trop peu de données cliniques pour conclure sur leur validité.
Il n'existe à ce jour aucun biomarqueur validé de la cachexie cancéreuse. Les résultats de ces études cliniques, parfois contradictoires (**Tableau 4**), sont difficiles à comparer tant les critères de diagnostic utilisés pour établir les groupes de patients cachectiques, varient d'une étude à l'autre. Certains articles comparent des groupes de patients cancéreux cachectiques à des patients sains (Bilir *et al.*, 2015; Mondello *et al.*, 2014; Kemik *et al.*, 2010). Le cancer, et non la cachexie, pourrait donc être responsable des changements observés. De plus, il semblerait que les dosages de marqueurs tels que IL6, TNFα et la leptine, pourraient varier d'un jour à l'autre et au sein d'une même journée, ce qui affecterait inévitablement les résultats (Fujiwara *et al.*, 2014). Les auteurs n'ont pas donné d'explication à ces observations mais nous pouvons émettre l'hypothèse d'un lien avec le rythme circadien et/ou l'état nutritionnel du patient.
De plus larges études cliniques, avec des critères de diagnostic uniformes, sont nécessaires pour déterminer quels candidats sont les plus robustes et reproductibles pour être considérés comme biomarqueurs de la cachexie cancéreuse.

Il est intéressant de noter qu'une augmentation de marqueurs inflammatoires sanguins n'est pas systématiquement observée dans les populations de patients avec une cachexie cancéreuse. En effet, plusieurs études cliniques montrent une absence de différence significative au niveau des

dosages de la CRP en particulier, entre des patients cancéreux cachectiques et non cachectiques (Prokopchuk *et al.*, 2017; Aversa *et al.*, 2016; Stephens *et al.*, 2015; Agustsson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Skorokhod *et al.*, 2012). La discordance des résultats pourrait être expliquée par les critères de diagnostic de la cachexie cancéreuse utilisés, mais aussi par les cancers étudiés.

Tableau 4 : Etudes cliniques récentes ayant recherché de potentiels biomarqueurs de la cachexie cancéreuse

Etude clinique	Cancer, population, prévalence de la cachexie cancéreuse	Critères de diagnostic de la cachexie	Biomarqueurs et observations patients cancéreux cachectiques vs cancéreux non-cachectiques			
(Prokopchuk *et al.*, 2017)	Cancer pancréatique Stades I-IV N=25, CC : 48%	Perte de poids > 10% en 6 mois	CRP, mg/dL	0.3 (0.1-4.7) vs 1.0 (0.1-4.0), *p*=ns	Albumine, g/dL	4.0 (3.7-4.4) vs 4.0 (3.2-4.7), *p*=ns
(Aversa *et al.*, 2016)	Multiples cancers Stades I-IV N=29, CC : 52%	Perte de poids > 5% en 6 mois	CRP, mg/dL	2.07 (±0.98) vs 1.92 (±1.04), *p*=ns	Albumine, g/dL	3.5 (±0.2) vs 3.8 (±0.2), *p*=ns
(Lerner *et al.*, 2016)	Multiples cancers Stades NR N=92, CC : 53%	Non indiqué explicitement. Peut-être (Fearon *et al.*, 2011)	IL-1α, pg/mL IL-1β, pg/mL IL-6, pg/mL IL-8, pg/mL IL-10, pg/mL	369.4 vs 282.9, *p*=0.809 7.1 vs 6.8, *p*=0.913 30.4 vs 21.9, *p*=0.117 48.9 vs 41.7, *p*=0.764 20.6 vs 17.0, *p*=0.374	IFN-γ, pg/mL TNF-α, pg/mL VEGF, pg/mL Activine A, ng/mL GDF15, ng/mL	217.8 vs 211.5, *p*=0.779 126.0 vs 105.8, *p*=0.665 49.4 vs 36.4, *p*=0.286 ↑ 1.1 vs 0.6, *p*=0.028 ↑ 5.0 vs 2.7, *p*=0.025
(Penafuerte *et al.*, 2016)	Multiples cancers Stades III-IV N=122, CC : 50.8%	(Fearon *et al.*, 2011)	CRP, mg/L IL-6, pg/mL IL-8, pg/mL	↑ ~21 vs ~3, *p*<0.0001 ↑ ~40 vs ~15, *p*=0.0054 ↑ ~60 vs ~20, *p*=0.001	TGFβ-1, pg/mL Albumine, mg/L Angiotensine II, pg/mL	↑ ~22000 vs ~10000, *p*<0.0001 ↓ ~35 vs ~41, *p*=0.0027 ↑ ~17 vs ~8, *p*=0.022
(Loumaye *et al.*, 2015)	Cancer colorectal ou poumon Stade I-IV N=152, CC : 49%	(Fearon *et al.*, 2011)	CRP, mg/dL Albumine, g/dL	↑ 1.3 (0.1-25.7) vs 0.3 (0.0-10.3), *p*<0.001 ↓ 4.2 (2.8-5.0) vs 4.5 (3.0-5.1), *p*<0.001	Activine A, pg/mL Myostatine, pg/mL	↑ 558 (228-17660) vs 397 (165-2731), *p*<0.001 ↓ 1371 (167-4989) vs 2109 (715-4907), *p*<0.001
(Stephens *et al.*, 2015)	Cancer gastro-intestinal Stades I-IV N=92, CC : 55%	Perte de poids ≥ 5%	CRP, mg/L	18.3 (±32.6) vs 12.0 (±29.6), *p*=ns		
(Batista *et al.*, 2013)	Cancer gastro-intestinal Stades I-IV N=43, CC : 72%	Perte de poids > 5% en 3 mois ou > 10% en 6 mois	CRP, µg/mL IL-6, pg/mL IL-10, pg/mL	↑ 24.9 (±14) vs 14.9 (±13), *p*=0.015 ↑ 160 (±58) vs 30.3 (±8.2), *p*=0.011 24.3 (±19) vs 4.9 (±3.6), *p*=ns	TNF-α, pg/mL Leptine, pM Adiponectine, µg/mL	↑ 72.5 (±29) vs 13.8 (±4.3), *p*=0.046 ↓ 221 (±191) vs 309 (±271), *p*= ? ↑ 19.1 (±7.3) vs 11.1 (±8.5), *p*=0.010
(Agustsson *et al.*, 2012)	Multiples cancers Stades I-IV N=40, CC : 32.5%	Perte de poids > 5% en 3 mois ou > 10% en 6 mois	CRP, µg/L Leptine, ng/mL Albumine, g/L	26.9 (±11.6) vs 4.9 (±2.2), *p*=ns ↓ 4.5 (±0.6) vs 9.0 (±1.5), *p*<0.05 35.1 (±1.3) vs 37.2 (±0.9), *p*=ns	IGF-1, µg/L Acides gras libres, µmol/L/kg masse grasse Glycérol, µmol/L/kg masse grasse	109.8 (±10.2) vs 111.3 (±13.8), *p*=ns ↑ 53.8 (±8.6) vs 32.5 (±3.6), *p*<0.05 ↑ 6.9 (±1.3) vs 3.9 (±0.6), *p*<0.05

Tableau 4 : (suite)

Etude clinique	Cancer, population	Critères de diagnostic de la cachexie	Biomarqueurs et observations patients cancéreux cachectiques vs cancéreux non-cachectiques			
(Burney *et al.*, 2012)	Multiples cancers Stades I-IV N=95, CC : 47%	IMC < 35 kg/m^2 Perte de poids > 5% en 6 mois	CRP, mg/dL	↑ 3.5 (±1.1) vs 1.8 (±0.8), *p*=0.03	TNF-α, pg/mL	5.0 (3-7.8) vs 4.0 (2.9-6.2), *p*=ns
(Kim *et al.*, 2012)	Cancer colorectal ou pulmonaire Stades I-IV N=42, CC : 50%	Perte de poids ≥ 5% en 6 mois	CRP, mg/dL	3.0 (±4.0) vs 1.6 (±2.3), *p*=0.22	Albumine, g/dL	↓ 3.7 (±0.5) vs 4.0 (±0.4), *p*=0.04
(Skorokhod *et al.*, 2012)	Cancer pancréatique Stades II-IV N=23, CC : 43%	Perte de poids > 10%	CRP, NR	11.6 (3.1-25.6) vs 7.3 (5.7-11.8), *p*=ns		
(Felix *et al.*, 2011)	Cancer pancréatique Stade II N=33, CC : 70%	Perte de poids > 12% en 6 mois	ZAG, µg/mL	↑ 40.3 (34.5-56.5) vs 28.9 (23.8-30.3), *p*=0.001		
(Kerem *et al.*, 2008)	Cancer gastrique Stades I-IV N=30, CC : 50%	Perte d'IMC > 10% en 6 mois	IL-1β, pg/mL IL-6, pg/mL IGF-1, pg/mL Leptine, pg/mL	0.03 (0-0.07) vs 0 (0-0.05), *p*=ns ↑ 3.2 (1.4-6.2) vs 2.1 (1-4.2), *p*=0.005 ↓ 43.8 (±9.5) vs 63.1 (±13.1), *p*<0.001 ↑ 3405 (±640) vs 2623 (±665), *p*=0.003	IFN-γ, pg/mL Albumine, g/dL Résistine, ng/mL	0.8 (0.2-1.6) vs 0.5 (0.2-1.6), *p*=ns ↓ 3.4 (±0.1) vs 3.8 (±0.07), *p*=0.05 ↑ 66.7 vs 43.4, *p*<0.001
(Krzystek-Korpacka *et al.*, 2007)	Cancer gastrique + œsophagien Stades II-IV N=96, CC : 51%	Perte de poids ≥ 5% en 3 mois	IL-1, pg/mL IL-6, pg/mL IL-8, pg/mL TNF-α, pg/mL	2.8 (2.0-3.4) vs 2.6 (2.0-3.1), *p*=0.61 ↑ 6.6 (3.5-10.0) vs 3.0 (1.7-5.1), *p*=0.005 ↑ 47.8 (26.9-68.0) vs 21.8 (18.0-35.4), *p*=0.006 0.9 (0.4-2.6) vs 1.5 (0.9-2.7), *p*=0.207	VEGF-A, pg/mL VEGF-C, ng/mL Midkine, pg/mL	328 (232-378) vs 227 (170-381), *p*=0.130 16.0 (13.7-17.8) vs 17.6 (15.9-19.8), *p*=0.415 1975 (1356-2397) vs 1375 (1133-1945), *p*=0.053

CC : Cancéreux Cachectiques ; NR : Non Renseigné ; NS : Non Significatif

Concernant les dosages sanguins réalisés dans l'étude (Penafuerte *et al.*, 2016), aucune valeur précise n'ayant été fournie dans l'article, elles ont été estimées à partir des graphiques.

III. Altérations du muscle squelettique

La cachexie cancéreuse est caractérisée chez certains patients par un déséquilibre de la balance énergétique, avec une augmentation des dépenses énergétiques (hyper-métabolisme) et une diminution des apports alimentaires (anorexie). On observe une fonte musculaire squelettique progressive, avec ou sans atteinte des tissus adipeux, conduisant à une perte de poids.

Cette perte de muscle squelettique est généralement évaluée par imagerie sur des coupes transversales. Celles-ci proviennent de CT-Scanners (« Computed Tomography »), ou, moins fréquemment, d'IRM (Imagerie par Résonnance Magnétique) (MacDonald *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2009; Mitsiopoulos *et al.*, 1998), avec des erreurs de précision variant entre 0,4 et 1,5% suivant la machine, le patient et l'opérateur (MacDonald *et al.*, 2011). La validation de l'utilisation de la DXA (« Dual energy X-ray Absorptiometry ») pour mesurer la masse musculaire nécessite quant à elle, des études supplémentaires (Scafoglieri and Clarys, 2018).

Chez les patients atteints d'un cancer, l'accès aux scanners de diagnostic et de suivi de la pathologie, a permis la mise en place de très nombreuses études cliniques rétrospectives et prospectives d'évaluation de la composition corporelle en lien avec la cachexie cancéreuse (Mourtzakis *et al.*, 2008). Le plus souvent, une coupe transversale de CT-Scanner est choisie au niveau de la 3ème vertèbre lombaire. Une corrélation a en effet été démontrée entre l'aire du muscle squelettique quantifiée sur une image prise à ce niveau, et la masse musculaire corporelle globale. L'aire des tissus adipeux corrèle également avec la masse adipeuse corporelle globale (Mourtzakis *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2004).

Outre la quantification de l'aire du muscle squelettique et des tissus adipeux, les CT-Scanners permettent également de fournir des données sur l'atténuation radiologique des tissus, en unités de Hounsfield (HU). Chez la personne âgée, elle tend à diminuer. Le sexe du patient est aussi un facteur de variabilité, avec une radio densité musculaire plus faible chez la femme (Anderson *et al.*, 2013). Il existe dans la littérature des plages d'HU décrites et validées pour distinguer le muscle squelettique (-29 à +150 HU), le tissu adipeux viscéral (-150 à -50 HU) et les tissus adipeux sous-cutané et intermusculaire (-190 à -30 HU pour les deux) (Prado *et al.*, 2009).

J'ai réalisé sur Pubmed une revue de la littérature en utilisant comme mots-clés de recherche : « [(cancer) OR (carcinoma) OR (tumor) OR (malignant) OR (metastasis)] AND [(cachexia) OR (sarcopenia) OR (weight loss)] AND [(skeletal muscle) OR (muscle mass) OR (lean body mass) OR (rectus abdominis) OR (quadriceps)] AND biopsy - Filters: Humans; Adult: 19+ years; Publication date from 1900/01/01 to 2019/08/30 », afin de mettre en évidence les études cliniques ayant analysé des biopsies musculaires squelettiques de patients cancéreux cachectiques. Ont été exclues les études cliniques où :

- L'article n'était pas accessible dans son intégralité (Shaw *et al.*, 1991) ;
- Les patients cancéreux cachectiques ont été comparés à des patients contrôles sains (Puig-Vilanova *et al.*, 2015; Aversa *et al.*, 2012; Gallagher *et al.*, 2012; Op den Kamp *et al.*, 2012; Bonetto *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2009; Busquets *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007; Jagoe *et al.*, 2002). En effet, cela ne permet pas de distinguer l'impact du cancer de celui de la cachexie sur les différents paramètres étudiés ;
- Une étude de cas a été réalisée sur un patient cancéreux cachectique, sans comparaison avec une population de patients non cachectiques (Banduseela *et al.*, 2007).

Le **Tableau 5** regroupe toutes les données extraites des 27 études cliniques mises en évidence par cette revue de la littérature. La grande majorité de ces études a inclus des patients atteints de cancers gastro-intestinaux qui regroupent les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du foie, du pancréas, du colon et de l'anus. Les principaux mécanismes étudiés concernent : la structure et le typage des fibres musculaires, le système contractile musculaire, les voies de la protéolyse et de la synthèse protéique (analysées dans au moins la moitié des articles), ainsi que les métabolismes mitochondrial et lipidique.

Tableau 5 : Etudes cliniques recherchant des altérations liées à la cachexie cancéreuse sur des biopsies musculaires squelettiques

Etude clinique	Cancer	Population	Critères de diagnostic de la cachexie	Biopsie musculaire	Observations patients cancéreux cachectiques vs non cachectiques
(Aversa *et al.*, 2016)	Multiples cancers Stades I-IV	Sains N=11 (64% ♂) Cancer N=29 (59% ♂) CC : 41%	Perte de poids > 5% en 6 mois	RA	Augmentation de l'expression en ARNm de LC3B, et protéique de LC3BII et Parkin, diminution de l'expression en ARNm de Parkin et PINK1 chez les patients CC vs CNC (p<0.05). Pas de changement concernant Beclin-1, p62, BNIP3, Nix. Marqueurs de l'autophagie/mitophagie.
(Bossola *et al.*, 2001)	Estomac Stades I-IV	Sains N=10 (60% ♂) Cancer N=20 (55% ♂)	Aucun	RA	La sévérité de la perte de poids n'influence pas l'expression en ARNm de l'ubiquitine.
(Bossola *et al.*, 2003)	Estomac Stades I-IV	Sains N=14 (64% ♂) Cancer N=23 (61% ♂)	Aucun	RA	L'activité spécifique chymotrypsine du protéasome est augmentée lorsque la perte de poids est ≥ 10% (p=0.003). Pas de changement pour les activités trypsine et peptidyl-glutamyl-peptidase.
(Bossola *et al.*, 2006)	Estomac Stades I-IV	Sains N=5 (60% ♂) Cancer N=16 (50% ♂) Perte de poids > 5% : 69% (45% ♂)	Perte de poids modérée > 5%, sévère > 10%	RA	Pas de différence du pourcentage de noyaux apoptotiques entre patients CC vs CNC.
(Brzeszczyńska *et al.*, 2016)	Œsophage, estomac, pancréas Stades II-III	Sains N=41 (80% ♂) Cancer N=28 (75% ♂) CC : 36% (80% ♂)	Perte de poids > 5%	Q	Pas de différence au niveau de l'expression en ARNm de marqueurs de cellules satellites (Pax3, Pax7), de la myogenèse précoce (MyoD, Myf5) et tardive (MyoG), du facteur autophagique (p62), et de gènes de défenses antioxydantes (SOD2, GCLM, NRF2, HSP1a).
(D'Orlando *et al.*, 2014)	Estomac Stades I-IV	Sains N=12 (58% ♂) Cancer N=38 (66% ♂) CC : 18%	Perte de poids > 5% en 6 mois	RA	Pas de différence au niveau de l'expression en ARNm de gènes de l'atrophie musculaire (Atrogin-1, MuRF1, myostatine, follistatine).
(de Castro *et al.*, 2019)	Estomac, colorectal Stades I-IV	Cancer N=44 (55% ♂) CC : 55% (67% ♂)	Perte de poids > 5% en 12 mois maximum (Evans *et al.*, 2008) + CRP + Glasgow score + Questionnaires sur les symptômes liés à la cachexie	RA	En comparant les patients CC vs CNC : Augmentation de l'expression en ARNm de Fis1 (fission mitochondriale) (p=0.03). Pas de modification des transcrits de Mfn2 (fusion mitochondriale), TFAM et PGC1α (biogenèse mitochondriale). Augmentation de l'aire mitochondriale inter-myofibrillaire en MET (p=0.01). Pas de modification du nombre de copies d'ADN mitochondrial. Augmentation de l'expression protéique de LC3II (p=0.02), ATG5 (p=0.042) et ATG7 (p=0.03) (autophagie). Augmentation de l'expression protéique des caspases 8 (p=0.037), et 9 (p=0.046) et de p53 (p=0.041) (apoptose).

Tableau 5 : (suite)

Etude clinique	Cancer	Population	Critères de diagnostic de la cachexie	Biopsie musculaire	Observations patients cancéreux cachectiques vs non cachectiques
(Ebhardt *et al.*, 2017)	Œsophage, estomac, pancréas Stades NR	Sains N=18 (56% ♂) Cancer N=19 (79% ♂) CC : 26% (60% ♂)	Perte de poids > 5%	Q	Comparaison des signatures protéomiques. Chez les patients CC, plus faible expression de TPM1,2 ; et expression plus importante de MyHC1,4,8 (contraction musculaire) par rapport aux CNC. Dérégulation des protéines de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, et de l'adhésion focale.
(Eley *et al.*, 2008)	Estomac, œsophage Stades I-IV	Sains N=9 (10% ♂) Cancer N=15 (87% ♂)	Aucun	RA	Pas de corrélation entre la perte de poids et l'expression protéique des formes phosphorylées de PKR et eIF2α (facteurs d'inhibition de la synthèse protéique). Plus la perte de poids est importante, plus l'expression protéique de la myosine diminue.
(Johns *et al.*, 2017)	Multiples cancers Stades I-IV	Total N=1276 (61% ♂) CC : NR	Perte de poids > 5% ou 10% ou 15% Ou faible SMI + perte de poids >2%	RA	Suivant les critères de diagnostic de la CC, les SNP associés à la CC ainsi que leur degré d'association (*p* value) diffèrent. Lorsque la perte de poids > 10%, les SNP mis en évidence participent à la régulation de l'appétit (p=0.004), à l'adhésion (p=0.005), la structure et la fonction de la membrane cellulaire (p=0.037), et la transduction de signal (p=0.038). Lorsque la perte de poids > 15%, ils participent seulement à l'adhésion cellulaire (p=0.019). Lorsque la perte de poids > 2% et le SMI faible, ils participent à la régulation de l'appétit (p=0.014), à la transduction de signal (p=0.023), à la voie des glucocorticoïdes (p=0.034) et au métabolisme lipidique (p=0.039).
(Khal *et al.*, 2005)	Colorectum, pancréas Stades NR	Sains N=10 (80% ♂) Cancer N=18 (67% ♂) CC : 72% (69% ♂)	Perte de poids modérée > 1%, sévère > 11%	RA	Augmentation de l'expression en ARNm et protéique de sous-unités du protéasome 20S, et de l'expression protéique de $E2_{14k}$ (ubiquitination), en fonction de la perte de poids (surtout lorsqu'elle est comprise entre 10% et 20%).
(MacDonald *et al.*, 2015)	Gastro-intestinal supérieur Stades I-IV	Sains N=7 (42% ♂) Cancer N=14 (57% ♂) CC : 57% (50% ♂)	Perte de poids ≥ 5%	RA + Q	Synthèse protéique plus élevée chez les patients CC vs CNC (0.073% vs 0.061%/heure, p=0.022). Plus importante dans le Q vs RA chez les CC (p=0.021). Pas de différence au niveau de la protéolyse.

Tableau 5 : (suite)

Etude clinique	Cancer	Population	Critères de diagnostic de la cachexie	Biopsie musculaire	Observations patients cancéreux cachectiques vs non cachectiques
(Marzetti *et al.*, 2017)	Estomac Stades I-IV	Sains N=9 (89% ♂) Cancer N=18 (94% ♂) CC : 50% (89% ♂)	Perte de poids > 5% en 6 mois	RA	Pas de différence au niveau de l'expression protéique de Mfn2, OPA1 (fusion mitochondriale), ni en ARNm de PGC1α et TFAM (biogenèse mitochondriale). Expression en ARNm de Fis1 (fission mitochondriale) et protéique de LC3BI (mitophagie) augmentée chez les patients CC vs CNC (p<0.05).
(Narasimhan *et al.*, 2018)	Pancréas, colorectum Stades I-IV	Cancer N=40 (43% ♂) CC : 53% (38% ♂)	(Fearon *et al.*, 2011)	RA	Expression significativement différentielle de 922 gènes soumis à épissage alternatif (772 sur-régulés et 150 sous-régulés) chez les patients CC vs CNC. Gènes associés en particulier à la myogenèse, biosynthèse lipidique, ubiquitination protéique (et protéolyse) et inflammation.
(Narasimhan *et al.*, 2017)	Colorectum, pancréas Stades I-IV	Cancer N=42 (43% ♂) CC : 52% (41% ♂)	(Fearon *et al.*, 2011)	RA	Identification de 8 nouveaux miRNA associés à la CC et participant en particulier aux voies de la biosynthèse lipidique, de la myogenèse, de l'inflammation et de la réponse immunitaire innée.
(Op den Kamp *et al.*, 2015)	NSCLC Stades IIIb/IV	Sains N=22 (59% ♂) Cancer N=26 (65% ♂) CC : 62% (56% ♂)	(Fearon *et al.*, 2011)	Q	Pas de différence observée au niveau du typage de fibres, des activités enzymatiques oxydative et glycolytique, de l'expression protéique des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et de marqueurs de la biogenèse mitochondriale (PGC1α, TFAM).
(Op den Kamp *et al.*, 2013)	NSCLC Stades IIIb/IV	Sains N=22 (59% ♂) Cancer N=26 (65% ♂) CC : 62% (56% ♂)	(Fearon *et al.*, 2011)	Q	Pas de différence observée au niveau de l'aire transversale des fibres musculaires, de la concentration protéique par unité d'ADN, et de la force musculaire. Pas de différence observée au niveau des protéines de la voie Akt/FOXO, du système UPS (dont MuRF1, MAFBx). Concernant le système autophagique-lysosomal, augmentation de l'expression protéique de BNIP3 chez les patients CC vs CNC, pas de différence observée pour LC3B. Pas de différence observée pour l'activité luciférase de la NFκB, et pour l'expression en ARNm d'IκBα (inhibiteur de NFκB).
(Prokopchuk *et al.*, 2017)	Pancréas Stades I-IV	Sains N=19 (37% ♂) Cancer N=25 (32% ♂) CC : 48% (25% ♂)	Perte de poids > 10% en 6 mois	RA	Pas de différence au niveau de l'expression en ARNm de l'IL-4, IL-4R, IL-13R (marqueurs inflammatoires).

Tableau 5 : (suite)

Etude clinique	Cancer	Population	Critères de diagnostic de la cachexie	Biopsie musculaire	Observations patients cancéreux cachectiques vs non cachectiques
(Ramage *et al.*, 2018)	Gastro-intestinal supérieur Stades I-IV	Cancer N=32 (81% ♂) CC : 47%	Perte de poids > 5%	RA	Corrélation positive entre le contenu en protéines et la radiodensité du muscle squelettique sur CT-Scan (R=0.406, *p*=0.021), ainsi que la perte de poids (R=0.416, *p*=0.018).
(Rhoads *et al.*, 2010)	Estomac Stades Ib-IV	Sains N=10 (60% ♂) Cancer N=14 (57% ♂)	Aucun	RA	Une perte de poids plus ou moins importante n'entraîne pas de modification de l'expression protéique d'IκBα (inhibiteur de NFκB).
(Schmitt *et al.*, 2007)	Pancréas Stades II & IV	Sains N=3 Cancer N=13 CC : 62% (38% ♂)	Perte de poids > 10% en 6 mois	RA	Diminution significative de l'expression protéique de MyHC (-45%, *p*=0.036), de l'actine (-18%), d'Akt (-55%, *p*=0.001), de FOXO1 (-53%, *p*=0.011), des formes phosphorylées de FOXO3a (-77%, *p*=0.011), mTOR (-82%, *p*=0.007) et S6K (-39%, *p*=0.033) chez les patients CC vs CNC. Régulateurs de la contraction musculaire, synthèse protéique et désinhibiteurs de la dégradation protéique.
(Skorokhod *et al.*, 2012)	Pancréas Stades II-IV	Cancer N=23 (61% ♂) CC : 43% (50% ♂)	Perte de poids > 10%	RA	Identification de 183 gènes associés à la CC. Certains sont impliqués dans la contraction musculaire, le réarrangement du cytosquelette d'actine, la protéolyse, l'hypoxie tissulaire et les systèmes de réponse inflammatoire (ex : Egr-1 sur-régulé).
(Stephens *et al.*, 2015)	Gastro-intestinal supérieur Stades I-IV	Sains N=15 (53% ♂) Cancer : N=92 (72% ♂) CC : 55% (63% ♂)	Perte de poids ≥ 5%	RA	Augmentation de l'expression protéique de β-dystroglycane (structure musculaire) chez les patients CC vs CNC. Pas de modification de l'expression protéique de MyHC, β-sarcoglycane, dystrophine (structure musculaire), Akt, FOXO, MuRF1, MAFBx (protéolyse musculaire), BNIP3, GABARAPL1 (autophagie).
(Stephens *et al.*, 2011)	Œsophage, estomac, pancréas + autres Stades II-IV	Sains N=6 (33% ♂) Cancer N=19 (58% ♂)	Aucun	RA	Chez les patients cancéreux, plus la perte de poids est importante, plus le nombre de vacuoles lipidiques intra-myocellulaires augmente (R=0.51, *p*=0.025). Pas de corrélation avec le diamètre des vacuoles.
(Stephens *et al.*, 2010)	Gastro-intestinal supérieur Stades NR	Sains N=7 (71% ♂) Cancer N=65 (71% ♂) CC : NR	Perte de poids ≥ 5%	RA + Q + D	Association significative entre l'expression en ARNm de deux gènes activés par l'exercice, et la perte de poids : CaMKIIβ dans le RA (R=0.82, *p*=0.01), Q (R=0.45, *p*=0.06) et le D (R=0.50, *p*=0.03) ; et TIE1 dans le RA (R=0.67, *p*=0.01) et Q (R=0.70, *p*=0.003). Aucune corrélation observée pour les E3 ubiquitine ligases et protéines de la voie Akt/FOXO.

Tableau 5 : (suite)

Etude clinique	Cancer	Population	Critères de diagnostic de la cachexie	Biopsie musculaire	Observations patients cancéreux cachectiques vs non cachectiques
(Sun *et al.*, 2012)	Estomac Stades I-IV	Sains N=29 (72% ♂) Cancer N=102 (71% ♂)	Aucun	RA	Association significative entre l'expression en ARNm de l'ubiquitine et de TRAF6 avec la perte de poids (p=0.001 pour les deux).
(Taskin *et al.*, 2014)	Gastro-intestinal inférieur ou supérieur Stades NR	Sains N=5 (40% ♂) Cancer N=14 (50% ♂) CC : 43% (33% ♂)	Perte de poids > 10% en 6 mois	RA	La sensibilité calcique de l'appareil contractile est significativement augmentée chez les patients CC vc CNC. Pas de différence au niveau de la force absolue, ni des polymères protéiques d'ubiquitine. Tendance non significative à une diminution du ratio d'isoformes MyHC I:IIa, indiquant un plus grand nombre de fibres musculaires rapides chez les patients CC vs CNC.

Ne sont décrits ici que les résultats observés après comparaison des patients cancéreux cachectiques (CC) et cancéreux non cachectiques (CNC), ou en lien avec la perte de poids chez les patients atteints d'un cancer.

Abréviations du Tableau 5 :

CC : Cachexie Cancéreuse / Cancéreux Cachectiques ; **CNC** : Cancéreux Non Cachectiques ; **NR** : Non Renseigné ; **NSCLC** : « Non-Small-Cell Lung Cancer » ; **SMI** : « Skeletal Muscle Index »

D : muscle du Diaphragme ; **Q** : Quadriceps ; **RA** : *Rectus Abdominis*

Akt : ou PKB, Protéine Kinase B ; **ATG5/7** : « Autophagy-related 5/7 » ; **BNIP3** : « BCL2 Interacting Protein-3 » ; **CaMKIIβ** : « Calcium/Calmodulin-dependent protein Kinase-IIβ » ; **$E2_{14k}$** : « 14kDa ubiquitin-conjugating Enzyme » ; **eIF2α** : « eukaryotic Initiation Factor-2α » ; **Egr-1** : « Early growth response protein-1 » ; **Fis1** : « mitochondrial Fission protein-1 » ; **FOXO** : « Forkhead box O protein » ; **GABARAPL1** : « GABA Type A Receptor Associated Protein Like-1 » ; **GCLM** : « Glutamate-Cysteine Ligase Modifier subunit » ; **HSP1** : « Heat Shock 70 kDa Protein-1 » ; **IκBα** : « nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells Inhibitor-α » ; **LC3B**, ou MAP1-LC3B : « Microtubule-Associated Protein 1-Light Chain 3 Beta » ; **MAFBx** : ou atrogin-1, « Muscle Atrophy F-Box » ; **MET** : Microscopie Electronique ; **Mfn** : Mitofusine ; **mTOR** : « mechanistic Target Of Rapamycin » ; **MuRF1** : « Muscle RING Finger-1 » ; **MyHC** : « Myosin Heavy Chains » ; **MyoD** : « Myoblast Determination protein-1 » ; **Myf5** : « Myogenic Factor-5 » ; **MyoG** : « Myogenin » ; **NFκB** : « Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells » ; **Nix**, ou « BNIP3-like » ; **NRF2**, ou NFE2L2 : « Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2 » ; **OPA1** : « Optic Atrophy type 1 » ; **Pax** : « Paired box » ; **PGC1α** : « Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator-1α » ; **PINK1** : « PTEN-Induced Kinase-1 » ; **PKR** : Protéine Kinase R ; **S6K1**, Protéine S6 Kinase 1 ; **SNP** : « Single Nucleotide Polymorphism » ; **SOD2** : « Superoxide Dismutase-2 » ; **TFAM** : « Mitochondrial Transcription Factor-A » ; **TIE1** : « Tyrosine kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like domains-1 » ; **TPM** : Tropomyosine ; **TRAF6** : « Tumor necrosis factor Receptor (TNFR)-Associated Factor-6 » ; **UPS** : « Ubiquitin-Proteasome System ».

a. Structure et typage des fibres musculaires

Jusqu'à présent, la cachexie cancéreuse a été principalement étudiée sur des modèles précliniques généralement caractérisés par une transplantation de cellules cancéreuses ou une injection de carcinogènes. Les modèles les plus étudiés et les mieux décrits sont le « Colon-26 adenocarcinoma » (C26) (Talbert *et al.*, 2014) et le « Lewis-Lung adenocarcinoma » (LLC) (Choi *et al.*, 2013). La croissance de la tumeur entraîne une perte de poids corporel et de la masse musculaire (Bonetto *et al.*, 2011; Benny Klimek *et al.*, 2010), ainsi qu'une augmentation des concentrations sanguines de cytokines pro-inflammatoires (Pedroso *et al.*, 2012; Bonetto *et al.*, 2011). L'aire transversale des fibres musculaires, qu'elles soient de type I ou II, tend à diminuer. Sun *et al.* ont montré qu'elle diminuait de 15 et 45% chez des souris C26 à des stades précoces et tardifs de la cachexie cancéreuse respectivement, et de 13 et 43% chez des souris LLC (Sun *et al.*, 2016). L'atrophie toucherait plus particulièrement les fibres de type II (Acharyya *et al.*, 2005). Dans un modèle de rats cachectiques porteurs d'un « Yoshida Ascites Hepatoma » (AH-130), la fonte de la masse musculaire passerait principalement par une diminution du contenu en protéines dans les fibres, plutôt que par les processus apoptotiques ou une atteinte du nombre de fibres (Costelli *et al.*, 2006).

En clinique, les possibles altérations de la structure et du typage des fibres musculaires ont été peu étudiées chez des patients atteints de cachexie cancéreuse. L'expression protéique de la myosine (MyHC, « Myosin Heavy Chains »), un des composants majeurs de l'appareil contractile musculaire, a été retrouvée augmentée (pour les isoformes 1,4 et 8) (Ebhardt *et al.*, 2017), diminuée (Schmitt *et al.*, 2007) ou inchangée (Stephens *et al.*, 2015) chez des patients cachectiques avec un cancer gastro-intestinal. D'autres composants structurels musculaires ont aussi été étudiés : l'expression protéique de l'actine a été retrouvée diminuée par Schmitt *et al.*, tout comme celle de la tropomyosine 1 et 2 par Ebhardt *et al.*, alors que l'expression protéique de la β-dystroglycane était augmentée, et celles de la β-sarcoglycane et de la dystrophine demeuraient inchangées chez les patients cachectiques atteints de cancers gastro-intestinaux (Ebhardt *et al.*, 2017; Stephens *et al.*, 2015; Schmitt *et al.*, 2007). Alors que sur des modèles précliniques de cachexie cancéreuse, on observait une diminution significative de l'aire transversale des fibres musculaires, Op den Kamp *et al.* n'ont pas retrouvé de telle modification chez des patients cachectiques avec un cancer pulmonaire avancé (NSCLC, Non-Small-Cell Lung cancer) comparés à des patients pré-cachectiques (Op den Kamp *et al.*, 2013). Enfin, aucune altération significative du typage de fibres associée à la cachexie cancéreuse n'a été

rapportée en clinique, que ce soit sur des cancers gastro-intestinaux (Taskin *et al.*, 2014) ou pulmonaires (Op den Kamp *et al.*, 2015).

b. Protéolyse musculaire et synthèse protéique

Dans les études précliniques sur la cachexie cancéreuse, les preuves d'une augmentation de la protéolyse et d'une diminution de la synthèse protéique dans le muscle squelettique sont nombreuses. L'activation de NF-κB entraînerait une atrophie musculaire chez des souris (Cai *et al.*, 2004). NF-κB induit la transcription de gènes de l'UPS (**Figure 17**), dont l'activation a elle aussi été observée dans des études précliniques (Baracos *et al.*, 1995; Temparis *et al.*, 1994). L'inflammation systémique serait un facteur aggravateur de l'atrophie musculaire. Les cytokines inflammatoires retrouvées augmentées dans le sérum de certains patients cachectiques, pourraient jouer un rôle dans le dysfonctionnement métabolique du muscle squelettique, en activant les voies de la protéolyse et en inhibant les voies de la synthèse protéique (**Figure 17**) (Cohen *et al.*, 2015). L'injection de TNFα ou d'IL-1 sur des souris entraînerait une perte de muscle squelettique similaire à celle observée chez les patients cancéreux cachectiques (Fong *et al.*, 1989).

Cependant, les résultats des études cliniques sont bien plus controversés. D'une part, certaines études ont rapporté une expression plus importante de marqueurs de l'autophagie chez des patients cachectiques atteints de divers cancers, principalement gastro-intestinaux (de Castro *et al.*, 2019; Aversa *et al.*, 2016), une augmentation de l'activité du protéasome dans des cancers gastriques (Bossola *et al.*, 2003) et de l'expression protéique de sous-unités du protéasome dans des cancers colorectaux et pancréatiques (Khal *et al.*, 2005). Schmitt *et al.* ont aussi montré une diminution de l'expression d'acteurs des voies de synthèse protéique dans des cancers pancréatiques (Schmitt *et al.*, 2007). Narasimhan *et al.* et Skorokhod *et al.* ont identifié de nombreux gènes associés à la cachexie cancéreuse chez des patients cancéreux pancréatiques et/ou colorectaux, parmi lesquels des gènes de la protéolyse (Narasimhan *et al.*, 2018; Skorokhod *et al.*, 2012). Cependant, de nombreuses études cliniques n'ont trouvé aucune atteinte des voies de signalisation de la protéolyse et de la synthèse protéique dans le muscle squelettique de patients cachectiques (MacDonald *et al.*, 2015; Stephens *et al.*, 2015; D'Orlando *et al.*, 2014; Taskin *et al.*, 2014; Op den Kamp *et al.*, 2013), ou aucune association avec la perte

de poids (Rhoads *et al.*, 2010; Stephens *et al.*, 2010; Eley *et al.*, 2008; Bossola *et al.*, 2001), dans des cancers gastro-intestinaux ou pulmonaires.

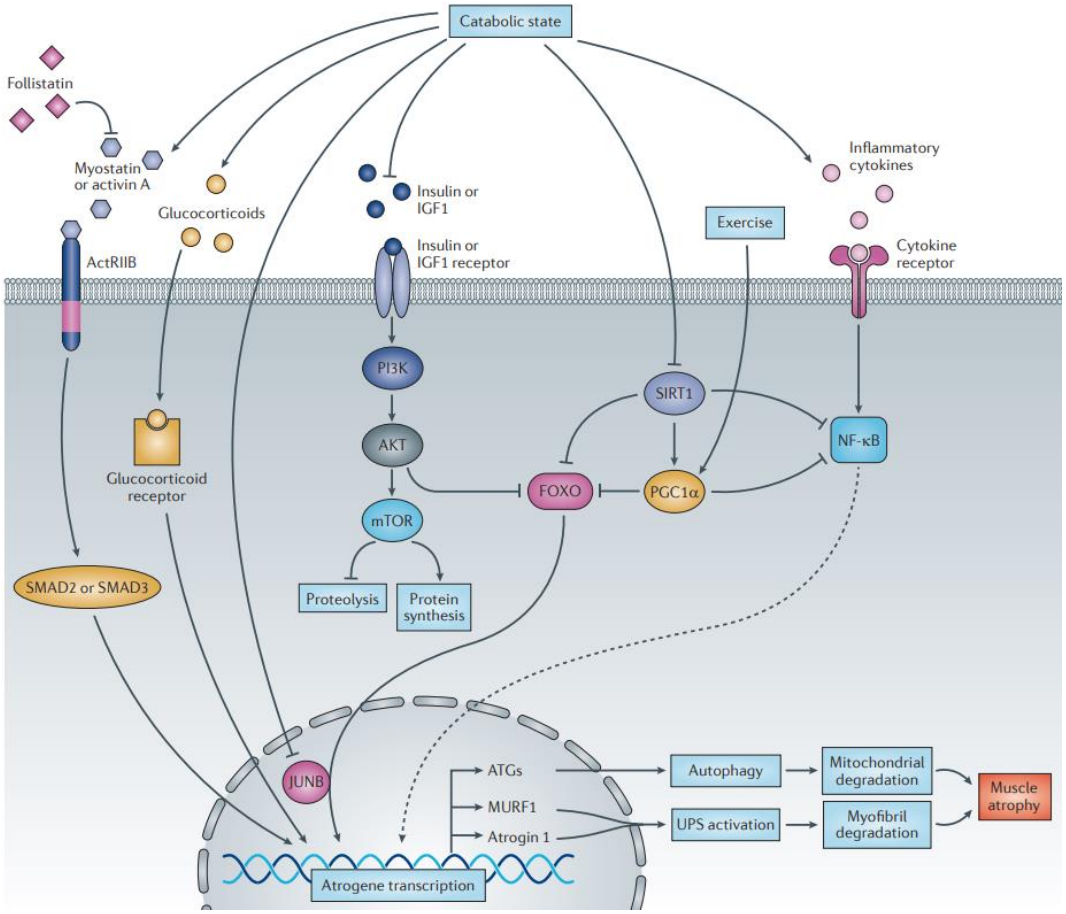


Figure 17 : Voies de signalisation intracellulaires induisant une atrophie musculaire.

L'état catabolique observé dans la cachexie cancéreuse est associé à une stimulation de la protéolyse, via l'UPS et l'autophagie, et à une diminution de la synthèse protéique. Les effets de stimuli extérieurs tels que les cytokines inflammatoires, l'inhibition de l'insuline, les glucocorticoïdes, ou encore la myostatine et activine A, sont transmis par les facteurs de transcription NF-κB, FOXO, et les SMADs, ou par une réduction de l'activité de la voie PI3K-Akt-mTOR.

ActRIIB : « Activin A Receptor type IIB » ; **ATGs** : « Autophagy-Related Genes » ; **Atrogin**, ou MAFBx : « Muscle Atrophy F-Box » ; **IGF1** : « Insulin-like Growth Factor-1 » ; **JUNB** : « transcription factor JunB » ; **MURF1** : « Muscle-specific RING-Finger-1 » ; **PGC1α** : « Peroxisome proliferator-activated receptor-γ Coactivator-1α ; **SIRT1** : « NAD-dependent protein deacetylase Sirtuin-1 » ; **UPS** : « Ubiquitin-Proteasome System ».

Issu de (Cohen *et al.*, 2015).

c. Métabolisme lipidique

A notre connaissance, aucune étude préclinique n'a regardé les possibles altérations du métabolisme lipidique dans le muscle squelettique dans le contexte de la cachexie cancéreuse. L'étude de l'atténuation radiologique du muscle squelettique sur les CT-Scanners a permis de montrer que celle-ci est très variable chez les patients atteints d'un cancer. Sa diminution serait le reflet d'une accumulation de lipides intramusculaires (Baracos *et al.*, 2019; Aubrey *et al.*, 2014) et serait associée à un plus faible taux de survie (van Dijk *et al.*, 2017). Chez les patients cancéreux cachectiques, la perte de poids a été retrouvée associée à un plus grand nombre de vacuoles lipidiques intra-myocellulaires, observées en microscopie électronique sur des biopsies musculaires abdominales (Stephens *et al.*, 2011) (**Figure 18**).

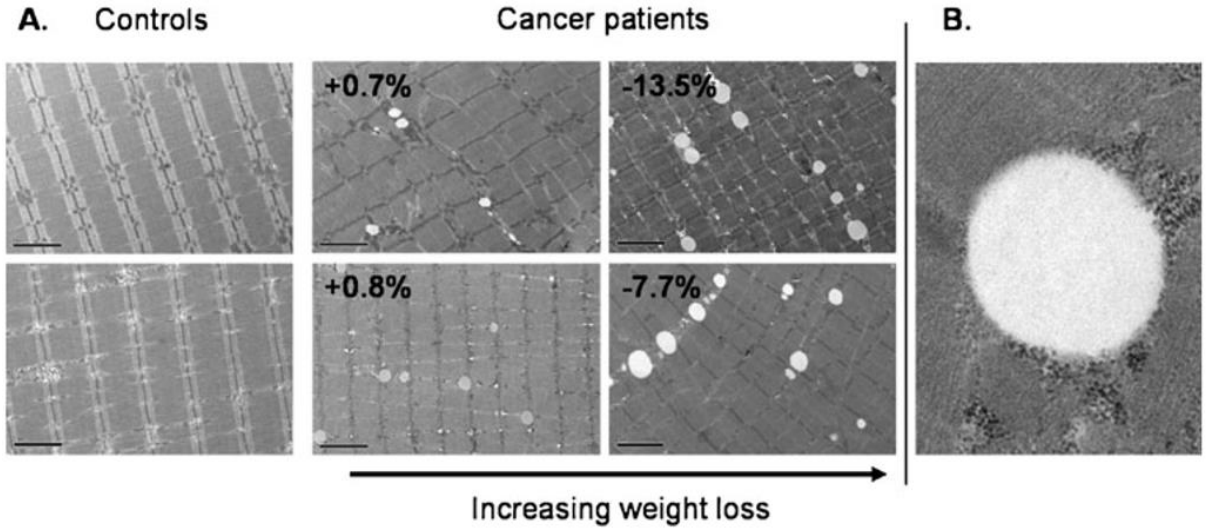


Figure 18 : L'accumulation de vacuoles lipidiques intra-myocellulaires est associée à la perte de poids chez les patients cancéreux cachectiques.

(A) Observations en microscopie électronique de biopsies musculaires squelettiques de *rectus abdominis* chez des patients sains et atteints d'un cancer gastro-intestinal. Plus la perte de poids est importante, plus le nombre de vacuoles lipidiques augmente. (x2,650 - Echelle à 2 µm).

(B) Image agrandie d'une vacuole lipidique intra-myocellulaire, caractérisée par l'absence de double membrane. (x11,000)

Issu de (Stephens *et al.*, 2011)

Les mécanismes patho-physiologiques spécifiques qui mènent à cette myostéatose ne sont pas encore bien caractérisés. Une étude récente a observé une expression différentielle de gènes

impliqués dans la mort, la survie, la morphologie, la fonction et la maintenance cellulaire, dans des biopsies musculaires squelettiques abdominales de patients avec un cancer pancréatique ou péri-ampullaire et présentant une faible *vs* une importante atténuation radiologique du muscle squelettique au CT-Scanner (Stretch *et al.*, 2018). La myostéatose serait associée à une apoptose augmentée et à une perturbation de l'organisation du cytosquelette dans les cellules musculaires squelettiques. La phosphorylation oxydative serait la voie métabolique la plus affectée dans le muscle de ces patients, avec une expression diminuée des protéines des complexes I, II, IV et V de la chaîne respiratoire mitochondriale. La diminution de la β-oxydation contribuerait à cette myostéatose. Des études génétiques et transcriptomiques ont identifié dans des biopsies musculaires squelettiques de patients cachectiques, atteints majoritairement de cancers gastro-intestinaux, des SNP (« Single Nucleotide Polymorphism ») (Johns *et al.*, 2017), des miRNA (Narasimhan *et al.*, 2017) ou encore une expression différentielle de gènes à épissage alternatif (Narasimhan *et al.*, 2018), impliqués dans la biosynthèse lipidique.

d. Métabolisme mitochondrial

La mitochondrie est l'organelle responsable de l'homéostasie énergétique de la cellule, il est important que sa capacité à produire de l'ATP via la phosphorylation oxydative et la β-oxydation soit maintenue. Or la cachexie cancéreuse est un syndrome métabolique complexe caractérisé parfois par une dépense énergétique excessive. Plusieurs études précliniques et cliniques se sont donc posées la question d'une dérégulation du métabolisme mitochondrial pour expliquer la fonte musculaire squelettique. Une atrophie musculaire liée à des dysfonctions mitochondriales, a ainsi été observée chez des rongeurs cachectiques (van der Ende *et al.*, 2018). Parmi ces dysfonctions, ont été décrites en particulier : une surface mitochondriale augmentée (Fontes-Oliveira *et al.*, 2013; Shum *et al.*, 2012) ; une atteinte de la dynamique mitochondriale : fission (Fis1) augmentée, fusion (Mfn1, Mfn2) et biogenèse (PGC1α) diminuées (White *et al.*, 2011) ; et une diminution de l'activité de certains complexes de la chaîne respiratoire (Fermoselle *et al.*, 2013; Padrão *et al.*, 2013; Julienne *et al.*, 2012). L'étude de Brown *et al.* sur des modèles précliniques de cachexie cancéreuse a montré que les altérations de la dynamique (biogenèse et fusion), de la qualité et de la fonction mitochondriales précéderaient l'atrophie musculaire, et qu'une diminution du contenu protéique mitochondrial ainsi qu'une augmentation de la mitophagie apparaîtraient à un stade plus tardif de la cachexie (Brown *et al.*, 2017).

Concernant les études cliniques, le métabolisme mitochondrial a très peu été étudié dans le contexte de la cachexie cancéreuse. Une étude clinique récente de de Castro *et al.* incluant des patients avec un cancer gastrique ou colorectal, a révélé une augmentation de l'expression en ARNm de Fis1 dans le muscle squelettique des patients cachectiques comparés aux non cachectiques ; tandis qu'il n'y avait aucune modification des transcrits de marqueurs de la fusion (Mfn2) et de la biogenèse mitochondriales (TFAM et PGC1α). D'autre part, ils ont montré qu'il y avait une augmentation de l'aire mitochondriale inter-myofibrillaire en MET, et une absence de modification au niveau du nombre de copies d'ADN mitochondrial, qui pourrait indiquer une absence d'augmentation significative de la mitophagie (de Castro *et al.*, 2019). Selon les auteurs, ces dernières observations conforteraient les résultats de l'étude préclinique de Brown *et al.* où l'atteinte du contenu protéique mitochondrial et l'augmentation de la mitophagie n'apparaitraient qu'à un stade bien plus tardif de la cachexie cancéreuse (Brown *et al.*, 2017).

De la même manière, Marzetti *et al.* ont observé une augmentation des transcrits de Fis1 et aucune modification de l'expression en ARNm ou protéique de marqueurs de la fusion mitochondriale (Mfn2, OPA1), et de la biogenèse mitochondriale (PGC1α, TFAM), chez des patients cachectiques atteints d'un cancer gastrique (Marzetti *et al.*, 2017). Enfin, Op den Kamp *et al.* ont rapporté une absence de modification de l'expression protéique des mêmes marqueurs de la biogenèse mitochondriale (PGC1α, TFAM), ainsi que des complexes de la chaîne respiratoire, chez des patients cachectiques atteints d'un cancer pulmonaire (Op den Kamp *et al.*, 2015). Aucune étude clinique n'a exploré la fonctionnalité mitochondriale dans le muscle squelettique de patients cancéreux cachectiques.

e. Stress du RE

De manière intéressante, l'expression de marqueurs de stress du RE / RS a été récemment étudiée sur un modèle préclinique de cachexie cancéreuse, les souris LLC. Il a été observé une augmentation des transcrits (IRE1α, XPB-1, ATF6 et DR5) ou de l'expression protéique (CHOP et phospho-eIF2α) de certains marqueurs de stress du RE / RS (Bohnert *et al.*, 2016). Les auteurs ont injecté aux souris LLC un inhibiteur du stress du RE / RS, le 4-BPA (bisphénol A), et ont observé une perte significative de la masse et de la force musculaires, via une diminution de l'aire transversale des fibres musculaires squelettiques (Bohnert *et al.*, 2016).

Toutefois, l'expression en ARNm de marqueurs de la protéolyse (MuRF1 et MAFBx) a été retrouvée diminuée. L'hypothèse avancée par les auteurs est celle d'un rôle de restauration de la fonction du RE par le système UPS en cas de stress (Wang and Kaufman, 2014; Wu and Kaufman, 2006). La conclusion de cette étude préclinique est que l'inhibition du stress du RE / RS entraîne une atrophie musculaire associée à la cachexie cancéreuse. Mais aucune étude n'a été réalisée chez l'homme pour vérifier la présence ou absence d'un stress du RE / RS, en association avec la cachexie cancéreuse.

Ainsi, pour la plupart des paramètres étudiés qui pourraient jouer un rôle dans la fonte musculaire, les résultats des études cliniques divergent. De la même manière que pour la recherche de biomarqueurs sanguins, une uniformisation des critères de diagnostic de la cachexie cancéreuse est nécessaire. D'autres facteurs pourraient également apporter une explication :

- L'hétérogénéité des cohortes, avec parfois plusieurs cancers étudiés et une répartition disproportionnée de ceux-ci entre les groupes cachectiques et non cachectiques. Or, on ne peut pas exclure que chaque cancer ait sa propre mécanistique ;
- La localisation musculaire des biopsies. Elles proviennent le plus souvent du *rectus abdominis*, mais certaines études cliniques ont travaillé sur des biopsies de quadriceps (Ebhardt *et al.*, 2017; Brzeszczyńska *et al.*, 2016; MacDonald *et al.*, 2015; Op den Kamp *et al.*, 2015, 2013; Stephens *et al.*, 2010) ou de muscle du diaphragme (Stephens *et al.*, 2010) ;
- Les effectifs souvent très petits qui ne peuvent apporter une puissance statistique suffisamment importante. Onze études cliniques sur 27 ont un effectif total de patients cancéreux inférieur à 20, il est inférieur à 30 patients pour 18 études, avec une prévalence de la cachexie d'environ 50% la plupart du temps.
- Les méthodes d'analyses. Certaines études se sont basées sur l'expression en ARNm de marqueurs tandis que d'autres ont comparé l'expression protéique ou l'activité enzymatique. Cela pourrait par exemple expliquer les divergences de résultats des études cliniques sur la protéolyse musculaire.

Les données extraites des études précliniques et cliniques sont elles aussi ambivalentes. Petruzzelli and Wagner ont émis l'hypothèse que ces différences seraient dues au degré de gravité de la cachexie (Petruzzelli and Wagner, 2016). Les études sur rongeurs sont généralement réalisées pendant ou après une perte de poids rapide et drastique alors que la fonte

musculaire est bien plus progressive chez les patients cachectiques où les biopsies ne sont pas toujours prélevées au même stade de développement de la pathologie.
Deux autres points critiques ont également été discutés récemment :

- Les modèles précliniques de cachexie cancéreuse ne sont pas suffisamment représentatifs de la pathologie humaine, d'un point de vue métabolique (Baracos, 2018; Ballarò *et al.*, 2016). Des modèles plus complexes sont nécessaires.
- La grande majorité des études précliniques ne tiennent pas compte du dimorphisme sexuel, en utilisant exclusivement des rongeurs mâles. Pourtant, des différences importantes ont été observées entre hommes et femmes atteints de cachexie cancéreuse et les hormones ont un impact non négligeable sur sa physiopathologie (Montalvo *et al.*, 2018; Yoon *et al.*, 2018).

L'ensemble des résultats des études précliniques et cliniques suggère la présence d'altérations dans le muscle squelettique des patients cancéreux cachectiques. Ces altérations pourraient toucher la structure des fibres musculaires, les voies de la protéolyse et de la synthèse protéique, le métabolisme lipidique (myostéatose), le métabolisme mitochondrial (surface et dynamique mitochondriales, ADN mitochondrial, chaîne respiratoire), ou encore le RE (stress du RE). Des études cliniques supplémentaires sont indispensables pour continuer à explorer et comprendre les altérations sous-jacentes à la fonte musculaire squelettique caractéristique de la cachexie cancéreuse.

IV. Altérations du tissu adipeux

En plus d'une fonte musculaire progressive, la cachexie cancéreuse serait parfois associée à un remodelage du tissu adipeux (TA) blanc. Les adipocytes constituent le principal type cellulaire retrouvé dans le TA (Pond, 2005). Plus de 90% du volume d'un adipocyte blanc est occupé par une vacuole lipidique massive, composée principalement de triacylglycérides (TAG). Les TA sont des tissus endocrines qui secrètent des adipokines, telles que la leptine et l'adiponectine (Trayhurn *et al.*, 2006). Celles-ci sont cruciales pour la régulation énergétique de l'organisme. Ce remodelage du TA associé à la cachexie cancéreuse, comprend plusieurs modifications morpho structurelles, décrites ci-après.

a. Atrophie adipocytaire

Elle a été observée dans le TA sous-cutané de certains patients cancéreux cachectiques. Elle résulterait d'une augmentation de la lipolyse, via une surexpression de la HSL et de l'ATGL (Silvério *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2011; Agustsson *et al.*, 2007). Aucune dysfonction de la synthèse lipidique ne serait impliquée dans la pathologie (Rydén *et al.*, 2008).

b. Détérioration de l'adipogenèse *de novo*

L'adipogenèse correspond au processus de différenciation de cellules précurseurs (pré-adipocytes) en cellules adipocytaires (Hausman *et al.*, 2001). La dérégulation de l'adipogenèse jouerait un rôle dans les pathologies métaboliques liées à l'obésité (insulino-résistance, hyperlipidémie, diabète de type II) (Guilherme *et al.*, 2008; Murano *et al.*, 2008). Une diminution significative de l'expression de facteurs de transcription adipogéniques (C/EBPα (« CCAAT/Enhancer Binding Protein alpha »), C/EBPβ, PPARγ (« Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma »), et SREBP-1c (« Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c ») a été observée dans le tissu adipeux de rongeurs cachectiques (Bing *et al.*, 2006). Mais chaque sous-compartiment du TA répondrait différemment au développement de la cachexie cancéreuse, avec des dysfonctions apparaissant plus ou moins tardivement (Batista *et al.*, 2012). Le bon déroulement de l'adipogenèse est important pour le « turnover » des adipocytes. Il s'effectue en étroite collaboration avec l'apoptose cellulaire, qui ne semble pas être modifiée chez les patients cachectiques (Rydén *et al.*, 2008).

c. Inflammation tissulaire

Une inflammation tissulaire a été observée dans le TA de certains patients cachectiques (Henriques *et al.*, 2017), mais pas tous (Rydén *et al.*, 2008). Celle-ci serait caractérisée par une infiltration de macrophages pro- (M1) et anti-inflammatoires (M2) et la présence de cytokines inflammatoires. Les études sur modèles précliniques ont montré que cette inflammation apparaitrait à un stade plutôt avancé de la cachexie cancéreuse (Batista *et al.*, 2012) et qu'elle pourrait avoir un rôle protecteur contre la fonte du TA (Erdem *et al.*, 2019). De plus amples recherches sont nécessaires pour comprendre la source et le rôle de l'inflammation du TA dans le développement de la pathologie.

d. Fibrose tissulaire

Plusieurs études cliniques et précliniques ont rapporté des altérations architecturales dans la matrice extracellulaire du TA sous-cutané de patients (Alves *et al.*, 2017; Batista *et al.*, 2016) et de rongeurs cachectiques (Bing *et al.*, 2006). Ce réarrangement se manifeste par une fibrose tissulaire plus prononcée, caractérisée par une surexpression des fibres de collagène de types I, III et IV, et de la fibronectine (**Figure 19**).

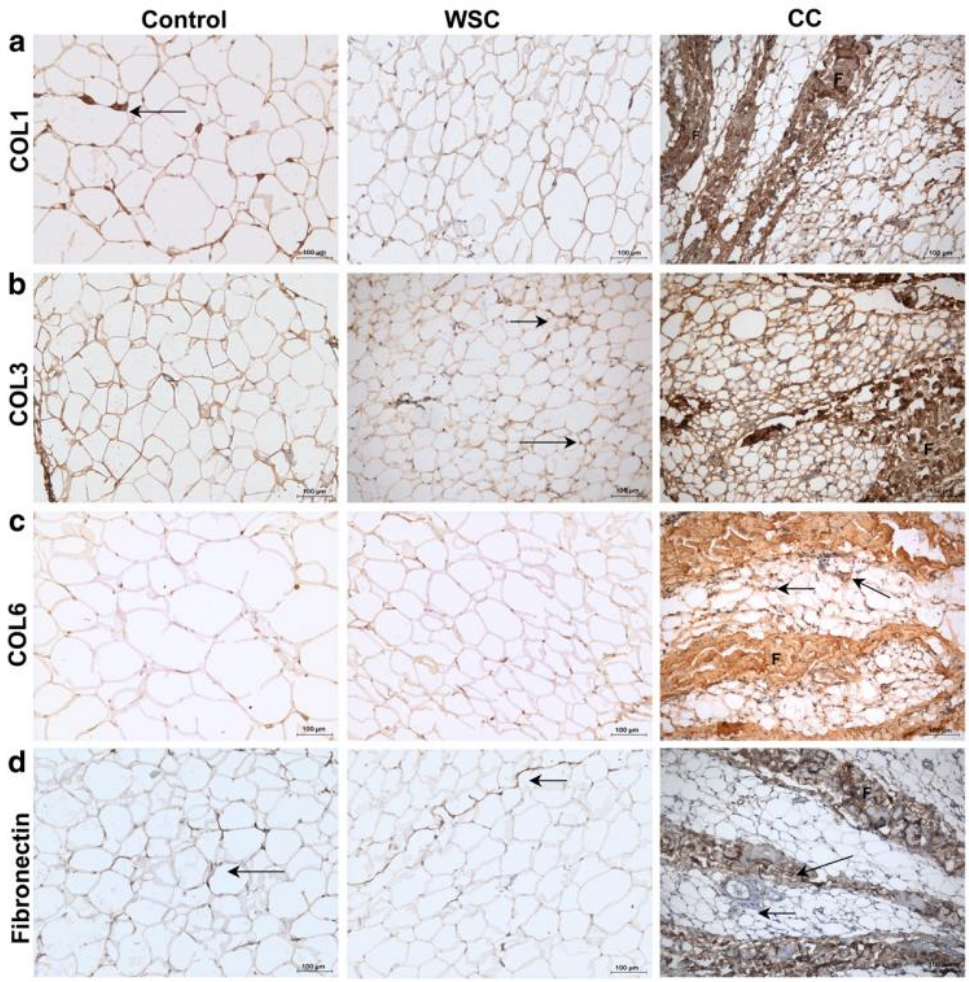


Figure 19 : La cachexie cancéreuse induit une surexpression du collagène et de la fibronectine dans le TA sous-cutané de patients.

Comparaison entre des patients sains (« control »), cancéreux non cachectiques (WSC, « weight-stable cancer ») et cancéreux cachectiques (CC, « cancer cachexia »). Collagène de types (a) I ; (b) III et (c) VI ; (d) Fibronectine. F : fibrose.

Issu de (Alves *et al.*, 2017)

e. Brunissement du TA blanc

Enfin, la cachexie cancéreuse induirait un brunissement du TA blanc, causant l'apparition d'adipocytes dits « beiges ». Ce phénotype a été observé dans le tissu adipeux viscéral de patients cachectiques avec un sarcome de Kaposi (Petruzzelli *et al.*, 2014) (**Figure 20**), et détecté très tôt (Elattar *et al.*, 2018; Kir *et al.*, 2014; Petruzzelli *et al.*, 2014) ou au contraire à un stade tardif (Han *et al.*, 2018) dans des modèles précliniques de cachexie cancéreuse. Il

favorise l'augmentation de la dépense énergétique et de l'utilisation des acides gras dans les adipocytes (Tisdale, 2009; Petruzzelli *et al.*, 2014), avec pour conséquence une thermogenèse plus importante, qui contribue au déséquilibre de la balance énergétique observé chez les patients cancéreux cachectiques. Cette thermogenèse est liée à l'activation de l'UCP1 (« Uncoupling Protein 1 »), normalement retrouvée dans le TA brun, qui induit le découplage de la phosphorylation oxydative, pour dissiper l'énergie sous forme de chaleur (Klingenberg and Huang, 1999; Nicholls and Rial, 1999).

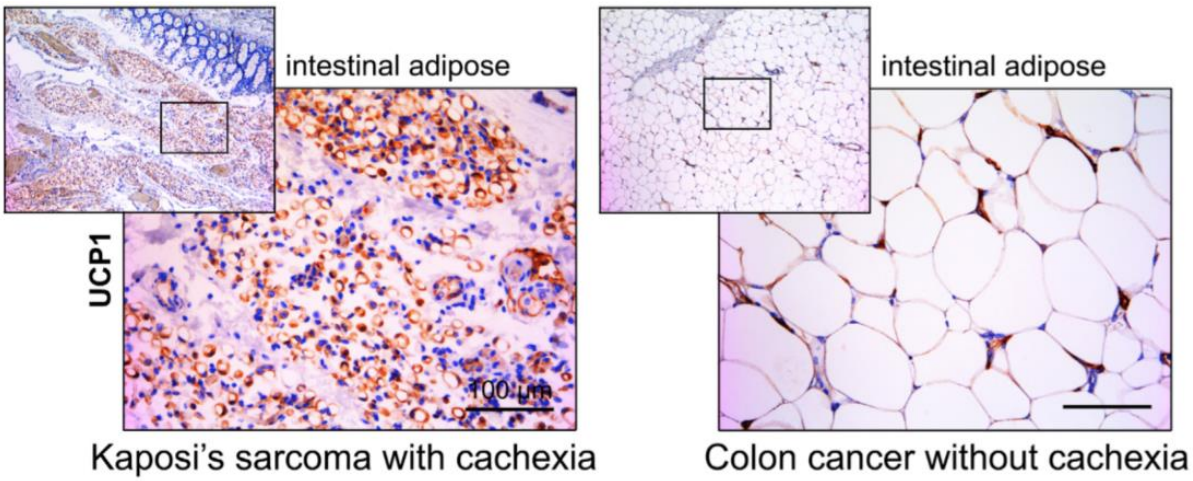


Figure 20 : Brunissement du TA viscéral chez des patients cancéreux cachectiques
Le marquage immunohistochimique de l'UCP1 révèle un brunissement du TA viscéral chez le patient cachectique avec un sarcome de Kaposi (gauche), qui accompagne l'atrophie adipocytaire. Aucun brunissement du TA n'est observé chez le patient non cachectique avec un cancer du côlon (droite), où les adipocytes ont une taille normale.
Issu de (Petruzzelli *et al.*, 2014)

De manière générale, il a été montré que le TA est affecté durant le développement de la cachexie cancéreuse, d'un point de vue morphologique et métabolique. Mais les études cliniques sont encore trop peu nombreuses pour permettre une caractérisation de ces altérations. De plus amples recherches sur de larges cohortes sont donc nécessaires.

f. Lien entre la fonte musculaire squelettique et les altérations du TA

Il a été proposé que l'atteinte du TA (lorsqu'elle a lieu) précède la fonte musculaire dans le développement de la cachexie cancéreuse, que ce soit en clinique (Fouladiun *et al.*, 2005) ou en préclinique (Das *et al.*, 2011). Tandis que le TA sécrète des adipokines qui peuvent avoir un effet direct sur le métabolisme musculaire (Makki *et al.*, 2013), le muscle peut lui aussi induire la libération de myokines, telles qu'IL-6 et IL-15, qui peuvent perturber le métabolisme du TA (Argilés *et al.*, 2009). Ces signaux participeraient à une boucle de régulation réciproque entre les masses musculaire squelettique et adipeuse (Argilés *et al.*, 2005).

V. Altérations des autres tissus

Le muscle squelettique et le tissu adipeux ne sont pas les seuls tissus à être impliqués dans le développement de la cachexie cancéreuse chez les patients atteints d'un cancer. En effet, des études cliniques ont montré que la cachexie cancéreuse est un syndrome qui affecterait de nombreux organes et tissus, tels que le cœur (Kazemi-Bajestani *et al.*, 2019a; Barkhudaryan *et al.*, 2017) ; le microbiote intestinal (Bindels and Delzenne, 2013) ; le foie (Lieffers *et al.*, 2009), le cerveau (Molfino *et al.*, 2017; Bodine and Furlow, 2015) et le tissu osseux (Bonetto *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2013).

Concernant le tissu osseux, une atrophie et des dysfonctions concomitantes des tissus osseux et musculaire squelettique ont été observées chez des modèles précliniques de cachexie cancéreuse (Choi *et al.*, 2013), dépendamment du type et du stade de la tumeur (Bonetto *et al.*, 2016). Plusieurs mécanismes physiologiques et moléculaires ont été étudiés, qui relieraient l'atrophie de ces deux tissus. Dans le cas de tumeurs avec métastases osseuses, l'ostéolyse pourrait induire la sécrétion d'activine et de TGFβ, dont les voies de signalisation incluent des médiateurs de la protéolyse musculaire squelettique (Regan *et al.*, 2017). De façon réciproque, la sécrétion de l'IL-15 par le muscle squelettique augmenterait le contenu minéral osseux (Quinn *et al.*, 2009). Or, les concentrations sanguines d'IL-15 semblent diminuées chez les patients cachectiques (Martínez-Hernández *et al.*, 2012). La voie NF-κB a aussi été identifiée comme pouvant réguler non seulement la fonte de la masse musculaire mais aussi la résorption osseuse (Kandarian, 2008). Plusieurs autres molécules cataboliques et anaboliques ont été proposées pour décrire les interactions bidirectionnelles qui existent entre ces deux tissus (Waning and Guise, 2015; Cianferotti and Brandi, 2014).

VI. Obésité sarcopénique

Dans le contexte de l'obésité, une augmentation de la charge liée à l'excès de poids, une augmentation des tissus adipeux, et des troubles métaboliques peuvent induire des modifications de la masse, de la structure et de la fonction du muscle squelettique, contribuant à réduire la mobilité et la qualité de vie des patients obèses. Toutefois, les effets de l'adiposité et de l'obésité sur les caractéristiques musculaires ne sont pas encore élucidés. Une augmentation du volume musculaire au niveau des membres inférieurs a été observée chez des patients obèses, dépendamment de l'âge et du sexe du patient (Lafortuna *et al.*, 2014; Tomlinson *et al.*, 2014). Une diminution de l'atténuation musculaire a également été rapportée (Lafortuna *et al.*, 2014). Des dérégulations au niveau du métabolisme protéique du muscle liées à l'insulino-résistance caractéristique de l'obésité pourraient participer aux modifications de la masse musculaire et de sa qualité (Guillet, 2019). Certaines études ont également montré une diminution de la proportion de fibres musculaires de type I (oxydatives) et une augmentation de celles de type II (glycolytiques) dans le *rectus abdominis* de patients obèses (Tanner *et al.*, 2002; Hickey *et al.*, 1995).

La prévalence accrue de l'obésité observée au cours des dernières décennies a fait émerger un nouveau concept d'obésité sarcopénique, caractérisée par la présence simultanée d'une sarcopénie et de l'obésité chez le patient (Baumgartner, 2000). Chez les patients obèses, la sarcopénie est masquée par l'importante adiposité, ce qui rend le dépistage de la pathologie plus difficile. Actuellement, les critères d'inclusion lors d'études cliniques sur la cachexie cancéreuse sont basés sur l'IMC et la perte de poids (Fearon *et al.*, 2011). Cependant, il a été montré que des personnes avec le même IMC peuvent avoir une masse musculaire différente (Martin *et al.*, 2013). La perte de poids peut également être sous-évaluée chez les patients obèses. L'obésité sarcopénique fait l'objet de débats dans la communauté scientifique. Certains parlent de l'effet paradoxalement protecteur de l'obésité, notamment grâce à des réserves adipeuses plus importantes qui préserveraient d'une perte de poids délétère. Tandis que d'autres pointent du doigt la dangerosité de la fonte musculaire masquée (Prado *et al.*, 2016). En effet, sarcopénie et obésité ont en commun certains mécanismes physio pathologiques, tels que l'insulino-résistance, l'état inflammatoire et le stress oxydatif. Un cercle vicieux pourrait exister entre l'augmentation de l'adiposité et la fonte musculaire squelettique, d'autant plus de par l'influence réciproque exercée par ces deux tissus. A notre connaissance, aucune étude préclinique ou clinique n'a étudié l'impact de l'obésité sur la structure et le métabolisme musculaires squelettiques, ou du tissu adipeux, chez des patients sarcopéniques.

Partie 5 : Cachexie cancéreuse et chimiothérapie

En plus d'une dénutrition associée au cancer, les traitements anticancéreux, en particulier la chimiothérapie, peuvent également aggraver l'état nutritionnel du patient. L'utilisation de CT-Scanners de diagnostic et de suivi a permis d'évaluer l'effet anabolique ou catabolique d'agents chimio thérapeutiques, ajouté à celui de la tumeur, sur différents paramètres de la composition corporelle.

a. Masse musculaire squelettique

L'évolution de la masse musculaire squelettique (« Lean Body Mass », LBM) au cours de la chimiothérapie a fait l'objet de plusieurs études, notamment dans les cancers gastro-intestinaux (regroupant les cancers de l'œsophage, de l'estomac, du foie, du pancréas, du colon et de l'anus) et pulmonaires. La plupart des chimiothérapies entraînent une perte de la LBM, notamment les chimiothérapies à base de platine (Kazemi-Bajestani *et al.*, 2019; Nattenmüller *et al.*, 2017; Palmela *et al.*, 2017; Awad *et al.*, 2012), de taxane ou de fluoropyrimidine (Goncalves *et al.*, 2018; Nattenmüller *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2015) ainsi que divers régimes de traitements néoadjuvants ou adjuvants (Benjamin *et al.*, 2018; Daly *et al.*, 2018) (**Tableau 6**). Dans le cancer colorectal métastatique (mCCR), avec un traitement à base de bévacizumab associé à une chimiothérapie cytotoxique telle que l'oxaliplatine ou l'irinotécan, une diminution globale de la LBM a été observée après 2 à 6 mois de traitement (Sasaki *et al.*, 2019; Kurk *et al.*, 2018; Blauwhoff-Buskermolen *et al.*, 2016; Poterucha *et al.*, 2012), à l'exception d'une étude clinique récente d'Antoun *et al.* où elle demeurait inchangée (Antoun *et al.*, 2019) (**Tableau 7**).

b. Densité osseuse

La perte de la densité minérale osseuse (« Bone Mineral Density », BMD) est considérée comme un élément critique dans les cancers gynécologiques et du sein chez les femmes pré- et post-ménopausées, qui sont particulièrement à risque de développer de l'ostéoporose. La BMD est généralement évaluée par absorptiométrie à rayons X en double énergie (DXA) dans le rachis lombaire, la hanche et / ou le col du fémur. Dans la plupart des études, qui incluaient des patientes traitées avec différents régimes de chimiothérapie, la perte de BMD au cours du

traitement était significative (Lee *et al.*, 2016; Oostra *et al.*, 2015; Cameron *et al.*, 2010; Hui *et al.*, 2010; Hadji *et al.*, 2009) (**Tableau 8**). Une étude a cependant montré que cette perte de densité osseuse pouvait être au moins partiellement évitée grâce à une supplémentation en calcium et en vitamine D (Monroy-Cisneros *et al.*, 2016).

c. Tissu adipeux

Concernant le tissu adipeux (TA), différents types de changement ont pu être observés au cours de traitements anti-cancéreux. Parallèlement à une diminution de la LBM, Nattenmüller *et al.* ont observé une augmentation de tous les compartiments du tissu adipeux (total, viscéral, sous-cutané et intermusculaire) après différents régimes néoadjuvants de chimiothérapie chez des patients atteints d'un cancer pulmonaire (Nattenmüller *et al.*, 2017). Au contraire, Awad *et al.* ont rapporté que des patients atteints de cancer œsophago-gastrique perdaient une quantité significative de LBM et de masse grasse après une chimiothérapie néoadjuvante à base de platine (Awad *et al.*, 2012). Ces pertes concomitantes de LBM et de TA ont également été observées dans d'autres études (Kazemi-Bajestani *et al.*, 2019a; Daly *et al.*, 2018; Palmela *et al.*, 2017).

Les études précliniques donnent également des informations sur les pertes tissulaires induites par le cancer et la chimiothérapie, qui peuvent inclure le muscle squelettique (Damrauer *et al.*, 2018), ou cardiaque (Ibrahim *et al.*, 2019), la graisse sous-cutanée et abdominale (Biondo *et al.*, 2018), et la BMD (Ponnapakkam *et al.*, 2011). Damrauer *et al.* ont rapporté que des souris saines traitées au cisplatine développaient une perte musculaire squelettique, suggérant que la chimiothérapie induisait bien un changement de LBM (Damrauer *et al.*, 2018).

Ainsi, la chimiothérapie a été associée à des modifications de la composition corporelle dans divers cancers, en fonction du type de tumeur, du type de médicament et de la dose. Toutefois, rares sont les études cliniques dans lesquelles les changements de multiples tissus ont été suivis simultanément. Kazemi-Bajestani *et al.* ont constaté des pertes concomitantes de masse musculaire squelettique et cardiaque et de masse graisseuse chez des patients porteurs d'un cancer du poumon non à petites cellules, et traités par des thérapies à base de carboplatine (Kazemi-Bajestani *et al.*, 2019a). Dans les mCCR, les pertes tissulaires sont associées à une augmentation des toxicités liées à la chimiothérapie (Barret *et al.*, 2012) et à une survie significativement diminuée (Blauwhoff-Buskermolen *et al.*, 2016). A notre connaissance, il

n’existe actuellement aucune étude clinique rapportant des données sur la LBM, le TA et la BMD chez des patients cancéreux au cours d’une chimiothérapie.

Tableau 6 : Etudes cliniques décrivant l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur la masse musculaire squelettique et le tissu adipeux, chez des patients porteurs d'un cancer gastro-intestinal ou pulmonaire

Etude clinique	Cancer, Population	Chimiothérapie	Intervalle de mesures	Observations sur les paramètres de composition corporelle
(Kazemi-Bajestani *et al.*, 2019a)	NSCLC Stade IV N=50 (48% ♂)	Palliative A base de carboplatine	CT-Scans Intervalle médian : 112 ± 6 jours Avant et après traitement	Diminution de la masse ventriculaire gauche (-8,9%, 95%CI : -10.8 to -4.8; p<0.001), retrouvée fréquemment associée avec une perte de la LBM (p=0.01) et du TAT (p<0.001).
(Benjamin *et al.*, 2018)	Pancréas Stades I et II N=85 (41% ♂)	Néoadjuvante, adjuvante, palliative	CT-Scans Intervalle non renseigné Avant traitement, post-néoadjuvante, post-chirurgie et après la fin de tout traitement	Diminution de l'index basé sur l'aire du muscle psoas après la chimiothérapie néoadjuvante (-0.6 cm^2/m^2, 95% CI : −0.8 to −0.3, p<0.001) et après la fin de tout traitement (-0.5 cm^2/m^2, 95% CI : −0.9 to −0.2, p=0.004). Aucune différence observée après chirurgie.
(Daly *et al.*, 2018)	Gastro-intestinal Stades I à IV N=163 (64% ♂)	Néoadjuvante, adjuvante, palliative	CT-Scans Intervalle médian : 118 jours (IQR : 92 à 58) Avant et après traitement	Diminution de l'aire du MS (-6.1 cm^2 (3.9%)/100 jours, p<0.001). La perte est plus importante après la chimiothérapie néoadjuvante comparée au traitement palliatif (-11.3 cm^2 (7.3%)/100 jours *vs* -4.7 cm^2 (2.8%) /100 jours, p<0.001). Diminution de l'aire du TAT (-17.3 cm^2 (3.5%)/100 jours, p=0.002).
(Goncalves *et al.*, 2018)	NSCLC Stades I à IV N=88 (48% ♂)	Néoadjuvante A base de Taxane Ou à base de Gemcitabine Ou à base de Bévacizumab	CT-Scans Intervalle médian : 3.4 mois (IQR : 2.9 à 4.1) Avant et après traitement	Diminution du volume MS thoracique (-3.3%, p=0.0005) et lombaire (-2.6%, p=0.0101). Pas de modification au niveau des volumes de TA.
(Nattenmüller *et al.*, 2017)	Poumon Stades IIb à IV N=200 (65% ♂)	Néoadjuvante Carboplatine, Cisplatine, Gemcitabine, Vinorelbine, Etoposide, Pemetrexed	CT-Scans Intervalle médian : 4.3 mois Avant et après traitement	Diminution de l'aire du MS (-4.1cm^2, p<0.001) et du SMI (-1.4 cm^2/m^2, p<0.001). Augmentation des aires de TAIM (2.0cm^2, p<0.001), TAV (9.1cm^2, p=0.001), TAS (5.9cm^2, p=0.04) et du TAT (17.3cm^2, p=0.001).
(Palmela *et al.*, 2017)	Estomac ou jonction gastro-œsophagienne Stades II et III N=48 (68% ♂)	Néoadjuvante ECF/EOF/ EOX/ECX XELOX/FOLFOX/ Xeloda/DCF	CT-Scans Intervalle médian : 86.4 ± 29.0 jours Avant et après traitement	Diminution de l'aire du MS (15.4 ± 2.8 cm^2; p<0.001), du TAV (p<0.001) et du TAS (p=0.002).

Tableau 6 : (suite)

Etude clinique	Cancer, Population	Chimiothérapie	Intervalle de mesures	Observations sur les paramètres de composition corporelle
(Choi *et al.*, 2015)	Pancréas Localement avancé ou métastatique N=484 (61% ♂)	Palliative A base de Gemcitabine Ou à base de Fluoropyrimidine	CT-Scans Intervalle non renseigné Avant et après progression de la maladie	Diminution du SMI (-2.8 cm^2/m^2 ± 5.1, p<0.001)
(Awad *et al.*, 2012)	Gastro-œsophagien Stades I à IV N=47 (72% ♂)	Néoadjuvante ECF, CF, Capécitabine/cisplatine, Epirubicine/oxaliplatine	CT-Scans Intervalle médian : 107 ± 27 jours Avant et après traitement	Diminution de la masse maigre (2.9 ± 4.7 kg, p < 0.0001) et masse grasse (1.3 ± 3.2 kg, p=0.007).

DCF : Docétaxel, Cisplatine, et 5-Fluorouracil ; **ECF** : Epirubicine, Cisplatine, et 5-Fluorouracil ; **ECX** : Epirubicine, Cisplatine, et Capécitabine ; **EOF** : Epirubicine, Oxaliplatine, et 5-Fluorouracil ; **EOX** : Epirubicine, Oxaliplatine, et Capécitabine ; **FOLFOX** : 5-Fluorouracil, Leucovorine et Oxaliplatine ; **Xeloda** : Capécitabine ; **XELOX** : Capécitabine et Oxaliplatine

CI : « Confidence Interval » ; **IQR** : « Interquartile Range » ; **(M)MS** : (Masse du) Muscle Squelettique ; **NSCLC** : « Non-Small-Cell-Lung-Cancer » ; **SD** : « Standard Deviation » ; **SMI** : « Skeletal Muscle Index » ; **TAIM** : Tissu Adipeux Intermusculaire ; **TAV** : Tissu Adipeux Viscéral ; **TAS** : Tissu Adipeux Sous-Cutané ; **TAT** : Tissu Adipeux Total

Tableau 7 : Etudes cliniques décrivant l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur la masse musculaire squelettique et le tissu adipeux, chez des patients porteurs d'un cancer colorectal métastatique

Etude clinique	Cancer, Population	Chimiothérapie	Intervalle de mesures	Observations sur les paramètres de composition corporelle
(Antoun *et al.*, 2019)	Colorectal Métastatique N=76 (50% ♂)	XELIRI ou FOLFIRI	CT-Scans 2 et 4 mois de suivi du traitement	57 patients avec CT-Scans de suivi. Pas de changement significatif observé pour le poids, LBM and TAV en 4 mois. Chez les femmes, diminution de la densité du MS entre 2 et 4 mois (-6.8 HU, p=0.012), et du TAS après 4 mois (-15.4 cm^2/m^2, p=0.03).
(Sasaki *et al.*, 2019)	Colorectal Métastatique N=219 (65% ♂)	Régimes de chimiothérapie combinés incluant mFOLFOX6, FOLFIRI, Bévacizumab, XELOX, SOX ou XELIRI	CT-Scans 3 et 6 mois après l'administration de la chimiothérapie systémique	31 patients / 142 (22%) avec une perte de la LBM > 9% en 3 mois. 21 patients / 87 (24%) avec une perte de la LBM > 9% en 6 mois. Pas de différence observée concernant les TAV et TAS entre les patients ayant perdu ou non de la LBM.
(Kurk *et al.*, 2018)	Colorectal Métastatique N=450 (63% ♂)	Capécitabine + oxaliplatine + bévacizumab	CT-Scans Intervalle médian : 4.3 mois (IQR : 4.0 to 4.5) 6 cycles de traitement	Diminution de la LBM (-0.69 kg, 95% CI, -1.11 to -0.26) et du poids corporel (-0.05 kg, 95% CI, -0.54 to 0.45) En utilisant un cutoff de 2%, 43% of patients ont perdu de la LBM, 33% en ont gagné et 24% avaient une LBM stable.
(Blauwhoff-Buskermolen *et al.*, 2016)	Colorectal Métastatique N=67 (63% ♂)	Capécitabine ± oxaliplatine, irinotecan, bévacizumab Ou irinotecan Ou FU + oxaliplatine ± bévacizumab	CT-Scans Intervalle médian : 78 jours (IQR : 67 to 92) CT-Scans réalisés avant et pendant traitement	Diminution de l'aire du MS de 6.1% (95% CI, -8.4 to -3.8, p<0.001), que ce soit chez les hommes ou chez les femmes. Diminution du poids corporel chez les femmes seulement, de 4.4% (95% CI, -8.5 to -0.4, p=0.031).
(Poterucha *et al.*, 2012)	Colorectal Métastatique N=57 (53% ♂)	Bévacizumab pour tous + FU + oxaliplatine + leucovorin Ou à base d'irinotecan Ou capécitabine Ou 5-FU + leucovorine	CT-Scans Dans les 3 mois suivant le début de la chimiothérapie	Diminution globale du poids corporel et de l'aire du MS. Le poids corporel moyen au 1er et 2nd scanner étaient 85 kg (SD, 19) et 83 kg (SD, 19) respectivement (p=0.002). 22 (39%) patients ont gagné du poids. L'aire moyenne du MS au 1er et 2nd scanner étaient 148 cm^2 (SD, 38) et 145 cm^2 (SD, 39) respectivement (p=0.02). L'aire du MS a augmenté chez 24 (42%) patients.

5-FU : 5-Fluorouracil ; **FOLFIRI** : 5-Fluorouracil, Leucovorine et Irinotecan ; **mFOLFOX6** : 5-Fluorouracil, Leucovorine et Oxaliplatine modifiée ; **SOX** : S-1 et Oxaliplatine ; **XELIRI** : Capécitabine et Irinotecan ; **XELOX** : Capécitabine et Oxaliplatine

CI : « Confidence Interval » ; **HU** : Unité de Hounsfield ; **IQR** : « Interquartile Range » ; **(M)MS** : (Masse du) Muscle Squelettique ; **SD** : « Standard Deviation » ; **TAS** : Tissu Adipeux Sous-Cutané ; **TAV** : Tissu Adipeux Viscéral

Tableau 8 : Etudes cliniques décrivant l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur la densité osseuse, chez des patientes porteuses d'un cancer gynécologique ou du sein

Etude clinique	Cancer, Population	Chimiothérapie	Intervalle de mesures	Observations sur les paramètres de composition corporelle
(Lee *et al.*, 2016)	Ovarien : Stades Ic à IV Endomètre : Stades Ia à IV Cervical : Stades Ib à IV N=118 Pré- et post-ménopause	Adjuvante Radiothérapie ou chimiothérapie à base de platine	DXA Avant et 12 mois après traitement	Diminution des T-scores de densité osseuse au niveau du col du fémur et du rachis lombaire chez les patientes atteintes d'un cancer de l'endomètre.
(Oostra *et al.*, 2015)	Sein avec insuffisance ovarienne Stades I et II N=40 Pré-ménopause	Adjuvante Cyclophosphamide + methotrexate + fluorouracil Ou Cyclophosphamide + doxorubicine ± fluorouracil ou paclitaxel	DXA Avant puis 6 et 12 mois après traitement	Diminution de la densité osseuse au niveau du rachis lombaire (médiane avant traitement : 0.993 g/cm^2, après 6 mois : 0.976 g/cm^2, et 12 mois : 0.937 g/cm^2, p<0.001 pour les 2).
(Cameron *et al.*, 2010)	Sein Stade précoce N=41 Pré-ménopause	Adjuvante CMF, AC, A, E, FEC-T, EC-T, TACT, TANGO	DXA Avant puis 6 et 12 mois après traitement	Diminution de la densité osseuse au niveau du rachis lombaire (moyenne avant traitement : 1.05 ± 0.02 g/m^2, après 6 mois : 1.01 ± 0.02 g/m^2, et 12 mois : 1.00 ± 0.02 g/m^2, p<0.001 pour les deux).
(Hui *et al.*, 2010)	Gynécologique (ovarien, endomètre, cervical) N=40	A base de platine Ou à base de taxane ± radiothérapie	CT-Scans Avant puis 7 et 12 mois après le traitement initial	Diminution de la densité osseuse volumétrique au niveau du rachis lombaire et du col du fémur (-15.9% ±5.67 et -10.4% ± 4.06 respectivement).

Tableau 8 : (suite)

Etude clinique	Cancer, Population	Chimiothérapie	Intervalle de mesures	Observations sur les paramètres de composition corporelle
(Hadji *et al.*, 2009)	Sein Non métastatique N=53 Pré-ménopause	Doxorubicine / cyclophosphamide	DXA Avant puis 6 et 12 mois après traitement	Diminution de la densité osseuse au niveau du rachis lombaire (-5.17%, p=0.001), de la hanche (-4.02%, p=0.001) et du col du fémur (-2.79%, p=0.02) après 12 mois.
(Monroy-Cisneros *et al.*, 2016)	Sein Stades I à IIIb N=40 Pré- et post-ménopause	Néoadjuvante, adjuvante FAC, FEC, FAC+P, FA, DAC ± radiothérapie	DXA Avant et après 6 mois de traitement	Diminution de la densité osseuse au niveau du col du fémur (-0.018 g/cm^2, 95%CI, -0.026 to -0.011) et du rachis lombaire (-0.048 g/cm^2, 95%CI -0.063 to -0.033) (p<0.001 pour les 2). Effet protecteur d'une supplémentation en calcium et vitamine D pour le col du fémur.

A : Doxorubicine ; **AC** : Doxorubicine et Cyclophosphamide ; **CMF** : Cyclophosphamide, Méthotrexate et 5-Fluorouracil ; **DAC** : Docetaxel, Adriamicine et Cyclophosphamide ; **E** : Epirubicine ; **EC-T** : Epirubicine, Cyclophosphamide et Paclitaxel ; **FA** : 5-Fluorouracile et Adriamicine ; **FAC** : 5-Fluorouracile, Adriamicine et Cyclophosphamide ; **FAC+P** : 5-Fluorouracile, Adriamicin, Cyclophosphamide et Paclitaxel ; **FEC** : 5-Fluorouracile, Epirubicine et Cyclophosphamide ; **FEC-T** : 5-Fluorouracil, Epirubicine, Cyclophosphamide et Docetaxel ; **TACT** : « Taxotere as Adjuvant Chemotherapy Trial » ; **TANGO** : « tAnGo trial (paclitaxel-containing, epirubicin-based chemotherapy) »

CI : « Confidence Interval »

Partie 6 : Problématique, hypothèses et objectifs de la thèse

I. Objectif général

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donnés comme objectifs d'étudier les liens entre la composition corporelle et un traitement par chimiothérapie à base de bévacizumab (étude clinique STIC-Avastin (NCT00489697)) ; ou avec la structure et le métabolisme du muscle squelettique, dans le contexte de la cachexie cancéreuse (protocoles cliniques METERMUCADIG (NCT02573974) et METERMUS-IMC (NCT03027479)).

II. Etude clinique STIC-Avastin (NCT00489697)

Aucune étude clinique n'a jusqu'ici rapporté de données sur l'évolution simultanée de la masse musculaire squelettique (« Lean Body Mass », LBM), des tissus adipeux totaux (TAT) et de la densité minérale osseuse (« Bone Mineral Density », BMD) chez des patients porteurs d'un cancer au cours d'un traitement chimio thérapeutique. Nous avons émis l'hypothèse que des variations simultanées de LBM, TAT et BMD se produisent pendant la chimiothérapie, affectées à la fois par le traitement du cancer et la tumeur elle-même. L'objectif spécifique de ce protocole était d'évaluer l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur l'évolution simultanée de trois paramètres de la composition corporelle (masse maigre, masse grasse, et densité osseuse) dans une population de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique traités par une chimiothérapie à base de bévacizumab.

III. Protocoles cliniques pilotes METERMUCADIG (NCT02573974) et METERMUS-IMC (NCT03027479)

i) L'ensemble des résultats des études précliniques et cliniques suggère la présence d'altérations dans le muscle squelettique des patients porteurs d'un cancer et cachectiques. Cependant, pour la plupart des paramètres étudiés qui pourraient jouer un rôle dans la fonte musculaire, les conclusions des études cliniques sont contradictoires. Nous avons émis

l'hypothèse que chez les patients porteurs d'un cancer et cachectiques, il y avait des altérations des métabolismes lipidique et mitochondrial et un stress du RE / RS dans le muscle squelettique, participant aux mécanismes à l'origine de la fonte musculaire. Le premier objectif de ces protocoles était d'étudier la structure du muscle squelettique, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, la quantité de vacuoles lipidiques, et le RE / RS dans le muscle squelettique de patients cachectiques atteints d'une part d'un cancer colorectal ou pancréatique (METERMUCADIG), et d'autre part d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre (METERMUS-IMC).

ii) Il a été montré que le tissu adipeux pouvait être affecté durant le développement de la cachexie cancéreuse, d'un point de vue morphologique et métabolique. Mais les études cliniques sur le sujet sont peu nombreuses. Nous avons émis l'hypothèse d'un brunissement du tissu adipeux qui contribuerait au déséquilibre de la balance énergétique observé chez certains patients cachectiques porteurs d'un cancer. Le second objectif de METERMUS-IMC était d'explorer les altérations du tissu adipeux chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre et cachectiques, en se concentrant sur le brunissement du tissu adipeux sous-cutané.

iii) Chez les patients obèses, la sarcopénie est masquée par l'accumulation de graisse, ce qui rend le dépistage de la pathologie plus difficile. L'obésité sarcopénique fait l'objet de débats dans la communauté scientifique, quand certains parlent de l'effet paradoxalement protecteur de l'obésité, alors que d'autres pointent du doigt la dangerosité de la fonte musculaire masquée. Mais à notre connaissance, aucune étude clinique n'a étudié l'impact de l'obésité sur la structure et le métabolisme musculaire squelettique, chez des patients avec une faible masse musculaire. Nous avons émis l'hypothèse d'un effet aggravateur de l'obésité sur les altérations musculaires squelettiques chez les patients porteurs d'un cancer et avec une faible masse musculaire. Aussi, le dernier objectif du protocole METERMUS-IMC était d'évaluer si l'obésité pouvait modifier la structure du muscle, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, la quantité de vacuoles lipidiques, ou le RE / RS dans le muscle squelettique.

Chapitre II : Patients, Matériel & Méthodes

Cette section ne concerne que les protocoles cliniques METERMUCADIG et METERMUS-IMC. Le matériel et méthodes du protocole clinique STIC-Avastin est détaillé dans l'article de cette étude, au Chapitre III : Résultats.

Partie 1 : Design des études cliniques

I. Etude clinique pilote METERMUCADIG (NCT02573974)

L'étude a démarré le 19/01/2016 et les prélèvements ont été collectés jusqu'au 04/12/2018.
Les critères d'inclusion étaient : patient entre 18 et 80 ans ; cancer colorectal ou pancréatique avec une indication à une chimiothérapie systémique, et la mise en place d'une chambre implantable (Port-a-Cath, ou PAC) en sous-clavier ; espérance de vie ≥ 3 mois ; état général suivant la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ≤ 2. Les critères d'exclusion comprenaient : femme enceinte ou allaitante ; diabète déséquilibré ; corticothérapie systémique ; toute affection médicale sévère non contrôlée.
Le jour de la pose de PAC, avant le début du traitement par chimiothérapie, une biopsie du *pectoralis major* (**Figure 21**) et des prélèvements sanguins (à jeun ou non) ont été collectés pour chaque patient. Les patients atteints d'un cancer colorectal ou pancréatique, en particulier à un stade avancé, ne sont pas tous éligibles à une chirurgie pelvienne du fait d'un état nutritionnel trop dégradé. La pose de PAC était donc la seule opportunité chirurgicale d'accès à une biopsie musculaire squelettique en quantité suffisante pour tous les patients. La biopsie musculaire a été réalisée sous anesthésie locale (solution de Xylocaïne®) avec un bistouri froid. Un CT-Scanner anonymisé de diagnostic du cancer, incluant au moins la partie abdominale, a été récupéré *a posteriori*.
La dénutrition liée au cancer a été évaluée au moment de l'inclusion, en suivant un critère de perte de poids déclarative. Un patient avec une perte de poids > 5% en 1 mois, ou > 10% en 6 mois précédant l'inclusion, était considéré comme dénutri. L'objectif était d'inclure 35 dénutris et 10 non dénutris.
Lors de l'examen clinique à l'inclusion, la circonférence brachiale a été mesurée sur le bras dominant du patient (droit si droitier, gauche si gaucher) détendu le long du corps. La force musculaire du bras dominant a également été estimée avec un dynamomètre manuel.

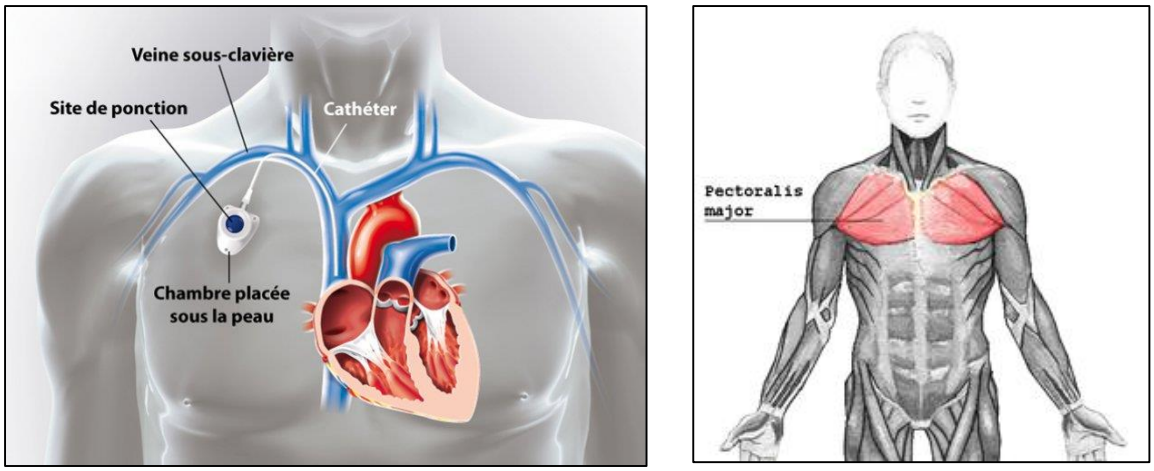


Figure 21 : Illustrations d'un Port-a-Cath et du muscle squelettique *pectoralis major*
Source : (Chambre implantable | Ramsay Générale de Santé)

II. Etude clinique pilote METERMUS-IMC (NCT03027479)

L'étude a démarré le 01/03/2017 et les prélèvements ont été collectés jusqu'au 16/07/2019.
Les critères d'inclusion étaient : patiente âgée de plus de 18 ans ; cancer de l'ovaire (y compris les tumeurs borderline de l'ovaire) ou de l'endomètre ; éligible à une chirurgie pelvienne. Les critères d'exclusion comprenaient : diabète déséquilibré ; affection neuromusculaire chronique ; toute affection médicale sévère non contrôlée.
Deux biopsies, du muscle *rectus abdominis* et du tissu adipeux sous-cutané profond (**Figure 22**), ont été prélevées lors d'une chirurgie pelvienne (cœlioscopie ou laparoscopie) sous anesthésie générale, avec un bistouri électrique. Le lendemain de la chirurgie, des prélèvements sanguins ont été collectés, à jeun, pour chaque patiente. Pour certaines patientes, la chirurgie était précédée d'un premier traitement par chimiothérapie. Les prélèvements ont donc été réalisés avant ou après traitement anti-cancéreux. Un CT-Scanner anonymisé de diagnostic du cancer et de faisabilité de l'intervention chirurgicale, incluant au moins la partie abdominale, a été récupéré *a posteriori*.
L'objectif était d'inclure 50 patientes porteuses d'un cancer de l'ovaire (sans compter les tumeurs borderline) ou de l'endomètre, et pour lesquelles un CT-Scanner était disponible. Les patientes pour qui l'analyse anatomo-pathologique post-opératoire révélait une tumeur borderline de l'ovaire, n'étaient pas exclues de l'étude. Lorsqu'*a posteriori*, certaines patientes n'avaient qu'un IRM disponible et non un CT-Scanner, elles n'étaient pas non plus exclues de l'étude. Leur composition corporelle n'a cependant pas pu être évaluée.

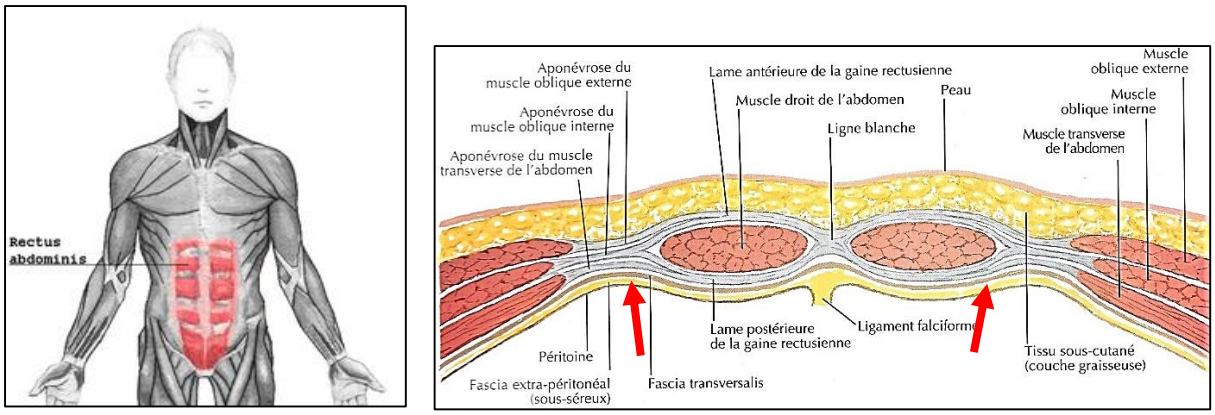


Figure 22 : Illustrations du muscle squelettique *rectus abdominis* et du tissu adipeux sous-cutané profond

Le tissu adipeux sous-cutané profond se situe entre le muscle et le péritoine. Il est aussi appelé tissu adipeux pré-péritonéal. Il est marqué par des flèches rouges sur l'illustration.

Source : Atlas d'anatomie humaine, 4ème édition, F.H.Netter

L'évaluation de la composition corporelle (masse maigre, masse grasse, densité osseuse) sur CT-Scanner est décrite en détails dans le matériel et méthodes de l'article STIC-Avastin, au Chapitre III : Résultats.

Les prélèvements sanguins ont été pris en charge par les laboratoires du CHRU de Tours.

Partie 2 : Traitement et analyses des biopsies

Pour les deux études cliniques METERMUCADIG et METERMUS-IMC, le critère de jugement principal choisi au moment de leur mise en place était la mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène musculaire par oxygraphie à haute résolution. Aussi, le tampon utilisé pour transporter les biopsies musculaires squelettiques après leur prélèvement, a été conçu tout particulièrement en vue de réaliser cette analyse de façon optimale. Sa composition est détaillée dans le **Tableau 9**. Il peut être conservé jusqu'à trois jours à +4°C.

Tableau 9 : Composition du tampon de transport des biopsies musculaires squelettiques

Produits utilisés	Concentration finale
K_2EGTA	7,23 mM
CaK_2EGTA	2,77 mM
Imidazole	20 mM
DTT	0,50 mM
KH_2PO_4	3 mM
$MgCl_2$	6,56 mM
BSA	0,2%
MES	53,3 mM
Taurine	20 mM
ATP	5,30 mM
PhosphoCréatine	15 mM
pH 7,1	

Chaque biopsie musculaire squelettique a été disséquée et séparée en 4 parties au maximum, en fonction de la quantité d'échantillon disponible :

- une partie pour l'oxygraphie à haute résolution, sur tissu frais ;
- une partie pour la microscopie optique / électronique, fixée dans du tampon « TRUMP » (paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 1%) et conservée jusqu'à une semaine à +4°C ;
- une partie pour l'immuno-histochimie, fixée dans du paraformaldéhyde 4% et conservée jusqu'à 48h à +4°C ;
- une partie pour l'extraction d'ARN/ADN/Protéines, conservée dans du RNALater (ThermoFisher) à -20°C.

Les biopsies de tissu adipeux ont été transportées dans du sérum physiologique après prélèvement. Elles ont été disséquées et divisées en 2 parties :

- une partie pour l'immuno-histochimie, fixée dans du paraformaldéhyde 4% et conservée jusqu'à 48h à +4°C ;
- une partie pour l'extraction d'ARN/ADN/Protéines, conservée dans du RNALater à -20°C.

I. Mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène

a. Principe

Les mesures de la consommation mitochondriale d'oxygène ont été réalisées par la technique d'oxygraphie à haute résolution. Elle permet de mesurer la quantité d'oxygène consommée par unité de temps par les mitochondries en présence de divers substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM).

b. Préparation des échantillons

Après retrait des éventuels tissus vasculaire, adipeux et collagénique, et des zones brûlées par le bistouri électrique, les fibres musculaires squelettiques ont été délicatement disséquées à l'œil nu à l'aide d'aiguilles et de pinces Dumont® extra-fines (**Figure 23**).

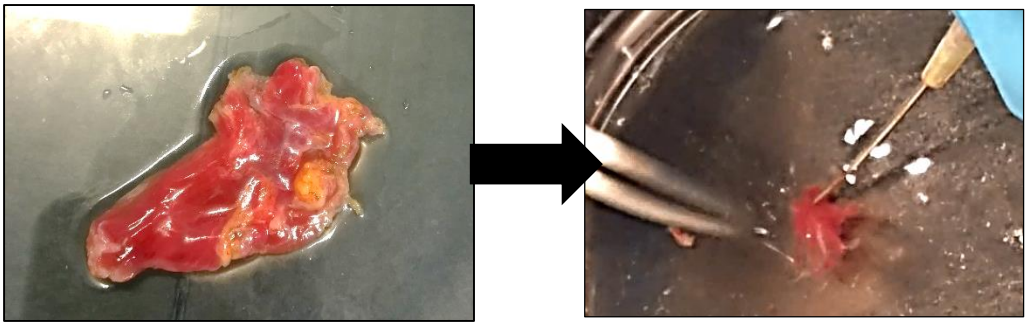


Figure 23 : Illustrations d'une biopsie musculaire squelettique avant et pendant dissection
A gauche : Biopsie du *rectus abdominis* après collection lors d'une laparoscopie.
A droite : Dissection de la biopsie à l'aide d'une aiguille et de pinces Dumont®. Les tissus vasculaire, adipeux et collagénique sont retirés au maximum, puis les fibres musculaires sont délicatement séparées. Seules quelques fibres, au total ~1 à 2 mg, sont utilisées pour la mesure de la consommation d'oxygène.

Les fibres musculaires squelettiques ont ensuite été perméabilisées avec de la saponine, pendant 30 min à +4°C, sous agitation. Ce détergent doux est dissout à 0,3% w/v puis dilué à 1,7% dans le tampon utilisé pour le transport des biopsies (**Tableau 9**). Il est important de ne pas laisser s'écouler plus d'une heure entre le prélèvement de la biopsie et la perméabilisation des fibres, pour conserver l'intégrité du métabolisme cellulaire.
Les fibres ont ensuite subi trois lavages successifs de 10 min dans un tampon de lavage (qui servira plus tard à la mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène) (**Tableau 10**), toujours à +4°C, sous agitation. Une fois perméabilisé et lavé, l'échantillon est prêt à être utilisé pour les mesures de la consommation mitochondriale d'oxygène.

Tableau 10 : Composition du tampon de lavage et de mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène des biopsies musculaires squelettiques.

Produits utilisés	Concentration finale
K_2EGTA	10 mM
Imidazole	20 mM
DTT	0,50 mM
KH_2PO_4	3 mM
$MgCl_2$	4 mM
BSA	0,2%
MES	109 mM
Taurine	20 mM
pH 7,1	

Ce tampon peut être aliquoté et stocké à -20°C jusqu'à 3 mois.

c. Appareil

La consommation mitochondriale d'oxygène a été mesurée à l'aide de l'OROBOROS Oxygraph-2k® (Oroboros Instrument). Cet appareil comporte deux cuves réactionnelles thermostatées, hermétiques, disposant d'une agitation magnétique et d'une électrode de type « Clark » (sensible à l'oxygène). Cette électrode est composée d'une cathode en platine polarisée à 0,7 volts et d'une anode en argent, mises en contact par un électrolyte KCl à 3 M. L'ensemble est isolé du milieu d'incubation par une membrane en téflon (Membrane PTFE ; Eurosep Instruments ou OroborosPOS-Menbranes ; Oroboros Instrument) imperméable à l'eau mais perméable à l'oxygène dissout dans le milieu de mesure. La réduction de l'oxygène au niveau de la cathode induit une modification de courant qui est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation.

L'appareil a été utilisé dans une configuration standard pour des biopsies, avec un volume de 2mL de tampon de respiration (**Tableau 10**) dans chaque cuve, à 30°C, et avec une vitesse d'agitation de 600 rpm.

d. Mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène

L'utilisation de la saponine a permis de perméabiliser la membrane plasmique cellulaire. L'intégrité des membranes mitochondriales est, quant à elle, maintenue. De cette manière, les substrats et inhibiteurs ajoutés en quantité saturante dans les cuves au cours de la mesure, sont directement accessibles aux mitochondries. La perméabilisation des fibres musculaires permet de contrôler l'apport des substrats à la mitochondrie et par conséquent de mesurer le fonctionnement intrinsèque de la CRM. Elle permet également de réaliser cette analyse en utilisant une quantité faible de biopsie musculaire, contrairement aux mesures sur mitochondries isolées.

A chaque mesure, l'intégrité de la membrane externe mitochondriale est vérifiée par ajout de cytochrome C dans les cuves de l'oxygraphe. Si ce cytochrome C exogène stimule la consommation mitochondriale d'oxygène de plus de 10%, alors cela signifie que l'intégrité de la membrane mitochondriale externe a été compromise au cours de la perméabilisation des fibres musculaires. En effet, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale conduit à la libération du cytochrome C contenu dans l'espace inter membranaire dans le cytoplasme, provoquant un ralentissement du fonctionnement de la CRM. L'ajout en excès de cytochrome C exogène permet alors d'améliorer le fonctionnement de la CRM et donc d'augmenter la consommation d'oxygène.

Différents états respiratoires sont mesurés :

- **L'état 3 ou état phosphorylant** : consommation mitochondriale d'oxygène liée à la synthèse d'ATP. Cette mesure est effectuée après ajout d'ADP.
- **L'état 4 ou état non phosphorylant** : consommation mitochondriale d'oxygène liée au gaspillage énergétique. Cet état est mesuré après ajout d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase.
- **L'état découplé ou état FCCP** : consommation d'oxygène liée à l'activité maximale de la CRM, mesurée après ajout de FCCP, une molécule découplante. Il représente la réserve énergétique mitochondriale.

- **L'état résiduel** : consommation d'oxygène résiduelle, obtenue après ajout d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III de la CRM. Il représente la consommation d'oxygène non mitochondriale, qui provient de réactions enzymatiques, telles que les enzymes pro-inflammatoires et pro-oxydantes cyclooxygénases (COX) et NADPH oxidases (NOX). Cette valeur est soustraite aux autres consommations d'oxygène.
- **L'activité du complexe 4** : mesurée après ajout d'Ascorbate et de TMPD, des substrats du complexe IV de la CRM.

La **Figure 24** schématise la CRM avec les différents substrats et inhibiteurs utilisés pour chaque complexe. Le **Tableau 11** liste les différents réactifs, avec leur concentration, utilisés pour les mesures d'oxygraphie. Les produits sont listés dans l'ordre de leur injection dans les cuves de l'oxygraphe.

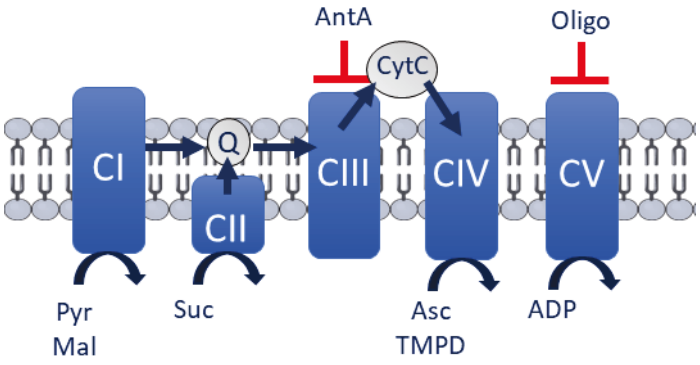


Figure 24 : Substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale

De gauche à droite : Pyr : Pyruvate ; Mal : Malate ; Suc : Succinate ; AntA : Antimycine A ; Asc : Ascorbate ; TMPD : N,N,N',N'-Tetramethyl-p-Phenylenediamine ; Oligo : Oligomycine ; ADP : Adénosine Di-Phosphate.

Tableau 11 : Réactifs utilisés pour la mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène et des différents états respiratoires

Produits utilisés	Concentration stock	Solvant	Concentration dans la cuve	Etats respiratoires
Pyruvate	0,5 M	Eau distillée	5 mM	Etat 3
Malate	0,5 M	Eau distillée	5 mM	
Succinate	0,5 M	Eau distillée	10 mM	
ADP	0,1 M	Eau distillée	1 mM	
Cytochrome C	320 µM	Eau distillée	8 µM	Intégrité mitochondriale
Oligomycine	8 mg/mL	Ethanol 70%	16 µg/mL	Etat 4
FCCP	1 mM	Ethanol 70%	1 µM	Etat découplé
Antimycine A	1 mg/mL	Ethanol 70%	2 µg/mL	Etat résiduel
Ascorbate	0,4 M	Eau distillée	4 mM	Complexe IV
TMPD	30 mM	Ethanol 70%	0,3 mM	

Les produits sont listés dans l'ordre de leur injection dans les cuves de l'oxygraphe. L'ADP, le cytochrome C, le FCCP et le TMPD ont été préparés extemporanément.

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel DatLab 6® (Oroboros Instrument). Les courbes obtenues représentent la diminution de la concentration d'oxygène dans la cuve réactionnelle au cours du temps. Après ajout d'un substrat ou inhibiteur, et une fois la pente stabilisée, la consommation d'oxygène conrrespondant à chaque état respiratoire a été déterminée.
Une fois les mesures terminées, les biopsies ont été séchées 30 min à 37°C puis pesées. Les valeurs des consommations d'oxygène ont été normalisées par rapport au poids sec des fibres musculaires déposées dans chaque cuve.

II. Microscopie

a. Microscopie optique / électronique

Les biopsies musculaires squelettiques fixées dans le tampon « TRUMP » ont été prises en charge par la Plateforme IBiSA de Microscopie Electronique de l'Université de Tours.
Elles ont été lavées dans du tampon phosphate, fixées par la suite dans du Tétroxyde d'Osmium, déshydratées dans des bains successifs d'éthanol à 50°, 70°, 90° et 100°, puis d'oxyde de propylène. Enfin, elles ont été inclues à l'épon.

Pour l'observation des fibres musculaires squelettiques en **microscopie optique**, les blocs ont été colorés au bleu de toluidine, le seul colorant capable d'entrer dans l'épon. Il permet ici de distinguer les fibres musculaires des vacuoles lipidiques inter myofibrillaires. Aussi, des coupes semi-fines de 1 µm ont été réalisées avec un histodiamant.
Pour l'analyse des biopsies musculaires en **microscopie électronique**, des coupes ultrafines ont été réalisées avec un diatome (couteau-diamant). Afin d'améliorer le contraste entre les différents organites cellulaires, les échantillons ont été exposés à un produit contenant des atomes lourds, tels que l'acétate d'uranyl et le citrate de plomb.

b. Immuno-histochimie et coloration histologique

Les biopsies musculaires squelettiques et de tissu adipeux, fixées dans le paraformaldéhyde, ont été prises en charge dans le service Anatomie et Cytologie pathologiques du CHRU de Tours - Hôpital Bretonneau (Pr. Fromont).
Après fixation, les biopsies ont été déshydratées dans des bains successifs avec des concentrations croissantes d'éthanol puis de xylène, avant d'être inclues en paraffine.
Pour la **coloration au Periodic Acid-Schiff (PAS)**, les coupes d'échantillons posées sur lames blanches ont été déparaffinées et réhydratées (par bains successifs de xylène, d'éthanol à des concentrations décroissantes et d'eau). Elles ont ensuite été mises en contact avec de l'acide périodique à 3% pendant 2 min, puis avec le réactif de Schiff pendant 15 min, avant d'être rincées à l'eau courante tiède. Une contre-coloration à l'hématoxyline a également été réalisée.
Pour le **marquage de l'UCP1**, l'anticorps polyclonal anti-UCP1 (ab155117, Abcam), dilué au 1/100ème a été utilisé. Le marquage a ensuite été révélé avec le kit de révélation ZytoChemPlus HRP Broad Spectrum DAB Kit (Diagomics).

III. Etude de l'expression génique par (RT-)qPCR

a. Principe

La technique de qPCR (« quantitative Polymerase Chain Reaction »), permet l'amplification et la détection de séquences cibles d'ADN, afin d'analyser l'expression de gènes d'intérêt. Elle est basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente, qu va s'intercaler dans l'ADN et permettre le suivi de la réaction d'amplification en temps réel.
Le mode opératoire décrit ci-après ne concerne que les biopsies musculaires squelettiques. Aucune extraction n'a pour l'instant été réalisée sur les biopsies de tissu adipeux.
Toutes les expériences ont été effectuées au sein même du laboratoire par un seul manipulateur.

b. Broyage des échantillons et extraction des acides nucléiques

Après macro-dissection, les fibres musculaires squelettiques destinées aux analyses de qPCR, ont été conservées dans du RNALater (ThermoFisher) à -20°C, comme conseillé sur la fiche-produit. Concernant le broyage des échantillons, les tests au sonicateur et au broyeur Potter se sont révélés infructueux. Aussi, toutes les biopsies ont été broyées à l'aide d'un cryobroyeur. L'appareillage comprend un système de refroidissement Cryolys (Bertin Instruments) et un homogénéisateur Precellys 24 (Bertin Instruments). L'azote liquide est utilisé pour le refroidissement de l'appareil pendant le processus d'homogénéisation. Pour un broyage efficace des fibres musculaires, un programme de 3 cycles de 25 secondes à 6800 tours/minute a été utilisé.

Les extractions d'ARN, ADN et Protéines à partir d'un même échantillon, ont été réalisées avec le kit NucleoSpin® TriPrep (Macherey-Nagel). Les fibres musculaires ont été broyées dans le tampon RP1 fourni avec le kit, à 1mL / 10 mg de fibres (en respectant un maximum de ~25mg de biopsie), puis lysées en ajoutant du β-mercaptoéthanol. ADN, ARN et protéines ont été purifiés en suivant le protocole fourni par le fournisseur puis conservés à -80°C.
Après extraction, ARN et ADN ont été dosés au spectrophotomètre (Epoch™ Microplate Spectrophotometer fourni avec le logiciel Gen5) pour vérifier leur pureté :

- A260 nm/A280 nm < 1,8 = contamination protéique
- A260 nm/A230 nm < 1,8 = contamination solvants

Lorsque celle-ci n'était pas suffisante, les échantillons étaient purifiés à nouveau en utilisant les kits NucleoSpin® gDNA Clean-up XS (pour l'ADN - Macherey-Nagel) et NucleoSpin® RNA Clean-up XS (pour l'ARN - Macherey-Nagel).

c. Rétrotranscription des ARN en ADN complémentaires (ADNc)

Le kit RT Reagent Kit (Takara - Ozyme) a été utilisé pour l'étape de rétrotranscription des ARN en ADNc. Les réactifs décrits dans le **Tableau 12** ont été mis en contact, puis le tube réactionnel a été conservé sous glace avant d'être rapidement placé dans le Thermocycler (Labcycler, SensoQuest). Quinze minutes à 37°C sont nécessaires pour la rétrotranscription puis 5 secondes à 85°C pour l'inactivation de l'enzyme. Les échantillons ont ensuite été refroidis et conservés à 4°C avant d'être immédiatement utilisés pour l'étape de qPCR.
La quantité d'ARN utilisée pour la réaction de rétrotranscription variait en fonction de la quantité d'ARN totaux extraite par biopsie et de celle nécessaire pour les analyses de qPCR. A noter qu'à partir de 500 ng d'ARN totaux, on obtenait 50 ng/µL d'ADNc.

Tableau 12 : Réactifs utilisés pour la rétrotranscription

Réactifs utilisés	Volume par réaction
PrimeScript™ Buffer 5X	2 µL
Oligo dT Primer 50 µM	0,5 µL
Random 6 mers 100 µM	0,5 µL
PrimeScript™ RT Enzyme Mix	0,5 µL
ARN totaux	Quantité souhaitée dans 6,5µL H_2O RNAse Free

d. Conception des amorces de qPCR

Les amorces de qPCR ont été définies en respectant les règles suivantes :

- Longueur de l'amorce : entre 18 et 22 paires de bases (pb).
- Longueur de l'amplicon : entre 80 et 150 pb.
- Température de fusion (Tm) de l'amorce : de préférence entre 52 à 58°C (pas au-delà de 65°C). Et pas plus de 5°C de différence (de préférence < 2°C) entre les Tm des deux amorces « forward » et « reverse ».
- Pourcentage de bases GC : entre 40 et 60% (de préférence 50%). Et pas plus de 3 bases G ou C dans les 5 dernières bases en 3' de l'amorce.

- « Gibbs Free Energy » (ΔG), l'énergie requise pour briser une structure secondaire, < -3 kcal/mol pour les structures en épingles à cheveux (« hairpin ») et -6 kcal/mol pour les auto- et cross-hybridations des primers.
- Pas plus de 4 répétitions successives de nucléotides et dinucléotides.

Ces règles permettent de s'assurer de la bonne amplication de l'amplicon au cours de la réaction de qPCR et de l'absence de formation de structure secondaire et d'hybridation stable au niveau des amorces, qui affecteraient considérablement la réaction de qPCR.

Lorsque le gène cible présentait plusieurs isoformes, l'amplicon était choisi dans une séquence commune à tous les isoformes.

Pour la conception et la vérification des séquences des amorces, plusieurs sites internet ont été utilisés (PCR Primer Stats; PREMIER Biosoft; Primer3Plus; Primer-Blast). Les oligonucléotides ont ensuite été commandés chez le fournisseur Sigma-Aldrich, avec une purification de type « Desalt ». Les séquences d'amorces sont listées dans les **Tableaux 13 et 14**.

Tableau 13 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR sur échantillons d'ADN

Gène cible	Identifiant de la séquence cible sur NCBI	Amorce « forward »	Amorce « reverse »
ND4	NC_012920.1	TGAACGCAGGCACATACTTC	TCTTGGGCAGTGAGAGTGAG
CO1	NC_012920.1	CTCTTCGTCTGATCCGTCCT	GAAGGTGGTGTTGAGGTTGC
TL1	NC_012920.1	CACCCAAGAACAGGGTTTGT	TGGCCATGGGTATGTTGTTA
β2M	NG_012920.2:5041-12401	CAAATTCAAACCCAGCCTGT	TCCTGCCTGGAACTCTCTGT
GAPDH	NG_007073.2:5027-8885	AATCCCATCACCATCTTCCA	AGCCACACCATCCTAGTTGC
NCOA3	NG_016810.1:5001-160021	TAGGCAGTTTGAGGGCATCT	AGCTTCCGTGTCATTCCATT

Tableau 14 : Séquences des amorces utilisées pour la qPCR sur échantillons d'ADNc

Gène cible	Identifiant de la séquence cible sur NCBI	Amorce « forward »	Amorce « reverse »
GRP78	NM_005347.4	GTCTACTATGAAGCCCGTCCA	CGAGCCACCAACAAGAACA
EDEM	NM_014674.2	TTGTCTCTGGGCAAACAGGT	ACAGGCAGGAAGAACTCACC
ATF4	NM_001675.4	GTTCTCCAGCGACAAGGCTA	TTGCTGTTGTTGGAGGGACT
CHOP	NM_001195053.1	TCTGATTGACCGAATGGTGA	TCTGGGAAAGGTGGGTAGTG
MuRF1	NM_032588.3	ACCAGGAGAAGGAAGCCAAC	CTGTGGGAAGGAATGAGAGC
MAFbx	NM_058229.4	CTGCCCTCAATAGCACACAA	ATTCTGGCGTAGCACAAACA
Perilipine 2	NM_001122.3	GTGTGAGATGGCAGAGAACG	CAATTTGCGGCTCTAGCTTC
Perilipine 3	NM_005817.4	CCACCAATGTGAAGGACCA	GAAGGAGTGGATGCTGGAAA
Perilipine 4	NM_001080400.1	AATGAGCAACTTCGGAGCAC	CACCGTGTGACTTTGGACAG
Perilipine 5	NM_001013706.2	CCACAAGCTGGGTTCTTCAC	TGATCCACCTGCCTCAGACT
PGC1α	NM_001330751.1	CCTGTGGATGAAGACGGATT	CAGGCATGGAGGAAGGACTA
MTFA	NM_003201.2	TTCCGAGTCGTTGGGACTAC	CCTGGGCAACATAGCAAGAT
NRF2	NM_006164.5	AGCCCAGTATCAGCAACAGC	CTGTGCTTTCAGGGTGGTTT
Mfn1	NM_033540.2	GTGGCACTTGCTGAAGGATT	TTCACTGCTGACTGCGAGAT
Mfn2	NM_014874.3	TGAGAGGCATCAGTGAGGTG	GCAGAACTTTGTCCCAGAGC
Opa1	NM_015560.2	AATCGGACCCAAGAACAGTG	ACTCCTCGGGATTCAAGGTT
Fis1	NM_016068.2	GGAGGACCTGCTGAAGTTTG	ACGATGCCTTTACGGATGTC
Mff	NM_001277061.1	TGGAAGAGGAGAACAAAGAACG	CCAGAGCCAGCTATTAAGCAG
Drp1	NM_012062.4	GGAACAGCGAGATTGTGAGG	CCTTTGGCACACTGTCTTGA

e. Protocole de qPCR

L'étape de qPCR a été réalisée par une ADN polymérase et suivie en temps réel grâce à la fluorescence émise par le TB Green (ou SYBR Green), lorsqu'il s'intercale dans le double brin d'ADN. Le mix TB Green Premix Ex Taq II (Takara - Ozyme) comprend l'ADN polymérase TaKaRa Ex Taq HS, les désoxyribonucléotides (dNTP), le Mg^{2+}, la Tli RNaseH, et le TB Green. Par échantillon et par gène cible, le mélange réactionnel préparé fut le suivant :

- 5 µL de TB Green 5X
- 0,5 µL de chaque amorce « forward » et « reverse » à 4 µM
- 10ng d'ADNc ou 4,5 ng d'ADN QSP 4 µL d'H_2O RNAse Free

Les échantillons ont été déposés manuellement en duplicats dans des plaques de qPCR 384 puits (Roche), la quantité d'ADNc ou d'ADN étant insuffisante pour un dépôt en triplicats. Un LightCycler® 480 Instrument (Roche) a été utilisé pour réaliser la qPCR suivant le protocole décrit dans le **Tableau 15**.

Tableau 15 : Protocole de qPCR

Etapes	Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (min:sec)
Activation de la polymérase	1	50	02:00
Dénaturation		95	02:00
	40	95	00:15
Hybridation des amorces		60	00:30
Elongation		72	00:10
Fusion	1	95	00:05
		65	01:00
Courbes de fusion	1	95	0,11°C/sec 5 acquisitions par °C
Fin	1	40	00:30

La température d'hybridation des amorces doit être légèrement au-dessus de leur température de fusion (Tm).

f. Validation de la qPCR

La spécificité des amorces a été vérifiée de deux manières :

- Avec les courbes de fusion de qPCR. Pour chaque couple d'amorces, un seul pic de fusion devait être observé, correspondant à un produit amplifié.
- En déposant les produits de qPCR sur gels d'agarose. Nos amplicons ayant une longueur comprise entre 80 et 150 pb, des gels standards à 2% d'agarose dilué dans un tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA), ont été utilisés. Pour permettre la polymérisation du gel, 0.006% de GelRed® (Nucleic Acid Gel Stain - Biotium) était ajouté. Les gels étaient ensuite transférés dans des cuves d'électrophorèse (Bio Rad). Vingt-cinq microlitres d'échantillon étaient déposés dans les puits : 2 x 10 µL de produits qPCR + 5 µL de Green GoTaq Reaction Buffer 5X (Promega). Ce tampon contient deux colorants (un bleu et un jaune) qui se séparent pendant l'électrophorèse pour suivre la progression de la migration. Sur chaque gel, 6 µL de marqueur de poids moléculaire (TrackIt™ DNA Ladder - Invitrogen) a également été déposé. L'électrophorèse a été réalisée pendant environ 1 heure à 60 volts après ajout du tampon TAE. La visualisation de la migration se faisait ensuite avec un appareil UV. Une bande correspondant à un amplicon à la taille attendue devait apparaître pour chaque échantillon déposé.

L'intégrité des ARN après chaque extraction a pu être vérifiée de cette manière en utilisant l'Actine B. Une seule bande propre devait apparaître après révélation du gel.

L'efficacité des amorces a été vérifiée en établissant une courbe d'étalonnage (« standard curve ») pour chaque couple d'amorces. Six concentrations ont été utilisées :

- de 20 ng à 1,25 ng pour l'ADNc avec des dilutions successives au demi + 0 ng
- de 9 ng à 0,56 ng pour l'ADN avec des dilutions successives au demi + 0 ng

Pour chaque concentration, le crossing point (Cp, équivalent au Ct) correspondant a été déterminé par qPCR, et la droite de régression des Cp en fonction du logarithme des concentrations a pu être construite.

L'efficacité d'un couple d'amorces est déterminée à partir de la pente de sa courbe d'étalonnage. Elle devait être comprise entre ~90% et 100% pour être validée.

g. Analyse des données

Les analyses de qPCR ont été réalisées à l'aide du logiciel LightCycler® 480 (v.1.5.0). L'expression génique de chaque gène cible a été déterminée par quantification absolue, en utilisant les courbes d'étalonnage comme référence. A partir des Cp obtenus en qPCR, il était alors possible de déterminer la quantité de transcrits du gène cible contenue dans chaque échantillon.

Partie 3 : Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism® pour Windows (v.6.01, La Jolla, Californie, États-Unis) et d'Excel XLSTATS® (v.2019.1.2, Addinsoft, Boston, États-Unis). Des tests de normalité omnibus D'Agostino & Pearson ont été réalisés afin de vérifier la distribution gaussienne normale des variables continues. Nous avons utilisé des tests non paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney (avec médiane et interquartile (IQR)) et des coefficients de corrélation de Spearman pour comparer des variables continues non normales. Pour les variables de distribution normale, nous avons utilisé des tests t paramétriques (avec moyenne et écart type (SD)) et des coefficients de corrélation de Pearson. Nous avons considéré que $p \leq 0,05$ était statistiquement significatif.

Chapitre III : Résultats

Partie 1 : Article

En révision mineure dans « Clinical Nutrition »

Pertes simultanées de tissu musculaire squelettique, de tissu adipeux, et de densité osseuse pendant un traitement chimiothérapeutique associé au bévacizumab chez des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique

Etude clinique STIC-Avastin (NCT00489697)

Concurrent losses of skeletal muscle mass, adipose tissue and bone mineral density during bévacizumab **/ cytotoxic chemotherapy treatment for metastatic colorectal cancer**

Adeline Dolly[1], Thierry Lecomte[2,3], Olivier Bouché[4], Christophe Borg[5], Eric Terrebonne[6], Jean-Yves Douillard[7], Romain Chautard[2,3], William Raoul[3], David Ternant[3,8], Julie Leger[9], Aurore Bleuzen[10], Jean-François Dumas[1*], Stéphane Servais[1*], Vickie E. Baracos[11]

[1] INSERM UMR1069, "Nutrition, Croissance et Cancer", University of Tours, France

[2] Department of Hepatogastroenterology and Digestive Oncology, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, 37044 Tours Cedex 09, France

[3] EA GICC 7501, University of Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France

[4] Department of Hepatogastroenterology, Hôpital Robert Debré, CHU de Reims, avenue Général Koenig, 51092 Reims Cedex, France

[5] Department of Medical Oncology, Hôpital Jean Minjoz, CHRU de Besançon, 3 Boulevard Alexandre Fleming, 25000 Besançon, France

[6] Department of Hepatogastroenterology and Digestive Oncology, Hôpital du Haut Lêvèque, CHU de Bordeaux, avenue Magellan, 33604 Pessac Cedex, France

[7] Department of Medical Oncology, ICO René Gauducheau, 44805 Saint-Herblain, France

[8] Department of Pharmacology & Toxicology, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours, CHRU de Tours, 37044 Tours Cedex 09, France

[9] INSERM CIC 1415, CHRU de Tours, CHRU de Tours, 37044 Tours Cedex 09, France

[10] Department of Radiology, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours, CHRU de Tours, 37044 Tours Cedex 09, France

[11] Department of Oncology, Division of Palliative Care Medicine, University of Alberta, Edmonton, Canada

* Both authors contributed equally to this manuscript.

Corresponding Author:

Dr Vickie Baracos

Division of Palliative Care Medicine,

Department of Oncology

University of Alberta

11560 University Avenue

Edmonton Alberta CANADA

Postal Code T6G 1Z2

Phone +1 780 432 8232; Fax +1 780 432 8425

vickie.baracos@ualberta.ca

Dr Stéphane Servais

Inserm UMR1069, Nutrition, Croissance et Cancer

Université de Tours

10, boulevard Tonnellé

37032 Tours, Cedex, France

Phone +33 2 47 36 75 24; Fax +33 2 47 36 62 26

stephane.servais@univ-tours.fr.

Main abbreviations:

BMD: Bone Mineral Density

EH: Extra-Hepatic

mCRC: metastatic Colorectal Cancer

SMM: Skeletal Muscle Mass

SMI: Skeletal Muscle Index

TAT: Total Adipose Tissue

ABSTRACT (303 words)

Background:

Changes in skeletal muscle mass (SMM), total adipose tissue mass (TAT) or bone mineral density (BMD) have been described in patients with cancer undergoing various treatments; simultaneous variations of all 3 tissues has not been reported.

Methods:

Data were prospectively collected in a clinical study (NCT00489697) including patients with liver metastases of colorectal cancer who received 4 cycles of bevacizumab in combination with cytotoxic chemotherapy. Computerized tomography (CT) at baseline and after chemotherapy was used to quantify skeletal muscle and adipose tissue cross-sectional areas, and mean lumbar spine BMD using validated approaches.

Results:

After exclusion of patients lacking adequate CT images or missing data, 72 subjects were included. Patients were 63% male, aged 63.2 ± 10.3 years, 100% had liver metastases and 54%, 24% and 22% respectively has 0, 1 and ≥ 2 extrahepatic metastases. 100% tolerated 4 cycles of treatment and none showed progressive disease at the end of treatment. The scan interval was 70 days (95% CI, 62.3 to 80.5). Thresholds for loss of tissue were defined as loss ≥ measurement error. 10% of patients showed no loss of any tissue and a further 43% lost one tissue (SMM, TAT or BMD); 47% of patients lost 2 tissues (16.5% lost SMM + TAT, 8% lost SMM + BMD, 10% lost TAT + BMD) or all 3 tissues (12.5%). Catabolic behavior (2 or 3 tissue loss *vs* 0 or 1 tissue loss) associated with disease burden, including unresectable primary tumor (p=0.010), presence of extrahepatic (EH) metastases (p=0.039) and number of EH metastases (p=0.004). No association was found between the number of tissues lost and treatment response, which was uniformly high, or treatment toxicity, which was uniformly low.

Conclusion:

Multiple tissues can be measured in routine CT images and these show considerable inter-individual variation. Substantial losses in some individuals appears to associate with disease burden.

28 **Keywords (up to 6):** Bone Mineral Density, Body Composition, Cancer, Chemotherapy, CT-Scan,
29 Skeletal Muscle

INTRODUCTION

Using diagnostic, staging or follow-up CT-Scans, skeletal muscle mass (SMM) change in patients with cancer has been investigated, especially in gastrointestinal and lung cancers. Muscle loss occurs in patients on platinum-[1–4], taxane- or fluoropyrimidine-based treatments [3,5,6], and various regimens of neoadjuvant/adjuvant treatment [7,8]. In metastatic colorectal cancer (mCRC), with bevacizumab ± oxaliplatin- or irinotecan-based combination chemotherapy, an overall decrease in SMM was observed within 2 to 6 months of treatment [9–12], except in one recent study where it remained unchanged [13] (**Table 1**). Various patterns have emerged concerning adipose tissue (AT) during cancer treatment. Alongside a decrease of SMM, Nattenmüller *et al.* observed an increase of all AT compartments (total, visceral, subcutaneous and intermuscular) after different regimens of 1st line-chemotherapy in lung cancer patients [3], while Awad *et al.* found that patients with oesophagogastric cancer lost SM and fat mass after neoadjuvant platinum-based chemotherapy [4]. Concurrent losses of SM and AT were also observed in other studies [1,2,8,14].

Bone Mineral Density (BMD) loss is considered an issue in gynecological and breast cancers in pre- and post-menopausal women at risk for osteoporosis. BMD is generally assessed by Dual- energy X-ray absorptiometry (DXA) in the lumbar spine, hip and/or femoral neck. Patients on a variety of cancer treatments showed significant loss of BMD [15–19] (**Table 2**), which was at least partly prevented with calcium and vitamin D supplementation [20]. While muscle and fat are often studied together, investigations of BMD are entirely separate, without attention to soft tissue behavior. Investigations in which multiple tissue losses have been followed concurrently are very few. Kazemi-Bajestani *et al.* found concurrent losses of muscle, fat and left ventricular mass in non-small cell lung cancer patients on carboplatin-based 1st line therapies [1].

There is experimental data to suggest interactions among changes in muscle, bone and fat described above. Specific catabolic and anabolic effector molecules may have common effects on these tissues, or may participate in cross-talk between them. Bidirectional interactions between muscle and bone are suggested [21,22]. In the context of cancer with bone metastases, osteolysis induces the secretion of activin and TGFβ, mediators of muscle proteolysis [23]. Conversely, secretion of IL-15 by muscle seems

to increase bone mineral content [24]. The NF-κB pathway has also been identified as being able to regulate both muscle and bone catabolism [25]. While AT secretes adipokines that may have a direct effect on muscle metabolism [26], release of myokines from muscle, such as IL-6 and IL-15, may disrupt AT metabolism [27]. These signals are part of a reciprocal regulation loop between SMM and AT [28]. Lastly, specific chemotherapy-induced tissue losses have been described in skeletal [29], respiratory and cardiac muscle [30], subcutaneous, abdominal fat [31] as well as BMD [32].

We aimed to evaluate the evolution of muscle mass, adipose tissue and BMD in a population of patients with mCRC treated with bevacizumab and cytotoxic chemotherapy. We hypothesized that simultaneous variations of SM, AT and BMD occur, affected by both cancer treatment and the disease itself, and are associated with poor treatment response and toxicity.

Table 1. Recent studies describing evolution of skeletal muscle and adipose tissue in colorectal cancer

Author, year	Cancer, Population	Chemotherapy	Length of measurements	Body composition's findings measurements
Antoun *et al.* 2019 [13]	CRC Metastatic *N* = 76 (50% ♂)	XELIRI or FOLFIRI	2 and 4 months of treatment follow-up	57 patients with follow-up CT-Scans. No significant change in weight, SMM and VAT during the 4 months of follow-up. Decrease in women only, in SMD between 2 and 4 months (-6.8 HU, p=0.012), and SAT after 4 months (-15.4 cm^2/m^2, p=0.03).
Sasaki *et al.* 2019 [9]	CRC Metastatic *N* = 219 (65% ♂)	Combination chemotherapy regimen containing mFOLFOX6, FOLFIRI, Bévacizumab, XELOX, SOX or XELIRI	3 and 6 months after systemic chemotherapy administration	31 patients / 142 (22%) with > 9% SMM loss at 3 months. 21 patients / 87 (24%) with > 9% SMM loss at 6 months. No difference regarding VFA and SFA between patients with or without SMM loss.
Kurk *et al.* 2018 [10]	CRC Metastatic *N* = 450 (63% ♂)	Capecitabine + oxaliplatin + bévacizumab	Median interval: 4.3 months (IQR: 4.0 to 4.5) 6 cycles initial of treatment	Decrease in SMM (-0.69 kg, 95% CI, -1.11 to -0.26) and body weight (-0.05 kg, 95% CI, -0.54 to 0.45) Using 2% as cutoff value, 43% of patients lost SMM, 24% were stable and 33% gained SMM.
Blauwhoff-Buskermolen *et al.* 2016 [11]	CRC Stage IV *N* = 67 (63% ♂)	Capecitabine ± oxaliplatin, irinotecan, bévacizumab or Irinotecan or FU + oxaliplatin ± bévacizumab	Median interval: 78 days (IQR: 67 to 92) Before and during treatment CT-Scans	Decrease in SMA in both men and women by 6.1% (95% CI, -8.4 to -3.8, p<0.001) Significant decrease of body weight in women by 4.4% (95% CI, -8.5 to -0.4, p=0.031) but not in men
Poterucha *et al.* 2012 [12]	CRC Metastatic *N* = 57 (53% ♂)	Bévacizumab for all patients + FU + oxaliplatin + leucovorin or irinotecan-based regimen or capecitabine or 5-FU + leucovorin	Within 3 months of starting chemotherapy	Overall decrease in body weight and SMA. Mean body weight on the first and second CT-Scans were 85 kg (SD, 19) and 83 (SD, 19) respectively (p=0.002). 22 patients gained weight. Mean SMA on the first and second CT-Scans were 148 cm^2 (SD, 38) and 145 cm^2 (SD, 39) respectively (p=0.02). 24 patients gained SMA.
Lieffers *et al.* 2009 [14]	CRC Metastatic *N* = 34 (65% ♂)	Any 1st, 2nd or 3rd line regimen	Year of death, 12, 10, 6 and 1.5 months to death	One month from death, concurrent losses of muscle (4.2 kg) and fat (3.5 kg) (p<0.05) were observed, as well as increase in liver weight (0.74 kg, p=0.010).

CRC: Colorectal Cancer; 5-FU: 5-Fluorouracil; FOLFIRI: 5-Fluorouracil plus Leucovorin plus Irinotecan; mFOLFOX6: 5-Fluorouracil plus Leucovorin plus modified Oxaliplatin; SOX: S-1 plus Oxaliplatin; XELIRI: Capecitabine plus Irinotecan; XELOX: Capecitabine plus Oxaliplatin. CI: Confidence Interval; HU: Hounsfield Unit; SD: Standard Deviation; SFA: Subcutaneous Fat Area; SMA: Skeletal Muscle Area; SMD: Skeletal Muscle Density; SMM: Skeletal Muscle Mass; VFA: Visceral Fat Area

Table 2. Recent studies describing evolution of bone mineral density in women with in Gynecological or Breast cancers

Author, year	Cancer, Population	Chemotherapy	Length of measurements	Body composition's findings measurements
Lee *et al.* 2016 [15]	Gynecological cancer Ovarian: Stage Ic to IV Uterine endometrial: Stage Ia to IV Cervical Stage: Ib to IV *N* = 118 Pre and post-menopausal	Adjuvant Radiation therapy or chemotherapy Including platinum-based	12 months after treatment DXA	Loss of femur neck and lumbar spine BMD T-scores in the Uterine Endometrial cancer subgroup.
Monroy-Cisneros *et al.* 2016 [20]	Breast cancer Stage I to IIIb *N* = 40 Pre and post-menopausal	Neoadjuvant, adjuvant FAC, FEC, FAC+P, FA, DAC ± radiotherapy	6 months of treatment DXA	Loss of femoral neck (-0.018 g/cm^2, 95%CI, -0.026 to -0.011) and lumbar spine BMD (-0.048 g/cm^2, 95%CI -0.063 to -0.033) (both p<0.001) Protective effect of calcium + vitamin D supplementation on femoral neck BMD
Oostra *et al.* 2015 [16]	Breast cancer with ovarian failure Stage I, II *N* = 40 Pre-menopausal	Adjuvant Cyclophosphamide + methotrexate + fluorouracil Cyclophosphamide + doxorubicin ± fluorouracil or paclitaxel	6 and 12 months after treatment DXA	Loss of lumbar spine BMD (median at baseline: 0.993 g/cm^2, 6 months: 0.976 g/cm^2, 12 months: 0.937 g/cm^2 both p<0.001)
Cameron *et al.* 2010 [17]	Breast cancer Early-stage *N* = 41 Pre-menopausal	Adjuvant CMF, AC, A, E, FEC-T, EC-T, TACT, TANGO	6 and 12 months after treatment DXA	Loss of lumbar spine BMD (mean at baseline: 1.05 ± 0.02 g/m^2, 6 months: 1.01 ± 0.02 g/m^2, 12 months: 1.00 ± 0.02 g/m^2 both p<0.001)
Hui *et al.* 2010 [18]	Gynecological cancer (ovarian, endometrial, cervical) *N* = 40	Platinum-based Taxane-based ± radiotherapy	7 and 12 months after initial course of treatment CT-Scans	Loss of lumbar spine and femoral neck vBMD after chemotherapy (-15.9% ±5.67 and -10.4% ± 4.06 respectively)
Hadji *et al.* 2009 [19]	Breast cancer Non metastatic *N* = 53 Pre-menopausal	Doxorubicin /cyclophosphamide	6 and 12 months after treatment DXA	Loss of lumbar spine (-5.17%, p=0.001), total hip (-4.02%, p=0.001) and femoral neck (-2.79%, p=0.02) BMD at 12 months from baseline

A: Doxorubicin; AC: Doxorubicin plus Cyclophosphamide; CMF: Cyclophosphamide plus Methotrexate plus 5-Fluorouracil; DAC: Docetaxel plus Adriamicin plus Cyclophosphamide; E: Epirubicin; EC-T: Epirubicin plus Cyclophosphamide, followed by Paclitaxel; FA: 5-Fluorouracile plus Adriamicin (plus Cyclophosphamide: FAC, plus Paclitaxel: FAC+P); FEC: 5-Fluorouracil plus Epirubicin plus Cyclophosphamide (followed by Docetaxel: FEC-T); TACT: Taxotere as Adjuvant Chemotherapy Trial; TANGO: tAnGo trial (Paclitaxel-containing, Epirubicin-based chemotherapy). BMD: Bone Mineral Density; vBMD: Volumetric BMD; DXA: Dual- energy X-ray absorptiometry

PATIENTS AND METHODS

Study design and patients

Data were prospectively collected in a French multicenter, non-randomized study designed to evaluate whether contrast-enhanced ultrasound imaging predicts the efficacy of bevacizumab on colorectal cancer with hepatic metastases (mCRC) (STIC-Avastin, NCT00489697) [33], sponsored by the University Hospital of Tours. This study was in accordance with the code of ethics of the World Medical Association. Patients were enrolled between January 2007 and December 2010, with follow-up until December 2012. Inclusion criteria were: adult patients with histologically confirmed colorectal tumor with hepatic metastases; starting 1st line treatment bevacizumab-based chemotherapy; life expectancy > 2 months; World Health Organization (WHO) performance status ≤ 2; absence of major surgery within 28 days of starting bevacizumab. Exclusion criteria included no hepatic lesion detected by conventional ultrasonography, prior chemotherapy for metastatic colorectal cancer (adjuvant chemotherapy was permitted if terminated for more than 6 months), cardiac disease and any contraindication to bevacizumab treatment. Eligible patients received bevacizumab plus chemotherapy (chosen at the clinician's discretion: single-agent fluoropyrimidine or fluoropyrimidine plus oxaliplatin or irinotecan) until disease progression or unacceptable toxicity occurred, according to the investigator's assessment. The bevacizumab dose was 5 mg/kg body weight every 2 weeks (5-FU-based regimens) or 7.5 mg/kg every 3 weeks (capecitabine-based regimens).

CT-Scan analyses

Computerized tomography (CT) studies were done to evaluate tumor response according to RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) criteria [34]; these scans were also used to determine body composition. CT analysis of the lumbar (L3) muscle area has been thoroughly validated [35–37]. Assessments were made on CT images as specified in the study protocol, at baseline (within 2 weeks of before and at two months after the start of bevacizumab-based chemotherapy [33]). One axial image at the 3rd lumbar vertebra was selected for analysis of total muscle and fat cross-sectional areas (cm2) [36–39]. CT image parameters included: contrast-enhanced, 2 to 5 mm slice thickness, 120 kVp, and

~200 to 400 mA. Contrast alters tissue radiodensity [40,41] and thus only contrast- enhanced images were included and these were typically in porto-venous phase. Observers were blinded to the patients' treatment status. Tissues were identified anatomically and quantified within pre-specified Hounsfield unit (HU) ranges [39]: muscle (−29 to +150 HU); subcutaneous fat (-190 to -30 HU); visceral fat (-150 to -50 HU) using Slice-O–Matic software (v.5.0; Tomovision, Magog, Canada). Total muscle and fat cross-sectional areas (cm2) were computed. Cross-sectional area of total muscle was normalized for stature, and skeletal muscle index (SMI; cm2/m2) was calculated [36,37]. We used validated cut points for sarcopenia [42]: SMI < 43 or 53 cm2/m2 for men with BMI respectively below or over 25 kg/m2; SMI < 41 cm2/m2 for all women. Patients with a SMI below these cut-points were considered sarcopenic.

Mean lumbar spine Bone Mineral Density (BMD) from 1st to 3rd lumbar vertebrae was assessed. For each vertebra, we selected two to four consecutive images and used a phantom-less calibration technique [43,44] to assess spine BMD. This method is based on known linear attenuation coefficients of subcutaneous adipose tissue and paraspinal muscle that can be used as internal reference standards to convert the mean trabecular bone CT attenuation and give a BMD estimation in mg/cm3 [43,44]. With the ROI manager in ImageJ software (ImageJ 1.52h; Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), three elliptical Regions of Interest (ROI) were placed in the subcutaneous adipose tissue, the paraspinal muscle and the body trabecular bone (**Figure 1**). The ROI size was constant from one patient to another, they were manually positioned according to patient morphology. CT number for each tissue ROI corresponding to the peak of a normal Gaussian distribution was collected and the BMD value was calculated. We found a mean intra-observer coefficient of variation of 8% for BMD in a random sample of 40 patients. STIC Avastin investigation was not originally planned to include analyses of BMD. Therefore, the phantom-less technique was performed as described in several studies [43,44].

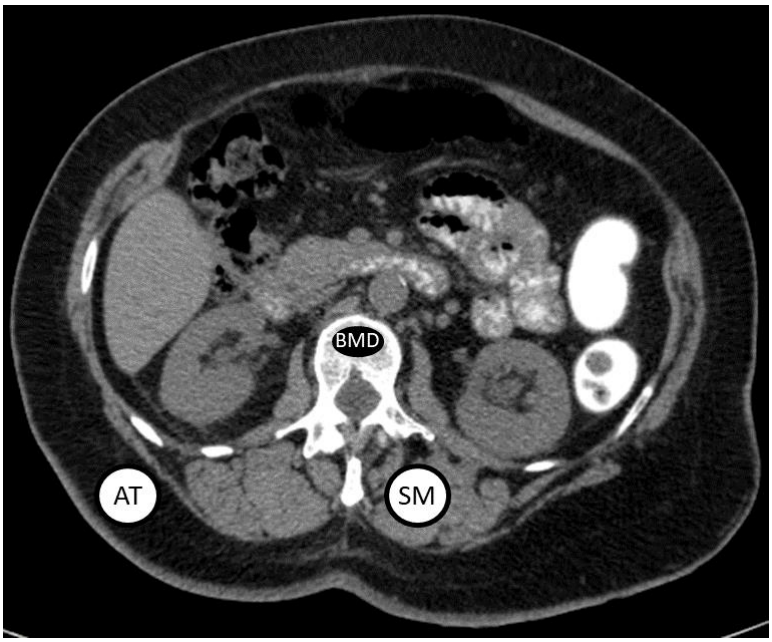


FIGURE 1. Phantom-less calibration technique to estimate spine Bone Mineral Density. Manual placement of the Regions of Interest of the subcutaneous adipose tissue, the paraspinal muscle and the body trabecular bone.

AT: Adipose Tissue; BMD: Bone Mineral Density; SM: Skeletal Muscle

To address this limitation and confirm our BMD data, we collected a calibration external reference phantom for 4 CT-scanners available in CHRU of Tours: SIEMENS SOMATON Force, SIEMENS SOMATON Definition AS+, GE Discovery CT750 HD and TOSHIBA B15. We used an external phantom containing several density plugs and created for each CT-Scanner, a calibration curve which maps CT attenuation in HU to bone mineral density in mg/cm3. This method is called asynchronous quantitative computed tomography (QCT) [45–48]. We observed no significant difference between these 4 CT-Scanners (data not shown). Once again, since the analysis of BMD was secondary in STIC Avastin study, no external reference phantom was used with the CT-Scanners of the study. Therefore, we used the calibration curves obtained with the QCT Scans mentioned above to assess spine BMD for each patient. We then compared these data to those obtained with the phantom-less calibration technique.

Men and women with a BMD below 120 mg/cm3 were considered osteopenic [49].

Treatment response and survival

Tumor response to chemotherapy was evaluated by means of CT-scans at baseline and follow-up. Best treatment response was assessed using RECIST guidelines [34], as complete response: disappearance of all lesions; partial response: at least a 30% decrease in the sum of diameters of metastases, compared to baseline sum diameters; stable disease: between 20% increase and 30% decrease; progressive disease: at least a 20% increase in the sum of diameters of metastases, compared to the smallest sum on study. Overall Survival (OS) was defined as the time from first infusion of bevacizumab-based chemotherapy until death. If a patient didn't meet this outcome, (s)he was censored at the date of the last known follow-up visit.

Toxicity monitoring

The primary goal of STIC Avastin investigation was to evaluate the pharmacodynamics of bevacizumab. Data regarding toxicity of cytotoxic chemotherapy were not collected. Patients were evaluated for adverse events attributable to bevacizumab [50,51]: Hypertension, Proteinuria, Low level of Hemoglobin, Hemorrhage, Epitaxis, Cardiac Ischemia, Heart Failure, Thrombosis / Embolism, Arterial Thrombosis, Wound Healing, Cerebral Ischemia, Gastrointestinal Perforation. This was done according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE), version 3.0 [52]. They were monitored at the first day of every chemotherapy cycle (every two or three weeks) until 2 months from baseline, and every two to three months afterwards until the end of the first-line bevacizumab-based chemotherapy (maximum 12 long-term follow-ups). We included grade 1-3 toxicities. Grade ≥ 3 adverse events were not frequent enough to narrow down the analysis.

Other analysis

Blood samples were collected 1 to 8 days before the first bevacizumab infusion. Baseline Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) plasma concentrations were measured for each patient with an ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), as described in Caulet *et al.* 2016 [53].

Statistics

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software for Windows (v.6.01, La Jolla, California, USA) and Excel XLSTATS by Addinsoft (v.2019.1.2, Boston, USA). D'Agostino & Pearson omnibus normality tests were performed to test for normal Gaussian distribution of continuous variables. We used nonparametric Wilcoxon-Mann-Whitney tests (with median and interquartile range (IQR)) and univariate Spearman correlations coefficients to compare non-normal continuous variables. For variables with a normal distribution, we used parametric t tests (with mean and standard deviation (SD)) and univariate Pearson correlations coefficients. We considered $p \leq 0.05$ to be statistically significant.

Regression analysis were performed to test associations between tissues lost both individually and collectively during chemotherapy and parameters including baseline patients' characteristics, hematological clinical parameters, tumor growth and treatment toxicity.

Survival analyses were performed using Excel XLSTATS by Addinsoft (v.2019.1.2, Boston, USA). We plotted percent survival at each time with Kaplan-Meier survival curves and compared them with log-rank tests. Median survival was defined as the time at which the survival curve crosses 50% survival, even if data from some subjects were censored.

RESULTS

Of 137 patients who participated in the STIC-AVASTIN investigation, 72 were included in the current analysis (**Figure 2**). The main reasons for exclusion were missing or inadequate CT-Scan, including 6 patients excluded from analysis of BMD, owing to technical artefact in the images (n=52) and failure to complete the treatment plan (n= 7).

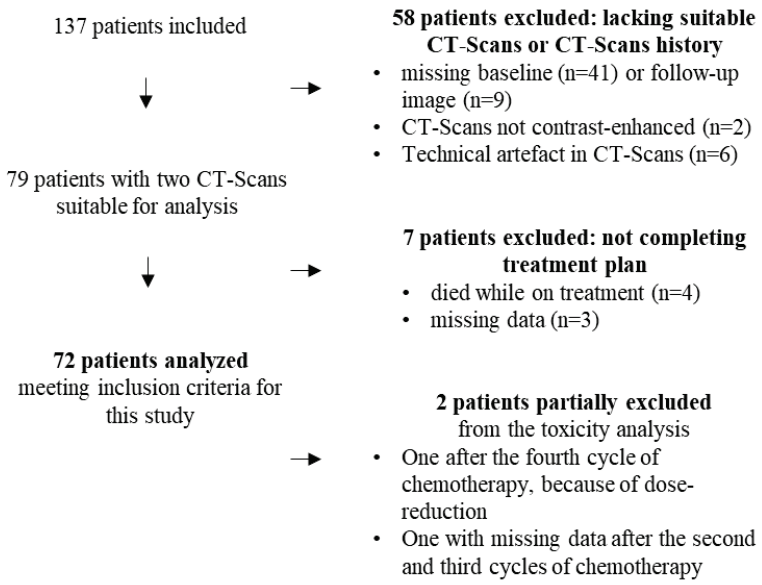


FIGURE 2. Flow-chart showing patient selection. The main reason for exclusion was lack of CT scans or CT scans not suitable due to artefact or lack of contrast enhancement. Seven patients did not complete the treatment plan i.e. 4 cycles of bevacizumab-based chemotherapy.

Baseline characteristics

Patient characteristics are described in **Table 3**. Overall, 62.5% of the participants were men and the mean age was 63.2 ± 10.3 years. The majority of patients had primary tumor localized in colon (76%) and 60% had had their primary tumor resected; 40% had measurable extra-hepatic (EH) metastases, which were mainly localized in peritoneum, lung and lymph nodes (for respectively 18%, 32% and 32% of EH-metastatic patients). No bone metastases was measurable in any patient.

The most common chemotherapy was FOLFIRI (irinotecan with infusional leucovorin (LV) and 5-fluorouracil (5-FU)), for 65% of the cohort. Another 10% received FOLFOX (oxaliplatin with LV and 5-FU) and the remaining 25% received several different regimens of chemotherapy (**Table 3**). A single male participant was taking treatment for osteoporosis: bisphosphonate zoledronic acid (Zometa©), in association with his chemotherapy regimen. Since the analysis of BMD was not planned when STIC Avastin study was designed, no data regarding patients' medication history that might affect BMD was available.

Expected differences in body composition were observed between men and women (Table 3). Compared to men, women had lower BMI (22.9 ± 3.9 kg/m2 *versus* 25.1 ± 3.6 kg/m2, p=0.019), SM area (97.5 ± 13.9 cm2 *versus* 148.8 ± 23.8 cm2, p<0.0001) and SMI (37.4 ± 5.3 cm2/m2 *versus* 49.3 ± 7.2 cm2/m2, p<0.0001). Sarcopenia was present in 68% of patients. No significant difference observed for TAT area, or BMD. A quarter of patients were considered osteopenic at baseline.

208 **TABLE 3. Patient characteristics (N=72).**

Characteristic	Men (n=45)			Women (n=27)			*p* value
	No. (%)	Mean Median	SD IQR	No. (%)	Mean	SD	
Age, years		64.2	10.5		61.4	9.8	0.255
Primary tumor							0.778
Colon	35 (78)			20 (74)			
Rectum	10 (22)			7 (26)			
Resection of the primary tumor							0.329
Yes	29 (64)			14 (52)			
No	16 (36)			13 (48)			
Sum of diameters of hepatic metastases, mm		100	50 to 184		114	76	0.833
Measurable extra-hepatic metastases							
Number of metastases							0.099
None	24 (54)			19 (70)			
1	11 (24)			7 (26)			
≥ 2	10 (22)			1 (4)			
Localization							0.198
Peritoneum	3 (7)			3 (11)			
Lung	11 (24)			2 (8)			
Lymphadenopathy	11 (24)			2 (8)			
Other	3 (7)			1 (4)			
Vascular endothelial growth factor (n=69), µg/L		263	81 to 425		253	229	0.280
WHO performance status (n=70)							0.087
0	24 (54)			9 (33)			
1	19 (42.5)			16 (59)			
2	0			2 (8)			
Combined chemotherapy							0.762
FOLFIRI	28 (62)			19 (70)			
FOLFOX	5 (11)			2 (8)			

Others	12 (27)			6 (22)			
BMI category, kg/m²		25.1	3.6		22.9	3.9	0.019
Underweight (< 18.5)	1 (2)			4 (15)			
Normal weight (18.5 to 24.9)	21 (47)			16 (59)			
Overweight (25 to 29.9)	18 (40)			6 (22)			
Obese (> 30)	5 (11)			1 (4)			
Body composition parameters							
Skeletal muscle Area (cm^2)		148.8	23.8		97.5	13.9	< 0.0001
Skeletal muscle Index (cm^2/m^2)		49.3	7.2		37.4	5.3	< 0.0001
Sarcopenic patients	28 (62)			21 (78)			0.201
Visceral adipose Area (cm^2)		154.0	101.7		82.1	70.0	0.002
Subcutaneous adipose Area (cm^2)		111.2	75.4 to 151.0		158.8	76.8	0.025
Total adipose Area (cm^2)		285.4	153.1		252.8	139.6	0.369
Bone mineral density (mg/cm^3)		152.0	119.1 to 173.1		150.0	38.2	0.892
Osteopenic patients	12 (27)			7 (26)			1.000

209 Values are expressed as mean ± SD or median with interquartile range (IQR).

210 FOLFOX: oxaliplatin + infusional 5-Fluorouracil (5-FU) + leucovorin (LV). FOLFIRI: irinotecan + 5-FU + LV. Others: LV5FU2 (5-FU + LV); FOLFOXIRI

211 (oxaliplatin + irinotecan + 5-FU + LV); Irinotecan + raltitrexed; FOLFOX + bisphosphonate zoledronic acid (Zometa©); Campto© (Irinotecan)

Bone Mineral density measurements methodical equivalence

Correlations of spine BMD measurements estimated with the phantom-less calibration technique and asynchronous QCT technique showed that BMD values were highly correlated at both baseline (Spearman, $p<0.0001$, r=0.992) and after chemotherapy (Pearson, $p<0.0001$, r=0.992) (**Figure 3**).

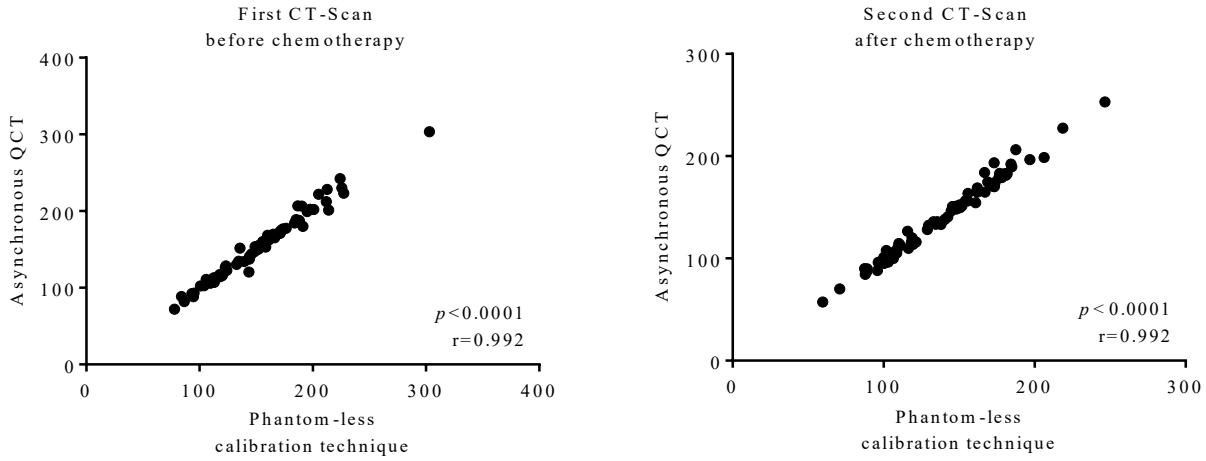
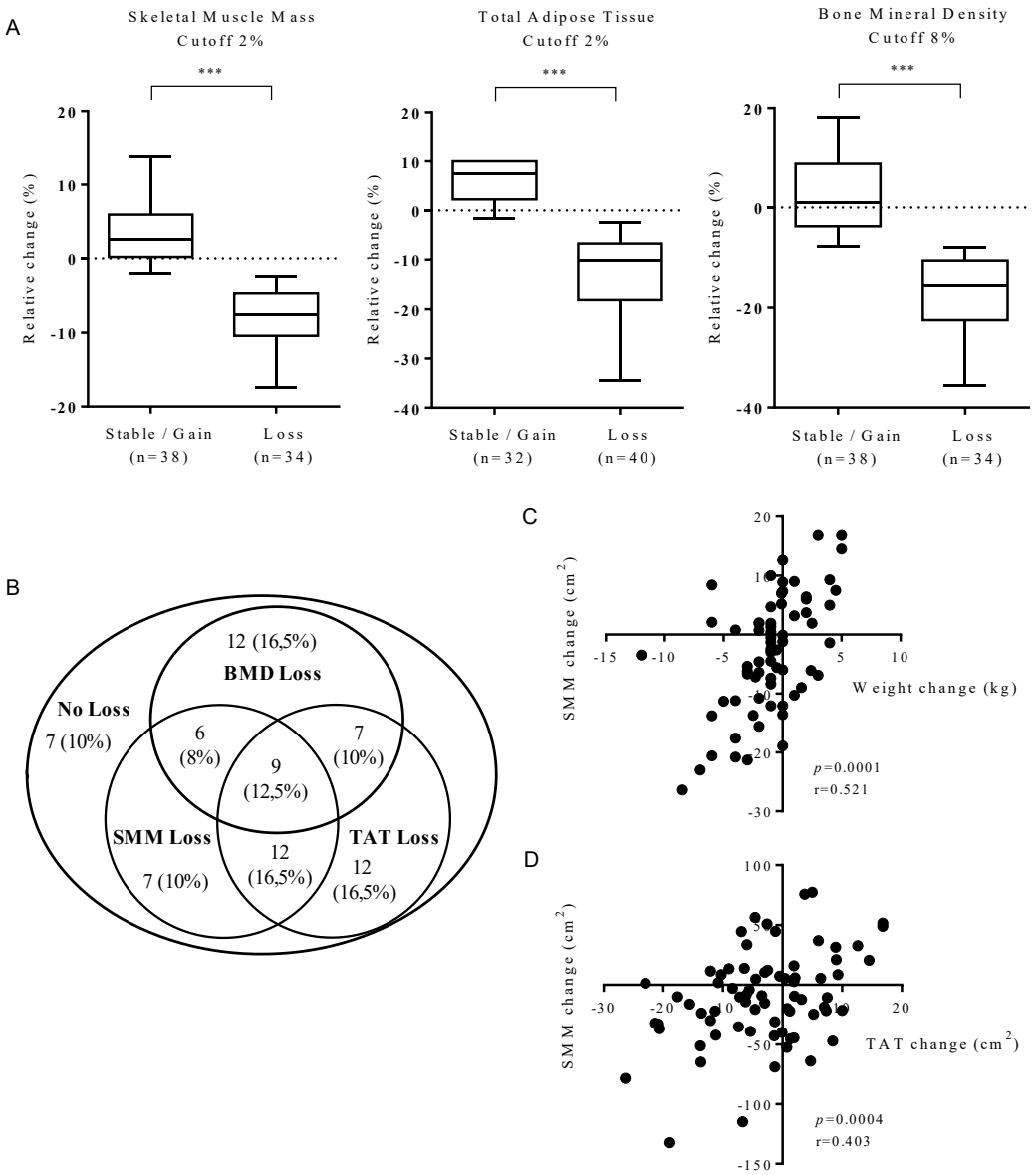


FIGURE 3. Validation of the Phantom-less calibration technique to estimate Bone Mineral Density. Correlations of lumbar bone mineral density estimated with the phantom-less calibration technique and asynchronous QCT technique, (A) at baseline and (B) after chemotherapy (n=72).

Changes in Muscle Mass, Fat Mass and BMD

The 72 patients included all reached the 2nd time point and had a CT-scan with a median duration interval of 70 days (95% CI, 62.3 to 80.5). Data for change over time were normalized to 70 days. For each tissue, patients who experienced tissue loss greater than the measurement error (2% for SMM and TAT [54], and 8% for BMD), were categorized as tissue losers. Other patients were categorized as stable/gaining tissue over time. Tissue loss distribution is illustrated according to these categories in **Figure 4A**. Tissue losses resulted in 3 men becoming sarcopenic, and 5 men and 3 women becoming osteopenic. Half of patients who were sarcopenic at baseline had further reduction in muscle mass during treatment, while 42% of patients who were osteopenic at baseline had further decrease in BMD.

Tissue losses were frequently simultaneous, as illustrated by a Venn diagram in **Figure 4B** which displays the overlap of patients with SMM, TAT and BMD losses. Ten percent of 72 patients showed no loss of any tissue and 43% showed isolated loss of a single tissue, with no predominance of any tissue in particular (16.5% lost SMM, 16.5% lost TAT and 10% lost BMD). By contrast, a subset (12.5% of patients) showed concomitant loss of SMM, TAT and BMD; the remaining 34.5% lost two tissues: 16.5% lost SMM + TAT, 8% lost SMM + BMD and 10% lost TAT + BMD. **Figure 4C** illustrates correlation between change in skeletal muscle *versus* change in body weight over 4 cycles of treatment. These were moderately correlated (Spearman r-value 0.521, $p<0.001$). Likewise, in **Figure 4D** the correlation between change of muscle and change of fat over time was significant but with very modest Pearson r-value of 0.403. Mean muscle radiodensity, a parameter related to survival in patients with solid tumors [42], did not show variation over time (data not shown).



239 **FIGURE 4. Tissue losses over time** (A) Individual tissue losses. Relative change of skeletal muscle mass
240 (SMM), total adipose tissue (TAT) and bone mineral density (BMD) during treatment. Patients with
241 positive or stable tissue change over time are compared with patients who encountered tissue loss ≥ to
242 the measurement error for each tissue (2% for SMM and TAT, and 8% for BMD) ($p<0.0001$). (B)
243 Concurrent tissue losses. Venn diagram showing the overlap of patients with SMM, TAT and BMD
244 losses superior to the measurement error for each tissue. (C) Spearman correlation of muscle change
245 over time *versus* body weight change. (D) Pearson correlation of muscle change over time *versus* total
246 adipose tissue change over time.

Predictors of concurrent tissue loss

We conducted bivariate regression analysis comparing patients with concomitant loss of SMM, TAT and BMD, or two of these tissues, with those having lost none or a single tissue (**Table 4**). Tumor characteristics associated with the number of tissues lost. A higher percentage of patients with 2 or 3 tissues, still had the primary tumor in place (56% *versus* 26%, p=0.010) and presented extra-hepatic (EH) metastases (53% *versus* 29%, p=0.039), compared to patients with none or 1 tissue lost. The greater the number of EH-metastases, the greater the number of tissues lost (p=0.004). Serum VEGF levels, which reflect tumor mass, tend to associate with the number of tissues lost (p=0.060). However, no difference was found regarding patients' age and sex.

Treatment response data are summarized in **Table 4**. We found no association between best tumor response to chemotherapy and the number of tissues lost. Therefore, change in diameter of identified hepatic metastases was not associated with the number of tissues lost. Among the 72 patients included, only one had an increase in tumor size (progressive disease) at two months from baseline.

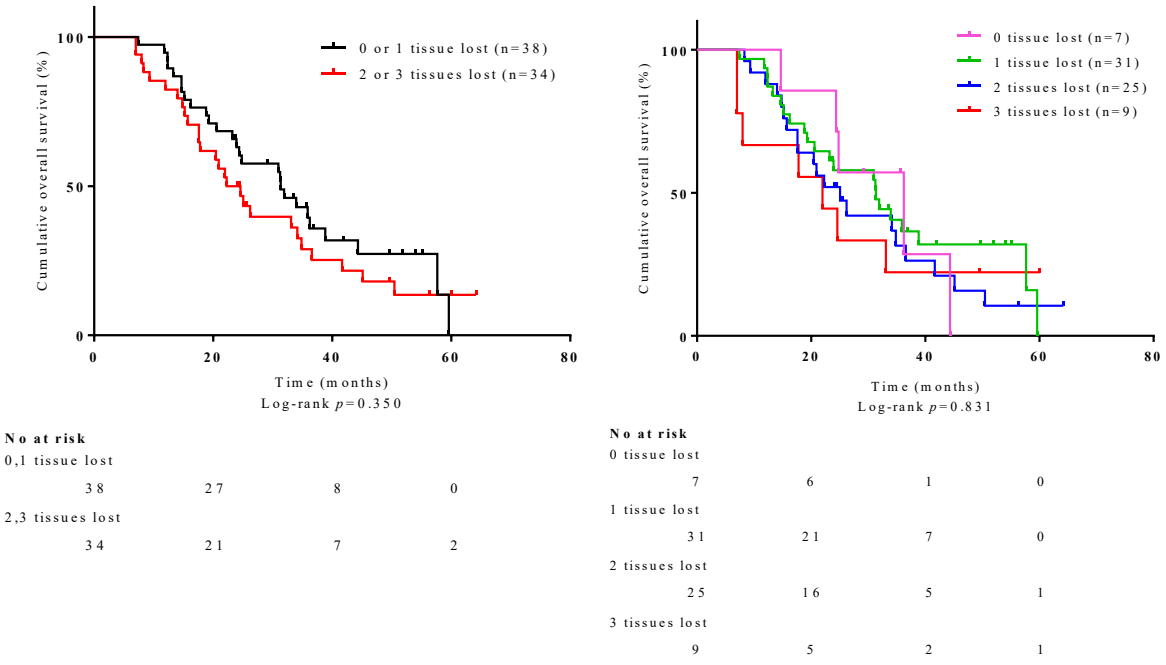
TABLE 4. Predictive factors of muscle, fat and bone loss.

Predictors	0 or 1 tissue loss (n=38)			2 or 3 tissues loss (n=34)			*p* value
	No. (%)	Mean Median	SD IQR	No. (%)	Mean Median	SD IQR	
Patients characteristics							
Age, years		64.1	9.9		62.1	10.7	0.406
Sex							0.185
Men	21 (55)			24 (71)			
Women	17 (45)			10 (29)			
VEGF (n=69), µg/L		194	56 to 324		287	106 to 511	0.060
Tumor mass							
Primary colorectal tumor resected	28 (74)			15 (44)			0.010
Presence of extra-hepatic metastases	11 (29)			18 (53)			0.039
Number of extra-hepatic metastases							0.004
1	9 (24)			9 (26)			262
≥ 2	2 (5)			9 (26)			263
Best treatment response							0.853
Complete response	8 (21)			6 (18)			
Partial response	19 (50)			17 (50)			
Stable disease	9 (24)			11 (32)			
Progressive disease	1 (2.5)			0			
Non-evaluable	1 (2.5)			0			

Values are expressed as mean ± standard deviation (SD) or median with interquartile range (IQR).

Secondary analyses

Secondary analyses were performed to detect potential association of the number of tissues lost with overall survival and toxicities. These analyses can be regarded as exploratory, owing to limited sample size. Median overall survival didn't differ when comparing patients with zero or one tissue lost (n=38, 34.1 months, 95% CI, 28.2 to 40.0) *vs.* patients with any two or three tissues lost (n=34, 28.5 months, 95% CI, 22.5 to 34.5, log-rank p=0.350) (**Figure S1**).



SUPPLEMENTARY FIGURE 1. Survival analyses by number of tissues lost, performed using Kaplan–Meier curves and log–rank tests. There was no difference between patients with zero or one tissue lost *vs.* patients with any two or three tissues lost (log-rank *p*=0.350).

We found no association between the frequency of toxicities, attributable to bevacizumab, and the number of tissues lost (**Table S1**). Patients experienced toxicities with maximum grade 3. Most frequent adverse events were hypertension, low levels of hemoglobin and epitaxis (data not shown).

	Number of patients who experienced toxicities				Chi-square *p* value
	None No. (%)	Maximum grade 1 No. (%)	Maximum grade 2 No. (%)	Maximum grade 3 No. (%)	
After the first cycle					0.681
0 or 1 tissue lost (n=38)	30 (79)	5 (13)	3 (8)	0	
2 or 3 tissues lost (n=34)	25 (73.5)	7 (20.5)	2 (6)	0	
After the second cycle					0.320
0 or 1 tissue lost (n=38)	28 (74)	8 (21)	2 (5)	0	
2 or 3 tissues lost (n=33)	20 (61)	8 (24)	4 (12)	1 (3)	
After the third cycle					0.047
0 or 1 tissue lost (n=38)	25 (66)	12 (31)	1 (3)	0	
2 or 3 tissues lost (n=33)	18 (55)	8 (24)	7 (21)	0	
After the fourth cycle					0.118
0 or 1 tissue lost (n=38)	32 (84)	5 (13)	1 (3)	0	
2 or 3 tissues lost (n=33)	22 (67)	6 (18)	4 (12)	1 (3)	

281

Cumulative toxicities (4 cycles of treatment)	Sum of Grade 1	Sum of Grade 2	Sum of Grade 3	*p* value
0 or 1 tissue lost	35	8	0	0.072
2 or 3 tissues lost	35	18	2	

282 **SUPPLEMENTARY TABLE 1. Toxicities, attributable to bevacizumab, experienced by patients,**
283 **by number of tissues lost.** Adverse events evaluated included hypertension, proteinuria, low level of
284 hemoglobin, hemorrhage, epitaxis, cardiac ischemia, heart failure, thrombosis / embolism, arterial
285 thrombosis, wound healing, cerebral ischemia, gastrointestinal perforation. At the first chemotherapy
286 cycle, all patients received the full dose of bevacizumab in combination with chemotherapy. Only one
287 patient was dose-reduced afterwards, at the fourth cycle of chemotherapy, and therefore excluded from
288 the analysis.

DISCUSSION

Oncologic images have begun to be exploited secondarily, to extract information on body composition mainly including the mass and change over time of skeletal muscle and adipose tissues. Here, this is the first study to add CT-defined bone mineral density, and show that patients with colorectal cancer may show changes over time in these tissues individually or collectively. Changes in muscle, bone and fat during anti-cancer therapy show considerable inter-individual variation with substantial losses of one or more tissues in some individuals.

Methodological considerations

This was a secondary analysis of a clinical trial (STIC Avastin, NCT00489697), allowing us to present data on patients with uniform cancer site and stage and under a currently used treatment for this disease. The study included detailed assessments of treatment response, adverse events and CT imaging. Our study is similar in this regard to that of Kazemi-Bajestani *et al.* [1] in which a well-defined population of patients with metastatic non-small cell lung cancer treated with carboplatin-based therapies was evaluated for body composition changes over time. We used standardized assessments of CT muscle and fat that are accepted and widely used [35–39]. We additionally extracted mean lumbar spine bone mineral density from CT images; this has not previously been reported in conjunction with muscle and adipose tissue changes in any oncological patient population.

A limitation of our study is that the STIC Avastin investigation was not originally planned to include analyses of bone mineral density, and for that reason a reference phantom was not included in the imaging protocol. There are currently 3 techniques for studying bone mineral density on CT-Scanners, two of which use a reference phantom:

a) Synchronous quantitative computed tomography (QCT) in which a phantom is placed directly under the subject during the scan [48];

b) Asynchronous QCT in which an external reference phantom is used. The use of an external phantom is currently often employed thanks to greater stability of x-ray output by modern CT-scanners. Several studies have shown a very good equivalence of BMD measurements obtained with DXA and

asynchronous QCT [47], as well as synchronous and asynchronous QCT [46]. These methods should be considered for future, prospectively conducted studies.

c) Phantom-less technical calibration. The phantom-less calibration technique is based on known linear attenuation coefficients of subcutaneous adipose tissue and paraspinal muscle that can be used to estimate BMD [43,44]. This method can, however be affected by scanner instability, contrast injection, presence of fat within bone marrow or skeletal muscle, beam hardening artefacts and patient metal artifacts [51,52,55]. To address this limitation, we compared asynchronous QCT and phantom-less calibration technique across 4 CT-Scanners of different brands available in CHRU of Tours, with CT images at baseline and after chemotherapy, confirming our results and increasing our confidence in this technique.

While this analysis included a homogenous population of clinical trial-eligible subjects, sample size was constrained by missing or inadequate CT images for analysis and this was particularly limiting for subgroup analyses. Larger studies are required to confirm our findings.

Muscle, bone and fat loss

Cancer associated weight loss has generally been considered as loss of skeletal muscle and adipose tissue [35], without consideration of other organs. Yet a series of recent studies in animals [56] and clinically in patients with non-small cell lung cancer [1], or lung, pancreatic, and gastro-intestinal cancers [57], point to a pronounced atrophy of cardiac muscle. Experimental studies also suggest that colorectal cancer may be accompanied by bone loss in addition to muscle and fat wasting [58,59]. While the idea of a broader participation of multiple organs and tissues is developing [60], and changes in lumbar, hip and/or femoral neck bone density during cancer treatments have been highlighted several times in recent clinical studies [15–20], concurrent changes of muscle, adipose tissue and bone mineral density have not been assessed clinically.

In colorectal cancer patients with metastatic disease under bevacizumab-based chemotherapy treatment, we assessed changes in muscle mass, fat mass and BMD over an interval of 70 days. There is well known inter-individual variation in loss of muscle and fat over time in patients during cancer therapy

[1–4,8]. We likewise noted tissue losses, as well as stable tissue mass and even a small degree of tissue gain in some individuals. Here, we classified each tissue as stable (within measurement error)/gained versus loss. Mean tissue loss in the losers was substantial (SMM –8.1%, SD 4.1; TAT –13.3%, SD 8.7; BMD –17.4%, SD 7.5), and it would be of interest to determine if these losses aggravated over time. As shown in Table 1, the average time interval between the two CT-Scans to examine changes in skeletal muscle and adipose tissues during anti-cancer treatments is ~3 to 4 months, while measurements of lumbar, hip and/or femoral neck BMD by DXA scans are commonly performed at 6 and 12 months after treatment. However, in our study we showed that significant changes in lumbar bone mineral density can already be observed within a relatively short period of time of ~70 days.

Around half of patients lost at least two tissues (16.5% lost SMM + TAT, 8% lost SMM + BMD and 10% lost TAT + BMD) and concurrent losses of skeletal muscle mass, total adipose tissue and bone mineral density were observed for 12.5% of patients. The drivers of this catabolic behavior remain to be fully elucidated. CRP, a well-known biomarker of cancer-associated wasting [1] was not available for patients in this sample and in future studies inflammatory catabolic effectors as well as molecules thought to be involved in bone-muscle-fat crosstalk would merit assessment.

We did not note any sexual dimorphism in the tissue losses described here. At baseline, we didn't see any sex difference in lumbar BMD. This result is consistent with other studies that have found little to no difference in lumbar BMD between the sexes in older men and women [55,61].

Our patients had very limited severity of bevacizumab related toxicity, and this toxicity was not related to multiple tissue loss. We did not have access to toxicity data from the concurrent cytotoxic chemotherapy, as this was not part of the original intention of the study, and this is a limitation. However, the majority of patients (68%) in this investigation had body composition features that correspond to the low risk category for toxicity of cytotoxic therapies as described by Ali *et al.* [62] so we could make the inference that there might have been little dose-limiting toxicity owing to the cytotoxic therapy in the current study. In Kazemi *et al.* study, simultaneous loss of skeletal muscle, cardiac muscle and adipose tissue was significantly related to progressive disease during therapy [1], however all patients in the STIC AVASTIN study had good disease control (stable disease or complete or partial response), so this

potential driver of catabolic behavior was absent here. Our results do suggest that catabolism of multiple tissues is a manifestation of a more advanced disease, as it was associated with a higher burden of hepatic and extrahepatic metastases, as well as tumor biomarker VEGF.

CONCLUSIONS

We demonstrated that lumbar trabecular bone mineral density data could be extracted from standard oncologic CT images and that combined with measures of skeletal muscle area and total adipose tissue area, it could give a more complete view of patient's body composition. We showed considerable inter-individual variation with substantial losses of muscle, fat masses and BMD in some individuals, speaking to a generalized catabolic state in a limited duration interval, which appears to be associated with disease burden. Further studies are necessary to confirm and extend our results. These would ideally be conducted with a phantom during CT imaging and longer term studies of tissue evolution would be helpful in revealing the appearance of sarcopenia and osteopenia in patients with colorectal cancer.

REFERENCES

[1] Kazemi-Bajestani SMR, Becher H, Butts C, Basappa NS, Smylie M, Joy AA, et al. Rapid atrophy of cardiac left ventricular mass in patients with non-small cell carcinoma of the lung. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2019. https://doi.org/10.1002/jcsm.12451.

[2] Palmela C, Velho S, Agostinho L, Branco F, Santos M, Santos MPC, et al. Body Composition as a Prognostic Factor of Neoadjuvant Chemotherapy Toxicity and Outcome in Patients with Locally Advanced Gastric Cancer. J Gastric Cancer 2017;17:74–87. https://doi.org/10.5230/jgc.2017.17.e8.

[3] Nattenmüller J, Wochner R, Muley T, Steins M, Hummler S, Teucher B, et al. Prognostic Impact of CT-Quantified Muscle and Fat Distribution before and after First-Line-Chemotherapy in Lung Cancer Patients. PloS One 2017;12:e0169136. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169136.

[4] Awad S, Tan BH, Cui H, Bhalla A, Fearon KCH, Parsons SL, et al. Marked changes in body composition following neoadjuvant chemotherapy for oesophagogastric cancer. Clin Nutr Edinb Scotl 2012;31:74–7. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.08.008.

[5] Goncalves MD, Taylor S, Halpenny DF, Schwitzer E, Gandelman S, Jackson J, et al. Imaging skeletal muscle volume, density, and FDG uptake before and after induction therapy for non-small cell lung cancer. Clin Radiol 2018;73:505.e1-505.e8. https://doi.org/10.1016/j.crad.2017.12.004.

[6] Choi Y, Oh D-Y, Kim T-Y, Lee K-H, Han S-W, Im S-A, et al. Skeletal Muscle Depletion Predicts the Prognosis of Patients with Advanced Pancreatic Cancer Undergoing Palliative Chemotherapy, Independent of Body Mass Index. PloS One 2015;10:e0139749. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139749.

[7] Benjamin AJ, Buschmann MM, Zhang SQ, Wroblewski K, Kindler HL, Roggin KK, et al. The impact of changes in radiographic sarcopenia on overall survival in older adults undergoing different treatment pathways for pancreatic cancer. J Geriatr Oncol 2018;9:367–72. https://doi.org/10.1016/j.jgo.2018.03.002.

[8] Daly LE, Ní Bhuachalla ÉB, Power DG, Cushen SJ, James K, Ryan AM. Loss of skeletal muscle during systemic chemotherapy is prognostic of poor survival in patients with foregut cancer. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2018;9:315–25. https://doi.org/10.1002/jcsm.12267.

[9] Sasaki S, Oki E, Saeki H, Shimose T, Sakamoto S, Hu Q, et al. Skeletal muscle loss during systemic chemotherapy for colorectal cancer indicates treatment response: a pooled analysis of a multicenter clinical trial (KSCC 1605-A). Int J Clin Oncol 2019. https://doi.org/10.1007/s10147-019-01460-8.

[10] Kurk SA, Peeters PHM, Dorresteijn B, de Jong PA, Jourdan M, Kuijf HJ, et al. Impact of different palliative systemic treatments on skeletal muscle mass in metastatic colorectal cancer patients. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2018;9:909–19. https://doi.org/10.1002/jcsm.12337.

[11] Blauwhoff-Buskermolen S, Versteeg KS, de van der Schueren MAE, den Braver NR, Berkhof J, Langius JAE, et al. Loss of Muscle Mass During Chemotherapy Is Predictive for Poor Survival of Patients With Metastatic Colorectal Cancer. J Clin Oncol 2016;34:1339–44. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.6043.

[12] Poterucha T, Burnette B, Jatoi A. A decline in weight and attrition of muscle in colorectal cancer patients receiving chemotherapy with bevacizumab. Med Oncol Northwood Lond Engl 2012;29:1005–9. https://doi.org/10.1007/s12032-011-9894-z.

[13] Antoun S, Bayar MA, Dyevre V, Lanoy E, Smolenschi C, Ducreux M. No evidence for changes in skeletal muscle mass or weight during first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer. BMC Cancer 2019;19:847. https://doi.org/10.1186/s12885-019-6086-2.

[14] Lieffers JR, Mourtzakis M, Hall KD, McCargar LJ, Prado CM, Baracos VE. A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and

tumor mass to whole-body energy demands123. Am J Clin Nutr 2009;89:1173–9. https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27273.
[15] Lee SW, Yeo SG, Oh I-H, Yeo JH, Park DC. Bone mineral density in women treated for various types of gynecological cancer. Asia Pac J Clin Oncol 2016;12:e398–404. https://doi.org/10.1111/ajco.12584.
[16] Oostra DR, Lustberg MB, Reinbolt RE, Pan X, Wesolowski R, Shapiro CL. Association of osteoprotegerin and bone loss after adjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer. Mol Cell Endocrinol 2015;402:51–6. https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.028.
[17] Cameron DA, Douglas S, Brown JE, Anderson RA. Bone mineral density loss during adjuvant chemotherapy in pre-menopausal women with early breast cancer: is it dependent on oestrogen deficiency? Breast Cancer Res Treat 2010;123:805–14. https://doi.org/10.1007/s10549-010-0899-7.
[18] Hui SK, Khalil A, Zhang Y, Coghill K, Le C, Dusenbery K, et al. Longitudinal assessment of bone loss from diagnostic computed tomography scans in gynecologic cancer patients treated with chemotherapy and radiation. Am J Obstet Gynecol 2010;203:353.e1-7. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.001.
[19] Hadji P, Ziller M, Maskow C, Albert U, Kalder M. The influence of chemotherapy on bone mineral density, quantitative ultrasonometry and bone turnover in pre-menopausal women with breast cancer. Eur J Cancer Oxf Engl 1990 2009;45:3205–12. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.09.026.
[20] Monroy-Cisneros K, Esparza-Romero J, Valencia ME, Guevara-Torres AG, Méndez-Estrada RO, Anduro-Corona I, et al. Antineoplastic treatment effect on bone mineral density in Mexican breast cancer patients. BMC Cancer 2016;16:860. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2905-x.
[21] Waning DL, Guise TA. Cancer-associated muscle weakness: What's bone got to do with it? BoneKEy Rep 2015;4:691. https://doi.org/10.1038/bonekey.2015.59.
[22] Cianferotti L, Brandi ML. Muscle–bone interactions: basic and clinical aspects. Endocrine 2014;45:165–77. https://doi.org/10.1007/s12020-013-0026-8.
[23] Regan JN, Trivedi T, Guise TA, Waning DL. The Role of TGFβ in Bone-Muscle Crosstalk. Curr Osteoporos Rep 2017;15:18–23. https://doi.org/10.1007/s11914-017-0344-5.
[24] Quinn LS, Anderson BG, Strait-Bodey L, Stroud AM, Argilés JM. Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;296:E191-202. https://doi.org/10.1152/ajpendo.90506.2008.
[25] Kandarian S. The molecular basis of skeletal muscle atrophy--parallels with osteoporotic signaling. J Musculoskelet Neuronal Interact 2008;8:340–1.
[26] Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. ISRN Inflamm 2013;2013:139239. https://doi.org/10.1155/2013/139239.
[27] Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Therapeutic potential of interleukin-15: a myokine involved in muscle wasting and adiposity. Drug Discov Today 2009;14:208–13. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.10.010.
[28] Argilés JM, López-Soriano J, Almendro V, Busquets S, López-Soriano FJ. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? Med Res Rev 2005;25:49–65. https://doi.org/10.1002/med.20010.
[29] Damrauer JS, Stadler ME, Acharyya S, Baldwin S, Couch ME, Guttridge DC. Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF-κB and cancer cachexia. 2008.
[30] Ibrahim MA, Bakhaat GA, Tammam HG, Mohamed RM, El-Naggar SA. Cardioprotective effect of green tea extract and vitamin E on Cisplatin-induced cardiotoxicity in mice: Toxicological, histological and immunohistochemical studies. Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother 2019;113:108731. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108731.

[31] Biondo LA, Batatinha HA, Souza CO, Teixeira AAS, Silveira LS, Alonso-Vale MI, et al. Metformin Mitigates Fibrosis and Glucose Intolerance Induced by Doxorubicin in Subcutaneous Adipose Tissue. Front Pharmacol 2018;9:452. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00452.
[32] Ponnapakkam T, Katikaneni R, Nichols T, Tobin G, Sakon J, Matsushita O, et al. Prevention of chemotherapy-induced osteoporosis by cyclophosphamide with a long-acting form of parathyroid hormone. J Endocrinol Invest 2011;34:e392-397. https://doi.org/10.3275/7864.
[33] Tranquart F, Dujardin P-A, Bouché O, Marcus C, Borg C, Manzoni P, et al. Value of Contrast-Enhanced Ultrasound Quantification Criteria for Identifying Patients not Responding to Bevacizumab-Based Therapy for Colorectal Liver Metastases. Ultraschall Med Stuttg Ger 1980 2018;39:544–58. https://doi.org/10.1055/s-0043-122497.
[34] Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer Oxf Engl 1990 2009;45:228–47. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026.
[35] Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet Oncol 2011;12:489–95. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7.
[36] Prado CMM, Lieffers JR, McCargar LJ, Reiman T, Sawyer MB, Martin L, et al. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. Lancet Oncol 2008;9:629–35. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70153-0.
[37] Mourtzakis M, Prado CMM, Lieffers JR, Reiman T, McCargar LJ, Baracos VE. A practical and precise approach to quantification of body composition in cancer patients using computed tomography images acquired during routine care. Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab 2008;33:997–1006. https://doi.org/10.1139/H08-075.
[38] Shen W, Punyanitya M, Wang Z, Gallagher D, St-Onge M-P, Albu J, et al. Total body skeletal muscle and adipose tissue volumes: estimation from a single abdominal cross-sectional image. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 2004;97:2333–8. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00744.2004.
[39] Mitsiopoulos N, Baumgartner RN, Heymsfield SB, Lyons W, Gallagher D, Ross R. Cadaver validation of skeletal muscle measurement by magnetic resonance imaging and computerized tomography. J Appl Physiol Bethesda Md 1985 1998;85:115–22. https://doi.org/10.1152/jappl.1998.85.1.115.
[40] van Vugt JLA, Coebergh van den Braak RRJ, Schippers HJW, Veen KM, Levolger S, de Bruin RWF, et al. Contrast-enhancement influences skeletal muscle density, but not skeletal muscle mass, measurements on computed tomography. Clin Nutr Edinb Scotl 2018;37:1707–14. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.07.007.
[41] Rollins KE, Javanmard-Emamghissi H, Awwad A, Macdonald IA, Fearon KCH, Lobo DN. Body composition measurement using computed tomography: Does the phase of the scan matter? Nutr Burbank Los Angel Cty Calif 2017;41:37–44. https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.02.011.
[42] Martin L, Birdsell L, Macdonald N, Reiman T, Clandinin MT, McCargar LJ, et al. Cancer cachexia in the age of obesity: skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol 2013;31:1539–47. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2722.
[43] Gudmundsdottir H, Jonsdottir B, Kristinsson S, Johannesson A, Goodenough D, Sigurdsson G. Vertebral bone density in icelandic women using quantitative computed tomography without an external reference phantom. Osteoporos Int 1993;3:84–9. https://doi.org/10.1007/BF01623378.
[44] Boden SD, Goodenough DJ, Stockham CD, Jacobs E, Dina T, Allman RM. Precise measurement of vertebral bone density using computed tomography without the use of an external reference phantom. J Digit Imaging 1989;2:31–8. https://doi.org/10.1007/BF03168013.

[45] Brown JK, Timm W, Bodeen G, Chason A, Perry M, Vernacchia F, et al. Asynchronously Calibrated Quantitative Bone Densitometry. J Clin Densitom 2017;20:216–25. https://doi.org/10.1016/j.jocd.2015.11.001.
[46] Wang L, Su Y, Wang Q, Duanmu Y, Yang M, Yi C, et al. Validation of asynchronous quantitative bone densitometry of the spine: Accuracy, short-term reproducibility, and a comparison with conventional quantitative computed tomography. Sci Rep 2017;7:6284. https://doi.org/10.1038/s41598-017-06608-y.
[47] Pickhardt PJ, Bodeen G, Brett A, Brown JK, Binkley N. Comparison of femoral neck BMD evaluation obtained using Lunar DXA and QCT with asynchronous calibration from CT colonography. J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom 2015;18:5–12. https://doi.org/10.1016/j.jocd.2014.03.002.
[48] Shepherd JA, Schousboe JT, Broy SB, Engelke K, Leslie WD. Executive Summary of the 2015 ISCD Position Development Conference on Advanced Measures From DXA and QCT: Fracture Prediction Beyond BMD. J Clin Densitom Off J Int Soc Clin Densitom 2015;18:274–86. https://doi.org/10.1016/j.jocd.2015.06.013.
[49] American College of Radiology. American College of Radiology. ACR-SPR-SSR Practice Parameter for the Performance of Quantitative Computed Tomography (QCT) Bone Densitometry (Amended 2014 Resolution 39) Reston, Va, USA: American College of Radiology. 2008.
[50] Brandes AA, Bartolotti M, Tosoni A, Poggi R, Franceschi E. Practical Management of Bevacizumab-Related Toxicities in Glioblastoma. The Oncologist 2015;20:166–75. https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0330.
[51] Randall LM, Monk BJ. Bevacizumab toxicities and their management in ovarian cancer. Gynecol Oncol 2010;117:497–504. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.02.021.
[52] CTCAE. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) | Protocol Development | CTEP n.d. https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm (accessed June 23, 2019).
[53] Caulet M, Lecomte T, Bouché O, Rollin J, Gouilleux-Gruart V, Azzopardi N, et al. Bevacizumab Pharmacokinetics Influence Overall and Progression-Free Survival in Metastatic Colorectal Cancer Patients. Clin Pharmacokinet 2016;55:1381–94. https://doi.org/10.1007/s40262-016-0406-3.
[54] MacDonald AJ, Greig CA, Baracos V. The advantages and limitations of cross-sectional body composition analysis. Curr Opin Support Palliat Care 2011;5:342–9. https://doi.org/10.1097/SPC.0b013e32834c49eb.
[55] Naganathan V, Sambrook P. Gender differences in volumetric bone density: a study of opposite-sex twins. Osteoporos Int 2003;14:564–9. https://doi.org/10.1007/s00198-003-1422-3.
[56] Olivan M, Springer J, Busquets S, Tschirner A, Figueras M, Toledo M, et al. Theophylline is able to partially revert cachexia in tumour-bearing rats. Nutr Metab 2012;9:76. https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-76.
[57] Barkhudaryan A, Scherbakov N, Springer J, Doehner W. Cardiac muscle wasting in individuals with cancer cachexia. ESC Heart Fail 2017;4:458–67. https://doi.org/10.1002/ehf2.12184.
[58] Pin F, Barreto R, Kitase Y, Mitra S, Erne CE, Novinger LJ, et al. Growth of ovarian cancer xenografts causes loss of muscle and bone mass: a new model for the study of cancer cachexia. J Cachexia Sarcopenia Muscle 2018;9:685–700. https://doi.org/10.1002/jcsm.12311.
[59] Bonetto A, Kays JK, Parker VA, Matthews RR, Barreto R, Puppa MJ, et al. Differential Bone Loss in Mouse Models of Colon Cancer Cachexia. Front Physiol 2016;7:679. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00679.
[60] Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, Busquets S. Inter-tissue communication in cancer cachexia. Nat Rev Endocrinol 2018;15:9–20. https://doi.org/10.1038/s41574-018-0123-0.
[61] Faulkner RA, McCulloch RG, Fyke SL, De Coteau WE, McKay HA, Bailey DA, et al. Comparison of areal and estimated volumetric bone mineral density values between older men and women. Osteoporos Int 1995;5:271–5. https://doi.org/10.1007/BF01774017.

[62] Ali R, Baracos VE, Sawyer MB, Bianchi L, Roberts S, Assenat E, et al. Lean body mass as an independent determinant of dose-limiting toxicity and neuropathy in patients with colon cancer treated with FOLFOX regimens. Cancer Med 2016;5:607–16. https://doi.org/10.1002/cam4.621.

Acknowledgments:

Authors thank F. Tranquart, J. Drouillard, F. Patat, C. Roussel, PA. Dujardin, A. Fourmy, A. Fayault (INSERM CIC 1415, CHRU de Tours), C. Labbe-Devilliers (Department of Radiology, ICO René Gauducheau, Saint-Herblain, France), Olivier Lucidarme (Department of Radiology, Hôpital Pitié-Salpétrière, APHP, Paris, France), Jean-Pierre Tasu (Department of Radiology, CHU de Poitiers, France), Sylvain Manfredi (Department of Hepatogastroenterology and Digestive Oncology, CHU de Rennes, France), Christophe Aubé (Department of Radiology, CHU d'Angers, France), Hervé Trillaud (Department of Diagnostic and Interventional Imaging, CHU de Bordeaux, France), Philippe Manzoni (Department of Radiology, CHRU de Besançon, France), Claude Marcus (Department of Radiology, CHU de Reims, France), and Céline Desvignes (University of Tours and Department of Pharmacology & Toxicology, CHRU of Tours, France).

Funding:

This work was supported by INCa (Institut National du Cancer) and by the French Higher Education and Research Ministry under the program "Investissements d'avenir" Grant Agreement: LabEx MAbImprove ANR-10-LABX-53-01. A. Dolly was supported by Research French Ministry and "Société Française de Nutrition Clinique et Métabolisme (SFNCM, Exceptional Research Price). VE. Baracos received financial support from the Canadian Institutes of Health Research and the Alberta Cancer Foundation.

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest

Individual author's contribution:

T. Lecomte was the principal investigator of STIC-Avastin study.

Inclusion of patients: T. Lecomte, O. Bouché, C. Borg, E. Terrebonne, J-Y. Douillard

Collection and assembly of data: R. Chautard, W. Raoul, D. Ternant, J. Léger, A. Bleuzen

CT image body composition analysis: A. Dolly

Data analysis and interpretation: A. Dolly, VE. Baracos, T. Lecomte, S. Servais, JF. Dumas

Manuscript writing: A. Dolly, VE. Baracos, T. Lecomte, S. Servais, JF. Dumas

Manuscript editing and proofreading: All authors

Final approval of manuscript: All authors.

Partie 2

Etude de la structure et du métabolisme des fibres musculaires squelettiques chez des patients atteints d'un cancer pancréatique ou colorectal dans le contexte de la cachexie cancéreuse

Protocole clinique METERMUCADIG (NCT02573974)

I. Hypothèses et objectifs

Bien que les résultats des études cliniques divergent, il semble que des altérations de la structure des fibres musculaires, des voies de la protéolyse et de la synthèse protéique, du métabolisme lipidique (accumulation de vacuoles lipidiques), du métabolisme mitochondrial (surface et dynamique mitochondriales, ADN mitochondrial, chaîne respiratoire), ou encore du RE / RS (stress du RE / RS) puissent participer à la fonte musculaire des patients porteurs d'un cancer et cachectiques. Par ailleurs, les classifications de la cachexie cancéreuse utilisées dans les études sont hétérogènes, il y a des disproportions au niveau du nombre d'hommes et de femmes dans les groupes de patients cachectiques et non cachectiques, et les effectifs sont souvent très faibles. Des études cliniques supplémentaires sont donc indispensables pour comprendre les altérations structurelles et métaboliques sous-jacentes à la fonte musculaire squelettique caractéristique de la cachexie cancéreuse.

Les vacuoles lipidiques peuvent être à l'origine de la production d'intermédiaires lipidiques toxiques dont l'accumulation pourrait entraîner une augmentation de la protéolyse via la voie UPS. Dans ces circonstances, une accumulation lipidique intramusculaire pourrait aussi entrainer des dysfonctions du métabolisme mitochondrial. Inversement, ces altérations du métabolisme mitochondrial pourraient limiter l'oxydation des lipides et accentuer l'accumulation de vacuoles lipidiques. Elles peuvent également activement participer à la fonte musculaire via une diminution de la production d'énergie sous forme d'ATP (nécessaire au bon fonctionnement de la cellule musculaire) et la production d'espèce réactives de l'oxygène (ROS). L'augmentation des concentrations sanguines de cytokines inflammatoires dans le contexte de la cachexie cancéreuse peut déclencher un stress du RE / RS dans les fibres musculaires squelettiques, ce qui va limiter la synthèse protéique via, entre autres, la voie du senseur ATF4 (« Activating Transcription Factor 4 »). Mitochondries et RE possèdent des sites de contact, les MAM (« Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membranes »), nécessaires à certains processus clés, tels que la formation des autophagosomes, la régulation de la morphologie, de la fusion et fission, et des fonctions mitochondriales, le transport du calcium du RE à la mitochondrie, la synthèse et le transport lipidiques, la protéolyse, ainsi que la mort cellulaire. Des altérations au niveau des MAM pourraient aggraver les dysfonctions au niveau des métabolismes mitochondrial et lipidique, et participer à l'augmentation de la protéolyse, induisant une atrophie des fibres musculaires squelettiques et une diminution de la masse musculaire squelettique. En outre, les MAM pourraient constituer un lien entre les dysfonctions mitochondriales et le stress du RE / RS. Aussi, nous avons émis l'hypothèse que

chez les patients porteurs d'un cancer et cachectiques, il y avait des altérations des métabolismes lipidique et mitochondrial et un stress du RE / RS dans le muscle squelettique, participant aux mécanismes à l'origine de la fonte musculaire (**Figure 25**).

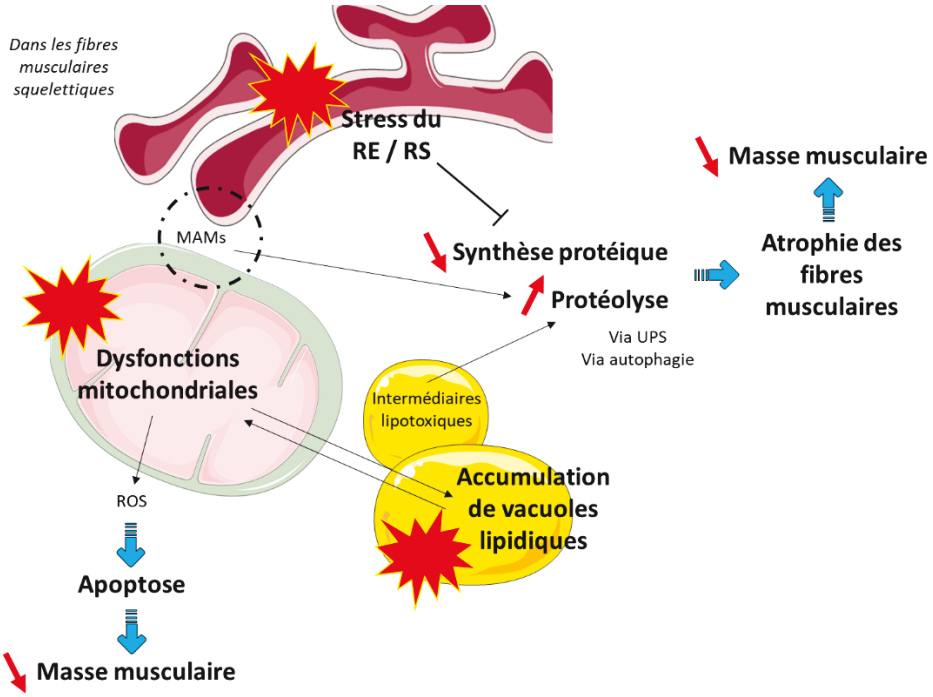


Figure 25 : Schéma des hypothèses concernant les dysfonctions métaboliques et structurelles induisant une fonte musculaire squelettique chez les patients cachectiques.
Une accumulation de vacuoles lipidiques, des dysfonctions mitochondriales et un stress du RE / RS pourraient conduire à une augmentation de la protéolyse, via la voie UPS et l'autophagie, et une diminution de la synthèse protéique, induisant une atrophie des fibres musculaires squelettiques et une diminution de la masse musculaire. La production de ROS suite à des altérations mitochondriales peut aussi participer à la fonte musculaire, par l'activation des voies apoptotiques.

L'objectif de cette partie du travail de thèse était d'étudier la structure et le métabolisme du muscle squelettique (consommation mitochondriale d'oxygène, expression en ARNm de marqueurs de la protéolyse via la voie UPS, de la biogenèse, fusion et fission mitochondriales, ou des vacuoles lipidiques, ou du stress du RE / RS) de patients cachectiques porteurs d'un cancer colorectal ou pancréatique. Pour répondre à cet objectif, nous avons séparé les patients en fonction de leur index de masse musculaire squelettique (SMI).

II. Résultats

Quarante-cinq patients ont été inclus dans le protocole clinique METERMUCADIG (NCT02573974). Un CT-Scanner a été récupéré pour les 45 patients, tandis que la biopsie musculaire squelettique a été collectée pour 39 d'entre eux. Parmi les six patients sans biopsie musculaire squelettique, quatre sont décédés avant la pose de leur PAC, pendant laquelle la biopsie est prélevée ; et pour les deux autres, la biopsie était inexploitable, de mauvaise qualité et trop riche en graisse.

Caractéristiques cliniques des patients à l'inclusion

Parmi les 45 patients inclus, il y avait 30 (67%) hommes et 15 (33%) femmes, avec un âge médian à l'inclusion de 67 ans (IQR, 59 à 77). Dix-huit (40%) patients ont été pris en charge pour un cancer du pancréas métastatique, 12 (27%) pour un cancer colorectal métastatique. Parallèlement, 5 (11%) patients atteints d'un cancer pancréatique localement avancé et 10 (22%) patients atteints d'un cancer du côlon localisé opéré, ont été inclus. La moitié des patients avait un statut de performance OMS à 0. Onze (24%) patients avaient un diabète de type II, 10 (22%) avaient une dyslipidémie, 6 (13%) avaient une insuffisance cardiaque, 3 (7%) avaient une maladie inflammatoire chronique, et 2 (4%) avaient une hypothyroïdie. Seuls trois patients avec une dyslipidémie n'avaient pas de traitement correcteur pour leur pathologie. Cela n'a eu aucun impact sur les paramètres étudiés, ils n'ont donc pas été exclus des analyses.

L'indice de masse corporelle (IMC) et l'index de masse musculaire (SMI) médian étaient respectivement de 21,9 kg/m^2 (IQR, 20,3 à 24,7) et 44,4 cm^2/m^2 (IQR, 40,1 à 49,0) chez les hommes ; et de 22,9 kg/m^2 (SD, 4,3 ; ♂ *vs* ♀ *p*=ns) et 36,4 cm^2/m^2 (IQR, 34,0 à 42,8 ; ♂ *vs* ♀ *p*=0,009) chez les femmes.

Répartition des patients en tertiles de SMI

Afin d'étudier la structure et les fonctions métaboliques du muscle squelettique des patients suivant leur index de masse musculaire, hommes et femmes ont été séparés en tertiles de SMI. Le tertile 1 (T1) comprend 5 femmes avec un SMI < 34,47 cm^2/m^2 et 10 hommes avec un SMI < 42,14 cm^2/m^2. Le tertile 3 (T3) comprend 5 femmes avec un SMI > 38,70 cm^2/m^2 et 10 hommes avec un SMI > 47,78 cm^2/m^2. La **figure 26** montre la répartition des patients entre les tertiles de SMI en fonction du sexe. Au sein de chaque tertile, hommes et femmes ont un SMI significativement différent (T1 ♂ 38,95 cm^2/m^2 (IQR, 37,13 à 40,65) *vs* ♀ 33,36 cm^2/m^2 (IQR, 30,05 à 34,16), *p*=0,008 ; T2 ♂ 44,63 ± 1,54 cm^2/m^2 *vs* ♀ 36,22 cm^2/m^2 (IQR, 35,06 à 36,62), *p*=0,0007 ; T3 ♂ 53,83 ± 7,92 cm^2/m^2 *vs* ♀ 43,15 cm^2/m^2 (IQR, 40,80 à 48,73), *p*=0,028. Mann-Whitney). Pour la suite des analyses, nous nous sommes focalisés sur la comparaison des tertiles 1 et 3 de SMI.

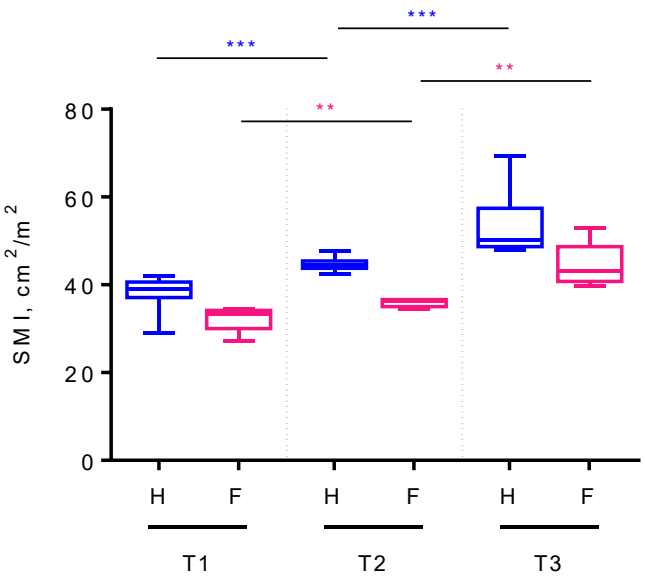


Figure 26 : Répartition des patients en tertiles de SMI

Chaque tertile comprend 5 femmes et 10 hommes. ♂ T1 *vs* T2, *p*<0,0001 ; T2 *vs* T3, *p*=0,002 ; T1 *vs* T3, *p*<0,0001. ♀ T1 *vs* T2, *p*=0,035 ; T2 *vs* T3, *p*=0,006 ; T1 *vs* T3, *p*=0,002. Mann-Whitney, excepté pour ♂ T2 *vs* T3, test T. # indique une différence significative entre hommes et femmes au sein de chaque tertile : ♂ *vs* ♀ T1 : *p*=0,008 ; T2 : *p*=0,0007 ; T3 : *p*=0,028, Mann-Whitney.

Caractéristiques cliniques des patients dans les tertiles T1 vs T3

En comparant les patients du Tertile 1, ayant les plus faibles SMI, avec ceux du Tertile 3, ayant des SMI plus importants, nous n'avons observé aucune différence significative au niveau de l'âge, de la répartition des cancers colorectal et pancréatique, métastatique ou localement avancé, ainsi que de la CRP (**Tableau 16**).

Les hommes du T3 avaient une masse grasse, un IMC et un tour de taille significativement plus élevés par rapport à ceux du T1. Trois hommes obèses ont été inclus dans le 3ème tertile avec des SMI de 49,7 cm^2/m^2, 67,5 cm^2/m^2 et 69,3 cm^2/m^2. En excluant, par test statistique, ces trois hommes, les différences au niveau de la masse grasse et du tour de taille n'étaient plus significatives. Toutefois, l'IMC demeurait plus élevé pour le T3 par rapport au T1 (T3, 24,6 kg/m^2 (IQR, 22,4 à 27,4) *vs* T1, 20,8 ± 3,5 kg/m^2, p=0,013, après exclusion des trois patients obèses), de même pour le SMI (T3, 49,9 cm^2/m^2 (IQR, 48,0 à 52,6) *vs* T1, 39,0 cm^2/m^2 (IQR, 37,1 à 40,7), p=0,0001, après exclusion des trois patients obèses).

Que ce soit pour les femmes ou les hommes (obèses exclus ou non), nous avons observé une circonférence brachiale plus importante chez les patients avec une forte masse musculaire (♀ T3, 30,0 cm (IQR, 27,0 à 32,5) *vs* T1, 24,0 cm (IQR, 23,0 à 27,8), p=0,040 / ♂ T3, 31,6 ± 4,4 cm *vs* T1, 26,3 ± 3,5 cm, p=0,009). Chez les femmes, il semblait également y avoir une tendance à l'augmentation de la force musculaire moyenne dans le T3 par rapport au T1 (T3, 27,0 kg (IQR, 20,8 - 28,8) *vs* T1, 20,0 kg (IQR, 14,9 - 20,7), p=0,056). Toutefois, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre la force musculaire moyenne et le SMI chez cette population.

Malgré l'importance de cette distinction, les analyses suivantes n'ont pu être réalisées en séparant les patients selon le sexe en raison d'un effectif trop faible, et du manque de puissance statistique qui en découlerait. Cependant, hommes et femmes ont été distingués par des symboles de couleur différente dans chaque graphique.

Tableau 16 : Caractéristiques cliniques des patients des tertiles 1 et 3 de SMI, en fonction du sexe

Caractéristique	Tertile 1 - Faible SMI				Tertile 3 - SMI important				*P value T1 vs T3*		
	Femmes (n=5)		Hommes (n=10)		Femmes (n=5)		Hommes (n=10)				
	No. (%)	Médiane (IQR)	No. (%)	Moyenne ± SD / Médiane (IQR)	No. (%)	Médiane (IQR)	No. (%)	Moyenne ± SD / Médiane (IQR)	Les 2	♀	♂
Age, ans		71 (65 - 79)		60 ± 14		63 (59 - 71)		68 ± 7	0,474	0,302	0,130
Cancer									0,715	1,000	0,350
Colorectal	0		8 (80)		1 (20)		5 (50)				
Pancréas	5 (100)		2 (20)		4 (80)		5 (50)				
Métastatique	4 (80)		7 (70)		4 (80)		5 (50)		0,700	1,000	0,650
IMC, kg/m²		20,0 (19,3 - 21,6)		20,8 ± 3,5		25,3 (20,7 - 28,0)		27,1 ± 4,5	0,0003	0,151	0,003
Catégorie d'IMC, kg/m²									0,021	0,167	0,170
Insuffisance pondérale (< 18,5)	0		3 (30)		1 (20)		0				
Poids normal (18,5 à 24,9)	5 (100)		5 (50)		1 (20)		4 (40)				
Surpoids (25 à 29,9)	0		2 (20)		3 (60)		3 (30)				
Obèse (> 30)	0		0		0		3 (30)				
Mesures corporelles											
Tour de taille, cm (n=44)		85,0 (80,0 - 86,0)		90,5 ± 11,7		98,0 (85,5 - 102,5)		103,7 ± 11,1	0,003	0,087	0,019
Circonférence brachiale, cm (n=44)		24,0 (23,0 - 27,8)		26,3 ± 3,5		30,0 (27,0 - 32,5)		31,6 ± 4,4	0,0006	0,040	0,009
Force musculaire moyenne, kg (n=43)		20,0 (14,9 - 20,7)		44,6 ± 20,4		27,0 (20,8 - 28,8)		42,5 ± 11,8	0,941	0,056	0,783
Composition corporelle											
Aire musculaire squelettique, cm²		84,6 (75,3 - 86,0)		117,3 ± 16,91		118,0 (99,6 - 136,0)		161,1 ± 21,7	0,0002	0,008	0,0001
SMI, cm²/m²		33,4 (30,1 - 34,2)		39,0 (37,1 - 40,7)		43,2 (40,8 - 48,7)		53,8 ± 7,9	0,0001	0,008	0,0001
Densité musculaire, HU (n=38)		26,8 (22,2 - 33,2)		30,49 ± 10,04		33,4 (16,6 - 43,0)		28,7 ± 4,6	0,987	0,786	0,639
Tissus adipeux totaux, cm²		252,3 (181,7 - 278,7)		233,6 ± 143,7		404,1 (237,4 - 523,6)		413,6 ± 202,6	0,006	0,151	0,034
WFM, kg		21,3 (16,5 - 23,1)		20,03 ± 9,77		31,6 (20,3 - 39,8)		32,3 ± 13,8	0,006	0,151	0,034
Paramètres hématologiques											
CRP, mg/L (n=39)		12,4 (4,5 - 54,3)		20,8 ± 27,1		22,2 (5,5 - 51,7)		4,6 (2,2 - 10,8)	0,865	0,825	0,515

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD ou médiane + IQR.

Abréviations dans l'ordre d'apparition : IMC, Indice de Masse Corporelle ; SMI : « Skeletal Muscle Index » ; HU : Unités de Hounsfield ; WFM : « Whole-Body Fat Mass » ; CRP : « C-Reactive Protein ».

Atrophie des fibres musculaires squelettiques chez les patients porteurs d'un cancer et avec une faible masse musculaire ?

Nous avons observé une surface médiane des fibres musculaires squelettiques significativement plus petite chez les patients avec une faible masse musculaire, comparés aux patients avec une masse musculaire importante (T1, 1991 ± 766 μm^2 *vs* T3, 2741 ± 966 μm^2, p=0,047 - Test T) (**Figures 27A-C**). La surface médiane des fibres corrélait positivement avec le SMI : plus les patients avaient un SMI faible, plus la surface médiane de leurs fibres musculaires était petite (Spearman p=0,0007 - r=0,541) (**Figure 27D**). Aucune différence significative n'a été observée pour la surface médiane des myofibrilles (**Figure 27E**). L'étude de l'expression en ARNm de MuRF1 (« Muscle RING Finger-1 ») et MAFbx (« Atrogin-1b »), deux marqueurs de la protéolyse musculaire via la voie UPS, n'a révélée aucune différence significative entre les tertiles (**Figure 27F**). La quantité d'ARNm ne corrèle pas avec le SMI des patients, ni avec la surface médiane des fibres musculaires ou des myofibrilles.

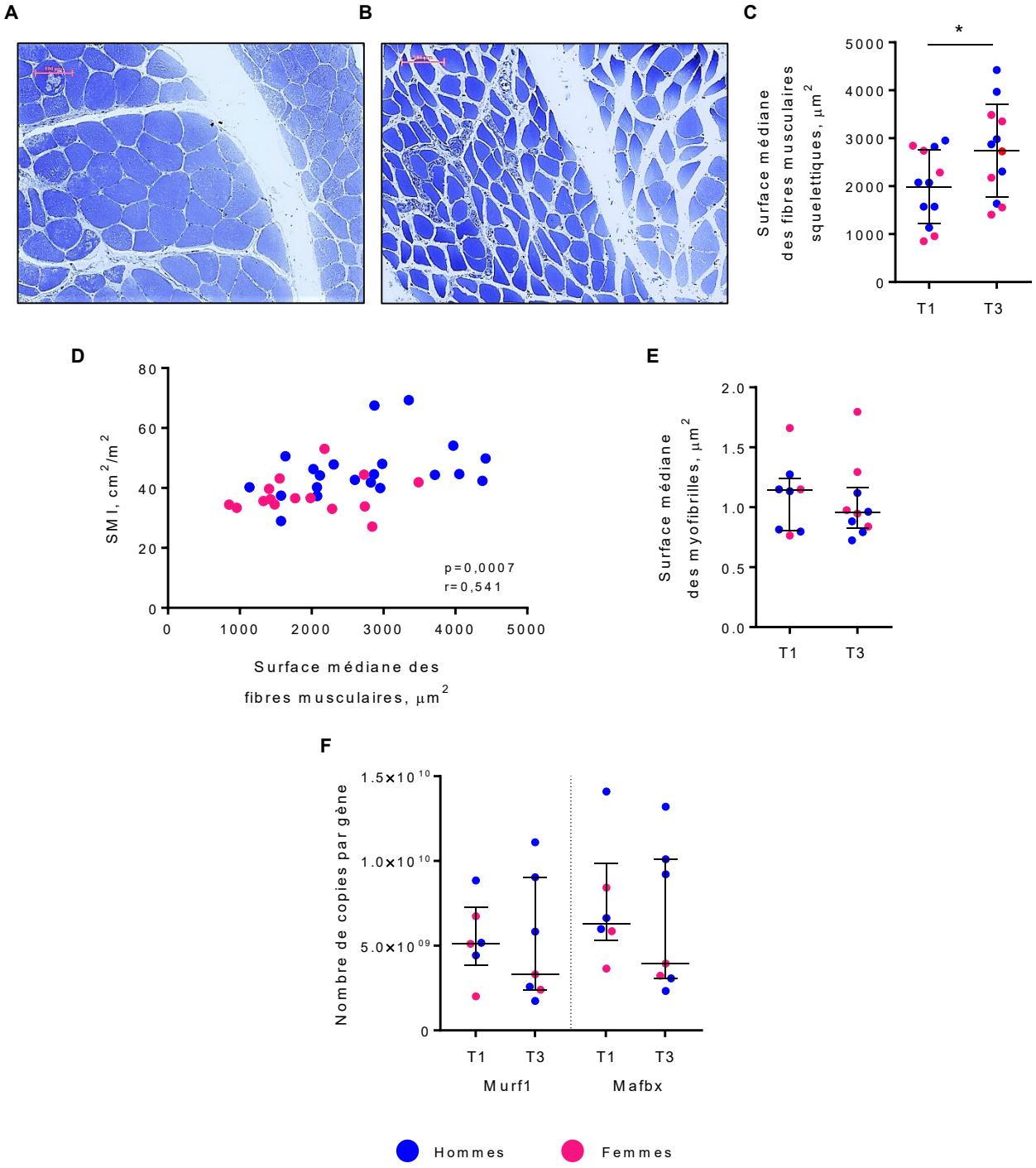


Figure 27 : Structure des fibres musculaires squelettiques

Observation en microscopie optique (MO) des fibres musculaires squelettiques colorées au bleu de toluidine **(A)** d'un homme du tertile 3 et **(B)** d'un homme du tertile 1. Echelle 100µm. **(C)** Surface médiane des fibres musculaires squelettiques en MO. Pour chaque patient, la surface médiane a été calculée sur 200 fibres environ. p=0,047 - Test T. Une valeur aberrante du T3 (surface médiane : 8726 cm^2) a été exclue en utilisant le test de Grubbs' α=0,01. **(D)** Corrélation entre la surface médiane des

fibres musculaires squelettiques et l'index de masse musculaire. Spearman *p*=0,0007 - r=0,541. **(E)** Surface médiane des myofibrilles en microscopie électronique en transmission (MET). Pour chaque patient, 4 coupes transversales, chacune sur une fibre musculaire différente, ont été utilisées et la surface médiane a été calculée sur au moins 30 myofibrilles par coupe. *p*=ns - Test Mann-Whitney. **(F)** Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de deux marqueurs de la protéolyse par la voie UPS : MuRF1 (« Muscle RING Finger-1 ») et MAFbx (« Atrogin-1b »). *p*=ns - Test Mann-Whitney.

Dysfonctions au niveau du métabolisme, de la dynamique et/ou de la structure de la mitochondrie chez les patients porteurs d'un cancer et avec une faible masse musculaire ?

Nous n'avons observé aucune association entre l'index de masse musculaire et la consommation mitochondriale d'oxygène (**Figure 28A**). Que ce soit à l'état 3 (proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée à la synthèse d'ATP), état 4 (proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée au gaspillage énergétique), état découplé (réserve énergétique mitochondriale) ou pour l'activité du complexe 4, la consommation mitochondriale d'oxygène ne différait pas entre les tertiles 1 et 3 de SMI. Nous n'avons observé aucune différence significative entre les tertiles au niveau de la quantité d'ARNm des marqueurs de la biogenèse mitochondriale : PGC1α (« Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1α »), MTFA (« Mitochondrial Transcription Factor A ») et NRF2 (« Nuclear Respiratory Factor 2 ») (**Figure 28B**), de la fusion mitochondriale : Mfn (Mitofusin) et OPA1 (« Optic Atrophy 1 ») (**Figure 28C**) ou de la fission mitochondriale : Fis1 (« mitochondrial Fission protein 1 »), Mff (« Mitochondrial fission factor ») ; Drp1 (« Dynamin-related protein 1 ») (**Figure 28D**). Il n'y avait pas de différence non plus de la quantité d'ADN mitochondrial (**Figure 28E**). Malgré des différences visibles entre les patients au niveau de la surface mitochondriale (**Figures 28F et G**), nous n'avons observé aucune différence significative sur ce paramètre entre les tertiles de SMI (**Figure 28H**).

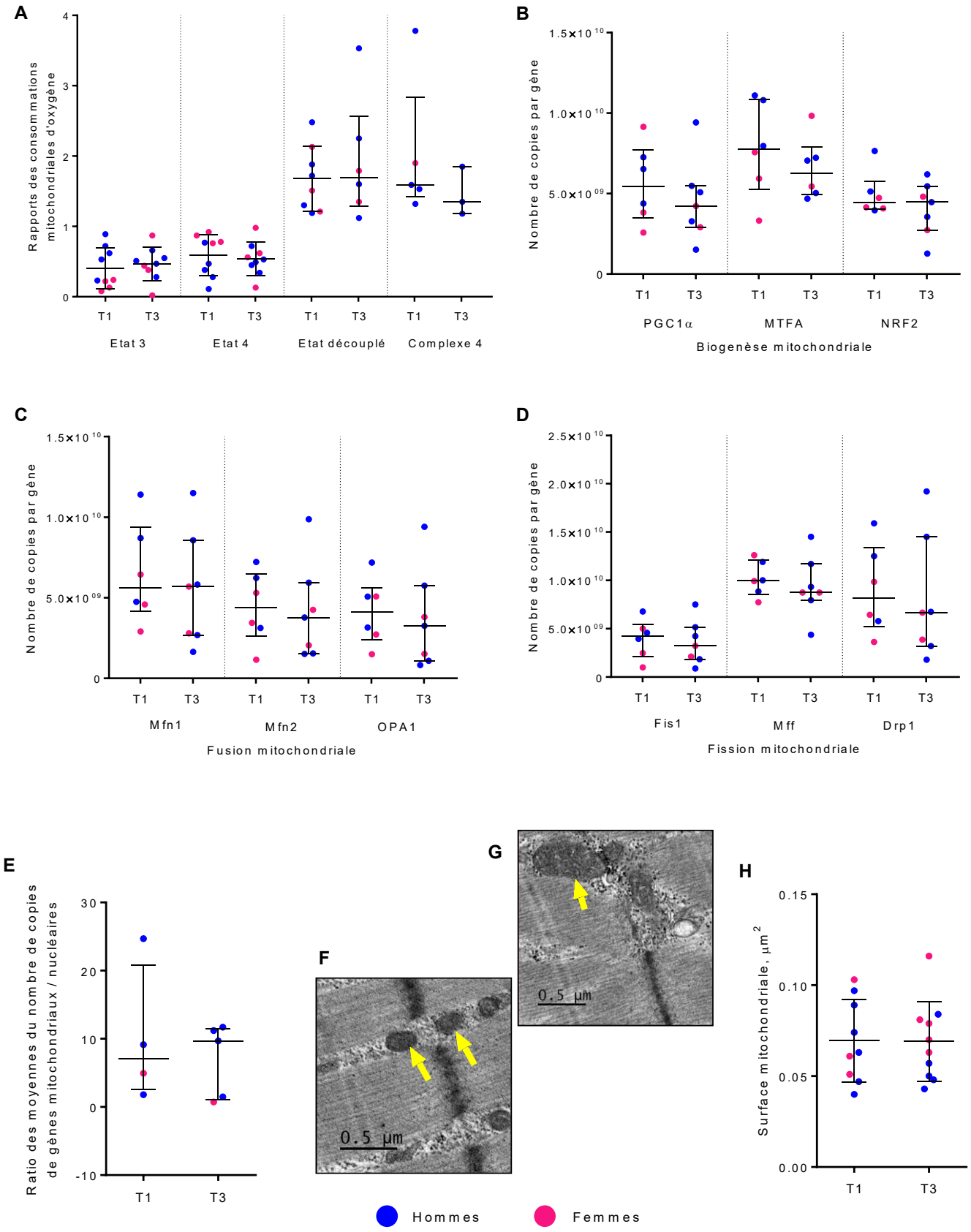


Figure 28 : Métabolisme, dynamique et structure de la mitochondrie

Légende de la figure 28 : **(A)** Mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène par oxygraphie à haute résolution. Etat 3 : Proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée à la synthèse d'ATP (Consommation d'O_2 (JO_2) après ajout d'ADP - JO_2 après ajout d'Oligomycine / JO_2 après ajout d'ADP) ; Etat 4 : Proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée au gaspillage énergétique (JO_2 après ajout d'Oligomycine / JO_2 après ajout d'ADP) ; Etat découplé : Réserve énergétique mitochondriale (JO_2 après ajout de FCCP / JO_2 après ajout d'ADP) ; Complexe 4 : Activité du complexe 4 (JO_2 après ajout de TMPD / JO_2 après ajout de FCCP). Pour les états 3 et 4, *p*=ns - Test T. Pour l'état découplé et l'activité du complexe 4, *p*=ns - Mann-Whitney. Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de trois marqueurs de la **(B)** biogenèse mitochondriale : PGC1α (« Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1α »), MTFA (« Mitochondrial Transcription Factor A ») et NRF2 (« Nuclear Respiratory Factor 2 »), **(C)** de la fusion mitochondriale : Mfn (« Mitofusin ») et OPA1 (« Optic Atrophy 1 ») et **(D)** de la fission mitochondriale : Fis1 (« mitochondrial Fission protein 1 »), Mff (« Mitochondrial fission factor ») et Drp1 (« Dynamin-related protein 1 »). *p*=ns - Mann-Whitney. Une valeur aberrante du T3 pour l'expression de MTFA ($2,7^{e+10}$ copies) a été exclue en utilisant le test de Grubbs' α=0,01. **(E)** Quantification de l'ADN mitochondrial par RT-qPCR en utilisant un ratio de la moyenne du nombre de copies d'au moins 2 gènes mitochondriaux sur la moyenne du nombre de copies d'au moins 2 gènes nucléaires. *p*=ns - Mann-Whitney. **(F)(G)** Observation en MET de coupes longitudinales de deux biopsies musculaires squelettiques. X10000. Il existe une hétérogénéité inter-patient au niveau de la surface mitochondriale (flèches jaunes). **(G)** Analyse de la surface mitochondriale en MET. Pour chaque patient, 4 coupes transversales et 4 coupes longitudinales, chacune sur une fibre musculaire différente, ont été utilisées et la surface médiane a été calculée sur au moins 30 mitochondries par coupe. *p*=ns - Test T.

Accumulation de vacuoles lipidiques intra myocellulaires chez les patients cancéreux avec une faible masse musculaire ?

Nous avons quantifié l'expression en ARNm de quatre périlipines comme marqueurs des vacuoles lipidiques. Nous n'avons trouvé aucune association entre la quantité d'ARNm de ces quatre périlipines et l'index de masse musculaire des patients, ni aucune différence significative entre les tertiles (**Figure 29**). Nous avons également essayé d'analyser le nombre et la surface des vacuoles lipidiques en MET. Toutefois, il existe une très grande hétérogénéité intra-patient de la distribution des vacuoles lipidiques au sein de chaque fibre et entre les fibres. Une quantification précise de ces paramètres n'a donc pas pu être réalisée pendant le travail de thèse.

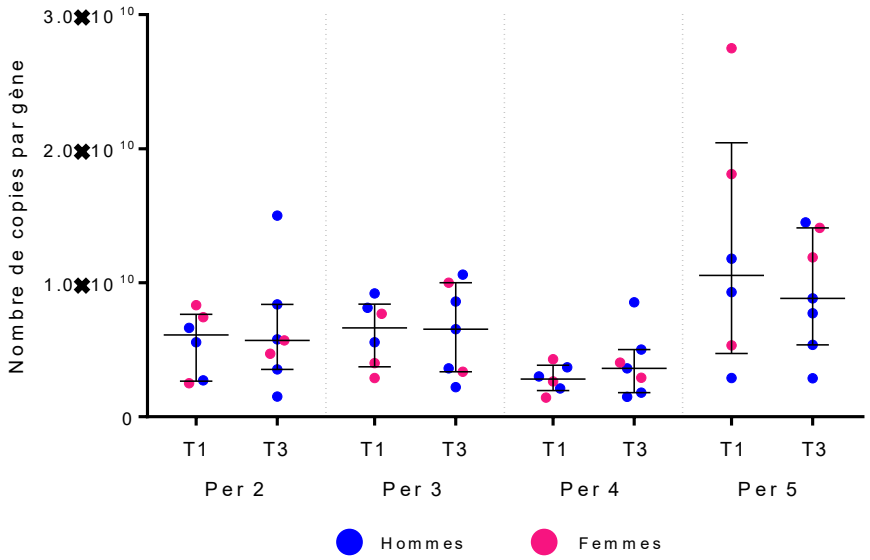


Figure 29 : Expression de marqueurs des vacuoles lipidiques.

Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de quatre périlipines (Per). Bleu : hommes, rose : femmes. *p*=ns - Mann-Whitney.

Stress du RE dans le muscle squelettique des patients porteurs d'un cancer et avec une faible masse musculaire ?

Nous avons quantifié le nombre de copies par gène de quatre marqueurs du stress du RE / RS : les protéines chaperonnes GRP78, ou BiP (« immunoglobin Binding Protein ») et EDEM (« ER-degradation-enhancing-α-mannidose-like protein ») et les facteurs de transcription ATF4 (« Activating Transcription Factor 4 ») et CHOP (« C/EBP homologous protein »), de la voie du senseur de stress du RE / RS PERK (« Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase »). Nous n'avons observé aucune différence entre les tertiles 1 et 3 de SMI, ni aucune corrélation avec le SMI, pour l'expression de ces quatre marqueurs (**Figure 30**).

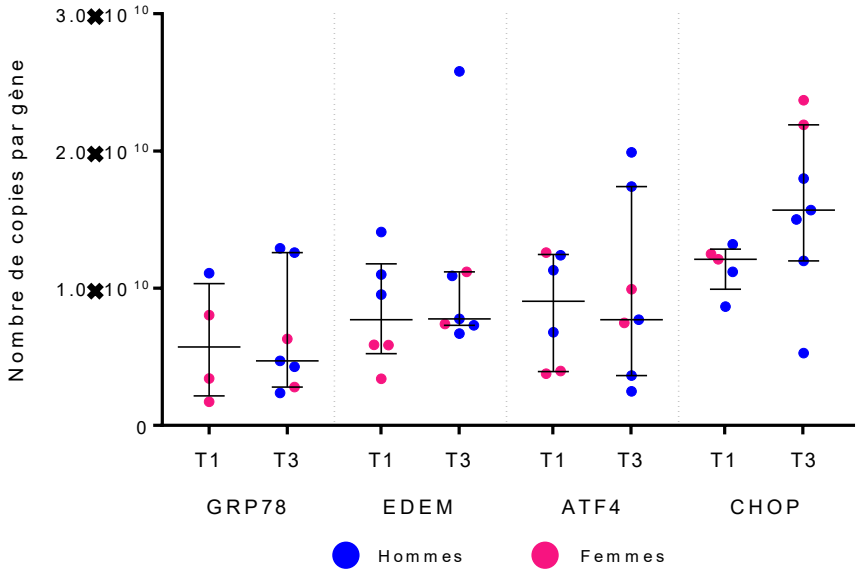


Figure 30 : Expression de gènes du stress du RE / RS.

Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de quatre marqueurs du stress du RE / RS : les protéines chaperonnes GRP78, ou BiP (« immunoglobin Binding Protein ») et EDEM (« ER-degradation-enhancing-α-mannidose-like protein ») et les facteurs de transcription ATF4 (« Activating Transcription Factor 4 ») et CHOP (« C/EBP homologous protein »). Bleu : hommes, rose : femmes. Deux valeurs aberrantes du T3 pour l'expression d'EDEM ($2{,}58^{e+10}$ copies) et du T1 pour l'expression de CHOP ($2{,}73^{e+10}$ copies) ont été exclues en utilisant le test de Grubbs' α=0,01. *p*=ns - Mann-Whitney.

Altération du stockage du glycogène dans le muscle squelettique des patients cancéreux avec une faible masse musculaire ?

Nous avons observé en MET une importante hétérogénéité entre les patients au niveau du glycogène stocké dans le cytoplasme des fibres musculaires squelettiques (**Figures 31A et B**). Cette altération métabolique pourrait être associée à l'atrophie des fibres musculaires squelettiques. Nous avons pu observer à nouveau une hétérogénéité au niveau du stockage du glycogène en microscopie optique sur coupes colorées au PAS (« Periodic-Acid Schiff ») (**Figures 31C et D**), qui met en évidence le glycogène. Toutefois, il n'y avait statistiquement aucune différence significative de l'intensité de cette coloration entre les tertiles 1 et 3 de SMI, et donc aucune différence au niveau du stockage de glycogène dans les fibres musculaires des patients de ces deux groupes (**Figure 31E**). Il n'y avait aucune corrélation entre le SMI et l'intensité de la coloration au PAS.

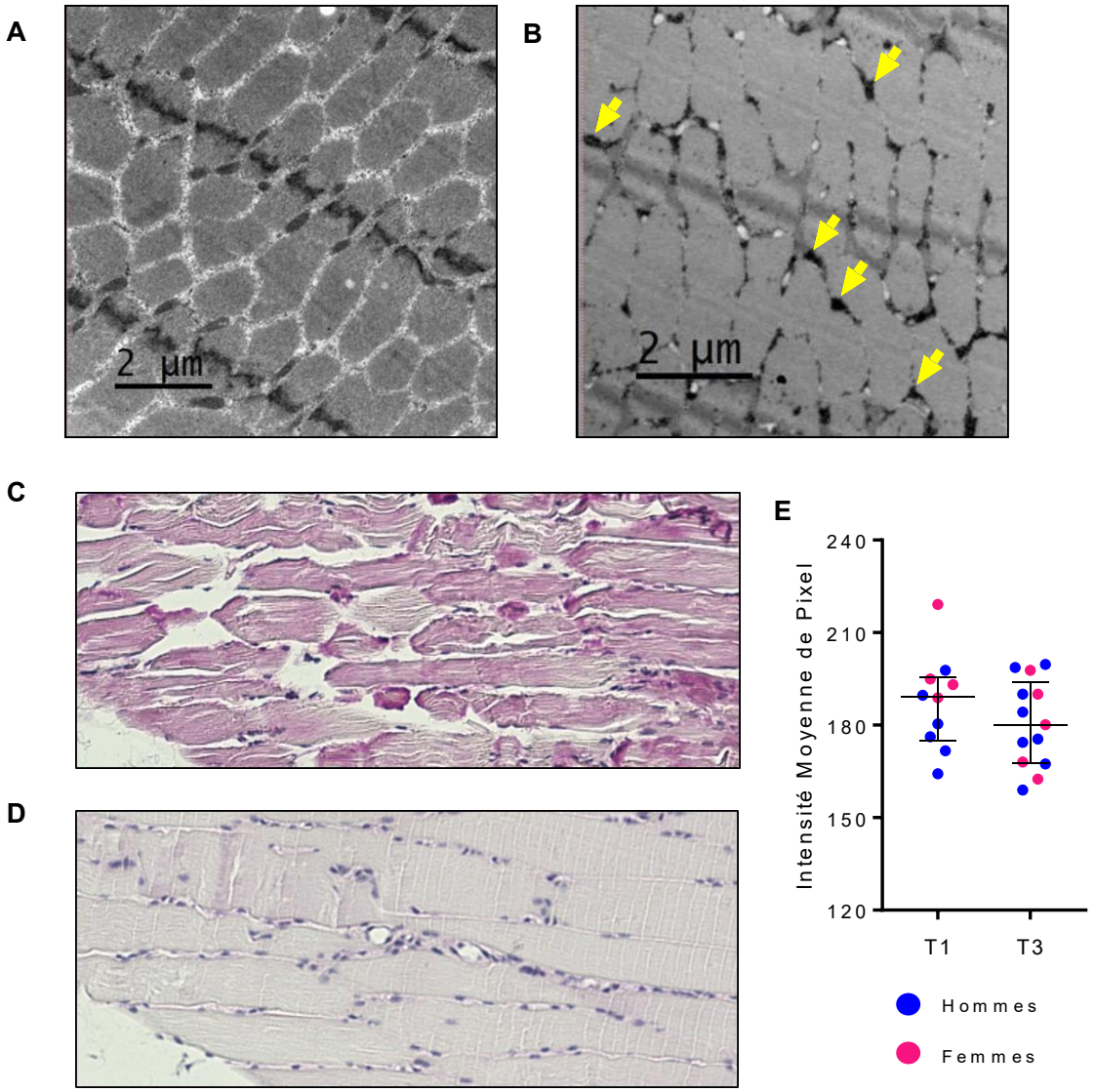


Figure 31 : Analyse du glycogène musculaire squelettique.

Observation en MET de coupes transversales de deux biopsies musculaires squelettiques avec un stockage de glycogène **(A)** normal et **(B)** anormalement élevé (flèches jaunes). X10000.

Coupes longitudinales de deux biopsies musculaires squelettiques avec une intensité **(C)** plus ou **(D)** moins importante de coloration PAS (« Periodic-Acid Schiff »). **(E)** Intensité moyenne de la coloration PAS. En moyenne, 5 images ont été prises par patient. Elles ont toutes été analysées avec les mêmes paramètres de MO : exposition, gain, intensité de la lumière blanche. Bleu : hommes, rose : femmes. *p*=ns - Test T.

III. Discussion et perspectives

L'objectif du protocole clinique METERMUCADIG était d'étudier la structure du muscle squelettique, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, la quantité de vacuoles lipidiques, et le RE / RS dans le muscle squelettique de patients cachectiques atteints d'un cancer colorectal ou pancréatique. Pour cela, dans un premier temps, une analyse avec une stratification de la sévérité de la cachexie a été testée. Il n'existe actuellement aucune définition stricte pour établir des groupes de patients cancéreux cachectiques et cancéreux non cachectiques. La plupart des études ayant exploré des paramètres structurels et métaboliques dans des biopsies musculaires squelettiques ont utilisé le consensus de 2011 (Fearon *et al.*, 2011) ou un critère de perte de poids > 5% ou 10% pour constituer leur groupe de patients cancéreux cachectiques. Cependant, un pourcentage fixe de perte de poids ne prend pas en considération l'IMC du patient, alors que la prévalence de l'obésité a considérablement augmenté au cours des dernières décennies. En effet, une perte de poids involontaire de 5% ne sera pas aussi sévère et n'aura pas un risque de mortalité aussi important chez un patient obèse que chez un patient en insuffisance pondérale. Utiliser un pourcentage fixe de perte de poids a l'inconvénient de regrouper des patients avec des risques de mortalité, et sûrement des degrés de dénutrition différents. C'est pourquoi, en étudiant une population totale de 8 160 européens et canadiens avec différents types de cancer, des auteurs ont mis au point un système robuste de notation intégrant le risque de diminution de la survie en fonction de l'IMC du patient et du pourcentage de perte de poids (Martin *et al.*, 2015).

Pour notre protocole clinique, la classification de la cachexie a été réalisée en utilisant deux critères : la sévérité de la perte de poids, suivant le système de notation décrit ci-dessus (Martin *et al.*, 2015) ; et la sarcopénie (Martin *et al.*, 2013). Dans un premier temps, les patients ont été répartis en trois groupes en fonction de la sévérité de la cachexie cancéreuse :

- cachexie sévère : grades 3 et 4 de perte de poids + sarcopénie
- cachexie très modérée / pas de cachexie : grades 0 à 2 de perte de poids + pas de sarcopénie
- cachexie modérée, un groupe intermédiaire incluant les autres patients.

Il y avait 8 (18%) patients non-cachectiques ou avec une cachexie très modérée, 18 (40%) et 19 (42%) patients avec une cachexie modérée et sévère respectivement. Mais une biopsie n'a pu être collectée que pour 6 patients du groupe cachexie très modérée / pas de cachexie, 17 avec une cachexie modérée et 16 avec une cachexie sévère. Afin d'essayer d'avoir une puissance

statistique suffisante, les patients non-cachectiques / cachexie très modérée et modérée ont été réunis dans un même groupe : cachexie modérée, qui a été comparé au groupe de patients avec une cachexie sévère. Malheureusement, ces deux groupes présentaient une disproportion au niveau du nombre d'hommes et de femmes : il y avait en effet 6 (23%) femmes et 20 (77%) hommes avec une cachexie modérée, et 9 (47%) femmes et 10 (53%) hommes avec une cachexie sévère. Or, le sexe est une variable importante à prendre en compte pour ces analyses. Hommes et femmes présentent des différences significatives au niveau de la composition corporelle, et en particulier de la masse musculaire squelettique, qui est plus petite chez les femmes. Un dimorphisme sexuel existe également au niveau de paramètres structurels et métaboliques du muscle squelettique (Rosa-Caldwell and Greene, 2019; Ventura-Clapier *et al.*, 2017). Anoveros-Barrera *et al.* ont observé une surface transversale moyenne des fibres musculaires plus petite chez les femmes que chez les hommes (♀ 2139 ± 854 µm^2 *vs* ♂ 3784 ± 1285 µm^2, p<0,05) ainsi que des différences au niveau de l'expression de gènes associés à la croissance musculaire, l'apoptose et l'inflammation (Anoveros-Barrera *et al.*, 2019). Pour ces raisons, il a été décidé de présenter uniquement les analyses réalisées en fonction de la masse musculaire squelettique des patients, en les séparant en tertiles de SMI. Chaque tertile comprend la même proportion d'hommes et de femmes. Pour explorer les liens entre composition corporelle, structure et métabolisme du muscle squelettique, nous nous sommes focalisés sur les patients avec le SMI le plus faible (Tertile 1) en les comparant avec ceux ayant le SMI le plus important (Tertile 3). Il est important de noter que les résultats obtenus avec la classification par tertiles de SMI sont similaires à ceux observés avec la stratification de la sévérité de la cachexie cancéreuse.

Outre le sexe des patients, trois autres caractéristiques cliniques étaient à prendre en considération lors de la répartition des patients en tertiles : l'IMC, le type de cancer et l'âge. Trois hommes et une femme obèses ont été inclus dans l'étude. Leur effectif était trop faible pour en faire un groupe à part entière. La femme se trouve dans le 2nd tertile de SMI et n'a donc pas été intégrée dans la suite des analyses. Les trois hommes présentent un SMI important, ils font partie du 3ème tertile de SMI, mais une biopsie musculaire squelettique n'a été récupérée que pour deux d'entre eux et les analyses de consommation mitochondriale d'oxygène et de microscopie électronique n'ont pas pu être réalisées par manque de matériel. Il a été montré dans la littérature que l'obésité peut avoir un impact sur la proportion des fibres de type I / II (Tanner *et al.*, 2002; Hickey *et al.*, 1995) et sur le métabolisme protéique musculaire (Guillet,

2019). Concernant les deux hommes obèses inclus dans notre étude, aucune influence particulière de leur IMC n'a été observée sur la surface des fibres musculaires en microscopie optique, ni sur l'expression des gènes étudiés. Il a donc été décidé de les conserver dans les analyses. Chaque cancer pouvant avoir sa propre mécanistique, il était important que la répartition des cancers colorectal et pancréatique, métastatique ou localement avancé, soit suffisamment bien proportionnée entre les tertiles T1 et T3, ce qui était le cas dans notre étude. Enfin, la sarcopénie liée à l'âge ayant un impact non négligeable sur la structure et le métabolisme du muscle squelettique, l'âge des patients inclus dans les tertiles T1 et T3 a également été comparé. Nous n'avons pas observé de différence significative pour cette variable.

Un paramètre hématologique a été mesuré : la CRP, marqueur de l'inflammation. Aucune différence significative n'a été observée entre les patients des tertiles T1 *vs* T3 pour ce paramètre. Les patients avec une cachexie modérée avaient une CRP à 6,6 mg/L (IQR, 2,4 à 34,0, n=24), tandis que les patients avec une cachexie sévère avaient une CRP à 16,6 mg/L (IQR, 3,3 à 59,2, n=16, p=0,361). Dans notre revue de la littérature, nous avions pu noter qu'une augmentation de marqueurs inflammatoires sanguins n'est pas systématiquement observée dans les populations de patients avec une cachexie cancéreuse. Plusieurs études cliniques ont montré une absence de différence significative au niveau des dosages de la CRP entre patients cancéreux cachectiques et non cachectiques (Prokopchuk *et al.*, 2017; Aversa *et al.*, 2016; Stephens *et al.*, 2015; Agustsson *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2012; Skorokhod *et al.*, 2012). Nos résultats vont dans ce sens. Cela dépend non seulement des critères de diagnostic de la cachexie cancéreuse utilisés, mais aussi des cancers étudiés.

Nous avions émis l'hypothèse que la faible masse musculaire des patients pourrait être associée à une atrophie des fibres et myofibrilles musculaires squelettiques. Tandis qu'aucune différence significative n'a été trouvée pour la surface médiane des myofibrilles, les patients avec une faible masse musculaire (Tertile 1) avaient une surface médiane des fibres musculaires squelettiques plus petite, comparés aux patients avec une masse musculaire importante (Tertile 3) (T1, 1991 μm^2 ± 766 *vs* T3, 2741 μm^2 ± 966, p=0.047). De plus, la surface médiane des fibres corrélait positivement avec le SMI. Ainsi, plus les patients avaient un SMI faible, plus la surface médiane de leurs fibres musculaires était petite (Spearman p=0,0007 - r=0,541). Tout en conservant à l'esprit le dimorphisme sexuel et la petite disproportion des hommes et femmes

entre les deux groupes, cette diminution de la surface des fibres musculaires a aussi été observée en utilisant la stratification de la cachexie cancéreuse, avec une surface médiane de fibres plus petite chez les patients avec une cachexie sévère (cachexie modérée, 2734 μm^2 (IQR, 2062 à 3545) *vs* cachexie sévère, 1771 μm^2 (IQR, 1330 à 2823), p=0,011 Mann-Whitney). Cette observation va dans le sens des résultats précliniques qui avaient montré une diminution de l'aire transversale des fibres musculaires chez des souris C26 ou LLC (Sun *et al.*, 2016). En revanche, en clinique, aucun impact de la cachexie cancéreuse n'a été observé sur ce paramètre (Op den Kamp *et al.*, 2013). Les auteurs avaient utilisé le consensus de 2011 (Fearon *et al.*, 2011) pour comparer 16 patients cachectiques atteints d'un cancer pulmonaire avancé (NSCLC, « Non-Small-Cell Lung Cancer ») à 10 patients cancéreux pré-cachectiques.

Nous avons appréhendé la question de la protéolyse musculaire en étudiant l'expression en ARNm de MuRF1 et MAFbx, deux marqueurs de la protéolyse musculaire via la voie UPS, tout en étant conscients des limites de cette technique. Nos résultats ne montrent aucune différence significative entre les tertiles 1 et 3 de SMI. Cette observation confirmerait le résultat d'autres études cliniques ayant analysé l'expression en ARNm (D'Orlando *et al.*, 2014) ou protéique de ces deux mêmes marqueurs (Stephens *et al.*, 2015; Op den Kamp *et al.*, 2013). Toutefois, puisqu'il ne s'agit que d'ARNm, nous ne pouvons pas totalement écarter l'hypothèse d'une protéolyse accrue via la voie UPS. La prochaine étape sera d'analyser l'expression protéique de ces gènes. Il pourrait également y avoir une implication d'autres voies de la protéolyse musculaire, telle que l'autophagie. Il est envisagé d'étudier l'expression protéique de certains marqueurs de l'autophagie, comme LC3B, ATG5, ATG7. Certaines études ont rapporté une expression plus importante de marqueurs de l'autophagie chez des patients cachectiques atteints de divers cancers, principalement gastro-intestinaux (de Castro *et al.*, 2019; Aversa *et al.*, 2016).

Nous avions émis l'hypothèse que chez les patients porteurs d'un cancer et cachectiques, il y avait une atteinte particulière des métabolismes lipidique et mitochondrial et du RE / RS dans le muscle squelettique, participant aux mécanismes à l'origine de la fonte musculaire.

i) L'ensemble de nos analyses du métabolisme énergétique semble écarter la présence d'une anomalie du fonctionnement mitochondrial en lien avec la diminution de la masse musculaire. En effet, nous n'avons observé aucune différence de la consommation mitochondriale d'oxygène, aucune différence significative de l'expression en ARNm de marqueurs de la biogenèse, fusion et fission mitochondriales et aucune différence de la quantité

d'ADN mitochondrial et de la surface mitochondriale entre les tertiles 1 et 3 de SMI, ou en utilisant la stratification de la cachexie. Jusqu'à présent, aucune étude clinique n'avait exploré la fonctionnalité mitochondriale dans le muscle squelettique de patients porteurs d'un cancer et cachectiques. Seules des études précliniques avaient montré une diminution de l'activité de certains complexes de la chaîne respiratoire (Fermoselle *et al.*, 2013; Padrão *et al.*, 2013; Julienne *et al.*, 2012). Plusieurs études cliniques incluant des patients cachectiques, avaient rapporté une augmentation des transcrits de Fis1, marqueur de la fission mitochondriale, mais aucune modification de l'expression de marqueurs de la fusion et biogenèse mitochondriales (de Castro *et al.*, 2019; Marzetti *et al.*, 2017). Ces deux études cliniques avaient, comme nous, inclus des patients porteurs de cancers gastro-intestinaux, mais leur classification de la cachexie cancéreuse était différente de la nôtre : de Castro *et al.* avaient utilisé plusieurs paramètres pour établir une classification de la cachexie cancéreuse : Perte de poids > 5% en 12 mois maximum (Evans *et al.*, 2008) + CRP + Glasgow score + Questionnaires sur les symptômes liés à la cachexie, tandis que Marzetti *et al.* avaient utilisé une perte de poids > 5% en 6 mois comme critère de diagnostic de la cachexie. Certains auteurs avaient observé une absence de modification du nombre de copies d'ADN mitochondrial et une augmentation de l'aire mitochondriale inter-myofibrillaire en MET (de Castro *et al.*, 2019). Il est cependant à noter que pour l'analyse de l'aire mitochondriale inter myofibrillaire, ils n'avaient comparé que trois patients cancéreux non cachectiques et quatre patients cancéreux cachectiques. Concernant notre protocole clinique, les données de dix patients sont encore à analyser pour le paramètre de la surface mitochondriale.

ii) Nos résultats préliminaires obtenus *in vitro* sur des cellules musculaires squelettiques murines (C2C12) ont montré qu'une accumulation de vacuoles lipidiques dans les cellules différenciées, induite par une incubation avec du palmitate (0,6mM pendant 48h), provoque une diminution du diamètre des cellules de 38%, sans altérer leur mortalité. Sur nos biopsies musculaires squelettiques, nous avons quantifié indirectement les vacuoles lipidiques en analysant l'expression en ARNm de quatre périlipines. Nos résultats ne montrent aucune association entre leur expression et l'index de masse musculaire des patients, ni avec la stratification de la cachexie. Malheureusement, les analyses directes en MET du nombre et de la surface des vacuoles lipidiques se sont révélées non concluantes. Nous prévoyons donc de mesurer l'accumulation des vacuoles lipidiques intra myocellulaires en utilisant un marquage à l'Oil Red O sur les coupes de biopsies musculaires.

iii) L'inhibition du stress du RE a été retrouvée associée à une augmentation de l'expression en ARNm de marqueurs de la protéolyse (MuRF1 et MAFbx) sur un modèle préclinique de cachexie cancéreuse (Bohnert *et al.*, 2016). Un stress du RE / RS peut aussi limiter la synthèse protéique via, entre autres, la voie du senseur ATF4. Dans notre étude, nous n'avons observé aucune différence entre les tertiles de SMI pour l'expression de quatre marqueurs du stress du RE. Il semble indispensable de valider nos résultats en déterminant la quantité protéique d'autres marqueurs de stress du RE tels que les formes phosphorylées de PERK et eIF2α.

Lors des analyses en MET, nous avons observé une importante hétérogénéité du glycogène stocké dans le cytoplasme des fibres musculaires squelettiques entre les patients. Cette altération métabolique pourrait être associée à l'atrophie des fibres musculaires squelettiques. En effet, s'il n'est pas possible de mobiliser les réserves glucidiques (stockées sous forme de glycogène), cela pourrait limiter les capacités d'oxydation des substrats lipidiques par la mitochondrie en restreignant l'approvisionnement du cycle de Krebs par la glycolyse (anaplérose). Cela entraînerait une accumulation de vacuoles lipidiques, et donc d'intermédiaires lipotoxiques, qui ont été retrouvés associés à une atrophie musculaire. Les glycogénoses musculaires sont cliniquement caractérisées par une fatigue musculaire et des épisodes de rhabdomyolyse, des symptômes qui pourraient être compatibles avec la fonte musculaire caractéristique de la cachexie cancéreuse. Toutefois, nous n'avons observé aucune différence au niveau du stockage de glycogène après coloration au PAS dans les fibres musculaires des patients des tertiles de SMI, ou avec la stratification de la cachexie.

En conclusion, nos résultats montrent une corrélation positive entre la surface médiane des fibres musculaires squelettiques et l'index de masse musculaire, ce qui suggère que la fonte musculaire caractéristique de la cachexie cancéreuse pourrait être expliquée par une diminution de la surface des fibres musculaires squelettiques. En revanche, nous n'avons pas observé de dysfonction structurelle ou métabolique mitochondriale et lipidique, dans le muscle squelettique des patients avec un faible index de masse musculaire, pris en charge pour un cancer digestif avancé. Il est important de considérer les limitations de cette étude et notamment un faible effectif dans chaque groupe. De plus, les différents paramètres sur biopsies n'ont pas pu être analysés pour tous les patients par manque de matériel. Nous envisageons à court terme de confirmer ces résultats par des analyses supplémentaires ; et d'étudier l'autophagie, un autre

système majeur contrôlant la protéolyse du muscle squelettique, ainsi que les voies apoptotiques, comme mécanismes potentiellement responsables de la fonte musculaire squelettique caractéristique de la cachexie cancéreuse.

Partie 3

Etude de la structure et du métabolisme des fibres musculaires squelettiques chez des patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre dans le contexte de la cachexie cancéreuse - Impact de l'obésité

Protocole clinique METERMUS-IMC (NCT03027479)

I. Hypothèses et objectifs

L'obésité sarcopénique fait l'objet de débats dans la communauté scientifique, quand certains parlent de l'effet paradoxalement protecteur de l'obésité, alors que d'autres pointent du doigt la dangerosité de la fonte musculaire masquée (Prado *et al.*, 2016). Sarcopénie et obésité ont en commun des mécanismes physio pathologiques, tels que l'insulino-résistance, l'état inflammatoire et le stress oxydatif. Un cercle vicieux pourrait exister entre l'augmentation de l'adiposité et la fonte musculaire squelettique, d'autant plus de par l'influence réciproque exercée par ces deux tissus (Argilés *et al.*, 2005). Mais à notre connaissance, aucune étude clinique n'a étudié l'impact de l'obésité sur la structure et le métabolisme musculaires squelettiques, ou du tissu adipeux, chez des patients cachectiques porteurs d'un cancer.

Chez le patient obèse, on observe une augmentation de la lipolyse basale dans les cellules adipeuses sous-cutanées, liée à leur surface plus grande associée à la sécrétion de cytokines inflammatoires, telle que TNFα (Arner and Langin, 2014). Une lipolyse excessive pourrait engendrer une accumulation de vacuoles lipidiques et d'intermédiaires lipotoxiques qui stimuleraient la protéolyse musculaire ; mais aussi une surcharge lipidique dans les mitochondries, entraînant des dysfonctions mitochondriales et une augmentation de la production mitochondriale de ROS (« Reactive Oxygen Species »), aggravant la fonte musculaire squelettique. Des perturbations de l'intégrité des MAM (« Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membranes ») pourraient avoir lieu, ainsi qu'un stress du RE, conduisant à une protéolyse et une fonte musculaire squelettique accrues.

Aussi, nous avons émis l'hypothèse d'un effet aggravateur de l'obésité sur les altérations musculaires squelettiques, via une lipolyse des compartiments adipeux, en quantité abondante chez les patients avec une surcharge pondérale (**Figure 32**). Nous avons également émis l'hypothèse d'un brunissement du tissu adipeux qui contribuerait au déséquilibre de la balance énergétique observé chez certains patients cachectiques porteurs d'un cancer.

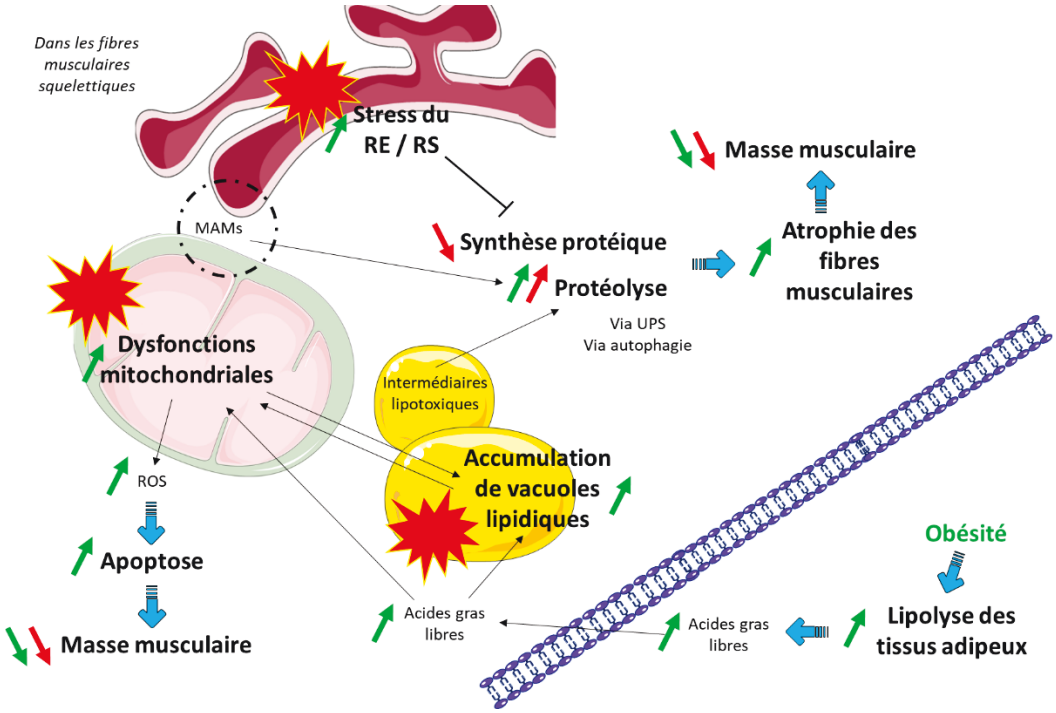


Figure 32 : Schéma des hypothèses de l'étude concernant les dysfonctions métaboliques et structurelles induisant une fonte musculaire squelettique chez les patients cachectiques, et du rôle aggravateur de l'obésité.

Une accumulation de vacuoles lipidiques, des dysfonctions mitochondriales et un stress du RE / RS pourraient conduire à une augmentation de la protéolyse, via la voie UPS et l'autophagie, et une diminution de la synthèse protéique, induisant une atrophie des fibres musculaires squelettiques et une diminution de la masse musculaire. La production de ROS suite à des altérations mitochondriales peut aussi participer à la fonte musculaire, par l'activation des voies apoptotiques. La lipolyse des compartiments adipeux, dont le niveau basal est retrouvé augmenté chez les patients obèses, pourrait engendrer une plus grande accumulation de vacuoles lipidiques dans les fibres musculaires, des dysfonctions mitochondriales et des perturbations de l'intégrité des MAM, qui aggraveraient la fonte musculaire squelettique. En vert sont représentées nos hypothèses sur les effets de l'obésité.

Les objectifs de cette partie du travail de thèse étaient :

i) D'étudier la structure du muscle squelettique, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, les vacuoles lipidiques, et le RE/RS dans le muscle squelettique chez des patientes cachectiques porteuses d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre ;

ii) D'étudier le brunissement du tissu adipeux sous-cutané dans le contexte de la cachexie cancéreuse et d'évaluer l'impact de l'obésité sur tous ces paramètres. Pour répondre à ces objectifs, nous avons séparé les patientes en fonction de leur index de masse musculaire squelettique (SMI) et de leur indice de masse corporelle (IMC).

II. Résultats

Soixante-cinq patientes avec un cancer ovarien ou de l'endomètre ont été inclues dans le protocole clinique METERMUS-IMC (NCT03027479). Les biopsies musculaires squelettiques et du tissu adipeux ont été collectées pour toutes les patientes, tandis qu'un CT-Scanner a été récupéré pour 54 d'entre elles. Parmi les 65 patientes inclues dans l'étude, 35 (54%) avaient un cancer de l'ovaire, 8 (12%) avaient une tumeur borderline de l'ovaire, et 22 (34%) avaient un cancer de l'endomètre. Elles avaient un âge médian de 68 ans (IQR, 62 à 72). Près de la moitié des patientes avaient un statut de performance OMS à 0. Vingt (30%) femmes avaient reçu un traitement chimio thérapeutique avant leur inclusion. La plupart du temps, il s'agissait d'un traitement à base de Taxol-Carboplatine.

Répartition des patientes en fonction de leur IMC et SMI

Afin d'étudier les fonctions structurelles et métaboliques dans le muscle squelettique des patientes suivant leur index de masse musculaire et de regarder l'impact de l'obésité sur ces paramètres, les patientes ont été séparées en fonction de leur IMC et de leur SMI.

Parmi les patientes pour qui nous avons pu récupérer un CT-Scanner et mesurer l'index de masse musculaire, deux étaient en insuffisance pondérale à l'inclusion, avec des IMC respectifs de 17,4 et 18,4 $kg/m^{2,}$ Ne pouvant constituer un groupe à part, elles ont été inclues dans le groupe des patientes avec un IMC inférieur à 25 kg/m^2, qu'on appellera « IMC normal » pour la suite des analyses. Dix-sept patientes avaient un IMC inférieur à 25 kg/m^2, 16 étaient en surpoids (IMC compris entre 25 et 29,9 kg/m^2) et 19 étaient obèses (12 avec un IMC compris entre 30 et 34,9 kg/m^2, quatre avec un IMC compris entre 35 et 39,9 kg/m^2 et trois avec un IMC supérieur à 40 kg/m^2). Les patientes obèses avaient un SMI significativement plus grand que les patientes en surpoids (48,43 ± 7,93 cm^2/m^2 *vs* 42,53 ± 4,94 cm^2/m^2, p=0,015, Test T) et que celles avec un IMC normal (48,43 ± 7,93 cm^2/m^2 *vs* 38,51 ± 4,84 cm^2/m^2, p=0,0001, Test T) (**Figure 33A**).

Pour chaque groupe d'IMC, la médiane du SMI (38,38 cm^2/m^2 pour les patientes avec un IMC inférieur à 25 kg/m^2, 42,71 cm^2/m^2 pour les patientes en surpoids et 48,40 cm^2/m^2 pour les patientes obèses) a été utilisée pour distinguer les femmes avec une faible masse musculaire (inférieure à la médiane) de celles avec une masse musculaire plus importante (supérieure à la médiane, p< 0,01) (**Figure 33B**). Ce sont ces groupes qui ont été utilisés pour la suite des analyses.

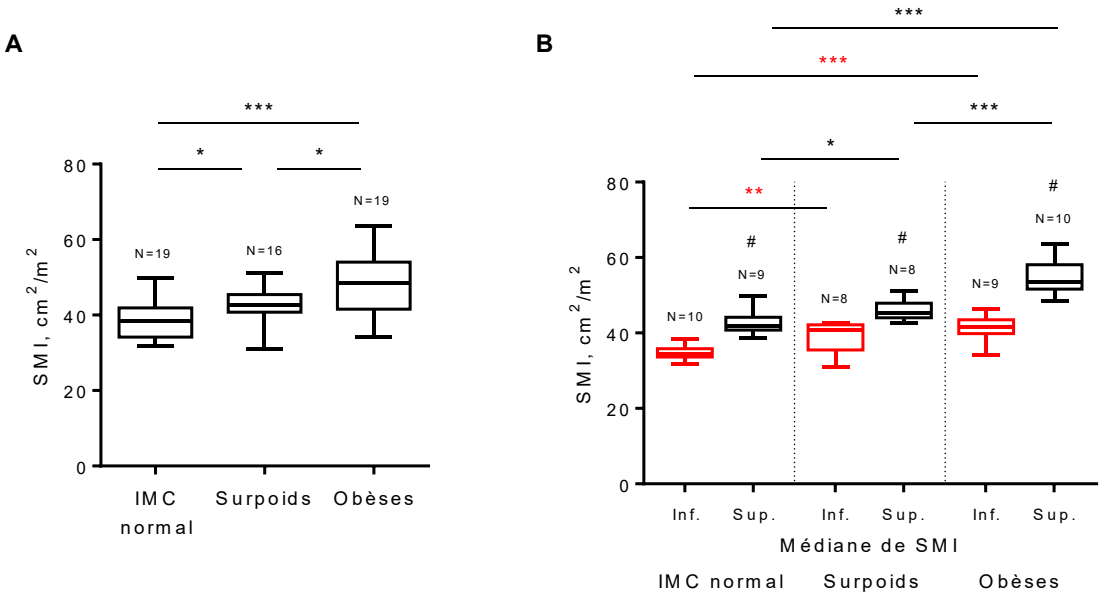


Figure 33 : Répartition des patientes en fonction de leur IMC et SMI.

(A) SMI des patientes pour chaque groupe d'IMC. Obèses vs Surpoids : p=0,015 ; Obèses vs IMC normal : p=0,0001 et Surpoids vs IMC normal : p=0,021 - Tests T. **(B)** Pour chaque groupe d'IMC, les femmes avec un SMI inférieur à la médiane, en rouge (IMC normal : 38,38 cm^2/m^2 ; Surpoids : 42,71 cm^2/m^2 ; Obèses : 48,40 cm^2/m^2) sont comparées à celles avec un SMI supérieur à la médiane, en noir (# p< 0,01). * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Caractéristiques cliniques des patientes en fonction de leur IMC et SMI

Le **Tableau 17** détaille les caractéristiques cliniques des patientes en fonction de leur IMC et de leur SMI. Pour chaque catégorie d'IMC (IMC normal, surpoids et obésité), nous n'avons pas observé de différence significative entre les patientes avec un SMI supérieur ou inférieur à la médiane, pour l'âge, le cancer, le pourcentage de femmes ayant reçu un traitement anti-cancéreux avant inclusion, et la masse grasse.

Tableau 17 : Caractéristiques cliniques des patientes en fonction de leur IMC et SMI

Caractéristique	IMC normal (n=19)					Surpoids (n=16)				
	SMI < médiane (n=10)		SMI > médiane (n=9)		*p* value	SMI < médiane (n=8)		SMI > médiane (n=8)		*p* value
	No. (%)	Médiane (IQR) Moyenne ± SD	No. (%)	Médiane (IQR) Moyenne ± SD		No. (%)	Médiane (IQR) Moyenne ± SD	No. (%)	Médiane (IQR) Moyenne ± SD	
Age, ans		71 (68 à 73)		69 ± 16	0,187		73 ± 6		68 ± 10	0,281
Cancer					0,180					0,244
Ovaire	9 (90)		5 (56)			7 (87,5)		4 (50)		
Tumeur borderline de l'ovaire	0		2 (22)			0		1 (12,5)		
Endomètre	1 (10)		2 (22)			1 (12,5)		3 (37,5)		
Chimiothérapie avant inclusion	5 (50)		2 (22)		0,350	3 (37,5)		3 (37,5)		1,000
IMC, kg/m²		20,6 ± 2,3		21,9 ± 1,5	0,250		26,9 ± 1,1		27,3 ± 1,5	0,489
Composition corporelle										
Aire musculaire squelettique, cm²		91,5 ± 7,2		110,1 ± 13,0	0,001		99,5 ± 15,9		112,8 ± 6,8	0,048
SMI, cm²/m²		34,7 ± 1,8		41,9 (40,8 à 44,1)	0,0001		39,1 ± 4,2		46,0 ± 2,7	0,001
Densité musculaire, HU (n=38)		35,2 (28,8 à 44,3)		43,4 ± 5,0	0,202		31,6 ± 6,7		39,3 ± 6,6	0,037
Tissus adipeux totaux, cm²		218,5 ± 108,6		167,6 ± 117,8	0,340		355,0 ± 99,1		355,8 ± 54,3	0,984
WFM, kg		19,0 ± 7,4		15,5 ± 8,0	0,340		28,3 ± 6,7		28,3 ± 3,7	0,983

Caractéristique	Obèses (n=19)				
	SMI < médiane (n=9)		SMI > médiane (n=10)		*p* value
	No. (%)	Médiane (IQR) Moyenne ± SD	No. (%)	Médiane (IQR) Moyenne ± SD	
Age, ans		65,7 ± 8,1		62 ± 8	0,375
Cancer					0,441
Ovaire	6 (67)		4 (40)		
Tumeur borderline de l'ovaire	1 (11)		1 (10)		
Endomètre	2 (22)		5 (50)		
Chimiothérapie avant inclusion	5 (56)		2 (20)		0,170
IMC, kg/m²		32,3 (31,1 à 35,0)		35,7 (33,6 à 39,9)	0,062
Composition corporelle					
Aire musculaire squelettique, cm²		105,7 ± 9,3		132,8 ± 12,7	0,0001
SMI, cm²/m²		41,4 ± 3,4		54,7 ± 4,7	0,0001
Densité musculaire, HU (n=38)		31,4 (26,4 à 35,8)		35,1 ± 8,8	0,184
Tissus adipeux totaux, cm²		563,7 ± 135,5		570,6 ± 258,4	0,944
WFM, kg		42,5 ± 9,2		42,9 ± 17,6	0,944

Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD ou médiane + IQR.

Abréviations dans l'ordre d'apparition : IMC, Indice de Masse Corporelle ; SMI : « Skeletal Muscle Index » ; HU : Unités de Hounsfield ; WFM : « Whole-Body Fat Mass »

Augmentation de la protéolyse dans le muscle squelettique chez les patientes porteuses d'un cancer et avec une faible masse musculaire, en fonction de l'IMC ?

Nous avons quantifié par RT-qPCR l'expression en ARN de deux marqueurs de la protéolyse via la voie UPS, MuRF1 (« Muscle RING Finger-1 ») et MAFbx (« Atrogin-1b »), et n'avons trouvé aucune association avec le SMI, quelle que soit la catégorie d'IMC (**Figure 34**).

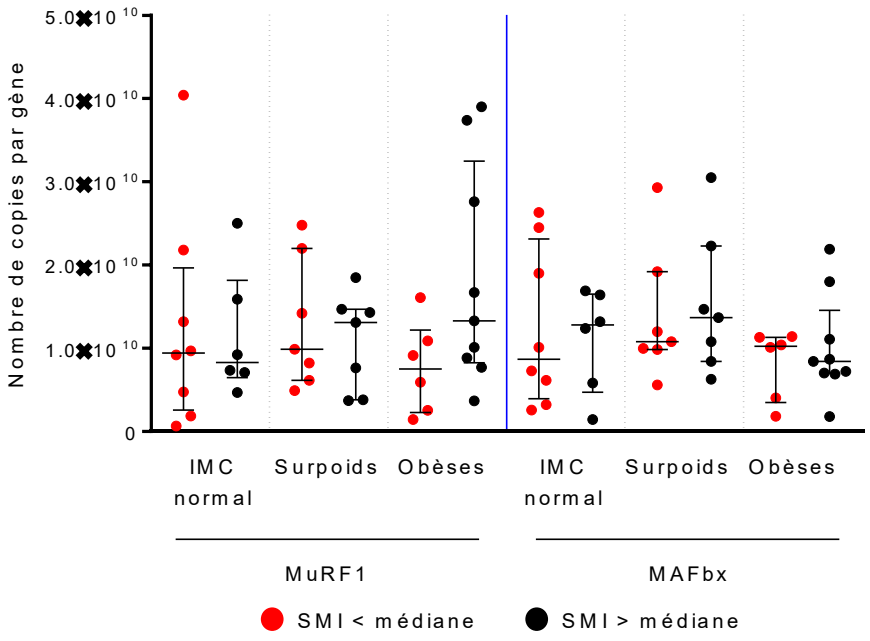


Figure 34 : Marqueurs de l'atrophie musculaire.

Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de deux marqueurs de la protéolyse par la voie UPS : MuRF1 (« Muscle RING Finger-1 ») et MAFbx (« Atrogin-1b »). Rouge : SMI < médiane, noir : SMI > médiane. Deux valeurs aberrantes ont été exclues en utilisant le test de Grubbs' α=0,01 dans le groupe des patientes obèses avec SMI < médiane : l'un pour MuRF1 (6,91^{e+10} copies) et l'autre pour MAFbx (4,07^{e+10} copies). Quel que soit l'IMC, *p*=ns - Tests Mann-Whitney.

Dysfonctions au niveau du métabolisme, de la dynamique et/ou de la structure de la mitochondrie chez les patientes porteuses d'un cancer et avec une faible masse musculaire, en fonction de l'IMC ?

Nous avons analysé la consommation mitochondriale d'oxygène aux état 3 (proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée à la synthèse d'ATP), état 4 (proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée au gaspillage énergétique), état découplé (réserve énergétique mitochondriale) et pour l'activité du complexe 4, Nous n'avons trouvé aucune association entre le SMI des patientes et la consommation mitochondriale d'oxygène, quel que soit leur IMC (**Figure 35A**). Nous avons aussi étudié le nombre de copies par gène de trois marqueurs de la biogenèse mitochondriale (**Figure 35B**) : PGC1α (« Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1α »), MTFA (« Mitochondrial Transcription Factor A ») et NRF2 (« Nuclear Respiratory Factor 2 »), de la fusion mitochondriale (**Figure 35C**) : Mfn (« Mitofusin ») et OPA1 (« Optic Atrophy 1 ») et de la fission mitochondriale (**Figure 35D**) : Fis1 (« mitochondrial Fission protein 1 »), Mff (« Mitochondrial fission factor ») ; Drp1 (« Dynamin-related protein 1 »). Aucune différence significative n'a été observée pour tous ces marqueurs entre les patientes avec un SMI supérieur ou inférieur à la médiane, qu'elles aient un IMC normal ou qu'elles soient en surpoids ou obèses.

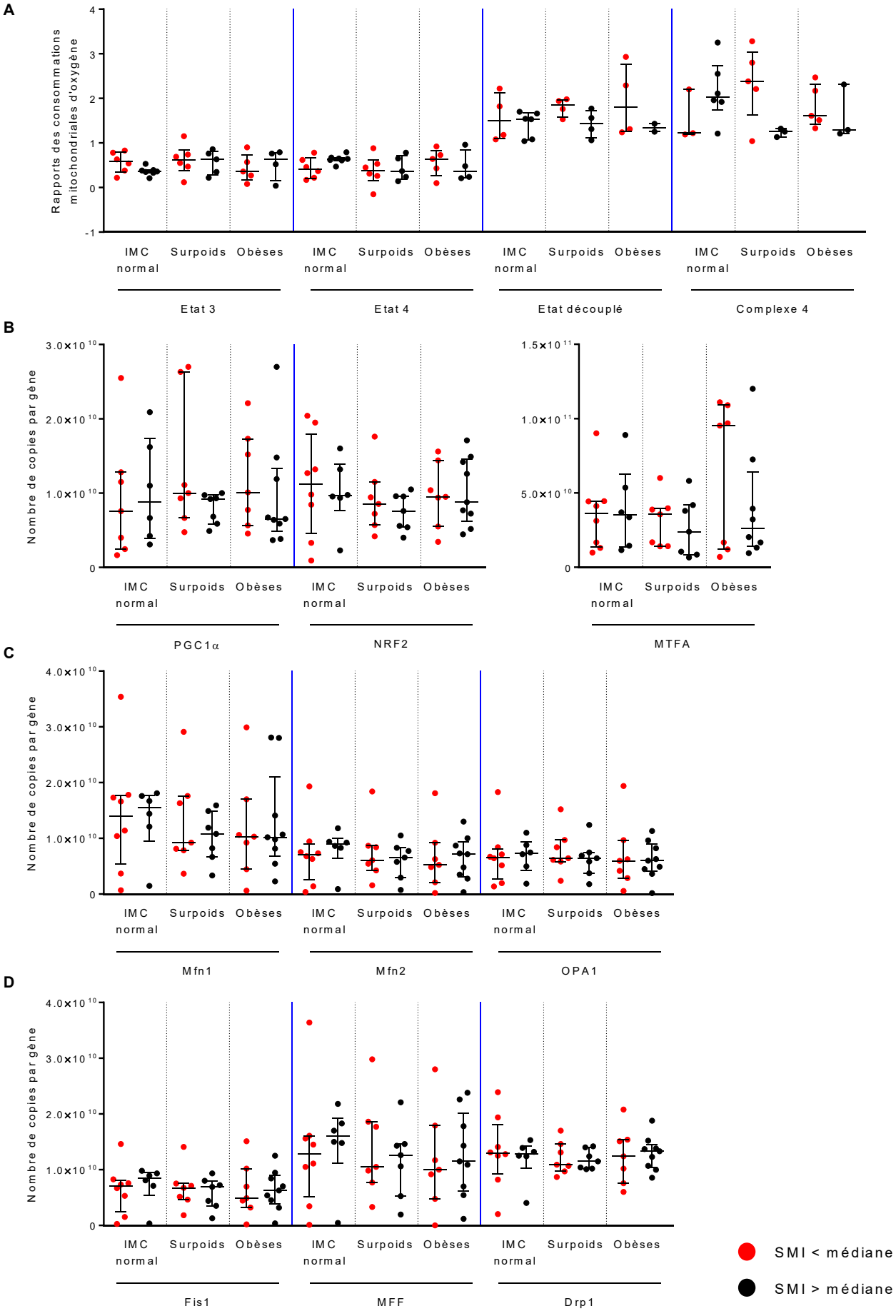

A
Rapports des consommations mitochondriales d'oxygène
IMC normal
Surpoids
Obèses
Etat 3
Etat 4
Etat découplé
Complexe 4
B
Nombre de copies par gène
PGC1α
NRF2
MTFA
C
Mfn1
Mfn2
OPA1
D
Fis1
MFF
Drp1
SMI < médiane
SMI > médiane

Figure 35 : Métabolisme, dynamique et structure de la mitochondrie

Légende de la figure 35 : **(A)** Mesure de la consommation mitochondriale d'oxygène par oxygraphie à haute résolution. Etat 3 : Proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée à la synthèse d'ATP (Consommation d'O_2 (JO_2) après ajout d'ADP - JO_2 après ajout d'Oligomycine / JO_2 après ajout d'ADP) ; Etat 4 : Proportion de la consommation mitochondriale d'oxygène liée au gaspillage énergétique (JO_2 après ajout d'Oligomycine / JO_2 après ajout d'ADP) ; Etat découplé : Réserve énergétique mitochondriale (JO_2 après ajout de FCCP / JO_2 après ajout d'ADP) ; Complexe 4 : Activité du complexe 4 (JO_2 après ajout de TMPD / JO_2 après ajout de FCCP). Quel que soit l'IMC, *p*=ns - Mann-Whitney.

Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de trois marqueurs de la **(B)** biogenèse mitochondriale : PGC1α (« Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1α »), MTFA (« Mitochondrial Transcription Factor A ») et NRF2 (« Nuclear Respiratory Factor 2 »), **(C)** de la fusion mitochondriale : Mfn (« Mitofusin ») et OPA1 (« Optic Atrophy 1 ») et **(D)** de la fission mitochondriale : Fis1 (« mitochondrial Fission protein 1 »), Mff (« Mitochondrial fission factor ») et Drp1 (« Dynamin-related protein 1 »). Rouge : SMI < médiane, noir : SMI > médiane. *p*=ns - Mann-Whitney. Une valeur aberrante du groupe des patientes obèses SMI > médiane a été exclue pour l'expression de MTFA ($3{,}03^{e+10}$ copies) en utilisant le test de Grubbs' α=0,01,

Accumulation de vacuoles lipidiques intra myocellulaires chez les patientes porteuses d'un cancer et avec une faible masse musculaire, en fonction de l'IMC ?

A l'heure actuelle, nous avons quantifié seulement l'expression en ARNm de quatre périlipines comme marqueurs des vacuoles lipidiques et n'avons trouvé aucune association avec le SMI, quel que soit l'IMC (**Figure 36**).

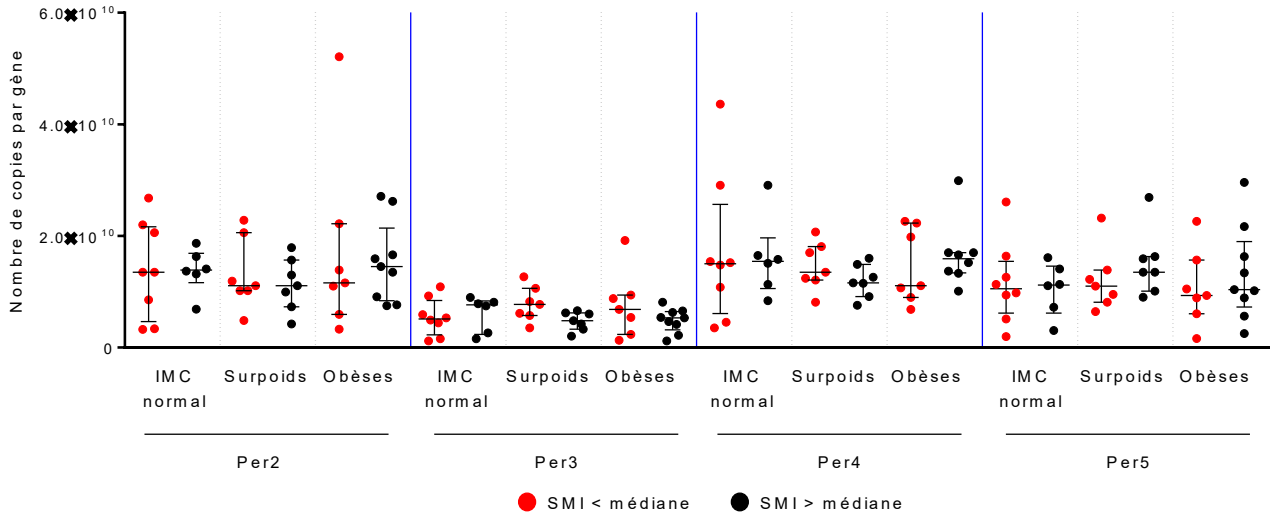


Figure 36 : Expression de marqueurs des vacuoles lipidiques.

Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de quatre périlipines (Per). Une valeur aberrante du groupe des patientes obèses avec SMI > médiane a été exclue pour l'expression de la périlipine 3 ($1{,}23^{e+11}$ copies) en utilisant le test de Grubbs' α=0,01, Rouge : SMI < médiane, noir : SMI > médiane. *p*=ns - Mann-Whitney.

Stress du RE dans le muscle squelettique des patientes porteuses d'un cancer et avec une faible masse musculaire, en fonction de l'IMC ?

Nous avons quantifié le nombre de copies par gène de quatre marqueurs du stress du RE / RS : les protéines chaperonnes GRP78, ou BiP (« immunoglobin Binding Protein ») et EDEM (« ER-degradation-enhancing-α-mannidose-like protein ») et les facteurs de transcription ATF4 (« Activating Transcription Factor 4 ») et CHOP (« C/EBP homologous protein »), de la voie du senseur de stress du RE / RS PERK (« Protein kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase »). Nous n'avons trouvé aucune association avec le SMI, quelle que soit la catégorie d'IMC, pour l'expression de ces quatre marqueurs (**Figure 37**).

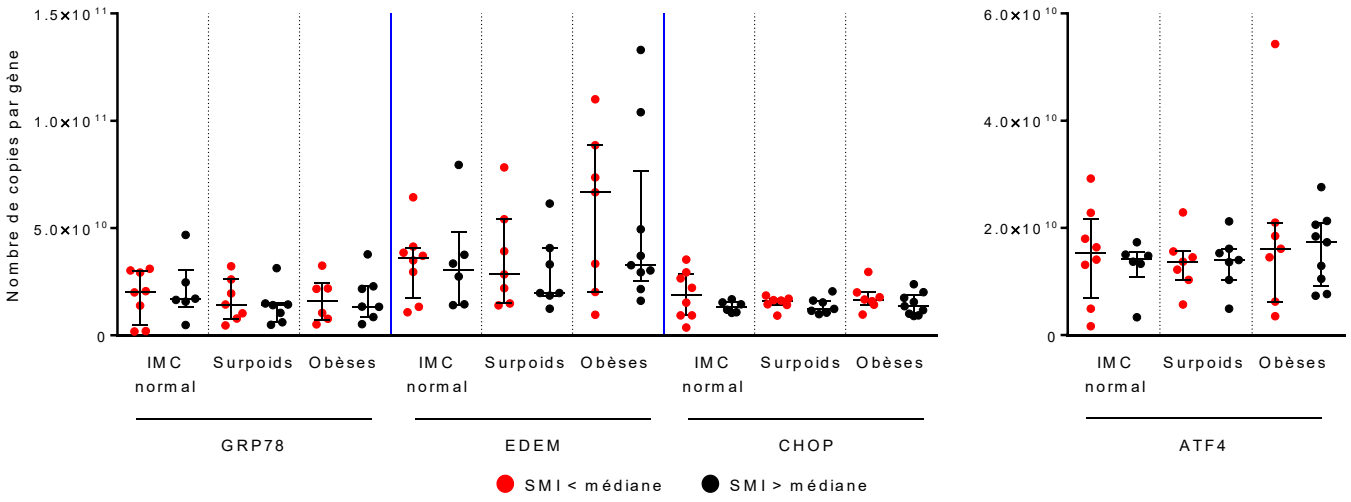


Figure 37 : Expression de gènes du stress du RE / RS.

Quantification par RT-qPCR du nombre de copies par gène de quatre marqueurs du stress du RE / RS : les protéines chaperonnes GRP78, ou BiP (« immunoglobin Binding Protein ») et EDEM (« ER-degradation-enhancing-α-mannidose-like protein ») et les facteurs de transcription ATF4 (« Activating Transcription Factor 4 ») et CHOP (« C/EBP homologous protein »). Rouge : SMI < médiane, noir : SMI > médiane. *p*=ns - Mann-Whitney.

Brunissement du tissu adipeux chez les patientes porteuses d'un cancer et avec une faible masse musculaire, en fonction de l'IMC ?

Un marquage très faible d'UCP1 en immuno-histologie, montrant le tissu adipeux beige/brun, a été observé pour 9 patientes, seules six avaient un CT-Scanner disponible. Trois patientes avaient un IMC normal (deux avec SMI > médiane et une avec SMI < médiane) ; deux patientes étaient en surpoids avec SMI > médiane ; une patiente était obèse avec SMI < médiane.

III. Discussion et perspectives

Le protocole clinique METERMUS-IMC avaient deux objectifs spécifiques :

i) Etudier la structure du muscle squelettique, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, les vacuoles lipidiques, et le RE/RS dans le muscle squelettique chez des patientes cachectiques porteuses d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre ;

ii) Etudier le brunissement du tissu adipeux sous-cutané dans le contexte de la cachexie cancéreuse et évaluer l'impact de l'obésité sur tous ces paramètres.

Par manque de données sur la perte de poids des patientes avant inclusion, il était impossible d'utiliser une stratification de la cachexie cancéreuse pour ce protocole clinique. En outre, les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire développent souvent de l'ascite dans la cavité péritonéale, avec des volumes pouvant atteindre 10 litres. Cet épanchement peut apparaître plus ou moins rapidement et biaiser les prises de poids corporel. Nous avons donc utilisé les données de SMI et séparé les patientes dans chaque catégorie d'IMC en utilisant la médiane, les effectifs étant trop faibles pour créer des tertiles. Il était important de vérifier qu'il y avait une bonne homogénéité entre les groupes au niveau de l'âge, du cancer et du pourcentage de femmes ayant reçu un traitement chimio thérapeutique avant leur inclusion. Malgré de légères disparités sur ces caractéristiques cliniques, aucune différence significative n'a été observée au sein de chaque catégorie d'IMC entre les femmes ayant un SMI inférieur à la médiane et celles avec un SMI supérieur à la médiane.

Nous avons émis l'hypothèse que chez les patientes porteuses d'un cancer et cachectiques, il y avait des altérations des métabolismes lipidique et mitochondrial et du RE / RS dans le muscle squelettique, participant aux mécanismes à l'origine de la fonte musculaire, et que l'obésité pourrait avoir un effet aggravateur sur ces altérations musculaires squelettiques. Quel que soit le paramètre étudié (consommation mitochondriale d'oxygène, expression en ARNm de marqueurs de la protéolyse via la voie UPS, de la biogenèse, fusion et fission mitochondriales, ou des vacuoles lipidiques, ou du stress du RE / RS), nous n'avons trouvé aucune association avec le SMI, quelle que soit la catégorie d'IMC. Néanmoins, il est indispensable de compléter certains résultats, en particulier l'analyse de l'expression protéique des marqueurs de la protéolyse, de la biogénèse, fusion et fission mitochondriales, et du stress du RE / RS. De plus,

l'accumulation des vacuoles lipidiques sera également quantifiée par un marquage des coupes de biopsies musculaires squelettiques à l'Oil Red O.

Parmi les modifications morpho structurelles retrouvées associées à la cachexie cancéreuse, un brunissement du tissu adipeux a été observé dans le tissu adipeux viscéral de patients cachectiques avec un sarcome de Kaposi (Petruzzelli *et al.*, 2014), et détecté très tôt (Elattar *et al.*, 2018; Kir *et al.*, 2014; Petruzzelli *et al.*, 2014) ou au contraire à un stade tardif (Han *et al.*, 2018) dans des modèles précliniques de cachexie cancéreuse. Nous avions émis l'hypothèse d'un brunissement du tissu adipeux qui contribuerait au déséquilibre de la balance énergétique observé chez certains patients cachectiques porteurs d'un cancer. Malheureusement, nos résultats d'immuno-histologie ne furent pas concluants, le marquage ne concernait qu'un adipocyte ou deux par patiente et aucune association n'a été trouvée avec le SMI ou l'IMC. Plusieurs paramètres pourraient expliquer que nous n'ayons pas obtenu le même résultat que l'étude de Petruzzelli *et al.* : nous n'avons pas étudié le même cancer (sarcome de Kaposi *vs* cancer gynécologique), ni le même tissu adipeux (viscéral *vs* sous-cutané). Les auteurs avaient d'ailleurs émis l'hypothèse d'une prédisposition différente des tissus adipeux à ce phénotype de thermogenèse accrue suivant leur localisation anatomique (Petruzzelli *et al.*, 2014). Une perspective envisagée est de quantifier l'expression protéique d'UCP1, Il serait également intéressant d'analyser d'autres paramètres dans le tissu adipeux de ces patientes, tel que la surface adipocytaire et l'expression de marqueurs de la lipolyse, pour vérifier l'hypothèse d'une atrophie de ces cellules, liée à une augmentation de la lipolyse.

Les mécanismes sous-jacents à la fonte musculaire squelettique dans le contexte de la cachexie cancéreuse ne sont pas tous élucidés. Nos résultats semblent montrer une absence d'altération mitochondriale et d'accumulation de vacuoles lipidiques chez les patientes porteuses d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre et avec une faible masse musculaire, et ce, quel que soit l'IMC considéré. Ces résultats confortent ceux obtenus sur le protocole clinique METERMUCADIG avec des patients atteints d'un cancer gastrique avancé et avec une faible masse musculaire. Il sera nécessaire de vérifier ces résultats par des analyses supplémentaires.

Chapitre IV : Conclusion et perspectives générales

Au cours de ce travail de thèse, nous nous étions donnés comme objectifs :

i) D'évaluer l'impact d'un traitement par chimiothérapie sur l'évolution simultanée de trois paramètres de la composition corporelle (masse maigre, masse grasse, et densité osseuse) dans une population de patients atteints d'un cancer colorectal métastatique traités par une chimiothérapie à base de bévacizumab (STIC-Avastin) ;

ii) D'étudier la structure du muscle squelettique, le métabolisme énergétique et la dynamique mitochondriales, les vacuoles lipidiques, et le réticulum endoplasmique (RE)/sarcoplasmique (RS) dans le muscle squelettique chez des patients cachectiques porteurs d'une part d'un cancer colorectal ou pancréatique (METERMUCADIG), et d'autre part d'un cancer de l'ovaire ou de l'endomètre (METERMUS-IMC) ;

iii) D'étudier le brunissement du tissu adipeux sous-cutané dans le contexte de la cachexie cancéreuse et d'évaluer l'impact de l'obésité sur tous ces paramètres (METERMUS-IMC).

L'analyse prospective des données de l'étude clinique STIC-Avastin nous a permis de montrer qu'une chimiothérapie cytotoxique à base de bévacizumab était associée à des modifications de la composition corporelle dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Il s'agit de la première étude clinique à mettre en évidence une variation interindividuelle considérable avec des pertes substantielles et simultanées de muscle squelettique, de masse grasse et de densité osseuse chez certains individus. Néanmoins, des études cliniques supplémentaires avec des effectifs plus importants sont nécessaires pour confirmer nos résultats. De plus, notre étude atteste qu'il est possible d'utiliser les CT-Scanners oncologiques de routine pour extraire les données de densité osseuse, en plus de la masse musculaire squelettique et des tissus adipeux totaux, pour obtenir une vision plus complète de la composition corporelle du patient.

Pour approfondir l'étude des liens entre composition corporelle et traitements anti cancéreux, nous avons voulu analyser l'influence des masses maigre et grasse sur la pharmacocinétique d'un anticorps monoclonal, le bévacizumab, toujours dans le cadre de l'étude clinique STIC-Avastin. Un article est actuellement en rédaction : « Body composition of patients with metastatic colon cancer is associated with bevacizumab pharmacokinetic parameters ». Nos résultats préliminaires montrent une association significative entre la masse maigre et le volume central de distribution (V1), la constante d'élimination (k10), et la clairance du bévacizumab. Cela confirme les données d'autres études cliniques qui suggèrent que la masse maigre devrait être utilisée pour normaliser les doses de médicaments chimio thérapeutiques hydrophiles, au lieu du poids et de la surface corporelle, comme il est d'usage à l'heure actuelle.

Nous en concluons que la composition corporelle est bien affectée par les traitements anti cancéreux, en plus de la tumeur, et qu'elle influe sur leur pharmacocinétique.

Nos résultats sur le protocole clinique METERMUCADIG montrent une corrélation positive entre la surface médiane des fibres musculaires squelettiques et l'index de masse musculaire des patients, ce qui suggère que la fonte musculaire caractéristique de la cachexie cancéreuse pourrait être expliquée par une diminution de la surface des fibres musculaires squelettiques. En revanche, nous n'avons ni observé d'altération du métabolisme mitochondrial, ni d'accumulation de vacuoles lipidiques, ni de stress du RE / RS chez des patients avec une faible masse musculaire, qu'ils soient porteurs d'un cancer digestif avancé (METERMUCADIG) ou d'un cancer gynécologique (METERMUS-IMC). Il est important de noter la concordance des résultats obtenus après avoir étudié les mêmes paramètres sur des biopsies de différents muscles squelettiques (*pectoralis major* et *rectus abdominis*), de patients porteurs de différents cancers (digestifs avancés et gynécologiques). Nous n'avons pas observé de brunissement du tissu adipeux sous-cutané et n'avons pas non plus trouvé d'impact de l'obésité sur tous ces paramètres, quel que soit le SMI considéré (METERMUS-IMC). Ces résultats originaux devront être confirmés par des analyses supplémentaires. Par ailleurs, nous envisageons d'étudier également l'autophagie, un autre système majeur contrôlant la protéolyse du muscle squelettique, ainsi que les voies apoptotiques, comme mécanismes potentiellement responsables de la fonte musculaire squelettique caractéristique de la cachexie cancéreuse.

Dans le cadre du protocole clinique METERMUCADIG, la dénutrition liée au cancer a été évaluée au moment de l'inclusion, en suivant un critère de perte de poids, comme c'est le cas dans beaucoup d'études cliniques. Un patient avec une perte de poids > 5% en 1 mois, ou > 10% en 6 mois précédant l'inclusion, était considéré comme dénutri. Toutefois, en utilisant une classification de la dénutrition basée sur la sévérité de la perte de poids (Martin *et al.*, 2015) ; et la sarcopénie (Martin *et al.*, 2013), nous avons remarqué que les groupes de patients dénutris et non dénutris variaient considérablement. Ces observations soulignent l'importance d'avoir des critères de diagnostic de la cachexie cancéreuse homogènes d'une étude clinique à l'autre, afin de pouvoir en comparer les résultats.

Aussi, un autre point important suggéré par ces travaux est l'absolue nécessité d'avoir des recommandations précises par les instances scientifiques (Society of Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders, ESPEN, SFNCM…) pour la réalisation de protocoles cliniques sur la

cachexie cancéreuse. Parmi les recommandations, une répartition homogène hommes / femmes au sein des groupes de patients (sauf cancer spécifique à un genre) et les critères de discrimination des patients dénutris ou non sont très importants pour rendre plus efficace la recherche dans ce domaine.

Ces recommandations doivent être adaptées à chaque catégorie d'IMC. La fonte musculaire est tout aussi délétère chez les patients en surpoids et obèses, où elle est masquée par l'importante adiposité, que chez les patients avec un IMC normal ou en insuffisance pondérale (Martin *et al.*, 2013; Prado *et al.*, 2008). Actuellement, la plupart des études cliniques utilisent un pourcentage fixe de perte de poids pour distinguer des patients cancéreux dénutris et non dénutris. Mais ce système ne prend pas en considération les risques de mortalité et degrés de dénutrition qui diffèrent pour un même pourcentage de perte de poids suivant la catégorie d'IMC (Martin *et al.*, 2015). Une bonne piste de réflexion pour le développement des recommandations serait d'utiliser une stratification de la cachexie cancéreuse basée sur le système robuste de notation de Martin *et al.* qui intègre le risque de diminution de la survie en fonction de l'IMC du patient et du pourcentage de perte de poids (Martin *et al.*, 2015). Une autre difficulté que nous avons eue avec le protocole clinique METERMUS-IMC est que les patientes obèses n'étaient pas enclines à déclarer leur véritable poids. Leur cancer étant détecté tardivement, si elles n'avaient pas été pesées lors d'une précédente hospitalisation, nous n'avions pas accès à une donnée fiable de perte de poids. Une piste serait de ne pas utiliser la perte de poids, mais seulement deux CT-Scanners, à un temps d'intervalle suffisant, pour évaluer l'évolution de la composition corporelle.

Les recommandations doivent aussi être adaptées aux spécificités de chaque cancer. L'une des particularités du cancer de l'ovaire est que la plupart des patientes présentent une accumulation d'ascite dans la cavité péritonéale, avec des volumes pouvant atteindre 10 litres suivant le moment où il est détecté. Il peut aussi se manifester en présence de cancers de l'utérus et de cancers digestifs, comme le cancer du côlon, du pancréas et du foie. Cet épanchement peut apparaître plus ou moins rapidement, biaiser les prises de poids corporel et masquer la sarcopénie / dénutrition associée au cancer. Là aussi, il serait peut-être plus approprié d'évaluer l'évolution de la composition corporelle sur deux CT-Scanners plutôt qu'utiliser une perte de poids. Toutefois, à notre connaissance, aucun critère de diagnostic de la cachexie cancéreuse basé sur l'analyse de la composition corporelle sur deux CT-Scanners n'a été validé dans la littérature.

Bibliographie

Aas, V., Kase, E.T., Solberg, R., Jensen, J., and Rustan, A.C. *Chronic hyperglycaemia promotes lipogenesis and triacylglycerol accumulation in human skeletal muscle cells*. Diabetologia 47, 2004, 1452–1461.

Acharyya, S., Butchbach, M.E.R., Sahenk, Z., Wang, H., Saji, M., Carathers, M., Ringel, M.D., Skipworth, R.J.E., Fearon, K.C.H., Hollingsworth, M.A., *et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: A regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia*. Cancer Cell 8, 2005, 421–432.

Agustsson, T., Rydén, M., Hoffstedt, J., van Harmelen, V., Dicker, A., Laurencikiene, J., Isaksson, B., Permert, J., and Arner, P. *Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia*. Cancer Res. 67, 2007, 5531–5537.

Agustsson, T., Wikrantz, P., Rydén, M., Brismar, T., and Isaksson, B. *Adipose tissue volume is decreased in recently diagnosed cancer patients with cachexia*. Nutrition 28, 2012, 851–855.

Ali, A.T. *Risk factors for endometrial cancer*. Ceska Gynekol. 78, 2013, 448–459.

Alonso, A., Martin, P., Albarran, C., Aquilera, B., Garcia, O., Guzman, A., Oliva, H., and Sancho, M. *Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis*. Electrophoresis 18, 1997, 682–685.

Alves, M.J., Figuerêdo, R.G., Azevedo, F.F., Cavallaro, D.A., Neto, N.I.P., Lima, J.D.C., Matos-Neto, E., Radloff, K., Riccardi, D.M., Camargo, R.G., *et al. Adipose tissue fibrosis in human cancer cachexia: the role of TGFβ pathway*. BMC Cancer 17, 2017.

Amat, R., Planavila, A., Chen, S.L., Iglesias, R., Giralt, M., and Villarroya, F. *SIRT1 Controls the Transcription of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ Co-activator-1α (PGC-1α) Gene in Skeletal Muscle through the PGC-1α Autoregulatory Loop and Interaction with MyoD*. J. Biol. Chem. 284, 2009, 21872–21880.

Amati, F., Dubé, J.J., Alvarez-Carnero, E., Edreira, M.M., Chomentowski, P., Coen, P.M., Switzer, G.E., Bickel, P.E., Stefanovic-Racic, M., Toledo, F.G.S., *et al. Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes?*. Diabetes 60, 2011, 2588–2597.

Ambrus, J.L., Ambrus, C.M., Mink, I.B., and Pickren, J.W. *Causes of death in cancer patients*. J. Med. 6, 1975, 61–64.

Anderson, E.J., and Neufer, P.D. *Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H2O2 generation*. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 290, 2006, C844–C851.

Anderson, D.E., D'Agostino, J.M., Bruno, A.G., Demissie, S., Kiel, D.P., and Bouxsein, M.L. *Variations of CT-Based Trunk Muscle Attenuation by Age, Sex, and Specific Muscle*. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 68, 2013, 317–323.

Anderson, L.J., Albrecht, E.D., and Garcia, J.M. *Update on Management of Cancer-Related Cachexia*. Curr. Oncol. Rep. 19, 2017, 3.

Anoveros-Barrera, A., Bhullar, A.S., Stretch, C., Esfandiari, N., Dunichand-Hoedl, A.R., Martins, K.J.B., Bigam, D., Khadaroo, R.G., McMullen, T., Bathe, O.F., *et al. Clinical and biological characterization of skeletal muscle tissue biopsies of surgical cancer patients*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 2019, jcsm.12466.

Anthony, T.G. *Mechanisms of protein balance in skeletal muscle*. Domest. Anim. Endocrinol. 56, 2016, S23–S32.

Antoun, S., Bayar, M.A., Dyevre, V., Lanoy, E., Smolenschi, C., and Ducreux, M. *No evidence for changes in skeletal muscle mass or weight during first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer*. BMC Cancer 19, 2019, 847.

Aquilano, K., Baldelli, S., La Barbera, L., Lettieri Barbato, D., Tatulli, G., and Ciriolo, M.R. *Adipose triglyceride lipase decrement affects skeletal muscle homeostasis during aging through FAs-PPARα-PGC-1α antioxidant response*. Oncotarget 7, 2016, 23019–23032.

Arends, J., Bachmann, P., Baracos, V., Barthelemy, N., Bertz, H., Bozzetti, F., Fearon, K., Hütterer, E., Isenring, E., Kaasa, S., *et al. ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients*. Clin. Nutr. 36, 2017, 11–48.

Argilés, J.M., López-Soriano, J., Almendro, V., Busquets, S., and López-Soriano, F.J. *Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity?*. Med. Res. Rev. 25, 2005, 49–65.

Argilés, J.M., López-Soriano, F.J., and Busquets, S. *Therapeutic potential of interleukin-15: a myokine involved in muscle wasting and adiposity*. Drug Discov. Today 14, 2009, 208–213.

Argilés, J.M., Busquets, S., López-Soriano, F.J., Costelli, P., and Penna, F. *Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia?*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 3, 2012, 73–76.

Argilés, J.M., Busquets, S., Stemmler, B., and López-Soriano, F.J. *Cancer cachexia: understanding the molecular basis*. Nat. Rev. Cancer 14, 2014, 754–762.

Armstrong, J., Pineda, M., and Monrós, E. *Mutation analysis of 16S rRNA in patients with Rett syndrome*. Pediatr. Neurol. 23, 2000, 85–87.

Arner, P., and Langin, D. *Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance*. Trends Endocrinol. Metab. 25, 2014, 255–262.

Aubrey, J., Esfandiari, N., Baracos, V.E., Buteau, F.A., Frenette, J., Putman, C.T., and Mazurak, V.C. *Measurement of skeletal muscle radiation attenuation and basis of its biological variation*. Acta Physiol. Oxf. Engl. 210, 2014, 489–497.

Aversa, Z., Bonetto, A., Penna, F., Costelli, P., Di Rienzo, G., Lacitignola, A., Baccino, F.M., Ziparo, V., Mercantini, P., Rossi Fanelli, F., *et al. Changes in myostatin signaling in non-weight-losing cancer patients*. Ann. Surg. Oncol. 19, 2012, 1350–1356.

Aversa, Z., Pin, F., Lucia, S., Penna, F., Verzaro, R., Fazi, M., Colasante, G., Tirone, A., Fanelli, F.R., Ramaccini, C., *et al. Autophagy is induced in the skeletal muscle of cachectic cancer patients*. Sci. Rep. 6, 2016.

Awad, S., Tan, B.H., Cui, H., Bhalla, A., Fearon, K.C.H., Parsons, S.L., Catton, J.A., and Lobo, D.N. *Marked changes in body composition following neoadjuvant chemotherapy for oesophagogastric cancer*. Clin. Nutr. Edinb. Scotl. 31, 2012, 74–77.

Baar, K., Wende, A.R., Jones, T.E., Marison, M., Nolte, L.A., Chen, M., Kelly, D.P., and Holloszy, J.O. *Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1*. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 16, 2002, 1879–1886.

Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., *et al. Mitofusin-2 Determines Mitochondrial Network Architecture and Mitochondrial Metabolism: A NOVEL REGULATORY MECHANISM ALTERED IN OBESITY*. J. Biol. Chem. 278, 2003, 17190–17197.

Ballarò, R., Costelli, P., and Penna, F. *Animal models for cancer cachexia:*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 10, 2016, 281–287.

Banduseela, V., Ochala, J., Lamberg, K., Kalimo, H., and Larsson, L. *Muscle Paralysis and Myosin Loss in a Patient with Cancer Cachexia*. Acta Myol. 26, 2007, 136–144.

Baracos, V.E. *Bridging the gap: are animal models consistent with clinical cancer cachexia?*. Nat. Rev. Clin. Oncol. 15, 2018, 197–198.

Baracos, V.E., DeVivo, C., Hoyle, D.H., and Goldberg, A.L. *Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma*. Am. J. Physiol. 268, 1995, E996-1006.

Baracos, V.E., Mazurak, V.C., and Bhullar, A.S. *Cancer cachexia is defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass*. Ann. Palliat. Med. 8, 2019, 3–12.

Barkhudaryan, A., Scherbakov, N., Springer, J., and Doehner, W. *Cardiac muscle wasting in individuals with cancer cachexia*. ESC Heart Fail. 4, 2017, 458–467.

Barret, M., Dalban, C., Taïeb, J., Malka, D., Mansourbakht, T., Latko, E., and Antoun, S. *Effect of cancer cachexia on treatment toxicity in metastatic colorectal cancer patients: Results of a prospective multicenter study.* J. Clin. Oncol. 30, 2012, 9026–9026.

Bartz, R., Zehmer, J.K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y., and Liu, P. *Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation*. J. Proteome Res. 6, 2007, 3256–3265.

Batista, M.L., Neves, R.X., Peres, S.B., Yamashita, A.S., Shida, C.S., Farmer, S.R., and Seelaender, M. *Heterogeneous time-dependent response of adipose tissue during the development of cancer cachexia*. J. Endocrinol. 215, 2012, 363–373.

Batista, M.L., Olivan, M., Alcantara, P.S.M., Sandoval, R., Peres, S.B., Neves, R.X., Silverio, R., Maximiano, L.F., Otoch, J.P., and Seelaender, M. *Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients*. Cytokine 61, 2013, 532–539.

Batista, M.L., Henriques, F.S., Neves, R.X., Olivan, M.R., Matos-Neto, E.M., Alcântara, P.S.M., Maximiano, L.F., Otoch, J.P., Alves, M.J., and Seelaender, M. *Cachexia-associated adipose tissue morphological rearrangement in gastrointestinal cancer patients*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 7, 2016, 37–47.

Baumgartner, R.N. *Body composition in healthy aging*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 904, 2000, 437–448.

Béchet, D., Tassa, A., Combaret, L., Taillandier, D., and Attaix, D. *Regulation of skeletal muscle proteolysis by amino acids*. J. Ren. Nutr. Off. J. Counc. Ren. Nutr. Natl. Kidney Found. 15, 2005, 18–22.

Ben, Q.-W., Liu, J., Sun, Y.-W., Wang, L.-F., Zou, D.-W., and Yuan, Y.-Z. *Cigarette Smoking and Mortality in Patients With Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. Pancreas 48, 2019, 985–995.

Ben Saad, S., Melki, B., Douik El Gharbi, L., Soraya, F., Chaouch, N., Aouina, H., Cherif, J., Hamzaoui, A., Merghli, A., Daghfous, H., *et al. [Tuberculous pneumothorax: Diagnosis and treatment]*. Rev. Pneumol. Clin. 74, 2018, 81–88.

Benjamin, A.J., Buschmann, M.M., Zhang, S.Q., Wroblewski, K., Kindler, H.L., Roggin, K.K., and Dale, W. *The impact of changes in radiographic sarcopenia on overall survival in older adults undergoing different treatment pathways for pancreatic cancer*. J. Geriatr. Oncol. 9, 2018, 367–372.

Benny Klimek, M.E., Aydogdu, T., Link, M.J., Pons, M., Koniaris, L.G., and Zimmers, T.A. *Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391, 2010, 1548–1554.

Bernardi, P., Penzo, D., and Wojtczak, L. *Mitochondrial energy dissipation by fatty acids. Mechanisms and implications for cell death*. Vitam. Horm. 65, 2002, 97–126.

Bilir, C., Engin, H., Can, M., Temi, Y.B., and Demirtas, D. *The prognostic role of inflammation and hormones in patients with metastatic cancer with cachexia*. Med. Oncol. 32, 2015, 56.

Bindels, L.B., and Delzenne, N.M. *Muscle wasting: The gut microbiota as a new therapeutic target?*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 2013, 2186–2190.

Bing, C., Russell, S., Becket, E., Pope, M., Tisdale, M.J., Trayhurn, P., and Jenkins, J.R. *Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice*. Br. J. Cancer 95, 2006, 1028–1037.

Biologywise biologywise.com/mitochondrial-function.

Biondo, L.A., Batatinha, H.A., Souza, C.O., Teixeira, A.A.S., Silveira, L.S., Alonso-Vale, M.I., Oyama, L.M., Alves, M.J., Seelaender, M., and Neto, J.C.R. *Metformin Mitigates Fibrosis and Glucose Intolerance Induced by Doxorubicin in Subcutaneous Adipose Tissue*. Front. Pharmacol. 9, 2018, 452.

Blauwhoff-Buskermolen, S., de van der Schueren, M. a. E., Verheul, H.M.W., and Langius, J. a. E. *'Pre-cachexia': a non-existing phenomenon in cancer?* Ann. Oncol. 25, 2014, 1668–1669.

Blauwhoff-Buskermolen, S., Versteeg, K.S., de van der Schueren, M.A.E., den Braver, N.R., Berkhof, J., Langius, J.A.E., and Verheul, H.M.W. *Loss of Muscle Mass During Chemotherapy Is Predictive for Poor Survival of Patients With Metastatic Colorectal Cancer*. J. Clin. Oncol. 34, 2016, 1339–1344.

Blum, D., Stene, G.B., Solheim, T.S., Fayers, P., Hjermstad, M.J., Baracos, V.E., Fearon, K., Strasser, F., Kaasa, S., Block Lieve, V. den, *et al. Validation of the Consensus-Definition for Cancer Cachexia and evaluation of a classification model—a study based on data from an international multicentre project (EPCRC-CSA)*. Ann. Oncol. 25, 2014, 1635–1642.

Bodine, S.C., and Furlow, J.D. *Glucocorticoids and Skeletal Muscle*. Adv. Exp. Med. Biol. 872, 2015, 145–176.

Bohnert, K.R., Gallot, Y.S., Sato, S., Xiong, G., Hindi, S.M., and Kumar, A. *Inhibition of ER stress and unfolding protein response pathways causes skeletal muscle wasting during cancer cachexia*. FASEB J. 30, 2016, 3053–3068.

Bonen, A., Jain, S.S., Snook, L.A., Han, X.-X., Yoshida, Y., Buddo, K.H., Lally, J.S., Pask, E.D., Paglialunga, S., Beaudoin, M.-S., *et al. Extremely rapid increase in fatty acid transport and intramyocellular lipid accumulation but markedly delayed insulin resistance after high fat feeding in rats*. Diabetologia 58, 2015, 2381–2391.

Bonetto, A., Aydogdu, T., Kunzevitzky, N., Guttridge, D.C., Khuri, S., Koniaris, L.G., and Zimmers, T.A. *STAT3 Activation in Skeletal Muscle Links Muscle Wasting and the Acute Phase Response in Cancer Cachexia*. PLoS ONE 6, 2011.

Bonetto, A., Penna, F., Aversa, Z., Mercantini, P., Baccino, F.M., Costelli, P., Ziparo, V., Lucia, S., Rossi Fanelli, F., and Muscaritoli, M. *Early changes of muscle insulin-like growth factor-1 and myostatin gene expression in gastric cancer patients*. Muscle Nerve 48, 2013, 387–392.

Bonetto, A., Kays, J.K., Parker, V.A., Matthews, R.R., Barreto, R., Puppa, M.J., Kang, K.S., Carson, J.A., Guise, T.A., Mohammad, K.S., *et al. Differential Bone Loss in Mouse Models of Colon Cancer Cachexia*. Front. Physiol. 7, 2016, 679.

Bosma, M., Hesselink, M.K.C., Sparks, L.M., Timmers, S., Ferraz, M.J., Mattijssen, F., van Beurden, D., Schaart, G., de Baets, M.H., Verheyen, F.K., *et al. Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels*. Diabetes 61, 2012, 2679–2690.

Bosma, M., Sparks, L.M., Hooiveld, G.J., Jorgensen, J.A., Houten, S.M., Schrauwen, P., Kersten, S., and Hesselink, M.K.C. *Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity*. Biochim. Biophys. Acta 1831, 2013, 844–852.

Bossola, M., Muscaritoli, M., Costelli, P., Bellantone, R., Pacelli, F., Busquets, S., Argilès, J., Lopez-Soriano, F.J., Civello, I.M., Baccino, F.M., *et al. Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280, 2001, R1518-1523.

Bossola, M., Muscaritoli, M., Costelli, P., Grieco, G., Bonelli, G., Pacelli, F., Rossi Fanelli, F., Doglietto, G.B., and Baccino, F.M. *Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients*. Ann. Surg. 237, 2003, 384–389.

Bossola, M., Mirabella, M., Ricci, E., Costelli, P., Pacelli, F., Tortorelli, A.P., Muscaritoli, M., Fanelli, F.R., Baccino, F.M., Tonali, P.A., *et al. Skeletal muscle apoptosis is not increased in gastric cancer patients with mild–moderate weight loss*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 38, 2006, 1561–1570.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA. Cancer J. Clin. 68, 2018, 394–424.

Brown, J.L., Rosa-Caldwell, M.E., Lee, D.E., Blackwell, T.A., Brown, L.A., Perry, R.A., Haynie, W.S., Hardee, J.P., Carson, J.A., Wiggs, M.P., *et al. Mitochondrial degeneration precedes the development of muscle atrophy in progression of cancer cachexia in tumour-bearing mice*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 2017, 926–938.

Brown, T.A., Tkachuk, A.N., Shtengel, G., Kopek, B.G., Bogenhagen, D.F., Hess, H.F., and Clayton, D.A. *Superresolution Fluorescence Imaging of Mitochondrial Nucleoids Reveals Their Spatial Range, Limits, and Membrane Interaction* ▿. Mol. Cell. Biol. 31, 2011, 4994–5010.

Brzeszczyńska, J., Johns, N., Schilb, A., Degen, S., Degen, M., Langen, R., Schols, A., Glass, D.J., Roubenoff, R., Greig, C.A., *et al. Loss of oxidative defense and potential blockade of satellite cell maturation in the skeletal muscle of patients with cancer but not in the healthy elderly*. Aging 8, 2016, 1690–1702.

Burgart, L.J., Zheng, J., Shu, Q., Strickler, J.G., and Shibata, D. *Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer.* Am. J. Pathol. 147, 1995, 1105–1111.

Burney, B.O., Hayes, T.G., Smiechowska, J., Cardwell, G., Papusha, V., Bhargava, P., Konda, B., Auchus, R.J., and Garcia, J.M. *Low Testosterone Levels and Increased Inflammatory Markers in Patients with Cancer and Relationship with Cachexia*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 97, 2012, E700–E709.

Burnham, J.M., Shults, J., Semeao, E., Foster, B.J., Zemel, B.S., Stallings, V.A., and Leonard, M.B. *Body-composition alterations consistent with cachexia in children and young adults with Crohn disease*. Am. J. Clin. Nutr. 82, 2005, 413–420.

Busquets, S., Deans, C., Figueras, M., Moore-Carrasco, R., Lopez-Soriano, F., Fearon, K., and Argiles, J. *Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients*. Clin. Nutr. Edinb. Scotl. 26, 2007, 614–618.

Cai, D., Frantz, J.D., Tawa, N.E., Melendez, P.A., Oh, B.-C., Lidov, H.G.W., Hasselgren, P.-O., Frontera, W.R., Lee, J., Glass, D.J., *et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice*. Cell 119, 2004, 285–298.

Cameron, D.A., Douglas, S., Brown, J.E., and Anderson, R.A. *Bone mineral density loss during adjuvant chemotherapy in pre-menopausal women with early breast cancer: is it dependent on oestrogen deficiency?*. Breast Cancer Res. Treat. 123, 2010, 805–814.

Campbell, S.E., Tandon, N.N., Woldegiorgis, G., Luiken, J.J.F.P., Glatz, J.F.C., and Bonen, A. *A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria*. J. Biol. Chem. 279, 2004, 36235–36241.

Carafoli, E., and Krebs, J. *Why Calcium? How Calcium Became the Best Communicator*. J. Biol. Chem. 291, 2016, 20849–20857.

de Castro, G.S., Simoes, E., Lima, J.D.C.C., Ortiz-Silva, M., Festuccia, W.T., Tokeshi, F., Alcântara, P.S., Otoch, J.P., Coletti, D., and Seelaender, M. *Human Cachexia Induces Changes in Mitochondria, Autophagy and Apoptosis in the Skeletal Muscle*. Cancers 11, 2019, 1264.

Cederholm, T., Bosaeus, I., Barazzoni, R., Bauer, J., Van Gossum, A., Klek, S., Muscaritoli, M., Nyulasi, I., Ockenga, J., Schneider, S.M., *et al. Diagnostic criteria for malnutrition – An ESPEN Consensus Statement*. Clin. Nutr. 34, 2015, 335–340.

Chambre implantable | Ramsay Générale de Santé https://ramsaygds.fr/vous-etes-patient-en-savoir-plus-sur-ma-pathologie/chambre-implantable.

Chang, S.W., Pan, W.S., Lozano Beltran, D., Oleyda Baldelomar, L., Solano, M.A., Tuero, I., Friedland, J.S., Torrico, F., and Gilman, R.H. *Gut hormones, appetite suppression and cachexia in patients with pulmonary TB*. PloS One 8, 2013, e54564.

Chen, L., Gong, Q., Stice, J.P., and Knowlton, A.A. *Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure*. Cardiovasc. Res. 84, 2009, 91–99.

Choi, E., Carruthers, K., Zhang, L., Thomas, N., Battaglino, R.A., Morse, L.R., and Widrick, J.J. *Concurrent muscle and bone deterioration in a murine model of cancer cachexia*. Physiol. Rep. 1, 2013.

Choi, Y., Oh, D.-Y., Kim, T.-Y., Lee, K.-H., Han, S.-W., Im, S.-A., Kim, T.-Y., and Bang, Y.-J. *Skeletal Muscle Depletion Predicts the Prognosis of Patients with Advanced Pancreatic Cancer Undergoing Palliative Chemotherapy, Independent of Body Mass Index*. PloS One 10, 2015, e0139749.

Cianferotti, L., and Brandi, M.L. *Muscle–bone interactions: basic and clinical aspects*. Endocrine 45, 2014, 165–177.

Civitarese, A.E., Carling, S., Heilbronn, L.K., Hulver, M.H., Ukropcova, B., Deutsch, W.A., Smith, S.R., and Ravussin, E. *Calorie Restriction Increases Muscle Mitochondrial Biogenesis in Healthy Humans*. PLoS Med. 4, 2007.

Clark, A.L., Coats, A.J.S., Krum, H., Katus, H.A., Mohacsi, P., Salekin, D., Schultz, M.K., Packer, M., and Anker, S.D. *Effect of beta-adrenergic blockade with carvedilol on cachexia in severe chronic heart failure: results from the COPERNICUS trial*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 2017, 549–556.

Cohen, S., Nathan, J.A., and Goldberg, A.L. *Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies*. Nat. Rev. Drug Discov. 14, 2015, 58–74.

Coletti, D. *Chemotherapy-induced muscle wasting: an update*. Eur. J. Transl. Myol. 28, 2018, 7587.

Conte, M., Vasuri, F., Trisolino, G., Bellavista, E., Santoro, A., Degiovanni, A., Martucci, E., D'Errico-Grigioni, A., Caporossi, D., Capri, M., *et al. Increased Plin2 Expression in Human Skeletal Muscle Is Associated with Sarcopenia and Muscle Weakness*. PLoS ONE 8, 2013.

Cooper, J.M., Mann, V.M., and Schapira, A.H. *Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing*. J. Neurol. Sci. 113, 1992, 91–98.

Costelli, P., Muscaritoli, M., Bossola, M., Penna, F., Reffo, P., Bonetto, A., Busquets, S., Bonelli, G., Lopez-Soriano, F.J., Doglietto, G.B., *et al. IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia*. Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol. 291, 2006, R674–R683.

Cotogni, P. *Enteral versus parenteral nutrition in cancer patients: evidences and controversies*. Ann. Palliat. Med. 5, 2016, 42–49.

Covington, J.D., Noland, R.C., Hebert, R.C., Masinter, B.S., Smith, S.R., Rustan, A.C., Ravussin, E., and Bajpeyi, S. *Perilipin 3 Differentially Regulates Skeletal Muscle Lipid Oxidation in Active, Sedentary, and Type 2 Diabetic Males*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 100, 2015, 3683–3692.

Crooke, H., Kobayashi, M., Mitchell, B., Nwokeji, E., Laurie, M., Kamble, S., McKenna, M., Masood, A., and Korytowsky, B. *Estimating 1- and 5-year relative survival trends in colorectal cancer (CRC) in the United States: 2004 to 2014.* J. Clin. Oncol. 36, 2018, 587–587.

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. *Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria*. J. Cell Biol. 174, 2006, 915–921.

Daly, L.E., Ní Bhuachalla, É.B., Power, D.G., Cushen, S.J., James, K., and Ryan, A.M. *Loss of skeletal muscle during systemic chemotherapy is prognostic of poor survival in patients with foregut cancer*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 9, 2018, 315–325.

Damrauer, J.S., Stadler, M.E., Acharyya, S., Baldwin, A.S., Couch, M.E., and Guttridge, D.C. *Chemotherapy-induced muscle wasting: association with NF-κB and cancer cachexia*. Eur. J. Transl. Myol. 28, 2018, 7590.

Das, S.K., Eder, S., Schauer, S., Diwoky, C., Temmel, H., Guertl, B., Gorkiewicz, G., Tamilarasan, K.P., Kumari, P., Trauner, M., *et al. Adipose Triglyceride Lipase Contributes to Cancer-Associated Cachexia*. Science 333, 2011, 233–238.

Daum, G., and Vance, J.E. *Import of lipids into mitochondria*. Prog. Lipid Res. 36, 1997, 103–130.

Debashree, B., Kumar, M., Keshava Prasad, T.S., Natarajan, A., Christopher, R., Nalini, A., Bindu, P.S., Gayathri, N., and Srinivas Bharath, M.M. *Mitochondrial dysfunction in human skeletal muscle biopsies of lipid storage disorder*. J. Neurochem. 145, 2018, 323–341.

Deldicque, L., Hespel, P., and Francaux, M. *Endoplasmic reticulum stress in skeletal muscle: origin and metabolic consequences*. Exerc. Sport Sci. Rev. 40, 2012, 43–49.

van Dijk, D.P.J., Bakens, M.J.A.M., Coolsen, M.M.E., Rensen, S.S., van Dam, R.M., Bours, M.J.L., Weijenberg, M.P., Dejong, C.H.C., and Olde Damink, S.W.M. *Low skeletal muscle*

radiation attenuation and visceral adiposity are associated with overall survival and surgical site infections in patients with pancreatic cancer. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 2017, 317–326.

Dlasková, A., Engstová, H., Špaček, T., Kahancová, A., Pavluch, V., Smolková, K., Špačková, J., Bartoš, M., Hlavatá, L.P., and Ježek, P. *3D super-resolution microscopy reflects mitochondrial cristae alternations and mtDNA nucleoid size and distribution*. Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1859, 2018, 829–844.

D'Orlando, C., Marzetti, E., François, S., Lorenzi, M., Conti, V., di Stasio, E., Rosa, F., Brunelli, S., Doglietto, G.B., Pacelli, F., *et al. Gastric cancer does not affect the expression of atrophy-related genes in human skeletal muscle: Muscle Atrophy Genes in Cancer*. Muscle Nerve 49, 2014, 528–533.

Dulai, P.S., Sandborn, W.J., and Gupta, S. *Colorectal Cancer and Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease: A Review of Disease Epidemiology, Pathophysiology, and Management*. Cancer Prev. Res. Phila. Pa 9, 2016, 887–894.

Ebhardt, H.A., Degen, S., Tadini, V., Schilb, A., Johns, N., Greig, C.A., Fearon, K.C.H., Aebersold, R., and Jacobi, C. *Comprehensive proteome analysis of human skeletal muscle in cachexia and sarcopenia: a pilot study*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 2017, 567–582.

Elattar, S., Dimri, M., and Satyanarayana, A. *The tumor secretory factor ZAG promotes white adipose tissue browning and energy wasting*. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32, 2018, 4727–4743.

Eley, H.L., Skipworth, R.J.E., Deans, D.A.C., Fearon, K.C.H., and Tisdale, M.J. *Increased expression of phosphorylated forms of RNA-dependent protein kinase and eukaryotic initiation factor 2α may signal skeletal muscle atrophy in weight-losing cancer patients*. Br. J. Cancer 98, 2008, 443–449.

van der Ende, M., Grefte, S., Plas, R., Meijerink, J., Witkamp, R.F., Keijer, J., and van Norren, K. *Mitochondrial dynamics in cancer-induced cachexia*. Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer 1870, 2018, 137–150.

Erdem, M., Möckel, D., Jumpertz, S., John, C., Fragoulis, A., Rudolph, I., Wulfmeier, J., Springer, J., Horn, H., Koch, M., *et al. Macrophages protect against loss of adipose tissue during cancer cachexia*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 2019, jcsm.12450.

Evans, W.J., Morley, J.E., Argilés, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., Jatoi, A., Kalantar-Zadeh, K., Lochs, H., Mantovani, G., *et al. Cachexia: a new definition*. Clin. Nutr. Edinb. Scotl. 27, 2008, 793–799.

Fearon, K.C.H., and Moses, A.G.W. *Cancer cachexia*. Int. J. Cardiol. 85, 2002, 73–81.

Fearon, K., Strasser, F., Anker, S.D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R.L., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., *et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus*. Lancet Oncol. 12, 2011, 489–495.

Fearon, K.C.H., Glass, D.J., and Guttridge, D.C. *Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways*. Cell Metab. 16, 2012, 153–166.

Fekete, M., Pongor, V., Fehér, Á., Veresné Bálint, M., Varga, J.T., and Horváth, I. *[Relationship of chronic obstructive pulmonary disease and nutritional status - clinical observations]*. Orv. Hetil. 160, 2019, 908–913.

Felix, K., Fakelman, F., Hartmann, D., Giese, N.A., Gaida, M.M., Schnölzer, M., Flad, T., Büchler, M.W., and Werner, J. *Identification of serum proteins involved in pancreatic cancer cachexia*. Life Sci. 88, 2011, 218–225.

Fermoselle, C., García-Arumí, E., Puig-Vilanova, E., Andreu, A.L., Urtreger, A.J., de Kier Joffé, E.D.B., Tejedor, A., Puente-Maestu, L., and Barreiro, E. *Mitochondrial dysfunction and therapeutic approaches in respiratory and limb muscles of cancer cachectic mice*. Exp. Physiol. 98, 2013, 1349–1365.

Fill, M., and Copello, J.A. *Ryanodine receptor calcium release channels*. Physiol. Rev. 82, 2002, 893–922.

Finck, B.N., and Kelly, D.P. *Peroxisome Proliferator–Activated Receptor γ Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease*. Circulation 115, 2007, 2540–2548.

Fitschen, P.J., Wilson, G.J., Wilson, J.M., and Wilund, K.R. *Efficacy of β-hydroxy-β-methylbutyrate supplementation in elderly and clinical populations*. Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif 29, 2013, 29–36.

Fliss, M.S., Usadel, H., Caballero, O.L., Wu, L., Buta, M.R., Eleff, S.M., Jen, J., and Sidransky, D. *Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids*. Science 287, 2000, 2017–2019.

Fong, Y., Moldawer, L.L., Marano, M., Wei, H., Barber, A., Manogue, K., Tracey, K.J., Kuo, G., Fischman, D.A., and Cerami, A. *Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins*. Am. J. Physiol. 256, 1989, R659-665.

Fontes-Oliveira, C.C., Busquets, S., Toledo, M., Penna, F., Paz Aylwin, M., Sirisi, S., Silva, A.P., Orpí, M., García, A., Sette, A., *et al. Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: altered energetic efficiency?*. Biochim. Biophys. Acta 1830, 2013, 2770–2778.

Fouladiun, M., Körner, U., Bosaeus, I., Daneryd, P., Hyltander, A., and Lundholm, K.G. *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, 2005, 2189–2198.

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. *ER tubules mark sites of mitochondrial division*. Science 334, 2011, 358–362.

Fujimoto, M., and Hayashi, T. New Insights into the Role of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membrane. In International Review of Cell and Molecular Biology, (Elsevier), pp. 73–117.

Fujiwara, Y., Kobayashi, T., Chayahara, N., Imamura, Y., Toyoda, M., Kiyota, N., Mukohara, T., Nishiumi, S., Azuma, T., Yoshida, M., *et al. Metabolomics evaluation of serum markers for*

cachexia and their intra-day variation in patients with advanced pancreatic cancer. PloS One 9, 2014, e113259.

Gaggin, H.K., Belcher, A.M., Gandhi, P.U., Ibrahim, N.E., and Januzzi, J.L. *Serial Echocardiographic Characteristics, Novel Biomarkers and Cachexia Development in Patients with Stable Chronic Heart Failure*. J Cardiovasc. Transl. Res. 9, 2016, 429–431.

Gallagher, I.J., Stephens, N.A., MacDonald, A.J., Skipworth, R.J.E., Husi, H., Greig, C.A., Ross, J.A., Timmons, J.A., and Fearon, K.C.H. *Suppression of Skeletal Muscle Turnover in Cancer Cachexia: Evidence from the Transcriptome in Sequential Human Muscle Biopsies*. Clin. Cancer Res. 18, 2012, 2817–2827.

Gandre-Babbe, S., and van der Bliek, A.M. *The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells*. Mol. Biol. Cell 19, 2008, 2402–2412.

García, M., Pujol, A., Ruzo, A., Riu, E., Ruberte, J., Arbós, A., Serafín, A., Albella, B., Felíu, J.E., and Bosch, F. *Phosphofructo-1-kinase deficiency leads to a severe cardiac and hematological disorder in addition to skeletal muscle glycogenosis*. PLoS Genet. 5, 2009, e1000615.

Gerbitz, K.D., van den Ouweland, J.M., Maassen, J.A., and Jaksch, M. *Mitochondrial diabetes mellitus: a review*. Biochim. Biophys. Acta 1271, 1995, 253–260.

Gołębiewska, J.E., Lichodziejewska-Niemierko, M., Aleksandrowicz-Wrona, E., Majkowicz, M., Lysiak-Szydłowska, W., and Rutkowski, B. *Influence of megestrol acetate on nutrition, inflammation and quality of life in dialysis patients*. Int. Urol. Nephrol. 44, 2012, 1211–1222.

Gomes, M.D., Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Navon, A., and Goldberg, A.L. *Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 2001, 14440–14445.

Goncalves, M.D., Taylor, S., Halpenny, D.F., Schwitzer, E., Gandelman, S., Jackson, J., Lukose, A., Plodkowski, A.J., Tan, K.S., Dunphy, M., *et al. Imaging skeletal muscle volume, density, and FDG uptake before and after induction therapy for non-small cell lung cancer*. Clin. Radiol. 73, 2018, 505.e1-505.e8.

Goodpaster, B.H., He, J., Watkins, S., and Kelley, D.E. *Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 2001, 5755–5761.

Gould, D.W., Lahart, I., Carmichael, A.R., Koutedakis, Y., and Metsios, G.S. *Cancer cachexia prevention via physical exercise: molecular mechanisms*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 4, 2013, 111–124.

Graham, K.K., Mikolich, D.J., Fisher, A.E., Posner, M.R., and Dudley, M.N. *Pharmacologic evaluation of megestrol acetate oral suspension in cachectic AIDS patients*. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 7, 1994, 580–586.

Gray, M.W. *Lynn Margulis and the endosymbiont hypothesis: 50 years later*. Mol. Biol. Cell 28, 2017, 1285–1287.

Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., and Czech, M.P. *Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 9, 2008, 367–377.

Guillet, C. Skeletal Muscle in Obesity and Chronic Overfeeding. In Nutrition and Skeletal Muscle, (Elsevier), pp. 107–115.

Habano, W., Sugai, T., Yoshida, T., and Nakamura, S. *Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability*. Int. J. Cancer 83, 1999, 625–629.

Habano, W., Sugai, T., Nakamura, S.I., Uesugi, N., Yoshida, T., and Sasou, S. *Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma*. Gastroenterology 118, 2000, 835–841.

Hadji, P., Ziller, M., Maskow, C., Albert, U., and Kalder, M. *The influence of chemotherapy on bone mineral density, quantitative ultrasonometry and bone turnover in pre-menopausal women with breast cancer*. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 45, 2009, 3205–3212.

von Haehling, S., and Anker, S.D. *Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 1, 2010, 1–5.

Han, J., Meng, Q., Shen, L., and Wu, G. *Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning*. Lipids Health Dis. 17, 2018, 14.

Handschin, C., Rhee, J., Lin, J., Tarr, P.T., and Spiegelman, B.M. *An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α expression in muscle*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 2003, 7111–7116.

Hart, W.R., and Norris, H.J. *Borderline and malignant mucinous tumors of the ovary. Histologic criteria and clinical behavior*. Cancer 31, 1973, 1031–1045.

Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., and Martin, R.J. *The biology of white adipocyte proliferation*. Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes. 2, 2001, 239–254.

Henriques, F.S., Sertié, R.A.L., Franco, F.O., Knobl, P., Neves, R.X., Andreotti, S., Lima, F.B., Guilherme, A., Seelaender, M., and Batista, M.L. *Early suppression of adipocyte lipid turnover induces immunometabolic modulation in cancer cachexia syndrome*. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 31, 2017, 1976–1986.

Herbst, A., Pak, J.W., McKenzie, D., Bua, E., Bassiouni, M., and Aiken, J.M. *Accumulation of Mitochondrial DNA Deletion Mutations in Aged Muscle Fibers: Evidence for a Causal Role in Muscle Fiber Loss*. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. 62, 2007, 235–245.

Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., and Glimcher, L.H. *The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1α*. Physiol. Rev. 91, 2011, 1219–1243.

Hickey, M.S., Carey, J.O., Azevedo, J.L., Houmard, J.A., Pories, W.J., Israel, R.G., and Dohm, G.L. *Skeletal muscle fiber composition is related to adiposity and in vitro glucose transport rate in humans*. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. 268, 1995, E453–E457.

Hidalgo, M., Cascinu, S., Kleeff, J., Labianca, R., Löhr, J.-M., Neoptolemos, J., Real, F.X., Van Laethem, J.-L., and Heinemann, V. *Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes*. Pancreatology 15, 2015, 8–18.

Hong, N., Yoon, H., Lee, Y., Kim, H.R., Lee, B.W., Rhee, Y., Kang, E.S., Cha, B.-S., and Lee, H.C. *Serum PTHrP Predicts Weight Loss in Cancer Patients Independent of Hypercalcemia, Inflammation, and Tumor Burden*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 101, 2016, 1207–1214.

Hopkins, J.J., and Sawyer, M.B. *Interactions of lean soft-tissue and chemotherapy toxicities in patients receiving anti-cancer treatments*. Cancer Chemother. Pharmacol. 82, 2018, 1–29.

Hoppeler, H., Lüthi, P., Claassen, H., Weibel, E.R., and Howald, H. *The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers*. Pflugers Arch. 344, 1973, 217–232.

Hotamisligil, G.S. *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell 140, 2010, 900–917.

Hsieh, K., Lee, Y.K., Londos, C., Raaka, B.M., Dalen, K.T., and Kimmel, A.R. *Perilipin family members preferentially sequester to either triacylglycerol-specific or cholesteryl-ester-specific intracellular lipid storage droplets*. J. Cell Sci. 125, 2012, 4067–4076.

Hudson, P., and Payne, S. *Family Caregivers and Palliative Care: Current Status and Agenda for the Future*. J. Palliat. Med. 14, 2011, 864–869.

Hui, S.K., Khalil, A., Zhang, Y., Coghill, K., Le, C., Dusenbery, K., Froelich, J., Yee, D., and Downs, L. *Longitudinal assessment of bone loss from diagnostic computed tomography scans in gynecologic cancer patients treated with chemotherapy and radiation*. Am. J. Obstet. Gynecol. 203, 2010, 353.e1-7.

Ibrahim, M.A., Bakhaat, G.A., Tammam, H.G., Mohamed, R.M., and El-Naggar, S.A. *Cardioprotective effect of green tea extract and vitamin E on Cisplatin-induced cardiotoxicity in mice: Toxicological, histological and immunohistochemical studies*. Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother. 113, 2019, 108731.

Ikezoe, K., Furuya, H., Ohyagi, Y., Osoegawa, M., Nishino, I., Nonaka, I., and Kira, J.-I. *Dysferlin expression in tubular aggregates: their possible relationship to endoplasmic reticulum stress*. Acta Neuropathol. (Berl.) 105, 2003, 603–609.

Ikezoe, K., Nakamori, M., Furuya, H., Arahata, H., Kanemoto, S., Kimura, T., Imaizumi, K., Takahashi, M.P., Sakoda, S., Fujii, N., *et al. Endoplasmic reticulum stress in myotonic dystrophy type 1 muscle*. Acta Neuropathol. (Berl.) 114, 2007, 527–535.

Institut National du Cancer https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/.

Irrcher, I., Ljubicic, V., and Hood, D.A. *Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1alpha transcription in skeletal muscle cells*. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 296, 2009, C116-123.

Jagoe, R.T., Lecker, S.H., Gomes, M., and Goldberg, A.L. *Patterns of gene expression in atrophying skeletal muscles: response to food deprivation*. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 16, 2002a, 1697–1712.

Jagoe, R.T., Redfern, C.P.F., Roberts, R.G., Gibson, G.J., and Goodship, T.H.J. *Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy*. Clin. Sci. Lond. Engl. 1979 102, 2002b, 353–361.

Jain, S.S., Luiken, J.J.F.P., Snook, L.A., Han, X.X., Holloway, G.P., Glatz, J.F.C., and Bonen, A. *Fatty acid transport and transporters in muscle are critically regulated by Akt2*. FEBS Lett. 589, 2015, 2769–2775.

Jayasinghe, I.D., and Launikonis, B.S. *Three-dimensional reconstruction and analysis of the tubular system of vertebrate skeletal muscle*. J. Cell Sci. 126, 2013, 4048–4058.

Jochem, C., and Leitzmann, M. *Obesity and Colorectal Cancer*. Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer 208, 2016, 17–41.

Johns, N., Stephens, N.A., and Fearon, K.C.H. *Muscle wasting in cancer*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 2013, 2215–2229.

Johns, N., Hatakeyama, S., Stephens, N.A., Degen, M., Degen, S., Frieauff, W., Lambert, C., Ross, J.A., Roubenoff, R., Glass, D.J., *et al. Clinical classification of cancer cachexia: phenotypic correlates in human skeletal muscle*. PloS One 9, 2014, e83618.

Johns, N., Stretch, C., Tan, B.H.L., Solheim, T.S., Sørhaug, S., Stephens, N.A., Gioulbasanis, I., Skipworth, R.J.E., Deans, D.A.C., Vigano, A., *et al. New genetic signatures associated with cancer cachexia as defined by low skeletal muscle index and weight loss*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 2017, 122–130.

Julienne, C.M., Dumas, J.-F., Goupille, C., Pinault, M., Berri, C., Collin, A., Tesseraud, S., Couet, C., and Servais, S. *Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 3, 2012, 265–275.

Kandarian, S. *The molecular basis of skeletal muscle atrophy--parallels with osteoporotic signaling*. J. Musculoskelet. Neuronal Interact. 8, 2008, 340–341.

Kazantzis, M., and Stahl, A. *Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease*. Biochim. Biophys. Acta 1821, 2012, 852–857.

Kazemi-Bajestani, S.M.R., Becher, H., Butts, C., Basappa, N.S., Smylie, M., Joy, A.A., Sangha, R., Gallivan, A., Kavsak, P., Chu, Q., *et al. Rapid atrophy of cardiac left ventricular mass in patients with non-small cell carcinoma of the lung*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 2019a.

Kemik, O., Sumer, A., Kemik, A.S., Hasirci, I., Purisa, S., Dulger, A.C., Demiriz, B., and Tuzun, S. *The relationship among acute-phase response proteins, cytokines and hormones in cachectic patients with colon cancer*. World J. Surg. Oncol. 8, 2010, 85.

Kerem, M., Ferahkose, Z., Yilmaz, U.T., Pasaoglu, H., Ofluoglu, E., Bedirli, A., Salman, B., Sahin, T.T., and Akin, M. *Adipokines and ghrelin in gastric cancer cachexia*. World J. Gastroenterol. 14, 2008, 3633–3641.

Khal, J., Hine, A.V., Fearon, K.C.H., Dejong, C.H.C., and Tisdale, M.J. *Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 2005, 2196–2206.

Kim, J., and Seli, E. *Mitochondria as a biomarker for IVF outcome*. Reproduction 157, 2019, R235–R242.

Kim, H.J., Kim, H.J., Yun, J., Kim, K.H., Kim, S.H., Lee, S.-C., Bae, S.B., Kim, C.K., Lee, N.S., Lee, K.T., *et al. Pathophysiological Role of Hormones and Cytokines in Cancer Cachexia*. J. Korean Med. Sci. 27, 2012, 128–134.

Kim, J., P Moody, J., K Edgerly, C., L Bordiuk, O., Cormier, K., Smith, K., Beal, M., and Ferrante, R. *Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease*. Hum. Mol. Genet. 19, 2010, 3919–3935.

Kimmel, A.R., Brasaemle, D.L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C., and Londos, C. *Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins*. J. Lipid Res. 51, 2010, 468–471.

Kir, S., White, J.P., Kleiner, S., Kazak, L., Cohen, P., Baracos, V.E., and Spiegelman, B.M. *Tumor-derived PTHrP Triggers Adipose Tissue Browning and Cancer Cachexia*. Nature 513, 2014, 100–104.

Klingenberg, M., and Huang, S.G. *Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue*. Biochim. Biophys. Acta 1415, 1999, 271–296.

Kraft, M., Kraft, K., Gärtner, S., Mayerle, J., Simon, P., Weber, E., Schütte, K., Stieler, J., Koula-Jenik, H., Holzhauer, P., *et al. L-Carnitine-supplementation in advanced pancreatic cancer (CARPAN)--a randomized multicentre trial*. Nutr. J. 11, 2012, 52.

Krzystek-Korpacka, M., Matusiewicz, M., Diakowska, D., Grabowski, K., Blachut, K., Kustrzeba-Wojcicka, I., and Banas, T. *Impact of weight loss on circulating IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, VEGF-A, VEGF–C and midkine in gastroesophageal cancer patients*. Clin. Biochem. 40, 2007, 1353–1360.

Kukat, C., Wurm, C.A., Spåhr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Jakobs, S. *Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 2011, 13534–13539.

Kurk, S.A., Peeters, P.H.M., Dorresteijn, B., de Jong, P.A., Jourdan, M., Kuijf, H.J., Punt, C.J.A., Koopman, M., and May, A.M. *Impact of different palliative systemic treatments on skeletal muscle mass in metastatic colorectal cancer patients*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 9, 2018, 909–919.

La Vecchia, C. *Ovarian cancer: epidemiology and risk factors*. Eur. J. Cancer Prev. Off. J. Eur. Cancer Prev. Organ. ECP 26, 2017, 55–62.

Lackner, L.L., and Nunnari, J.M. *The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division*. Biochim. Biophys. Acta 1792, 2009, 1138–1144.

Laforêt, P., Malfatti, E., and Vissing, J. *Update on new muscle glycogenosis:*. Curr. Opin. Neurol. 30, 2017, 449–456.

Lafortuna, C.L., Tresoldi, D., and Rizzo, G. *Influence of body adiposity on structural characteristics of skeletal muscle in men and women*. Clin. Physiol. Funct. Imaging 34, 2014, 47–55.

Langfort, J., Ploug, T., Ihlemann, J., Holm, C., and Galbo, H. *Stimulation of hormone-sensitive lipase activity by contractions in rat skeletal muscle*. Biochem. J. 351, 2000, 207–214.

Lee, S.W., Yeo, S.G., Oh, I.-H., Yeo, J.H., and Park, D.C. *Bone mineral density in women treated for various types of gynecological cancer*. Asia Pac. J. Clin. Oncol. 12, 2016, e398–e404.

Lenhard, M.S., Mitterer, S., Kümper, C., Stieber, P., Mayr, D., Ditsch, N., Friese, K., and Burges, A. *Long-term follow-up after ovarian borderline tumor: relapse and survival in a large patient cohort*. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 145, 2009, 189–194.

Lerner, L., Tao, J., Liu, Q., Nicoletti, R., Feng, B., Krieger, B., Mazsa, E., Siddiquee, Z., Wang, R., Huang, L., *et al. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 7, 2016, 467–482.

Levin, B.C., Cheng, H., and Reeder, D.J. *A Human Mitochondrial DNA Standard Reference Material for Quality Control in Forensic Identification, Medical Diagnosis, and Mutation Detection*. Genomics 55, 1999, 135–146.

Lieffers, J.R., Mourtzakis, M., Hall, K.D., McCargar, L.J., Prado, C.M., and Baracos, V.E. *A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands123*. Am. J. Clin. Nutr. 89, 2009, 1173–1179.

Lien, Y.H., and Ruffenach, S.J. *Low dose megestrol increases serum albumin in malnourished dialysis patients*. Int. J. Artif. Organs 19, 1996, 147–150.

Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, C.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E.N., *et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres*. Nature 418, 2002, 797–801.

Loskovich, M.V., Grivennikova, V.G., Cecchini, G., and Vinogradov, A.D. *Inhibitory effect of palmitate on the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) as related to the active-de-active enzyme transition*. Biochem. J. 387, 2005, 677–683.

Loumaye, A., and Thissen, J.-P. *Biomarkers of cancer cachexia*. Clin. Biochem. 50, 2017, 1281–1288.

Loumaye, A., de Barsy, M., Nachit, M., Lause, P., Frateur, L., van Maanen, A., Trefois, P., Gruson, D., and Thissen, J.-P. *Role of Activin A and Myostatin in Human Cancer Cachexia*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 100, 2015, 2030–2038.

MacDonald, A.J., Greig, C.A., and Baracos, V. *The advantages and limitations of cross-sectional body composition analysis*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 5, 2011, 342–349.

MacDonald, A.J., Johns, N., Stephens, N., Greig, C., Ross, J.A., Small, A.C., Husi, H., Fearon, K.C.H., and Preston, T. *Habitual Myofibrillar Protein Synthesis Is Normal in Patients with Upper GI Cancer Cachexia*. Clin. Cancer Res. 21, 2015, 1734–1740.

Maddocks, M., Murton, A.J., and Wilcock, A. *Improving muscle mass and function in cachexia: non-drug approaches*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 5, 2011, 361–364.

Maddocks, M., Jones, L.W., and Wilcock, A. *Immunological and hormonal effects of exercise: implications for cancer cachexia*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 7, 2013, 376–382.

Madeddu, C., Maccio, A., and Mantovani, G. *Multitargeted treatment of cancer cachexia*. Crit. Rev. Oncog. 17, 2012, 305–314.

Magkos, F., Wang, X., and Mittendorfer, B. *Metabolic actions of insulin in men and women*. Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif 26, 2010, 686–693.

Makki, K., Froguel, P., and Wolowczuk, I. *Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines*. ISRN Inflamm. 2013, 2013, 139239.

Malenfant, P., Joanisse, D.R., Thériault, R., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E., and Simoneau, J.-A. *Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects*. Int. J. Obes. 25, 2001, 1316.

Manczak, M., Calkins, M.J., and Reddy, P.H. *Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage*. Hum. Mol. Genet. 20, 2011, 2495–2509.

Martin, L., Birdsell, L., Macdonald, N., Reiman, T., Clandinin, M.T., McCargar, L.J., Murphy, R., Ghosh, S., Sawyer, M.B., and Baracos, V.E. *Cancer cachexia in the age of obesity: skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index*. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 31, 2013, 1539–1547.

Martin, L., Senesse, P., Gioulbasanis, I., Antoun, S., Bozzetti, F., Deans, C., Strasser, F., Thoresen, L., Jagoe, R.T., Chasen, M., *et al. Diagnostic Criteria for the Classification of Cancer-Associated Weight Loss*. J. Clin. Oncol. 33, 2015, 90–99.

Martínez-Hernández, P.L., Hernanz-Macías, Á., Gómez-Candela, C., Grande-Aragón, C., Feliu-Batlle, J., Castro-Carpeño, J., Martínez-Muñoz, I., Zurita-Rosa, L., Villarino-Sanz, M., Prados-Sánchez, C., *et al. Serum interleukin-15 levels in cancer patients with cachexia*. Oncol. Rep. 28, 2012, 1443–1452.

Marzetti, E., Calvani, R., Lorenzi, M., Tanganelli, F., Picca, A., Bossola, M., Menghi, A., Bernabei, R., and Landi, F. *Association between myocyte quality control signaling and sarcopenia in old hip-fractured patients: Results from the Sarcopenia in HIp FracTure (SHIFT) exploratory study*. Exp. Gerontol. 80, 2016, 1–5.

Marzetti, E., Lorenzi, M., Landi, F., Picca, A., Rosa, F., Tanganelli, F., Galli, M., Doglietto, G.B., Pacelli, F., Cesari, M., *et al. Altered mitochondrial quality control signaling in muscle of old gastric cancer patients with cachexia*. Exp. Gerontol. 87, 2017, 92–99.

McDonald, M.-L.N., Wouters, E.F.M., Rutten, E., Casaburi, R., Rennard, S.I., Lomas, D.A., Bamman, M., Celli, B., Agusti, A., Tal-Singer, R., *et al. It's more than low BMI: prevalence of cachexia and associated mortality in COPD*. Respir. Res. 20, 2019, 100.

McFarlan, J.T., Yoshida, Y., Jain, S.S., Han, X.-X., Snook, L.A., Lally, J., Smith, B.K., Glatz, J.F.C., Luiken, J.J.F.P., Sayer, R.A., *et al. In vivo, fatty acid translocase (CD36) critically regulates skeletal muscle fuel selection, exercise performance, and training-induced adaptation of fatty acid oxidation*. J. Biol. Chem. 287, 2012, 23502–23516.

Michaud, D.S. *Obesity and Pancreatic Cancer*. Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer 208, 2016, 95–105.

Mishra, S., Khaddaj, R., Cottier, S., Stradalova, V., Jacob, C., and Schneiter, R. *Mature lipid droplets are accessible to ER luminal proteins*. J. Cell Sci. 129, 2016, 3803–3815.

Mitch, W.E., and Price, S.R. *Mechanisms activating proteolysis to cause muscle atrophy in catabolic conditions*. J. Ren. Nutr. Off. J. Counc. Ren. Nutr. Natl. Kidney Found. 13, 2003, 149–152.

Mitchell, P. *Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism*. Nature 191, 1961, 144–148.

Mitsiopoulos, N., Baumgartner, R.N., Heymsfield, S.B., Lyons, W., Gallagher, D., and Ross, R. *Cadaver validation of skeletal muscle measurement by magnetic resonance imaging and computerized tomography*. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 85, 1998, 115–122.

Molfino, A., Iannace, A., Colaiacomo, M.C., Farcomeni, A., Emiliani, A., Gualdi, G., Laviano, A., and Rossi Fanelli, F. *Cancer anorexia: hypothalamic activity and its association with inflammation and appetite-regulating peptides in lung cancer*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 2017, 40–47.

Mondello, P., Lacquaniti, A., Mondello, S., Bolignano, D., Pitini, V., Aloisi, C., and Buemi, M. *Emerging markers of cachexia predict survival in cancer patients*. BMC Cancer 14, 2014, 828.

Monroy-Cisneros, K., Esparza-Romero, J., Valencia, M.E., Guevara-Torres, A.G., Méndez-Estrada, R.O., Anduro-Corona, I., and Astiazarán-García, H. *Antineoplastic treatment effect on bone mineral density in Mexican breast cancer patients*. BMC Cancer 16, 2016, 860.

Montalvo, R.N., Counts, B.R., and Carson, J.A. *Understanding sex differences in the regulation of cancer-induced muscle wasting*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 12, 2018, 394–403.

Morales, P.E., Bucarey, J.L., and Espinosa, A. *Muscle Lipid Metabolism: Role of Lipid Droplets and Perilipins*. J. Diabetes Res. 2017.

Morciano, G., Marchi, S., Morganti, C., Sbano, L., Bittremieux, M., Kerkhofs, M., Corricelli, M., Danese, A., Karkucinska-Wieckowska, A., Wieckowski, M.R., *et al. Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings*. Neoplasia 20, 2018, 510–523.

Morice, P., Leary, A., Creutzberg, C., Abu-Rustum, N., and Darai, E. *Endometrial cancer*. Lancet Lond. Engl. 387, 2016, 1094–1108.

Moses, S.W. *Muscle glycogenosis*. J. Inherit. Metab. Dis. 13, 1990, 452–465.

Mourtzakis, M., Prado, C.M.M., Lieffers, J.R., Reiman, T., McCargar, L.J., and Baracos, V.E. *A practical and precise approach to quantification of body composition in cancer patients using computed tomography images acquired during routine care*. Appl. Physiol. Nutr. Metab. Physiol. Appl. Nutr. Metab. 33, 2008, 997–1006.

Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., and Shaw, J.M. *Dnm1p Gtpase-Mediated Mitochondrial Fission Is a Multi-Step Process Requiring the Novel Integral Membrane Component Fis1p*. J. Cell Biol. 151, 2000, 367–380.

Muoio, D.M., and Neufer, P.D. *Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle*. Cell Metab. 15, 2012, 595–605.

Murano, I., Barbatelli, G., Parisani, V., Latini, C., Muzzonigro, G., Castellucci, M., and Cinti, S. *Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice*. J. Lipid Res. 49, 2008, 1562–1568.

Murphy, R.A., Mourtzakis, M., Chu, Q.S.C., Baracos, V.E., Reiman, T., and Mazurak, V.C. *Nutritional intervention with fish oil provides a benefit over standard of care for weight and skeletal muscle mass in patients with nonsmall cell lung cancer receiving chemotherapy*. Cancer 117, 2011, 1775–1782.

Mwamburi, D.M., Gerrior, J., Wilson, I.B., Chang, H., Scully, E., Saboori, S., Miller, L., Forfia, J., Albrecht, M., and Wanke, C.A. *Combination Megestrol Acetate, Oxandrolone, and Dietary Advice Restores Weight in Human Immunodeficiency Virus*. Nutr. Clin. Pract. 19, 2004, 395–402.

Nadege, B. *Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis*. Front. Biosci. Volume, 2009, 4015.

Nagaraju, K., Casciola-Rosen, L., Lundberg, I., Rawat, R., Cutting, S., Thapliyal, R., Chang, J., Dwivedi, S., Mitsak, M., Chen, Y.-W., *et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress response in autoimmune myositis: potential role in muscle fiber damage and dysfunction*. Arthritis Rheum. 52, 2005, 1824–1835.

Narasimhan, A., Ghosh, S., Stretch, C., Greiner, R., Bathe, O.F., Baracos, V., and Damaraju, S. *Small RNAome profiling from human skeletal muscle: novel miRNAs and their targets associated with cancer cachexia*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 8, 2017, 405–416.

Narasimhan, A., Greiner, R., Bathe, O.F., Baracos, V., and Damaraju, S. *Differentially expressed alternatively spliced genes in skeletal muscle from cancer patients with cachexia*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 9, 2018, 60–70.

Nattenmüller, J., Wochner, R., Muley, T., Steins, M., Hummler, S., Teucher, B., Wiskemann, J., Kauczor, H.-U., Wielpütz, M.O., and Heussel, C.P. *Prognostic Impact of CT-Quantified Muscle and Fat Distribution before and after First-Line-Chemotherapy in Lung Cancer Patients*. PloS One 12, 2017, e0169136.

Navigante, A., and Morgado, P. *Does physical exercise improve quality of life of advanced cancer patients?*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 10, 2016, 306–309.

Nicholls, D.G., and Rial, E. *A history of the first uncoupling protein, UCP1*. J. Bioenerg. Biomembr. 31, 1999, 399–406.

Nickerson, J.G., Alkhateeb, H., Benton, C.R., Lally, J., Nickerson, J., Han, X.-X., Wilson, M.H., Jain, S.S., Snook, L.A., Glatz, J.F.C., *et al. Greater transport efficiencies of the membrane fatty acid transporters FAT/CD36 and FATP4 compared with FABPpm and FATP1 and differential effects on fatty acid esterification and oxidation in rat skeletal muscle*. J. Biol. Chem. 284, 2009, 16522–16530.

Nisoli, E., Falcone, S., Tonello, C., Cozzi, V., Palomba, L., Fiorani, M., Pisconti, A., Brunelli, S., Cardile, A., Francolini, M., *et al. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 2004, 16507–16512.

Oldervoll, L.M., Loge, J.H., Lydersen, S., Paltiel, H., Asp, M.B., Nygaard, U.V., Oredalen, E., Frantzen, T.L., Lesteberg, I., Amundsen, L., *et al. Physical Exercise for Cancer Patients with Advanced Disease: A Randomized Controlled Trial*. The Oncologist 16, 2011, 1649–1657.

Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., *et al. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space*. FEBS Lett. 523, 2002, 171–176.

Oostra, D.R., Lustberg, M.B., Reinbolt, R.E., Pan, X., Wesolowski, R., and Shapiro, C.L. *Association of osteoprotegerin and bone loss after adjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer*. Mol. Cell. Endocrinol. 402, 2015, 51–56.

Op den Kamp, C.M., Langen, R.C., Minnaard, R., Kelders, M.C., Snepvangers, F.J., Hesselink, M.K., Dingemans, A.C., and Schols, A.M. *Pre-cachexia in patients with stages I-III non-small cell lung cancer: systemic inflammation and functional impairment without activation of skeletal muscle ubiquitin proteasome system*. Lung Cancer Amst. Neth. 76, 2012, 112–117.

Op den Kamp, C.M., Langen, R.C., Snepvangers, F.J., de Theije, C.C., Schellekens, J.M., Laugs, F., Dingemans, A.-M.C., and Schols, A.M. *Nuclear transcription factor κ B activation and protein turnover adaptations in skeletal muscle of patients with progressive stages of lung cancer cachexia*. Am. J. Clin. Nutr. 98, 2013, 738–748.

Op den Kamp, C.M., Gosker, H.R., Lagarde, S., Tan, D.Y., Snepvangers, F.J., Dingemans, A.-M.C., Langen, R.C., and Schols, A.M. *Preserved muscle oxidative metabolic phenotype in newly diagnosed non-small cell lung cancer cachexia*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 6, 2015, 164–173.

Oslowski, C.M., and Urano, F. *Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system*. Methods Enzymol. 490, 2011, 71–92.

Padrão, A.I., Oliveira, P., Vitorino, R., Colaço, B., Pires, M.J., Márquez, M., Castellanos, E., Neuparth, M.J., Teixeira, C., Costa, C., *et al. Bladder cancer-induced skeletal muscle wasting: disclosing the role of mitochondria plasticity*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 45, 2013, 1399–1409.

Paillusson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D.H.W., Mueller, S., Miller, T., and Miller, C.C.J. *There's Something Wrong with my MAM; the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases*. Trends Neurosci. 39, 2016, 146–157.

Palmela, C., Velho, S., Agostinho, L., Branco, F., Santos, M., Santos, M.P.C., Oliveira, M.H., Strecht, J., Maio, R., Cravo, M., *et al. Body Composition as a Prognostic Factor of Neoadjuvant Chemotherapy Toxicity and Outcome in Patients with Locally Advanced Gastric Cancer*. J. Gastric Cancer 17, 2017, 74–87.

Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. *MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery*. EMBO Rep. 12, 2011, 565–573.

Pasiakos, S.M., and Carbone, J.W. *Assessment of skeletal muscle proteolysis and the regulatory response to nutrition and exercise*. IUBMB Life 66, 2014, 478–484.

Pathinayake, P.S., Hsu, A.C.-Y., Waters, D.W., Hansbro, P.M., Wood, L.G., and Wark, P.A.B. *Understanding the Unfolded Protein Response in the Pathogenesis of Asthma*. Front. Immunol. 9, 2018.

PCR Primer Stats http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html.

Pedroso, F.E., Spalding, P.B., Cheung, M.C., Yang, R., Gutierrez, J.C., Bonetto, A., Zhan, R., Chan, H.L., Namias, N., Koniaris, L.G., *et al. Inflammation, organomegaly, and muscle wasting despite hyperphagia in a mouse model of burn cachexia*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 3, 2012, 199–211.

Penafuerte, C.A., Gagnon, B., Sirois, J., Murphy, J., MacDonald, N., and Tremblay, M.L. *Identification of neutrophil-derived proteases and angiotensin II as biomarkers of cancer cachexia*. Br. J. Cancer 114, 2016, 680–687.

Perocchi, F., Jensen, L.J., Gagneur, J., Ahting, U., von Mering, C., Bork, P., Prokisch, H., and Steinmetz, L.M. *Assessing systems properties of yeast mitochondria through an interaction map of the organelle*. PLoS Genet. 2, 2006, e170.

Petersen, A.M.W., and Pedersen, B.K. *The anti-inflammatory effect of exercise*. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 98, 2005, 1154–1162.

Petruzzelli, M., and Wagner, E.F. *Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia*. Genes Dev. 30, 2016, 489–501.

Petruzzelli, M., Schweiger, M., Schreiber, R., Campos-Olivas, R., Tsoli, M., Allen, J., Swarbrick, M., Rose-John, S., Rincon, M., Robertson, G., *et al. A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia*. Cell Metab. 20, 2014, 433–447.

Picard, M., Csukly, K., Robillard, M.-E., Godin, R., Ascah, A., Bourcier-Lucas, C., and Burelle, Y. *Resistance to Ca2+-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles*. Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol. 295, 2008, R659–R668.

Picard, M., Hepple, R.T., and Burelle, Y. *Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal function*. Am. J. Physiol.-Cell Physiol. 302, 2011, C629–C641.

Pond, C.M. *Adipose tissue and the immune system*. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 73, 2005, 17–30.

Ponnapakkam, T., Katikaneni, R., Nichols, T., Tobin, G., Sakon, J., Matsushita, O., and Gensure, R.C. *Prevention of chemotherapy-induced osteoporosis by cyclophosphamide with a long-acting form of parathyroid hormone*. J. Endocrinol. Invest. 34, 2011, e392-397.

Poterucha, T., Burnette, B., and Jatoi, A. *A decline in weight and attrition of muscle in colorectal cancer patients receiving chemotherapy with bevacizumab*. Med. Oncol. Northwood Lond. Engl. 29, 2012, 1005–1009.

Pourteymour, S., Lee, S., Langleite, T.M., Eckardt, K., Hjorth, M., Bindesbøll, C., Dalen, K.T., Birkeland, K.I., Drevon, C.A., Holen, T., *et al. Perilipin 4 in human skeletal muscle: localization and effect of physical activity*. Physiol. Rep. 3, 2015.

Prado, C.M., Cushen, S.J., Orsso, C.E., and Ryan, A.M. *Sarcopenia and cachexia in the era of obesity: clinical and nutritional impact*. Proc. Nutr. Soc. 75, 2016, 188–198.

Prado, C.M.M., Lieffers, J.R., McCargar, L.J., Reiman, T., Sawyer, M.B., Martin, L., and Baracos, V.E. *Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study*. Lancet Oncol. 9, 2008, 629–635.

Prado, C.M.M., Birdsell, L.A., and Baracos, V.E. *The emerging role of computerized tomography in assessing cancer cachexia*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 3, 2009, 269–275.

PREMIER Biosoft http://www.premierbiosoft.com/.

Primeau, J.O., Armanious, G.P., Fisher, M.E., and Young, H.S. *The SarcoEndoplasmic Reticulum Calcium ATPase*. Subcell. Biochem. 87, 2018, 229–258.

Primer3Plus http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi.

Primer-Blast https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi.

Prokopchuk, O., Steinacker, J.M., Nitsche, U., Otto, S., Bachmann, J., Schubert, E.C., Friess, H., and Martignoni, M.E. *IL-4 mRNA Is Downregulated in the Liver of Pancreatic Cancer Patients Suffering from Cachexia*. Nutr. Cancer 69, 2017, 84–91.

Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J.C., Zhang, C.Y., Krauss, S., Mootha, V.K., Lowell, B.B., and Spiegelman, B.M. *Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1*. Mol. Cell 8, 2001, 971–982.

Puig-Vilanova, E., Rodriguez, D.A., Lloreta, J., Ausin, P., Pascual-Guardia, S., Broquetas, J., Roca, J., Gea, J., and Barreiro, E. *Oxidative stress, redox signaling pathways, and autophagy in cachectic muscles of male patients with advanced COPD and lung cancer*. Free Radic. Biol. Med. 79, 2015, 91–108.

Quinn, L.S., Anderson, B.G., Strait-Bodey, L., Stroud, A.M., and Argilés, J.M. *Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296, 2009, E191-202.

Ramage, M.I., Johns, N., Deans, C.D.A., Ross, J.A., Preston, T., Skipworth, R.J.E., Jacobi, C., and Fearon, K.C.H. *The relationship between muscle protein content and CT-derived muscle radio-density in patients with upper GI cancer*. Clin. Nutr. 37, 2018, 752–754.

Rammohan, M., Kalantar-Zadeh, K., Liang, A., and Ghossein, C. *Megestrol acetate in a moderate dose for the treatment of malnutrition-inflammation complex in maintenance dialysis patients*. J. Ren. Nutr. Off. J. Counc. Ren. Nutr. Natl. Kidney Found. 15, 2005, 345–355.

Regan, J.N., Trivedi, T., Guise, T.A., and Waning, D.L. *The Role of TGFβ in Bone-Muscle Crosstalk*. Curr. Osteoporos. Rep. 15, 2017, 18–23.

Reid, J. *Psychosocial, educational and communicative interventions for patients with cachexia and their family carers*. Curr. Opin. Support. Palliat. Care 8, 2014, 334–338.

Reid, M.B. *Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 288, 2005, R1423-1431.

Remels, A.H.V., Gosker, H.R., Langen, R.C.J., and Schols, A.M.W.J. *The mechanisms of cachexia underlying muscle dysfunction in COPD*. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 114, 2013, 1253–1262.

Rhoads, M.G., Kandarian, S.C., Pacelli, F., Doglietto, G.B., and Bossola, M. *Expression of NF-kappaB and IkappaB proteins in skeletal muscle of gastric cancer patients*. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 46, 2010, 191–197.

Ries, A., Trottenberg, P., Elsner, F., Stiel, S., Haugen, D., Kaasa, S., and Radbruch, L. *A systematic review on the role of fish oil for the treatment of cachexia in advanced cancer: An EPCRC cachexia guidelines project*. Palliat. Med. 26, 2012, 294–304.

Rosa-Caldwell, M.E., and Greene, N.P. *Muscle metabolism and atrophy: let's talk about sex*. Biol. Sex Differ. 10, 2019, 43.

Rydén, M., Agustsson, T., Laurencikiene, J., Britton, T., Sjölin, E., Isaksson, B., Permert, J., and Arner, P. *Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia*. Cancer 113, 2008, 1695–1704.

Sacchetti, M., Saltin, B., Olsen, D.B., and van Hall, G. *High triacylglycerol turnover rate in human skeletal muscle*. J. Physiol. 561, 2004, 883–891.

Sadeghi, M., Keshavarz-Fathi, M., Baracos, V., Arends, J., Mahmoudi, M., and Rezaei, N. *Cancer cachexia: Diagnosis, assessment, and treatment*. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 127, 2018, 91–104.

Sagan, L. *On the origin of mitosing cells*. J. Theor. Biol. 14, 1967, 225-IN6.

Santel, A., and Fuller, M.T. *Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin*. J. Cell Sci. 114, 2001, 867–874.

Sasaki, S., Oki, E., Saeki, H., Shimose, T., Sakamoto, S., Hu, Q., Kudo, K., Tsuda, Y., Nakashima, Y., Ando, K., *et al. Skeletal muscle loss during systemic chemotherapy for colorectal cancer indicates treatment response: a pooled analysis of a multicenter clinical trial (KSCC 1605-A)*. Int. J. Clin. Oncol. 2019.

Scafoglieri, A., and Clarys, J.P. *Dual energy X-ray absorptiometry: gold standard for muscle mass?*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 9, 2018, 786–787.

Scarpulla, R.C. *Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network*. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1813, 2011, 1269–1278.

Schmitt, T.L., Martignoni, M.E., Bachmann, J., Fechtner, K., Friess, H., Kinscherf, R., and Hildebrandt, W. *Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia*. J. Mol. Med. Berl. Ger. 85, 2007, 647–654.

Scicchitano, B., Faraldi, M., and Musarò, A. *The Proteolytic Systems of Muscle Wasting*. Recent Adv. DNA Gene Seq. Former. Recent Pat. DNA Gene Seq. 9, 2016, 26–35.

Scorrano, L., Penzo, D., Petronilli, V., Pagano, F., and Bernardi, P. *Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha aopototic signaling*. J. Biol. Chem. 276, 2001, 12035–12040.

Scully, R.E. *Common epithelial tumors of borderline malignancy (carcinomas of low malignant potential)*. Bull. Cancer (Paris) 69, 1982, 228–238.

Sebastián, D., Guitart, M., García-Martínez, C., Mauvezin, C., Orellana-Gavaldà, J.M., Serra, D., Gómez-Foix, A.M., Hegardt, F.G., and Asins, G. *Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells*. J. Lipid Res. 50, 2009, 1789–1799.

Sebastián, D., Palacín, M., and Zorzano, A. *Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness with Healthy Aging*. Trends Mol. Med. 23, 2017, 201–215.

Sharma, H., Singh, A., Sharma, C., Jain, S.K., and Singh, N. *Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer*. Cancer Cell Int. 5, 2005, 34.

Shaw, C.S., Jones, D.A., and Wagenmakers, A.J.M. *Network distribution of mitochondria and lipid droplets in human muscle fibres*. Histochem. Cell Biol. 129, 2008, 65–72.

Shaw, E., Farris, M., McNeil, J., and Friedenreich, C. *Obesity and Endometrial Cancer*. Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer 208, 2016, 107–136.

Shaw, J.H., Humberstone, D.A., Douglas, R.G., and Koea, J. *Leucine kinetics in patients with benign disease, non-weight-losing cancer, and cancer cachexia: studies at the whole-body and tissue level and the response to nutritional support*. Surgery 109, 1991, 37–50.

Shen, W., Punyanitya, M., Wang, Z., Gallagher, D., St-Onge, M.-P., Albu, J., Heymsfield, S.B., and Heshka, S. *Total body skeletal muscle and adipose tissue volumes: estimation from a single abdominal cross-sectional image*. J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985 97, 2004, 2333–2338.

Shirendeb, U., Reddy, A., Manczak, M., Calkins, M.J., Mao, P., Tagle, D.A., and Reddy, P. (Hemachandra) *Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: Implications for selective neuronal damage*. Hum. Mol. Genet. 20, 2011, 1438–1455.

Shum, A.M.Y., Mahendradatta, T., Taylor, R.J., Painter, A.B., Moore, M.M., Tsoli, M., Tan, T.C., Clarke, S.J., Robertson, G.R., and Polly, P. *Disruption of MEF2C signaling and loss of*

sarcomeric and mitochondrial integrity in cancer-induced skeletal muscle wasting. Aging 4, 2012, 133–143.

Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., *et al. The proteome of Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 2003, 13207–13212.

Silvério, R., Lira, F.S., Oyama, L.M., Oller do Nascimento, C.M., Otoch, J.P., Alcântara, P.S.M., Batista, M.L., and Seelaender, M. *Lipases and lipid droplet-associated protein expression in subcutaneous white adipose tissue of cachectic patients with cancer*. Lipids Health Dis. 16, 2017, 159.

Skorokhod, A., Bachmann, J., Giese, N.A., Martignoni, M.E., and Krakowski-Roosen, H. *Real-imaging cDNA-AFLP transcript profiling of pancreatic cancer patients: Egr-1 as a potential key regulator of muscle cachexia*. BMC Cancer 12, 2012, 265.

Smith, B.K., Bonen, A., and Holloway, G.P. *A dual mechanism of action for skeletal muscle FAT/CD36 during exercise*. Exerc. Sport Sci. Rev. 40, 2012, 211–217.

Smith, I.J., Aversa, Z., Hasselgren, P.-O., Pacelli, F., Rosa, F., Doglietto, G.B., and Bossola, M. *Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss*. Muscle Nerve 43, 2011, 410–414.

Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. *Mitofusins and OPA1 Mediate Sequential Steps in Mitochondrial Membrane Fusion*. Mol. Biol. Cell 20, 2009, 3525–3532.

Stein, O., and Stein, Y. *LIPID SYNTHESIS, INTRACELLULAR TRANSPORT, AND STORAGE : III. Electron Microscopic Radioautographic Study of the Rat Heart Perfused with Tritiated Oleic Acid*. J. Cell Biol. 36, 1968, 63–77.

Stene, G.B., Helbostad, J.L., Balstad, T.R., Riphagen, I.I., Kaasa, S., and Oldervoll, L.M. *Effect of physical exercise on muscle mass and strength in cancer patients during treatment—A systematic review*. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 88, 2013, 573–593.

Stephens, N.A., Gallagher, I.J., Rooyackers, O., Skipworth, R.J., Tan, B.H., Marstrand, T., Ross, J.A., Guttridge, D.C., Lundell, L., Fearon, K.C., *et al. Using transcriptomics to identify and validate novel biomarkers of human skeletal muscle cancer cachexia*. Genome Med. 2, 2010, 1.

Stephens, N.A., Skipworth, R.J.E., MacDonald, A.J., Greig, C.A., Ross, J.A., and Fearon, K.C.H. *Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 2, 2011, 111–117.

Stephens, N.A., Skipworth, R.J.E., Gallagher, I.J., Greig, C.A., Guttridge, D.C., Ross, J.A., and Fearon, K.C.H. *Evaluating potential biomarkers of cachexia and survival in skeletal muscle of upper gastrointestinal cancer patients*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 6, 2015, 53–61.

Stretch, C., Aubin, J.-M., Mickiewicz, B., Leugner, D., Al-manasra, T., Tobola, E., Salazar, S., Sutherland, F.R., Ball, C.G., Dixon, E., *et al. Sarcopenia and myosteatosis are accompanied*

by distinct biological profiles in patients with pancreatic and periampullary adenocarcinomas. PLoS ONE 13, 2018.

Summermatter, S., Baum, O., Santos, G., Hoppeler, H., and Handschin, C. *Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} coactivator 1{alpha} (PGC-1{alpha}) promotes skeletal muscle lipid refueling in vivo by activating de novo lipogenesis and the pentose phosphate pathway*. J. Biol. Chem. 285, 2010, 32793–32800.

Sun, L., Quan, X.-Q., and Yu, S. *An Epidemiological Survey of Cachexia in Advanced Cancer Patients and Analysis on Its Diagnostic and Treatment Status*. Nutr. Cancer 67, 2015, 1056–1062.

Sun, R., Zhang, S., Lu, X., Hu, W., Lou, N., Zhao, Y., Zhou, J., Zhang, X., and Yang, H. *Comparative molecular analysis of early and late cancer cachexia-induced muscle wasting in mouse models*. Oncol. Rep. 36, 2016, 3291–3302.

Sun, Y.-S., Ye, Z.-Y., Qian, Z.-Y., Xu, X.-D., and Hu, J.-F. *Expression of TRAF6 and ubiquitin mRNA in skeletal muscle of gastric cancer patients*. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR 31, 2012, 81.

Suzuki, T., Palus, S., and Springer, J. *Skeletal muscle wasting in chronic heart failure*. ESC Heart Fail. 5, 2018, 1099–1107.

Taanman, J.W. *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. Biochim. Biophys. Acta 1410, 1999, 103–123.

Taherzadeh-Fard, E., Saft, C., Akkad, D.A., Wieczorek, S., Haghikia, A., Chan, A., Epplen, J.T., and Arning, L. *PGC-1alpha downstream transcription factors NRF-1 and TFAM are genetic modifiers of Huntington disease*. Mol. Neurodegener. 6, 2011, 32.

Talbert, E.E., Metzger, G.A., He, W.A., and Guttridge, D.C. *Modeling human cancer cachexia in colon 26 tumor-bearing adult mice*. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 5, 2014, 321–328.

Tamura, G., Nishizuka, S., Maesawa, C., Suzuki, Y., Iwaya, T., Sakata, K., Endoh, Y., and Motoyama, T. *Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients*. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 35, 1999, 316–319.

Tanner, C.J., Barakat, H.A., Dohm, G.L., Pories, W.J., MacDonald, K.G., Cunningham, P.R.G., Swanson, M.S., and Houmard, J.A. *Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss*. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. 282, 2002, E1191–E1196.

Taskin, S., Stumpf, V.I., Bachmann, J., Weber, C., Martignoni, M.E., and Friedrich, O. *Motor protein function in skeletal abdominal muscle of cachectic cancer patients*. J. Cell. Mol. Med. 18, 2014, 69–79.

Taylor, H. *Malignant and semi-malignant tumors of the ovary.* Surg Gynecol Obstet 48, 1929, 204–230.

Taylor, J.K., and Pendleton, N. *Progesterone therapy for the treatment of non-cancer cachexia: a systematic review*. BMJ Support. Palliat. Care 6, 2016, 276–286.

Temparis, S., Asensi, M., Taillandier, D., Aurousseau, E., Larbaud, D., Obled, A., Béchet, D., Ferrara, M., Estrela, J.M., and Attaix, D. *Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats*. Cancer Res. 54, 1994, 5568–5573.

Tisdale, M.J. *Mechanisms of cancer cachexia*. Physiol. Rev. 89, 2009, 381–410.

Tomlinson, D.J., Erskine, R.M., Winwood, K., Morse, C.I., and Onambélé, G.L. *The impact of obesity on skeletal muscle architecture in untrained young vs. old women*. J. Anat. 225, 2014, 675–684.

Trayhurn, P., Bing, C., and Wood, I.S. *Adipose tissue and adipokines--energy regulation from the human perspective*. J. Nutr. 136, 2006, 1935S-1939S.

Turnbull, P.C., Longo, A.B., Ramos, S.V., Roy, B.D., Ward, W.E., and Peters, S.J. *Increases in skeletal muscle ATGL and its inhibitor G0S2 following 8 weeks of endurance training in metabolically different rat skeletal muscles*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 310, 2016, R125-133.

Vagnildhaug, O.M., Balstad, T.R., Almberg, S.S., Brunelli, C., Knudsen, A.K., Kaasa, S., Thronæs, M., Laird, B., and Solheim, T.S. *A cross-sectional study examining the prevalence of cachexia and areas of unmet need in patients with cancer*. Support. Care Cancer 26, 2018, 1871–1880.

Vance, J.E. *MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond*. Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids 1841, 2014, 595–609.

Vattemi, G., Engel, W.K., McFerrin, J., and Askanas, V. *Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in inclusion body myositis muscle*. Am. J. Pathol. 164, 2004, 1–7.

Vega, R.B., Huss, J.M., and Kelly, D.P. *The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes*. Mol. Cell. Biol. 20, 2000, 1868–1876.

Ventura-Clapier, R., Moulin, M., Piquereau, J., Lemaire, C., Mericskay, M., Veksler, V., and Garnier, A. *Mitochondria: a central target for sex differences in pathologies*. Clin. Sci. 131, 2017, 803–822.

Virbasius, J.V., and Scarpulla, R.C. *Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91, 1994, 1309–1313.

Von Roenn, J.H., Murphy, R.L., and Wegener, N. *Megestrol acetate for treatment of anorexia and cachexia associated with human immunodeficiency virus infection*. Semin. Oncol. 17, 1990, 13–16.

Wallace, D.C. *Diseases of the Mitochondrial DNA*. Annu. Rev. Biochem. 61, 1992, 1175–1212.

Wanagat, J., Cao, Z., Pathare, P., and Aiken, J.M. *Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia*. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 15, 2001, 322–332.

Wang, M., and Kaufman, R.J. *The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development*. Nat. Rev. Cancer 14, 2014, 581–597.

Wang, Y., Michikawa, Y., Mallidis, C., Bai, Y., Woodhouse, L., Yarasheski, K.E., Miller, C.A., Askanas, V., Engel, W.K., Bhasin, S., *et al. Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 2001, 4022–4027.

Waning, D.L., and Guise, T.A. *Cancer-associated muscle weakness: What's bone got to do with it?* BoneKEy Rep. 4, 2015, 691.

Warren, S. *THE IMMEDIATE CAUSES OF DEATH IN CANCER:*. Am. J. Med. Sci. 184, 1932, 610–615.

Watt, M.J., and Hoy, A.J. *Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function*. Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab. 302, 2011, E1315–E1328.

Webb, P.M., and Jordan, S.J. *Epidemiology of epithelial ovarian cancer*. Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol. 41, 2017, 3–14.

Weber, M.-A., Kinscherf, R., Krakowski-Roosen, H., Aulmann, M., Renk, H., Künkele, A., Edler, L., Kauczor, H.-U., and Hildebrandt, W. *Myoglobin plasma level related to muscle mass and fiber composition: a clinical marker of muscle wasting?*. J. Mol. Med. Berl. Ger. 85, 2007, 887–896.

Weber, M.-A., Krakowski-Roosen, H., Schröder, L., Kinscherf, R., Krix, M., Kopp-Schneider, A., Essig, M., Bachert, P., Kauczor, H.-U., and Hildebrandt, W. *Morphology, metabolism, microcirculation, and strength of skeletal muscles in cancer-related cachexia*. Acta Oncol. Stockh. Swed. 48, 2009, 116–124.

Weed, H.G., Ferguson, M.L., Gaff, R.L., Hustead, D.S., Nelson, J.L., and Voss, A.C. *Lean body mass gain in patients with head and neck squamous cell cancer treated perioperatively with a protein- and energy-dense nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid*. Head Neck 33, 2011, 1027–1033.

White, J.P., Baltgalvis, K.A., Puppa, M.J., Sato, S., Baynes, J.W., and Carson, J.A. *Muscle oxidative capacity during IL-6-dependent cancer cachexia*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 300, 2011, R201-211.

Wigmore, S.J., Todorov, P.T., Barber, M.D., Ross, J.A., Tisdale, M.J., and Fearon, K.C.H. *Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor: Cachectic factor in pancreatic cancer*. Br. J. Surg. 87, 2000, 53–58.

Williams, A., Sun, X., Fischer, J.E., and Hasselgren, P.O. *The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer*. Surgery 126, 1999, 744–749; discussion 749-750.

Wu, J., and Kaufman, R.J. *From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response*. Cell Death Differ. 13, 2006, 374–384.

Yan, Z., Lira, V.A., and Greene, N.P. *Exercise training-induced Regulation of Mitochondrial Quality*. Exerc. Sport Sci. Rev. 40, 2012, 159–164.

Yoon, S.L., Grundmann, O., Williams, J.J., Gordan, L., and George, T.J. *Body composition changes differ by gender in stomach, colorectal, and biliary cancer patients with cachexia: Results from a pilot study*. Cancer Med. 7, 2018, 3695–3703.

Yoshida, T., and Delafontaine, P. *Mechanisms of Cachexia in Chronic Disease States*. Am. J. Med. Sci. 350, 2015, 250–256.

Zamir, O., Hasselgren, P.O., Kunkel, S.L., Frederick, J., Higashiguchi, T., and Fischer, J.E. *Evidence that tumor necrosis factor participates in the regulation of muscle proteolysis during sepsis*. Arch. Surg. Chic. Ill 1960 127, 1992, 170–174.

Zechner, R., Kienesberger, P.C., Haemmerle, G., Zimmermann, R., and Lass, A. *Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores*. J. Lipid Res. 50, 2009, 3–21.

Zhang, H., Wang, Y., Li, J., Yu, J., Pu, J., Li, L., Zhang, H., Zhang, S., Peng, G., Yang, F., *et al. Proteome of skeletal muscle lipid droplet reveals association with mitochondria and apolipoprotein a-I*. J. Proteome Res. 10, 2011, 4757–4768.

Zhao, J., Liu, T., Jin, S., Wang, X., Qu, M., Uhlén, P., Tomilin, N., Shupliakov, O., Lendahl, U., and Nistér, M. *Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission*. EMBO J. 30, 2011, 2762–2778.

Zhou, G., Gui, X., Chen, R., Fu, X., Ji, X., and Ding, H. *Elevated serum Activin A in chronic obstructive pulmonary disease with skeletal muscle wasting*. Clin. Sao Paulo Braz. 74, 2019, e981.

Annexe 1 : Communications

- **Communications orales**

Congrès international

4th meeting of the International Society of Cancer Metabolism (ISCaM), Bertinoro, Italie (19-21 Octobre 2017). « Skeletal Muscle Mitochondrial Energy Metabolism in Cancer Cachexia: Clinical and Mechanistic approaches ».

Congrès nationaux

12ème Colloque du réseau « Valorisation des produits de la mer en cancérologie » du Cancéropôle Grand Ouest, Nantes, France (30 Mai 2016). « Métabolisme énergétique musculaire chez les patients dénutris porteurs d'un cancer et impact de l'obésité ».

14ème Colloque du réseau « Valorisation des produits de la mer en cancérologie » du Cancéropôle Grand Ouest, Mansigné, France (24 Mai 2018). « Métabolisme énergétique du muscle squelettique dans la cachexie cancéreuse ».

15ème Colloque du réseau « Molécules marines, métabolisme et cancer » du Cancéropôle Grand Ouest, Mansigné, France (23 Mai 2019). « Cachexie cancéreuse : Composition corporelle, structure et métabolisme du muscle squelettique ».

Journée Recherche en pharmacie, Tours, France (05 Juillet 2019). « Cachexie cancéreuse : Composition corporelle, structure et métabolisme du muscle squelettique ».

- **Communications affichées dans des congrès internationaux**

10th International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Muscle Wasting, Rome, Italie (8-10 Décembre 2017). « Skeletal Muscle Mitochondrial Energy Metabolism in Cancer Cachexia: Clinical and Mechanistic approaches ».

11th International Conference on Cachexia, Sarcopenia and Muscle Wasting, Maastricht, Pays-Bas (7-9 Décembre 2018). « Skeletal Muscle Structure and Energy Metabolism in Cancer Cachexia: Clinical Approach ».

Journées Francophones d'Hépato-gastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD), Paris, France (26-29 Mars 2020).
1er poster : « Structure et métabolisme énergétique du muscle squelettique dans la cachexie cancéreuse chez les patients atteints d'un cancer digestif ».
2nd poster : « Perte simultanée de masse musculaire squelettique, de densité minérale osseuse et de tissu adipeux au cours d'un traitement par bevacizumab / chimiothérapie cytotoxique dans le traitement du cancer colorectal métastatique ».

Adeline DOLLY

Cachexie cancéreuse : Composition corporelle, structure et métabolisme du muscle squelettique

La cachexie cancéreuse est un syndrome multifactoriel caractérisé notamment par une perte progressive du muscle squelettique, qui entraîne une diminution de la qualité de vie, de la réponse aux traitements anticancéreux, et de la survie des patients. De par la complexité physiopathologique de ce syndrome clinique, il n'existe pour le moment aucun traitement curatif.
Malgré de récentes découvertes, les mécanismes à l'origine de la fonte musculaire squelettique ne sont pas clairement élucidés. Les résultats des études précliniques et cliniques pointent sur de possibles altérations des métabolismes mitochondrial et lipidique. De plus, si la composition corporelle est affectée par la tumeur, elle l'est aussi par les traitements anti-cancéreux.
Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes donnés comme objectifs d'étudier les liens entre la composition corporelle et un traitement par chimiothérapie à base de bévacizumab (étude clinique STIC-Avastin (NCT00489697)) ; ou avec la structure et le métabolisme du muscle squelettique, dans le contexte de la cachexie cancéreuse (protocoles cliniques METERMUCADIG (NCT02573974) et METERMUS-IMC (NCT03027479)).

Mots clés : Cachexie cancéreuse, composition corporelle, muscle squelettique, études cliniques, sarcopénie

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome characterized by progressive loss of skeletal muscle, leading to decreased quality of life, response to cancer treatments, and patient survival. Due to the physio pathological complexity of this clinical syndrome, there is currently no cure to cancer cachexia.
Despite recent discoveries, the mechanisms underlying skeletal muscle wasting are not clearly understood. Recent preclinical and clinical studies highlighted possible alterations in mitochondrial and lipid metabolism. Furthermore, body composition could be affected not only by the tumor, but also by anti-cancer treatments.
During this PhD, the aims were to study the links between body composition and bevacizumab-based chemotherapy treatment (clinical study STIC-Avastin (NCT00489697)); or with skeletal muscle structure and metabolism, in the context of cancer cachexia (clinical protocols METERMUCADIG (NCT02573974) and METERMUS-IMC (NCT03027479)).

Keywords: Cancer cachexia, body composition, skeletal muscle, clinical studies, sarcopenia