



HAL
open science

Invalidation du gène de la myostatine dans un modèle murin de cachexie associée au cancer : implication dans la régulation de la masse musculaire

Yann Simon Gallot

► **To cite this version:**

Yann Simon Gallot. Invalidation du gène de la myostatine dans un modèle murin de cachexie associée au cancer : implication dans la régulation de la masse musculaire. Génétique. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013STET015T . tel-01058905

HAL Id: tel-01058905

<https://theses.hal.science/tel-01058905>

Submitted on 28 Aug 2014

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

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



- Thèse de Doctorat d'Université -

Ecole Doctorale EDSIS n°488 : Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité : Biologie, Médecine et Santé

Option : Biologie et Physiologie de l'Exercice

Invalidation du gène de la myostatine dans un modèle murin de cachexie associée au cancer : implication dans la régulation de la masse musculaire

Yann Simon GALLOT

Préparée au Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, EA 4338,
Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France

Présentée et soutenue publiquement le mercredi 6 Novembre 2013

Devant le jury composé de :

M. Didier ATTAIX

M. Jean-Paul THISSEN

Mme Silvia BUSQUETS RIUS

M. Georges NEMOZ

M. Lionel TINTIGNAC

Mme Anne BONNIEU

M. Damien FREYSSENET

Clermont-Ferrand

Bruxelles

Barcelone

Oullins

Bâle

Montpellier

Saint-Etienne

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Examineur

Co-directrice de thèse

Directeur de thèse

Remerciements

« Si tu veux quelque chose avec assez de force, tu l'obtiendras. Il te faudra de la patience, un travail acharné, une lutte de tous les instants, et beaucoup de temps ; mais tu l'auras. Sache que la foi est le fondement de toute entreprise. »

Margot Jones (1913-1955)

Voilà, nous y sommes ... Quatre années que j'attends ce moment ... Ecrire mes remerciements et terminer ma thèse de doctorat ... Le chemin a été long et parsemé d'embûches, mais je suis arrivé au bout !! Néanmoins, cet accomplissement n'a pu être possible qu'avec l'aide d'un bon nombre de personnes, qui m'ont épaulé personnellement, professionnellement et scientifiquement. Cette section est pour vous ...

En premier lieu, je tiens à remercier sincèrement les membres de mon jury, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de lire mon manuscrit et de juger mon travail. Merci à Messieurs **Didier Attaix** et **Jean-Paul Thissen** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, ainsi qu'à Madame **Silvia Busquets Rius**, et Messieurs **Georges Nemoz** et **Lionel Tintignac** d'avoir accepté d'être mes examinateurs.

Je remercie **Alain Belli**, pour m'avoir accueilli au sein du LPE, ainsi que toutes les membres qui le composent.

Je pense tout particulièrement à la personne la plus influente ... Un grand monsieur ... Mon directeur de thèse, **Damien Freyssenet**. Je te remercie pour tout le temps que nous avons passé ensemble, pour ta bienveillance, ta gentillesse, ton soutien et ta compréhension dans les moments les plus difficiles, qu'ils aient été professionnels ou personnels. Merci également pour tout ce que tu m'as appris et toutes les marques de confiance que tu m'as témoigné depuis notre rencontre le 13 novembre 2007 !!! Je ne t'oublierai jamais ...

J'exprime toute ma gratitude à ma co-directrice de thèse, **Anne Bonnieu**. Malgré la distance, merci d'avoir répondu présent dès que je t'ai sollicitée, notamment pour les relectures du manuscrit, mais également pour les manipes et les souris. C'est toujours un plaisir de venir à Montpellier et d'aller se baigner à Palavas !

J'adresse de profonds remerciements à **Adel Amirouche**, mon encadrant de M1, pour avoir révélé ma face cachée recherche, et m'avoir appris à ne pas être finaliste ! Je remercie sincèrement **François B. Favier**, mon guide spirituel ... « Le rock, c'est t'arrives, t'as une présentation p*werp*int et tu sais pas si tes animations vont marcher ... c'est ça le rock, tu prends des risques, t'as peur !! ». Merci de m'avoir fait confiance pour tes manipes. Je remercie également **Andrea Castro Perez**, **Aurélia Defour** et **Vanessa Jahnke**, qui m'ont très bien accueilli à mes débuts.

Je pense aussi à **Josiane Castells**, notre Maman du labo ! Merci pour ton aide ô combien précieuse en enzymo, en bio mol, en PCR, ... La liste est trop exhaustive ! Merci aussi pour ton soutien, ta joie (titre de thèse non validé « Tout nous sourit ») et parfois ta mauvaise humeur. Merci également à **Régis** « Trouvetou » **Bonnefoy** pour son aide informatique et technique infallible (y compris les weekends). Enfin, merci à **Anne-Cécile Durieux** pour son aide ainsi que pour les petites souris Apc.

J'ai une pensée pour tous les étudiants et (post)doctorants qui ont animé le labo et partagé un moment de mon doctorat. Une pensée spéciale pour **Stéphanie Chanon** (dosage des céramides), **Stéphanie Demars** (des heures de somnolence devant le labyrinthe en croix) et **Blandine Gri** (Jean-Paul Sartre inside).

Je tiens à remercier chaleureusement mes super stagiaires, qui m'ont grandement aidé pour les manipes : **Léa Plantureux**, **Thibaut Desgeorges** et mon poulain, **Damien Lacroix**. Je remercie également **Barbara Vernus** et **Ghislaine Roux**, pour leurs soins apportés à mes petites souris, que ce soit à Montpellier ou à Saint-Etienne. Mice Thanks !!!

Enfin, je remercie nos collaborateurs : **Bernard Serrurier**, **Hervé Sanchez** et **Xavier Bigard** (CRSSA – La Tronche) ; **Nordine Hafnaoui** et **Dominique Dardevet** (INRA – Clermont-Ferrand) ; **Michel Beylot** (ANIPHY – Lyon) ; **Nadia Boutahar** (NONI – Saint-Etienne) ; **Agathe Ensinas**, **Fabienne Jospin**, **Charles-Antoine Arthaud** et **Olivier Delézay** (GIMAP – Saint-Etienne) ; **Laurent Schaeffer** (LBMC – Lyon) ; et **Phanélie Berthon** (LPE – Chambéry). Des remerciements spéciaux pour **Etienne Lefai** et **Georges Nemoz** (CarMeN – Lyon), pour nos discussions scientifiques et leurs multiples conseils ainsi que leurs aides techniques.

Que serait une thèse, sans un bon repas, qui tient bien au ventre ? Hein ! Merci à **Marie** du R(oyal) U(topia) pour sa bonne humeur et son extrême gentillesse.

J'ai également une pensée pour toute l'équipe pédagogique du STAPS de Saint-Etienne avec qui j'ai passé cinq très bonnes années. Un grand merci à Messieurs **Henri Benoit**, **Thierry Busso** et **Xavier Devillard** pour leur confiance et toutes les heures d'enseignement que vous m'avez accordé. Et, je remercie évidemment mes élèves !

Je remercie tous les (post)doctorants du GIMAP et du LBTO ainsi que l'équipe « Radio Fajet » des JHC de Nancy, les BV.Nxt et les DUOPiens avec lesquelles j'ai pu échanger et/ou passer d'excellentes soirées. « Gros » remerciement à la choucard **Carole** (la petite fraise qui rougit à cause de son élève), à **Binh(ou) Minh(ou)**, à **Cédric** (le baddeur), à **Romain** (Blini), à **Nathalie** et **Muriel**, à **Igor** ('djakuju), à **Floriane**, à **Emilien** et à **Fiona** (c'est trop choupi !!). J'ai également une pensée pour **Aurélie** et **Angélique**.

Je remercie tous ceux qui font le beau temps dans ma vie, qui comptent beaucoup pour moi ... Et qui me demandent à chaque fois comment vont mes souris !!! Je pense notamment aux M1 CAPESiens (... ou pas) : **Marielle**, **Robin**(son), mon poulet le **Jé** et **Lisou**. On s'est bien marré avec ce master 1 improbable ! J'en profite aussi pour remercier mon prof de Géologie préféré, **Christophe Renac**, qui m'a conduit au doctorat. Je pense également au groupe de l'arrêt de car : **Marie Charlotte**, **Séb(iche)**, **Marion** (Vivo per lei), **Gautier** (des étoiles dans les yeux) et **Marion** (sorcière ! Au bûcher !!). Je n'oublierai pas les frères du foot, et en particulier **Nico** (Palavas, baignade à 14°C). Tu connais Robert le Vêto ?!

Je remercie aussi mon ami d'enfance et kiné, **Nico**, pour les 60 séances de souffrance, et au final, une mobilité d'épaule retrouvée. Tu me donnes ton goûter ?! Il y a aussi mes inclassables : **Bat** (SDF 20/04/2013), **Corentin** et **Sandrine**, la quenelle **Magali** et **Janus** (Caraaameeeelllll !!). Je pense également au « club » du lycée et leur connexion : ouais ouais ouais La Chapelle !!! **Mick** « Coc » (7 ans au Tibet), **Tony** Martinus de Jong (sweet soca music), **Titi** (asomo misobo), **Marie** (petit poney), la Ch'tite **Marion** et la Bruleuse de loups **Sandrine**. Et enfin, je pense au Biotope : **Bro'Geof** (YNWA) et **B'RomS** le niglo (Glasgow c'est çaaaaa !!!). Aïe aïe aïe ... L2, Farges inside, BU, in the VIP, Quick, commando, ... ça révisé !!!

Je pense bien évidemment à ma Binôme, **Nadia** BélouBélouDance, pour son soutien inconditionnel, et pour le rêve que tu m'as envoyé au fil des années : géologie, Slumdog, ...

Je remercie très fortement mon ami d'enfance **Julien** aka Jed (13h30 ! Un peu de rab') et SuperMaman **Alexandra**, pour leur si longue amitié.

Enfin, je n'oublierai sûrement pas, **Guénaëlle**, ma complice doctorale de chaque instant ! Merci d'être là, autant au labo que dans la « vraie » vie. Amitié fraternelle ...

Je remercie toute ma famille, qui a enfin saisi que je n'étais pas un dresseur de souris !! Un merci intemporel à ma maman, **Claude**, et mon papa, **Bruno**, pour tout ce qu'ils m'apportent depuis si longtemps. Je remercie aussi mes deux frères, **Brice** et **Loïc** pour toutes les bêtises que nous avons faites depuis tout petits !!! Je vous remercie également, ainsi que **Vérène** et **Estelle**, pour m'avoir rendu double tonton ! Je remercie mes grands-parents, et notamment **Maria**, ma Mamie (Pomme d'Api). Enfin, merci à **Cécile**, ma Marraine, qui est toujours là pour moi.

Je terminerai par un remerciement spécial pour la spécialiste de l'amorti au filet, mon « gemme au cœur », **Audrey**. Merci à **Elsa**, **Sasha**, **Angie** et toi, pour tout ce que vous m'apportez au quotidien. Enfin, merci pour toutes les relectures du manuscrit que tu as faites. Besser mehr wie nicht genug !

A mes deux nièces, Andréa Victoria et Tessa Maria ...

Table des matières

Remerciements.....	3
Table des matières.....	9
Tables des illustrations.....	15
Figures	16
Tableaux	18
Boîte	18
Liste des abréviations.....	19
Introduction générale	25
Etat de la littérature	31
Chapitre I : La cachexie associée au cancer	33
I. Généralités.....	33
II. La pathophysiologie de la cachexie associée au cancer.....	35
III. Les symptômes de la cachexie associée au cancer.....	39
1. Anorexie	39
2. Augmentation de la dépense énergétique de repos	41
3. Perte de poids	43
4. Altérations de la composition corporelle	45
A. Tissus musculaires et adipeux	47
B. Viscères	49
C. Compartiments liquidiens et minéraux.....	49
5. Altérations du métabolisme	49
A. Métabolisme glucidique.....	51
B. Métabolisme lipidique.....	53
a) Diminution de la lipogenèse.....	55
b) Augmentation de la lipolyse	57
c) Réduction de l'activité de la lipoprotéine lipase	59
C. Métabolisme protéique.....	61
a) Augmentation du renouvellement protéique de l'organisme	61
b) Augmentation de la synthèse protéique hépatique	63
c) Réduction de la synthèse protéique musculaire	63
d) Augmentation du catabolisme protéique musculaire	65
e) Modifications du pool d'acides aminés.....	65
6. Réponse de phase aiguë.....	67
IV. Les médiateurs de la cachexie associée au cancer	71
1. Les cytokines	71
A. Les cytokines pro-inflammatoires	73
a) Le tumor necrosis factor (TNF)- α	73
b) L'interleukine (IL)-6	75
c) L'interleukine (IL)-1 β	77
d) L'interféron (IFN)- γ	79
e) Le ciliary neurotrophic factor (CNTF)	79
f) Le leukemia inhibitory factor (LIF)	79
B. Les cytokines anti-inflammatoires.....	81
2. Les lipid mobilizing factor (LMF).....	81
3. Le proteolysis-inducing factor (PIF)	85

Chapitre II : Mécanismes moléculaires mis en jeu dans la cachexie associée au cancer . 91

I. La balance synthèse / dégradation des protéines au cours de la cachexie associée au cancer	91
1. La voie PI3K/Akt/mTOR	91
A. Généralités	93
B. La voie PI3K/Akt/mTOR dans le muscle squelettique	95
C. Implication de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la cachexie associée au cancer ...	97
2. Le système protéolytique ubiquitine-protéasome	99
A. Généralités	99
B. Le système ubiquitine-protéasome dans le muscle squelettique	101
C. Implication du système ubiquitine-protéasome dans la cachexie associée au cancer.....	105
3. Le système autophagie-lysosome	107
A. Généralités	107
B. Le système autophagie-lysosome dans le muscle squelettique.....	109
C. Implication du système autophagie-lysosome dans la cachexie associée au cancer.....	111
4. Les calpaïnes.....	113
A. Généralités	113
B. Les calpaïnes dans le muscle squelettique	115
C. Induction des calpaïnes dans la cachexie associée au cancer	117
II. Les facteurs de transcription impliqués.....	117
1. Le facteur de transcription nuclear factor kappa B (NF-κB)	117
A. Généralités	117
B. NF-κB dans le muscle squelettique	119
C. Implication du facteur de transcription NF-κB dans la cachexie associée au cancer.....	121
2. Les facteurs de transcription forkhead box O (FoxO).....	123
A. Généralités	123
B. Les facteurs de transcription FoxO dans le muscle squelettique	125
C. Implication des facteurs de transcription FoxO dans la cachexie associée au cancer.....	125
III. L'apoptose	127
1. Généralités	127
2. L'apoptose dans le muscle squelettique	129
3. Implication de l'apoptose dans la cachexie associée au cancer	131
IV. Les médiateurs de la cachexie associée au cancer	133
1. Les cytokines pro-inflammatoires	133
A. Le tumor necrosis factor (TNF)-α	133
B. L'interleukine-6	135
C. L'interleukine-1β	137
D. L'interféron-γ	139
2. La myostatine	139
A. Généralités	139
B. La myostatine et le contrôle de la masse musculaire	141
C. Implication de la Mstn dans la cachexie associée au cancer	145
3. Le TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)	147

A. Généralités	147
B. TWEAK-Fn14 dans le muscle squelettique	149
C. Implication de TWEAK dans la cachexie associée au cancer	151
4. Les céramides	151
A. Généralités	151
B. Les céramides dans le muscle squelettique	153
C. Implication des céramides dans la cachexie associée au cancer	155
Chapitre III : Prise en charge clinique de la cachexie associée au cancer.....	157
I. Soutien nutritionnel	157
1. Soutien nutritionnel oral	159
2. Soutien nutritionnel artificiel	161
A. La nutrition entérale	163
B. La nutrition parentérale	163
3. Les nutraceutiques	165
A. Les acides gras oméga-3.....	165
B. Les acides aminés	169
II. Traitement pharmacologique	171
1. Les agents stimulant l'appétit	173
A. Les cannabinoïdes	173
B. La cyproheptadine.....	173
C. Les corticostéroïdes.....	175
D. Les progestatifs	177
a) L'acétate de mégestrol.....	177
b) L'acétate de médroxyprogestérone.....	179
E. La ghréline	181
2. Les approches thérapeutiques basées sur les cytokines	183
A. La pentoxifylline	183
B. Le thalidomide.....	183
C. La mélatonine	185
D. Anticorps et récepteurs solubles.....	187
3. Les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	189
A. L'ibuprofène	189
B. L'indométacine	191
C. Le célécoxib	191
4. Les agents anabolisants	193
A. Les stéroïdes anabolisants et les SARM	193
B. Les β_2 -agonistes.....	195
III. Exercice.....	201
Objectifs	205
Matériels et méthodes.....	209
Culture cellulaire : Lewis lung carcinoma	211
Inoculation des cellules LLC	214
Prélèvement et conditionnement des échantillons tissulaires	216
Extraction protéique avec tampon complet sur tissu musculaire congelé	218
Mesure de la concentration en protéines totales.....	220
Electrophorèse SDS-PAGE.....	222

Anticorps primaires et secondaires utilisés.....	231
Quantification des bandes de Western Blot.....	232
Dessin des couples d'amorces	234
Amorces PCR.....	236
Quantification de l'expression des gènes d'intérêt	238
Extraction et purification de l'ARN – Muscle.....	239
Extraction et purification de l'ARN – Tissu Adipeux	241
Extraction et purification de l'ARN – Tumeur.....	243
Mesure de la concentration en acide ribonucléique messenger (ARN).....	245
Electrophorèse sur gel de formaldéhyde-agarose (FA) – ARN totaux	246
Quantification de l'expression des gènes d'intérêt	248
Dosage des acides aminés libres.....	253
Dosage des céramides musculaires.....	255
Dosage des phosphoprotéines, des protéines totales et des cytokines en Luminex	257
Activité enzymatique de la caspase-3	260
Introduction à la cytométrie en flux	262
Immunomarquage indirect de Ki-67 et marquage à l'Hoechst 33342 sur cellules LLC ..	265
Résultats	267
<i>Myostatin</i> gene inactivation induces resistance to skeletal muscle loss, reduces tumor growth and increases survival in mouse models of cancer cachexia.....	269
Discussion	319
I. Discussion des aspects méthodologiques de notre étude.....	321
1. Le modèle LLC.....	321
2. Le modèle <i>Apc^{Min/+}</i>	323
II. Discussion des résultats de notre étude.....	324
1. Mstn et épargne musculaire.....	324
2. Mstn et durée de vie	325
3. Mstn et croissance tumorale.....	326
4. Les céramides	327
Conclusion	331
Références bibliographiques	335
Annexes	403
Articles parus dans des revues internationales à comité de lecture	405
Communications affichées lors de congrès nationaux et internationaux.....	427
Communications orales lors de congrès nationaux et internationaux	439

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Données épidémiologiques sur le cancer dans le monde et en France.	26
Figure 2 : Phénotypes « hypermusclés » dus à l'inactivation du gène de la myostatine (Mstn).	28
Figure 3 : Survie de patients avec un cancer du poumon à non-petites cellules (NSCLC), représentée par le genre.	34
Figure 4 : Représentation conceptuelle de la cachexie.	36
Figure 5 : Chronologie des différents stades de la cachexie associée au cancer.	36
Figure 6 : Symptômes interférant avec la prise alimentaire.	38
Figure 7 : Schématisation de l'effet Warburg et du devenir du lactate.	50
Figure 8 : Caractéristiques du tissu adipeux au cours de la cachexie associée au cancer.	54
Figure 9 : Caractéristiques morphologiques du tissu adipeux.	54
Figure 10 : Modèle proposé des mécanismes moléculaires régulant la lipolyse.	56
Figure 11 : Effets de la délétion de la lipase ATGL ou HSL sur le tissu adipeux de souris, vingt et un jours après la transplantation de cellules LLC.	58
Figure 12 : Photographies du muscle <i>rectus abdominis</i> en microscopie électronique à transmission (grossissement x 2650).	58
Figure 13 : Modifications de la composition corporelle associées au développement de la cachexie.	60
Figure 14 : Représentation schématique de la RPA.	66
Figure 15 : Courbe de survie de patients atteints d'un cancer pancréatique, en présence (vert) ou en absence (orange) d'une RPA.	68
Figure 16 : Souris inoculées intramusculairement avec une lignée cellulaire sécrétant continuellement du TNF- α humain (CHO-TNF- α) ou surexprimant la néomycine (CHO- Neo).	74
Figure 17 : L'utilisation d'anticorps anti-IL-6 ou d'inhibiteur d'IL-6 prévient le développement de la cachexie associée au cancer.	76
Figure 18 : Souris nude inoculées avec des cellules CHO surexprimant le gène murin de l'IFN- γ humain (A) ou avec des cellules CHO seules (B).	78
Figure 19 : Souris implantées avec des cellules de gliome C6 sécrétant le CNTF (CNTF-s) ou non (CNTF-ns).	78
Figure 20 : Souris inoculée (A) ou non (B) avec une lignée cellulaire de mélanome humain sécrétant le LIF.	80
Figure 21 : Courbe de survie de patients atteints d'un cancer, présentant (en noir) ou non (en rose fuschia) une perte de masse musculaire.	90
Figure 22 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.	92
Figure 23 : Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome.	98
Figure 24 : Représentation schématique des protéines MAFbx/atrogin-1 et MuRF1 et de leurs domaines potentiels d'interaction protéine-protéine.	100
Figure 25 : Représentation schématique de la signalisation mise en jeu lors de l'autophagie.	106
Figure 26 : Représentation schématique de la structure générale de la grande sous-unité des calpaïnes (calpaïne 1 ou 2), de la petite sous-unité des calpaïnes et de la calpaïnes 3.114	
Figure 27 : Illustration de la libération des myofilaments induite par les calpaïnes en conditions d'atrophie.	116

Figure 28 : Les membres de la famille des facteurs de transcription NF- κ B, de la famille des protéines I κ B et du complexe IKK.	118
Figure 29 : Représentation schématique de la voie de signalisation canonique de NF- κ B... ..	120
Figure 30 : Représentation schématique des sites de phosphorylation (en orange) des facteurs de transcription FoxO, par Akt.....	122
Figure 31 : Représentation schématique de la voie de signalisation Akt/FoxO.....	124
Figure 32 : Représentation schématique simplifiée des principales voies moléculaires conduisant à l'apoptose.....	126
Figure 33 : Le gène de la Mstn.....	138
Figure 34 : Etapes d'activation de la Mstn.....	140
Figure 35 : Représentation schématique de la voie de signalisation de la Mstn.....	140
Figure 36 : Modèle proposé de l'action de la myostatine pendant la croissance et la différenciation musculaire.....	142
Figure 37 : Représentation schématique de la voie de signalisation TWEAK/Fn14.....	148
Figure 38 : Voies de synthèse des sphingolipides.....	152
Figure 39 : Structures des principaux sphingolipides impliqués dans la voie de « voie de recyclage » et la voie de synthèse <i>de novo</i>	154
Figure 40 : Modèle proposé de l'implication des céramides sur la voie PI3K/Akt/mTOR. ...	154
Figure 41 : Les différents types de soutien nutritionnel artificiel.....	160
Figure 42 : Représentation des trois principaux acides gras oméga-3.	164
Figure 43 : Structure chimique de certains β 2-agonistes.	194
Figure 44 : Cellules LLC en microscopie à un grossissement x 10.	211
Figure 45 : Illustration de l'inoculation de cellules LLC chez la souris.....	215
Figure 46 : Illustration du conditionnement des muscles prélevés.	217
Figure 47 : Illustration de la détection de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps primaire (spécifique de la protéine d'intérêt) et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.....	223
Figure 48 : Illustration de la détection de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps de capture (couplé à des billes magnétiques marquées par deux fluorochromes) et d'un anticorps de détection biotinylé (couplé à un conjugué streptavidine-phycoérythrine).	258
Figure 49 : Photographie d'un FACS Digital Vantage.....	262
Figure 50 : Représentation du flux dynamique des cellules à analyser dans la fluidique.....	263
Figure 51 : Exemple de banc optique.....	264

Tableaux

Tableau 1 : Statut métabolique des patients atteints de divers types de cancers.	42
Tableau 2 : Incidence de la perte de poids dans différents types de cancer.	44
Tableau 3 : Les divers types de LMF référencés.	80
Tableau 4 : Etudes mettant en évidence une augmentation de l'expression de certains composants du système-ubiquitine protéasome au cours de la cachexie associée au cancer.	104
Tableau 5 : Tissu/site d'expression du transcrit de la Mstn, en fonction de l'espèce.	138
Tableau 6 : Protéines interagissant avec la Mstn et inhibant son activité.....	142
Tableau 7 : Augmentation de l'expression de Mstn dans diverses conditions conduisant à une atrophie musculaire.....	144
Tableau 8 : Principaux effets obtenus au cours d'études ayant utilisé l'inhibition de la myostatine comme stratégie thérapeutique, au cours de la cachexie associée au cancer.	146
Tableau 9 : Etudes examinant les effets de la nutrition parentérale sur le développement de la cachexie associée au cancer.....	162
Tableau 10 : Etudes examinant les effets d'une supplémentation nutritionnelle riche en acides gras oméga-3, sur le développement de la cachexie associée au cancer.	166
Tableau 11 : Etudes examinant les effets de l'acétate de mégestrol, sur le développement de la cachexie associée au cancer.....	176
Tableau 12 : Modèles de tumeurs transplantables les plus utilisés pour l'étude de la cachexie associée au cancer.	320
Tableau 13 : Différentes études utilisant le modèle cachectique LLC.	322

Boîte

Boîte 1 : Généralités sur les sphingolipides.	150
--	-----

Liste des abréviations

A

A1AT : α -1 antitrypsine
A2M : α -2 macroglobuline
ABHD5 : α/β -hydrolase domain-containing protein 5
ActA : activine A
ActRII : récepteurs à l'activine II
Akt (PKB) : protéine kinase B
ADN : acide désoxyribonucléique
ADP : adénosine diphosphate
AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens
ALK : activin-like kinase
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
ang. : en anglais
APC (Apc) : adenomatous polyposis coli
APF1 : ATP-dependant proteolysis factor-1
ARN : acide ribonucléique
Atg : autophagy related genes
ATGL : triglycéride lipase adipeuse (ang., adipose triglyceride lipase)
ATP : adénosine triphosphate
av. J.-C : avant Jésus-Christ

B

Bax : Bcl-2-associated X protein
BCAA : acides aminés branchés (ang., branched-chain amino acids)
Bcl-2 : B-cell lymphoma-2
Bnip3 : Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive

C

C/EBP : CCAAT/enhancer binding protein
CANP : calcium-activated neutral protease
CHO : chinese hamster ovary
CID : calpastatin inhibitory domain
cm³ : centimètre cube
CNTF : ciliary neurotrophic factor
CO₂ : dioxyde de carbone
COX : cyclo-oxygénase
CGI-58 : comparative gene identification 58
CREB : cAMP response element binding protein
CRP : protéine C réactive

D

DER : dépense énergétique de repos
DET : dépense énergétique totale
DG : diglycérides
DHA : acide docosahexaénoïque

E

E1 : enzyme d'activation
E2 : enzyme de conjugaison
E2_{14kDa} : enzyme de conjugaison de 14 kDa
E3 : ubiquitine ligase
eIF : facteur d'initiation de la traduction (ang., eukaryotic initiation factor)
EPA : acide eicosapentaénoïque
ERBA : 20S,21-epoxy-resibufogenin-3 acétate

F

FLRG : follistatin-related gene
Fn14 : protein fibroblast growth factor-inducible 14
FoxO : forkhead box O

G

g : gramme
G α_i : sous-unité inhibitrice de la protéine G
G α_s : sous-unité stimulatrice de la protéine G
G0S2 : G0/G1 switch gene 2
GABARAP : gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
Gabarapl : GABA(A) receptor-associated protein-like
GASP : growth and differentiation factor-associated serum protein
GDF-8 : growth and differentiation factor-8
GHS-R : récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (ang., growth hormone secretagogue receptor)
GSK : glycogen synthase kinase

H

HCAP : human cachexia associated protein
hSGT : human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein
HSL : lipase hormonosensible (ang., hormone-sensitive lipase)

I

IGF-1 : insulin-like growth factor-1
IFN : interféron
I κ B : inhibiteur de kappa B (ang., inhibitor of kappa B)
IKK : I κ B kinase
IL : interleukine
IL-1ra : antagoniste du récepteur à l'IL-1
IMC : indice de masse corporelle
IRS-1 : substrat du récepteur à l'insuline (ang., insulin receptor substrate-1)

K

kDa : kilodalton
kg : kilogramme
KO : knock-out

L

LASS/CerS : dihydrocéramide synthase
LC3 : microtubule-associated protein light chain 3
LIF : leukemia inhibitory factor
LLC : Lewis lung carcinoma
LMF : lipid mobilizing factor
LNAA : grands acides aminés neutres (ang., large neutral amino acids)
LPL : lipoprotéine lipase

M

MA : acétate de mégestrol
MAFbx/atrogen-1 : muscle atrophy F-box
mdx : muscular dystrophy X-linked
MG : monoglycérides
MGL : lipase monoglycéride (ang., monoglyceride lipase)
Min : multiple intestinal neoplasia
mol : molécule
MPA : acétate de médroxyprogestérone
mTOR : mammalian target of rapamycin
mTORC : complexe mTOR
Mstn : myostatine
MuRF1 : muscle ring finger 1
MYBPC : protéine C de liaison à la myosine (ang., myosin-binding protein C)

N

n : nombre
NEMO : NF- κ B essential modulator
NF- κ B : nuclear factor kappa B
NIK : NF- κ B inducing kinase
NSCLC : cancer du poumon à non-petites cellules

O

O₂ : dioxygène
OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

p : valeur p (ang., p-value)
p70^{S6k} : protéine kinase de la protéine ribosomale S6
PARP : poly (ADP-ribose) polymérase
PDK : phosphoinositide-dépendant kinase
PGE₂ : prostaglandine E₂
pH : potentiel hydrogène
PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase
PIF : proteolysis-inducing factor
PIP2 : phosphatidylinositol 4,5 diphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate

PKA : protéine kinase A
PKC ζ : protéine kinase C ζ
PLIN A : périlipine A
PPA : protéines de phase aiguë
PPAR : peroxyosome proliferator-activated receptor

R

RC-1291 : anamoréline
Rheb : ras homology enriched in brain
ROS : espèces réactives de l'oxygène (ang., reactive oxygen species)
RPA : réponse de phase aiguë
rpS6 : protéine ribosomale S6 (ang., ribosomal protein S6)

S

S1P : sphingosine-1-phosphate
SAA : sérum amyloïde A
sActRIIB : récepteur soluble leurre du ActRIIB
SARM : modulateurs sélectifs des récepteurs androgènes (ang., selective androgen receptor modulators)
shRNA : petit ARN formant des boucles en épingle à cheveux (ang., short hairpin RNA)
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
SQSTM1 : sequestosome 1
SREBP : sterol regulatory element-binding protein

T

TAK1 : transforming growth factor- β activated kinase-1
TG : triglycérides
TGF : transforming growth factor
THC : Δ -9-tétrahydrocannabinol (ou dronabinol)
TNF : tumor necrosis factor
TNFR : récepteur au TNF
TRAF : TNF receptor-associated factor
Trp : tryptophane
TSC : tuberous sclerosis complex
TUNEL : fluorescent transferase-mediated dUTP nick end labeling
TWEAK : TNF-like weak inducer of apoptosis

U

Ub : ubiquitine
UCP : protéine découplante (ang., uncoupling protein)
Ulk : unc-51-like kinase

W

WT : sauvage (ang., wild type)

Z

ZAG : Zn- α ₂-glycoprotéine

Divers

4E-BP1 (PHAS-1) : 4E-binding protein 1

°C : degré Celsius

% : pour cent

Introduction générale

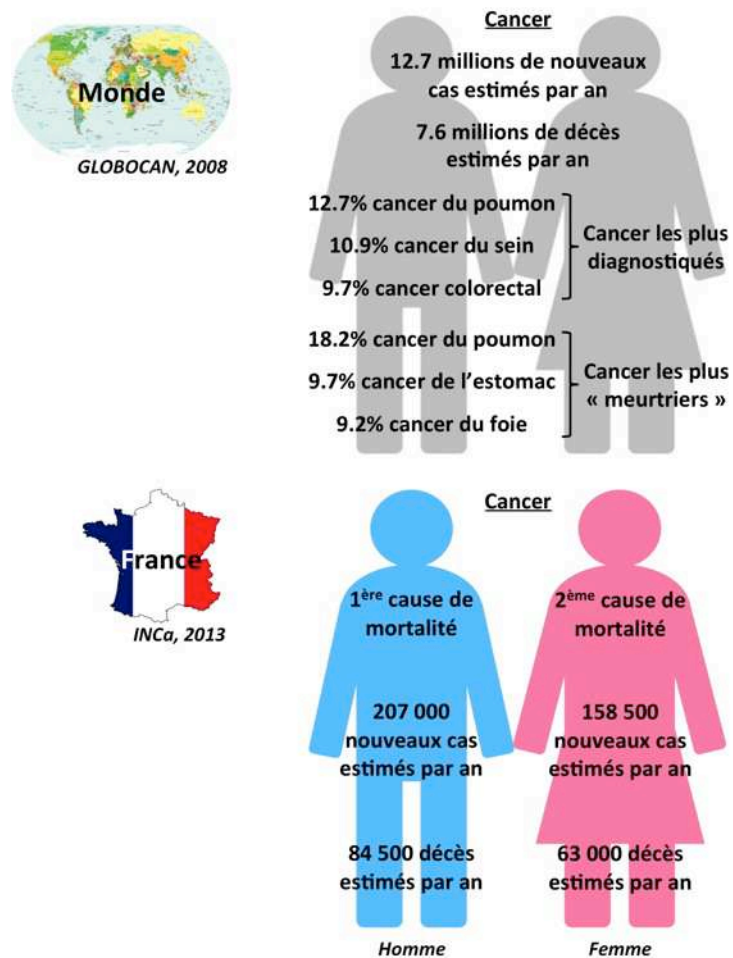


Figure 1 : Données épidémiologiques sur le cancer dans le monde et en France. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (WHO, 2008) et l'Institut National du Cancer (INCA, 2013).

Les premières descriptions du cancer remontent à plus de trois milliers d'années, puisque certains écrits égyptiens comme le Papyrus Ebers en faisaient déjà mention (Joachim *et al.*, 1900; von Klein, 1905). Toutefois, c'est Hippocrate (460 à 377 av. J.-C) qui aurait nommé cette maladie. Le mot cancer vient du latin *cancer*, apparenté au grec ancien « *karkinos* » et a pour signification « crabe » (David & Zimmerman, 2010). Cette dénomination aurait pour origine le fait que certaines tumeurs malignes, en envahissant les veines supérieures leur ont donné l'apparence de pinces de crabe. De nos jours, le cancer est toujours au cœur des préoccupations des médecins et chercheurs. Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il est à présent la troisième cause de décès dans le monde, après les maladies cardiovasculaires et les maladies infectieuses et parasitaires. Le cancer est la première cause de mortalité dans les pays économiquement développés et la seconde cause de mortalité dans les pays en voie de développement (WHO, 2008). En se basant sur les estimations de GLOBOCAN 2008 (projet fournissant des estimations contemporaines de l'incidence de la mortalité, de la prévalence et de l'espérance de vie corrigée de l'incapacité, des types de cancer majeurs, au niveau national, pour les 184 pays du monde), il y a eu 12.7 millions de nouveaux cas de cancer et 7.6 millions de décès dus au cancer en 2008 (Ferlay *et al.*, 2010). Le cancer est donc un problème de santé public majeur dans le monde.

Au niveau mondial, les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont le cancer du poumon (12.7%), le cancer du sein (10.9%) et le cancer colorectal (9.7%), et les principaux cancers causant la mort sont le cancer du poumon (18.2%), le cancer de l'estomac (9.7%) et le cancer du foie (9.2%) (Ferlay *et al.*, 2010) (Figure 1).

En France, le nombre de nouveaux cas de cancer diagnostiqués par an a augmenté de 89% entre 1980 et 2005, passant de 170 000 à 320 000. Le nombre de décès quant à lui a augmenté de 13% sur la même période, passant de 130 000 à 146 000 (Belot *et al.*, 2008). D'après l'Institut National du Cancer, pour la période 2004-2008, le cancer est la première cause de mortalité chez l'homme (33% de l'ensemble des décès masculins), et la deuxième cause chez la femme (24% de l'ensemble des décès féminins) (INCa, 2013). De plus, le nombre de nouveaux cas de cancer estimés est de 365 500 (207 000 chez l'homme et 158 500 chez la femme). Enfin, le nombre de décès par cancer estimés est de 147 500 (84 500 chez l'homme et 63 000 chez la femme) lors de l'année 2011 (INCa, 2013) (Figure 1).

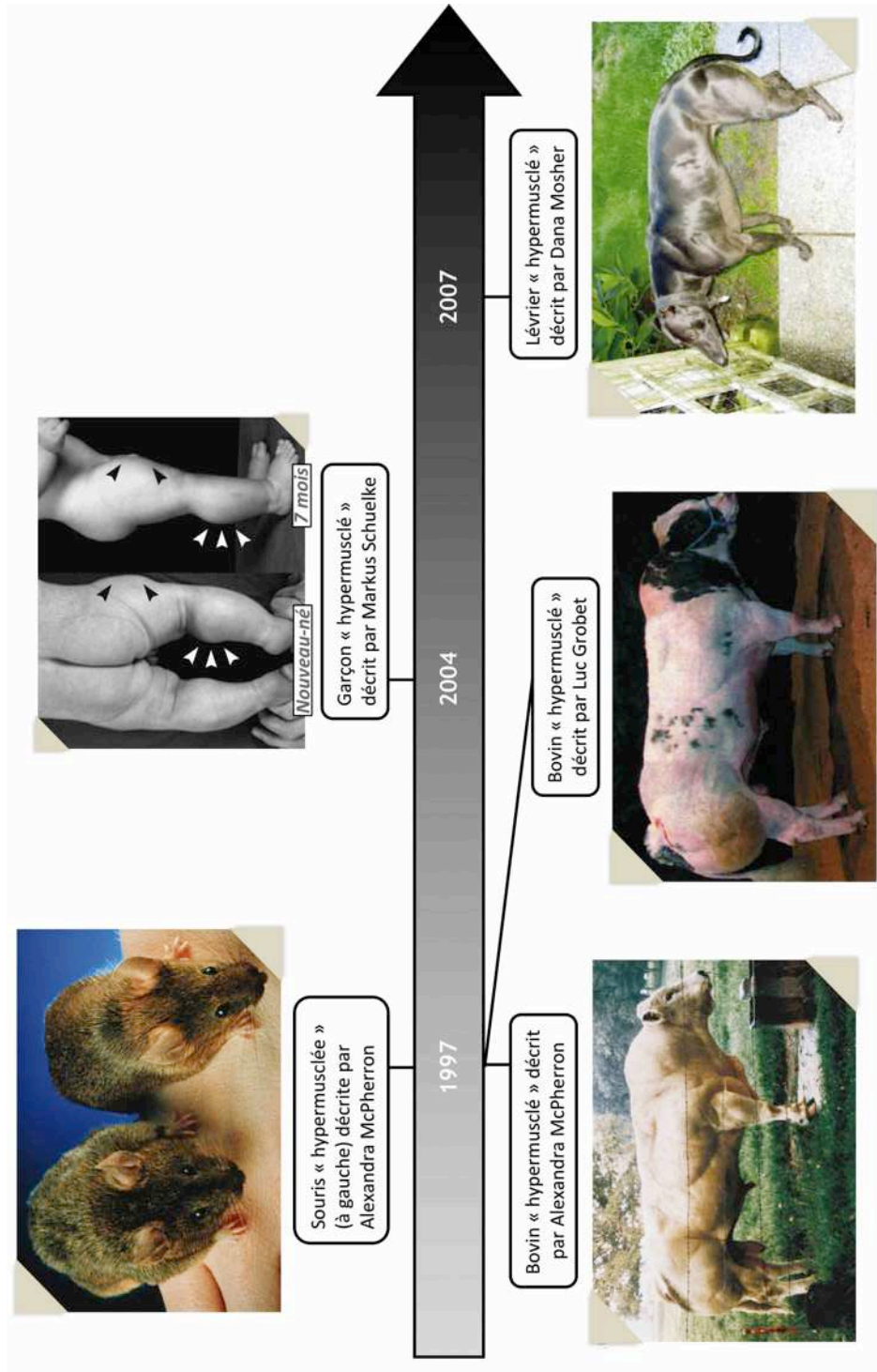


Figure 2 : Phénotypes « hypermusclés » dus à l'invalidation du gène de la myostatine (Mstn).

En cas de cancer, malgré un soutien nutritionnel adéquat tant en qualité qu'en quantité, des perturbations métaboliques complexes engendrent une perte de poids et une dégradation progressive de l'état des patients. Ces modifications du métabolisme sont regroupées sous le terme de cachexie et sont dues à un catabolisme musculaire squelettique et adipeux, se traduisant par un état d'affaiblissement et de maigreur extrême (Tisdale, 2003). La cachexie associée au cancer va être à l'origine d'une augmentation de la durée d'hospitalisation (Bauer *et al.*, 2002), de la fréquence d'hospitalisation (Ottery, 1996), d'une diminution des chances de succès des thérapies anti-cancéreuses (Andreyev *et al.*, 1998; Ross *et al.*, 2004), ainsi que d'une augmentation du coût de la prise en charge médicale (Tan & Fearon, 2008). Parallèlement, elle limite la qualité et l'espérance de vie des patients (Andreyev *et al.*, 1998; Tan & Fearon, 2008). Par conséquent, le développement de stratégies d'intervention précoces et efficaces pour prévenir la cachexie est devenu une des priorités de la communauté scientifique et contribue à l'effort de recherche dans les domaines fondamentaux et cliniques de la cancérologie.

La myostatine (Mstn), membre de la superfamille des transforming growth factor- β (TGF- β), est une protéine exprimée et sécrétée par le muscle strié squelettique (McPherron *et al.*, 1997). Elle joue un rôle essentiel dans la régulation de la croissance musculaire, en déterminant la taille et la masse du muscle squelettique pendant l'embryogenèse et la croissance post-natale (McPherron *et al.*, 1997; Grobet *et al.*, 2003). Son inactivation naturelle ou expérimentale est responsable chez l'homme (Schuelke *et al.*, 2004), comme chez l'animal (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997; McPherron & Lee, 1997; Grobet *et al.*, 2003; Mosher *et al.*, 2007), d'un phénotype « hypermusclé » (Figure 2). La Mstn est également un régulateur négatif de la masse musculaire squelettique chez l'adulte (Durieux *et al.*, 2007), en ciblant la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) (Amirouche *et al.*, 2009), qui régule l'initiation de la traduction. De façon intéressante, l'administration systémique de Mstn chez la souris induit une perte de masse musculaire sévère, analogue à celle observée chez l'humain au cours de la cachexie associée au cancer (Zimmers *et al.*, 2002). De plus, l'expression de la Mstn est augmentée dans des modèles animaux de cachexie associée au cancer (Costelli *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Bonetto *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Busquets *et al.*, 2012b; Padrao *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces données suggère que le ciblage de la myostatine peut constituer une approche thérapeutique dans la cachexie associée au cancer.

Mon projet de thèse a consisté à étudier les bénéfices de l'inactivation du gène de la Mstn sur le développement de la cachexie associée au cancer, chez la souris. Plus précisément, ce travail a eu pour objet de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la masse musculaire lors de la cachexie associée au cancer.

Le manuscrit est divisé en trois grandes parties. La première concerne la revue de la littérature qui s'articule en trois chapitres décrivant successivement la cachexie associée au cancer (Chapitre I), les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le muscle squelettique au cours de la cachexie associée au cancer (Chapitre II), ainsi que la prise en charge clinique de la cachexie chez les patients atteints de cancer (Chapitre III). La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée aux résultats obtenus, qui sont ensuite discutés dans la dernière partie.

Etat de la littérature

Chapitre I : La cachexie associée au cancer

Les causes de la mort chez les patients atteints de cancer sont : les infections (septicémie, pneumonie ou encore péritonite), les défaillances organiques (insuffisance respiratoire, cardiaque, hépatique ou encore rénale), les infarctus, les hémorragies et la cachexie (Warren, 1932; Inagaki *et al.*, 1974). Le syndrome cachectique a pendant longtemps été mal ou non défini, entraînant une sous-estimation, voire une négligence de son impact sur la santé des patients. De plus, son origine multifactorielle complexe ne suit pas un profil pathophysiologique uniforme, et ceci est un frein à la conduite d'études cliniques. Malheureusement, la cachexie associée au cancer représente un facteur de risque important en matière de morbidité et de mortalité.

I. Généralités

Le terme cachexie est dérivé des mots grecs « kakos » et « hexis », signifiant littéralement « mauvaise condition ». La cachexie est définie comme un syndrome clinique et métabolique avec une perte de poids progressive aux dépens du tissu adipeux et du tissu musculaire squelettique, entraînant un état de maigreur extrême. Elle peut survenir chez des patients avec une tumeur représentant moins de 0.01% de leur poids corporel, bien que certaines tumeurs plus grosses n'induisent pas de cachexie (Tisdale, 2003). De plus, elle ne peut pas être contrebalancée par une augmentation des apports alimentaires (Nixon *et al.*, 1981). De nombreuses pathologies chroniques ou à l'état de phase terminale telles que la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), le cancer, l'insuffisance cardiaque chronique, l'insuffisance rénale chronique, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), l'insuffisance cardiaque congestive ou encore la septicémie sont associées à une cachexie (Morley *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2008).

Le développement de la cachexie associée au cancer est la manifestation la plus commune liée à l'avancement de cette maladie. Le syndrome cachectique est présent chez plus de la moitié des patients atteints d'un cancer, aussi bien chez l'individu jeune que chez l'individu âgé, sa prévalence étant supérieure dans certains types de cancers tels que le cancer du poumon (60%) ou le cancer du tractus gastro-intestinal (80%) (DeWys *et al.*, 1980; Bruera, 1997). Il touche plus de 80% des patients avant la mort (DeWys *et al.*, 1980; Bruera, 1997; Prado *et al.*, 2008). On estime que la cachexie est responsable du décès d'environ 25%

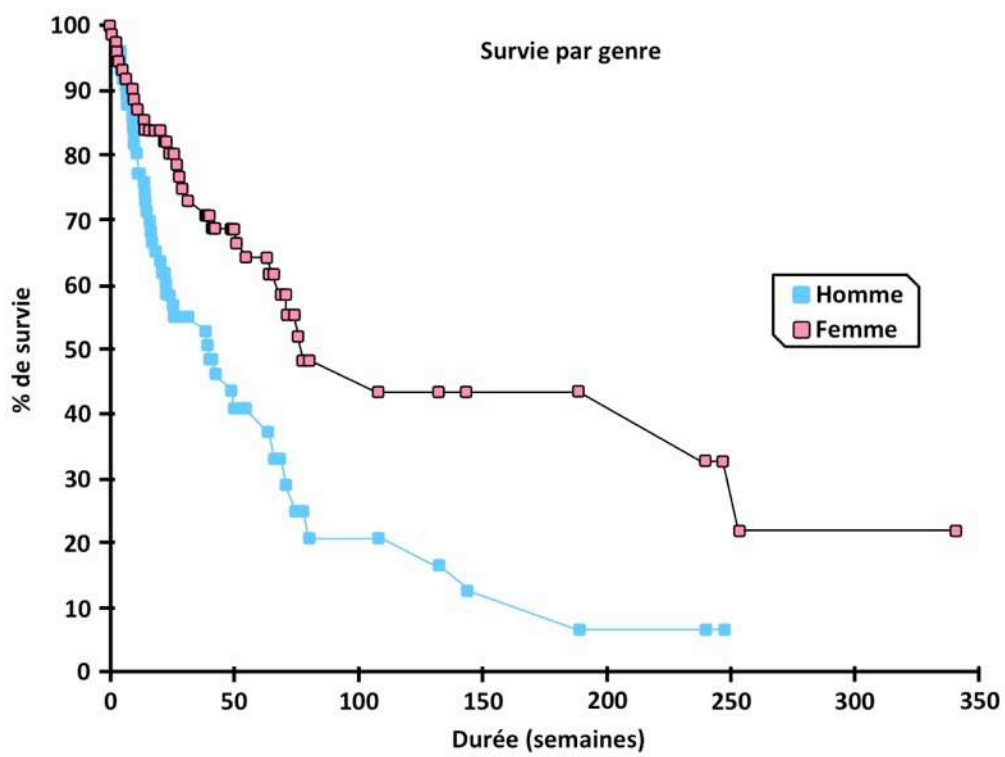


Figure 3 : Survie de patients avec un cancer du poumon à non-petites cellules (NSCLC), représentée par le genre. Comparaison homme/femme ; $p = 0.001$ [modifié d'après (Palomares *et al.*, 1996)].

des patients cancéreux (Warren, 1932). Chez certains patients, la cachexie est associée à une diminution significative de la réponse aux traitements anticancéreux (exérèse, chimiothérapie et radiothérapie), ainsi qu'à une augmentation des risques chirurgicaux (DeWys *et al.*, 1980; van Eys, 1982; Bruera, 1997; Ross *et al.*, 2004; Arrieta *et al.*, 2010). Elle contribue également à une détérioration de l'indice de performance (Scott *et al.*, 2002; Pressoir *et al.*, 2010), de la qualité de vie (Andreyev *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 2004; Fouladiun *et al.*, 2007), de l'activité physique spontanée (Fouladiun *et al.*, 2007), et à une diminution dramatique de la survie des patients (DeWys *et al.*, 1980; Andreyev *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 2004; Bachmann *et al.*, 2008).

D'après de récentes études, il semblerait que le genre puisse impacter la cachexie associée au cancer. En effet, des patientes cachectiques avec un cancer du poumon à non-petites cellules (NSCLC pour non-small cell lung cancer) vivaient significativement plus longtemps que leurs homologues masculins (Palomares *et al.*, 1996) (Figure 3). Ce dimorphisme sexuel est également observé dans une autre étude, où 61% des patients masculins avec un NSCLC présentaient une perte de masse musculaire sévère, alors qu'elle était uniquement observée chez 31% des patientes (Baracos *et al.*, 2010). Enfin, il a été montré chez des patients atteints d'un cancer gastro-intestinal que les femmes présentaient une perte de masse musculaire et une réduction de force musculaire atténuées par rapport aux patients masculins (Stephens *et al.*, 2012).

II. La pathophysiologie de la cachexie associée au cancer

Les signes cliniques de la cachexie associée au cancer incluent une asthénie sévère, une anorexie, des altérations métaboliques, une importante perte de poids, une lipolyse et surtout une atrophie musculaire extrêmement sévère à l'origine d'un syndrome d'épuisement musculaire (Bruera, 1997; Tisdale, 2002). Ces caractéristiques sont présentes à des degrés variables et leur gravité peut évoluer au cours de la maladie. La perte de poids est un indicateur pronostic péjoratif important pour les patients atteints d'un cancer (Andreyev *et al.*, 1998), puisqu'une diminution de plus de 15% est à l'origine d'une détérioration des fonctions physiologiques, et la mort survient généralement quand la perte de poids est de l'ordre de 25 à 30% (Wigmore *et al.*, 1997). En plus de ces modifications, d'autres signes plus subtils peuvent apparaître comme une satiété précoce, une dysgueusie

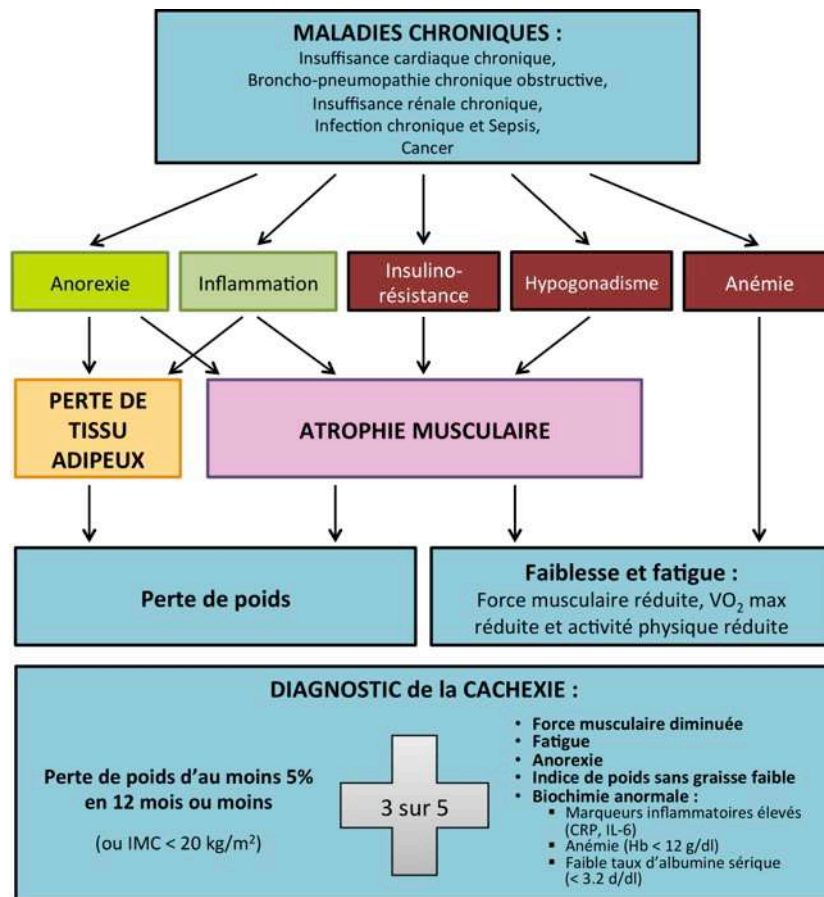


Figure 4 : Représentation conceptuelle de la cachexie.

La cachexie résulte de la réponse de l'organisme à une maladie chronique sous-jacente comme le cancer. La pathologie crée un environnement qui peut être caractérisé par une inflammation, une perte d'appétit (anorexie), de faibles taux de testostérone et d'autres hormones anabolisantes, et une anémie. La prise alimentaire réduite et l'anorexie résultent en une réduction du poids de corps et de la masse musculaire. En outre, l'inflammation, la résistance à l'insuline, et de faibles taux d'hormones anabolisantes contribuent également à l'atrophie musculaire [modifié d'après (Evans *et al.*, 2008)].

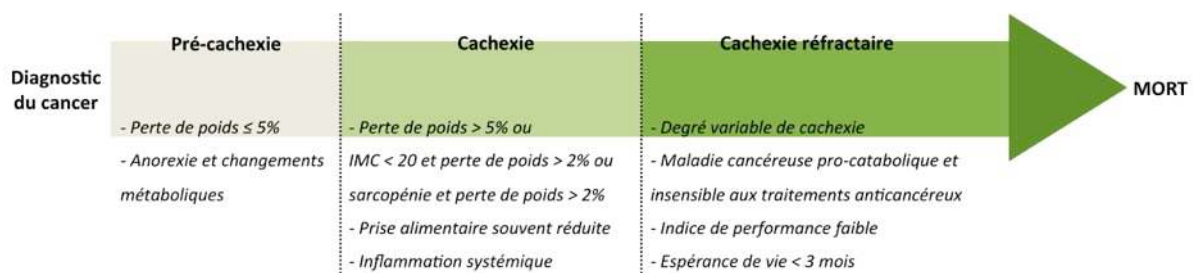


Figure 5 : Chronologie des différents stades de la cachexie associée au cancer. [modifié d'après (Fearon *et al.*, 2011)].

(altération du goût), ou encore un changement dans les habitudes alimentaires. Malheureusement ces signes passent généralement inaperçus en début de cachexie.

Jusqu'en 2008, aucune définition officielle de la cachexie n'existait, ce qui a limité l'identification et le traitement de patients cachectiques, ainsi que le développement et l'approbation d'agents thérapeutiques potentiels. Evans *et al.* ont officiellement défini pour la première fois la cachexie, comme étant « un syndrome métabolique complexe associé à une maladie sous-jacente et caractérisé par une perte de muscle avec ou sans perte de masse grasse. La caractéristique clinique importante de la cachexie est la perte de poids chez les adultes (corrigée pour la rétention d'eau) ou un retard de croissance chez les enfants (à l'exception des troubles endocriniens). L'anorexie, l'inflammation, l'insulino-résistance et l'augmentation de la dégradation des protéines musculaires sont souvent associées à la cachexie. La cachexie est distincte de la sous-alimentation, de la perte de masse musculaire liée à l'âge, de la dépression primaire, de la malabsorption et de l'hyperthyroïdie, et est associée à une morbidité accrue » (Evans *et al.*, 2008) (Figure 4).

D'autres définitions ont ensuite été proposées (Blum *et al.*, 2010; Muscaritoli *et al.*, 2010). Plus récemment, un panel d'experts mené par Kenneth Fearon a énoncé une définition consensuelle de la cachexie. Elle a été décrite comme étant « un syndrome multifactoriel caractérisé par une diminution continue de la masse musculaire squelettique (avec ou sans perte de masse grasse) qui ne peut pas être complètement inversée par une prise en charge nutritionnelle conventionnelle, et qui conduit à une détérioration fonctionnelle progressive. La physiopathologie est caractérisée par une balance énergétique et protéique négative entraînée par une combinaison variable d'une réduction de la prise alimentaire et d'un métabolisme anormal » (Fearon *et al.*, 2011).

La cachexie est un continuum comprenant trois stades de pertinence clinique : précachexie, cachexie et cachexie réfractaire (Figure 5). Tous les patients ne progressent pas à travers le spectre entier. Au stade de pré-cachexie, certains signes cliniques et métaboliques (par exemple, une anorexie et une intolérance au glucose) peuvent précéder une importante perte de poids involontaire (c'est à dire $\leq 5\%$). Le risque de progression est variable et dépend de facteurs tels que le type de cancer et son stade d'évolution, de la présence d'une inflammation systémique, d'une faible prise alimentaire et d'un manque de réponse aux traitements anticancéreux. Les patients ayant une perte de poids de plus de 5%

Symptômes interférant avec la prise alimentaire*
Satiété précoce
Altérations du goût
Altérations de l'odorat
Aversion pour la viande
Nausées/vomissements

*Les patients rapportant au moins un de ces symptômes sont définis comme anorexiques.

Figure 6 : Symptômes interférant avec la prise alimentaire.
[modifié d'après (Laviano *et al.*, 2003)].

au cours des 6 derniers mois, ou un indice de masse corporelle (IMC) inférieur à 20 et une perte de poids de plus de 2%, ou une sarcopénie et une perte de poids de plus de 2%, mais n'étant pas au stade de cachexie réfractaire, sont classés comme ayant une cachexie. Enfin, la cachexie peut être cliniquement réfractaire à la suite d'un cancer très avancé (phase préterminale) ou de la présence d'un cancer à évolution rapide insensible à une thérapie anticancéreuse. Ce dernier stade, appelé cachexie réfractaire, est associé à un catabolisme intense, ou à la présence de facteurs qui rend la prise en charge de la perte de poids impossible. La cachexie réfractaire se caractérise par un indice de performance faible (grade OMS de 3 ou 4) et une espérance de vie de moins de 3 mois (Fearon *et al.*, 2011).

Le diagnostic de la cachexie est difficile car c'est un processus latent, et son développement se poursuit souvent pendant une longue période avant sa manifestation clinique. Bien qu'il soit aisé de diagnostiquer une cachexie chez des patients au stade de cachexie réfractaire, l'absence de biomarqueurs robustes ne permet pas l'identification formelle de patients pré-cachectiques. Il a été récemment développé un système de notation, le CASCO pour « cachexia score », qui pourrait être un outil précieux pour définir le stade de la cachexie (Argiles *et al.*, 2011).

III. Les symptômes de la cachexie associée au cancer

1. Anorexie

L'anorexie est définie comme une réduction/perte du désir de manger. Elle est différente de l'anorexie nerveuse ou mentale (Muscaritoli *et al.*, 2010). L'anorexie est souvent diagnostiquée par l'un des symptômes suivants, à savoir : une aversion pour la viande, une dysgueusie, une dysosmie (altération de l'odorat), une satiété précoce ou encore des nausées et/ou vomissements (Rossi Fanelli *et al.*, 1986) (Figure 6).

La localisation tumorale peut également être un obstacle à l'alimentation. En effet, la présence d'une tumeur bloquant le tractus gastro-intestinal représente une gêne mécanique pour la prise alimentaire. D'autres troubles tels que la dépression, le stress ou encore l'anxiété peuvent entraîner une situation d'anorexie (Fearon, 1992; Reid *et al.*, 2009). Selon le type et le stade du cancer, 35 à 70% des patients sont anorexiques (Tchekmedyian *et al.*, 1992b; Maltoni *et al.*, 1999; Pirovano *et al.*, 1999).

Derrière l'anorexie se cache une pathologie multifactorielle complexe qui est associée à une perturbation du fonctionnement de l'hypothalamus, zone cérébrale contrôlant les apports énergétiques. Ceci aurait pour conséquence une incapacité de l'hypothalamus à reconnaître et à réagir de façon appropriée aux signaux orexigènes et anorexigènes (Laviano *et al.*, 2003; Muscaritoli *et al.*, 2010).

L'anorexie et la réduction de la prise alimentaire qui en découle sont des réponses physiologiques induites par le développement de la tumeur. Initialement, ces modifications ont pour but de combattre la croissance tumorale (Laviano *et al.*, 2003). Ainsi, récemment, une équipe a montré chez des modèles murins tumoraux qu'un jeûne alimentaire de quarante-huit heures retardait la croissance tumorale et potentialisait les effets de traitements chimiothérapeutiques (Lee *et al.*, 2012). Néanmoins, une anorexie de longue durée compromet la défense de l'organisme et retarde la guérison (Laviano *et al.*, 2003). Elle est souvent sous-estimée, et ceci peut contribuer à une détérioration nutritionnelle si elle n'est pas correctement traitée pharmacologiquement ou nutritionnellement (Laviano *et al.*, 2005). De plus, la réduction de la prise alimentaire est un facteur déterminant dans la perte de poids, puisqu'elle promeut la perte de masse musculaire (Laviano *et al.*, 2003). Néanmoins, la cachexie associée au cancer peut aussi apparaître chez l'humain (Grosvenor *et al.*, 1989; Bosaeus *et al.*, 2001; Bosaeus *et al.*, 2002), et expérimentalement chez l'animal en l'absence d'anorexie (Kralovic *et al.*, 1977; Beck & Tisdale, 1987).

2. Augmentation de la dépense énergétique de repos

La dépense énergétique totale (DET) est constituée de la dépense énergétique de repos (DER) (ou métabolisme énergétique de repos), de la thermogenèse et de l'activité physique. La DER représente 70% de DET des individus sédentaires en bonne santé (Ravussin & Bogardus, 1992). La DER est définie comme la consommation d'énergie nécessaire pour assurer les fonctions vitales de l'organisme : travail des pompes membranaires nécessaires pour maintenir les gradients ioniques, renouvellement des constituants de l'organisme (en particulier des protéines), travail cardiaque et respiratoire. Le foie contribue pour 27% du métabolisme énergétique de repos, tandis que le muscle et le cerveau représentent chacun 20% du métabolisme énergétique de repos chez un individu sain de 65 kg (Passmore & Draper, 1964). D'après Vernon R. Young, le métabolisme protéique constitue une part importante du métabolisme énergétique de repos puisque le renouvellement protéique

Statut métabolique des patients	Référence
Hypermétabolique	(Warnold <i>et al.</i> , 1978)
	(Knox <i>et al.</i> , 1983)
	(Arbeit <i>et al.</i> , 1984)
	(Dempsey <i>et al.</i> , 1984)
	(Fredrix <i>et al.</i> , 1991)
	(Falconer <i>et al.</i> , 1994)
	(Bosaeus <i>et al.</i> , 2001)
	(Jatoi <i>et al.</i> , 2001)
Normométabolique	(Moses <i>et al.</i> , 2004)
	(Knox <i>et al.</i> , 1983)
	(Dempsey <i>et al.</i> , 1984)
	(Fredrix <i>et al.</i> , 1991)
Hypométabolique	(Giacosa <i>et al.</i> , 1996)
	(Knox <i>et al.</i> , 1983)
	(Dempsey <i>et al.</i> , 1984)

Tableau 1 : Statut métabolique des patients atteints de divers types de cancers.

(synthèse et dégradation) serait responsable d'environ la moitié des dépenses énergétiques du métabolisme (Young, 1977).

Une augmentation de la DER peut être observée lors de la cachexie associée au cancer. En effet, la perte de poids observée lors de la cachexie indique un catabolisme exacerbé qui engendre un coût énergétique supplémentaire. Des études ont ainsi montré sur divers types de cancers, une augmentation marquée de la DER (Warnold *et al.*, 1978; Knox *et al.*, 1983; Arbeit *et al.*, 1984; Dempsey *et al.*, 1984; Fredrix *et al.*, 1991; Falconer *et al.*, 1994; Bosaeus *et al.*, 2001; Jatoi *et al.*, 2001; Moses *et al.*, 2004). Les patients atteints de cancer sont en majorité hypermétaboliques. Néanmoins, il a été montré que des patients atteints de cancer peuvent aussi présenter un statut hypométabolique ou normométabolique (Knox *et al.*, 1983; Dempsey *et al.*, 1984; Fredrix *et al.*, 1991; Giacosa *et al.*, 1996) (Tableau 1).

Le type de tumeur peut être un déterminant de la dépense énergétique (Fredrix *et al.*, 1991). De plus, il a été observé après résection du cancer, une diminution de la DER, celle-ci pouvant même retourner à un niveau normal (Warnold *et al.*, 1978; Arbeit *et al.*, 1984; Luketich *et al.*, 1990), ce qui supporte l'idée que la tumeur impose ses priorités énergétiques à l'hôte.

On constate donc, d'après ces différentes études, des anomalies du métabolisme énergétique chez la grande majorité des patients cachectiques cancéreux, pouvant entraîner une détérioration de la balance énergétique. Mais il est important de noter que la cachexie associée au cancer n'est pas systématiquement accompagnée d'une augmentation de la DER.

3. Perte de poids

Chez des patients présentant un stade avancé du cancer ou étant en phase terminale, il est observé une importante perte de poids (Warnold *et al.*, 1978; Lundholm *et al.*, 1982a; Falconer *et al.*, 1994; Fouladiun *et al.*, 2005). Dans le cas du cancer, cette perte de poids est un indicateur pronostic péjoratif de la survie des patients (Andreyev *et al.*, 1998; Deans *et al.*, 2009; Solheim *et al.*, 2014). Plus la perte de poids est importante, plus le temps de survie est court. Chez les patients et le personnel de santé, elle engendre une grande réticence à aborder le sujet puisque sa progression se termine généralement par un décès (Hopkinson *et al.*, 2006).

Type de cancer ou localisation du cancer	Incidence de la perte de poids (%)
Gastrique	83
Pancréas	83
Œsophage	79
Tête et cou	72
Colorectal	54-60
Poumon	50-66
Prostate	56
Sarcome	39-60
Rectum	40
Sein	9-36

Tableau 2 : Incidence de la perte de poids dans différents types de cancer. [d'après (Laviano & Meguid, 1996; Laviano *et al.*, 2003)].

L'incidence de la cachexie chez les patients atteints de cancer est déterminée par l'évaluation du degré de la perte de poids. Alessandro Laviano et ses collaborateurs ont récemment déterminé l'incidence de la perte de poids en cas de cancer, en fonction du type de cancer ou de sa localisation (Laviano & Meguid, 1996; Laviano *et al.*, 2005) (Tableau 2). Les patients souffrant d'un cancer gastrique ou pancréatique présentent la plus haute fréquence de perte de poids.

La sévérité de la perte de poids fonctionne généralement de pair avec l'incidence de la perte de poids. En effet, Wigmore *et al.* ont notamment montré chez 85% des patients atteints d'un cancer du pancréas au moment du diagnostic, une perte de 14% de leur poids habituel. Au stade terminal de la maladie, 100% des patients avait perdu 24.5% de leur poids habituel (Wigmore *et al.*, 1997). La perte de poids semble un bon indicateur de la cachexie associée au cancer, puisqu'elle est en relation avec l'évolution clinique du patient et est facilement mesurable. Néanmoins, ce critère manque de sensibilité étant donné qu'il présente l'inconvénient majeur de ne pas renseigner sur la nature du tissu qui est dégradé (Wigmore *et al.*, 1997).

4. Altérations de la composition corporelle

D'un point de vue métabolique, la perte de poids causée par le cancer diffère de celle observée durant la privation alimentaire. En effet lors d'un jeûne alimentaire, une protéolyse rapide se met en place, associée à une mobilisation importante des acides aminés depuis le muscle, et à une néoglucogenèse produisant du glucose depuis le foie, pour répondre aux besoins métaboliques (Brennan, 1977). Par la suite, ce sont donc les lipides issus du tissu adipeux qui sont préférentiellement utilisés comme substrats énergétiques, afin de préserver le contenu protéique. En revanche, au cours du syndrome cachectique, cette adaptation métabolique ne se produit plus, et une perte concomitante de masse grasse et de masse musculaire est observée (Brennan, 1977).

A. Tissus musculaires et adipeux

Les modifications de la composition corporelle reflètent un processus qui évolue avec le développement du cancer. Dans un groupe de patients ayant des tumeurs gastro-intestinales solides et ayant perdu 10% de leur poids habituel, il a été mis en évidence une perte importante de tissu adipeux (Fouladiun *et al.*, 2005), préférentiellement au niveau du tronc, puis au niveau des membres inférieurs et supérieurs. De plus, il a été observé une diminution de la masse maigre au niveau du bras (Fouladiun *et al.*, 2005). Dans une autre étude menée sur des patients atteints d'un cancer de la prostate, il a été constaté principalement une perte de masse maigre, sans modification de la composition corporelle en tissu adipeux (Maturro *et al.*, 2003). Enfin, dans une population de patients atteints d'un cancer du poumon et perdant 29% de leur poids initial, il était observé une réduction de 82% de tissu adipeux soit une perte moyenne de 14.2 kg, et une réduction de 74% du tissu musculaire (Preston *et al.*, 1987; Fearon & Preston, 1990). Récemment, il a également été noté chez des patients cachectiques une réduction importante de la section transversale du muscle *quadriceps femoris* et de la taille des fibres musculaires (Weber *et al.*, 2009). Des patients atteints d'un cancer gastro-intestinal, de la tête et du cou ou du poumon présentaient une fonte musculaire importante accompagnée d'une réduction de plus de 50% du contenu en protéines (Cohn *et al.*, 1981). Cette perte spectaculaire de masse musculaire squelettique explique pourquoi les patients cachectiques ont une qualité et une durée de vie diminuées, puisque la défaillance fonctionnelle des muscles respiratoires est un facteur de risque important conduisant à la mort (Windsor & Hill, 1988). Généralement, la perte de masse musculaire se met en place tôt après le début du développement tumoral (Kralovic *et al.*, 1977). Bien qu'il ait été décrit qu'elle apparaît après la fonte du tissu adipeux (Fouladiun *et al.*, 2005; Agustsson *et al.*, 2012), d'autres études ont montré que la perte de masse musculaire peut coexister avec un poids stable ou en l'absence d'une fonte de masse grasse (Prado *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009; Baracos *et al.*, 2010).

B. Viscères

Les organes viscéraux tels que le foie, les reins ou le cœur ne subissent pas de variation de volume chez les patients atteints de cancer, tandis que le volume de la rate augmente significativement (Heymsfield & McManus, 1985). Une splénomégalie et une hépatomégalie ont également été observées chez des patients atteints d'un cancer colorectal avancé (Liefers *et al.*, 2009). Fait intéressant, le compartiment protéique viscéral est relativement préservé voire augmenté chez des patients cachectiques (Preston *et al.*, 1987; Fearon & Preston, 1990; Fearon, 1992). Cette préservation est une des principales caractéristiques différenciant le processus cachectique du jeûne alimentaire (Fearon, 1992).

C. Compartiments liquidiens et minéraux

Chez des patients atteints d'un cancer du poumon et perdant 29% de leur poids initial, il y a une perte significative d'eau intracellulaire, mais il n'y a aucun changement du contenu en eau extracellulaire (Preston *et al.*, 1987; Fearon & Preston, 1990). Il est également observé chez des patients cachectiques une perte d'eau totale (Weber *et al.*, 2009). De plus, il a été également constaté une diminution du contenu en potassium (-33%), en calcium (-17%) et en phosphore (-9%) (Preston *et al.*, 1987; Fearon & Preston, 1990). Cette diminution significative du contenu minéral suggère une érosion de la masse osseuse.

5. Altérations du métabolisme

Au cours de la croissance tumorale, une interaction forte entre l'hôte et la tumeur s'établit. Celle-ci va provoquer l'apparition et la persistance d'un bouleversement du métabolisme au sein de l'organisme, caractérisée par des troubles glucidiques, lipidiques et protéiques.

Afin de se développer, les tumeurs utilisent le glucose et les acides aminés circulants de l'hôte comme substrats énergétiques et pour la synthèse de protéines (Norton *et al.*, 1980; Sauer *et al.*, 1982). Au fur et à mesure que la tumeur croît, la concentration en glucose et acides aminés circulants diminue (Burt *et al.*, 1981; Kurzer *et al.*, 1988). Dans cet état catabolique, le métabolisme de l'hôte va essayer de maintenir des taux de substrats circulants à un niveau normal, en augmentant la néoglucogenèse et le catabolisme musculaire en dépit de la fonte musculaire (Waterhouse *et al.*, 1979; Burt *et al.*, 1984). Quand la demande énergétique de la tumeur devient supérieure à ce que peut lui apporter l'hôte, une perte de poids apparaît (Rivera *et al.*, 1988).

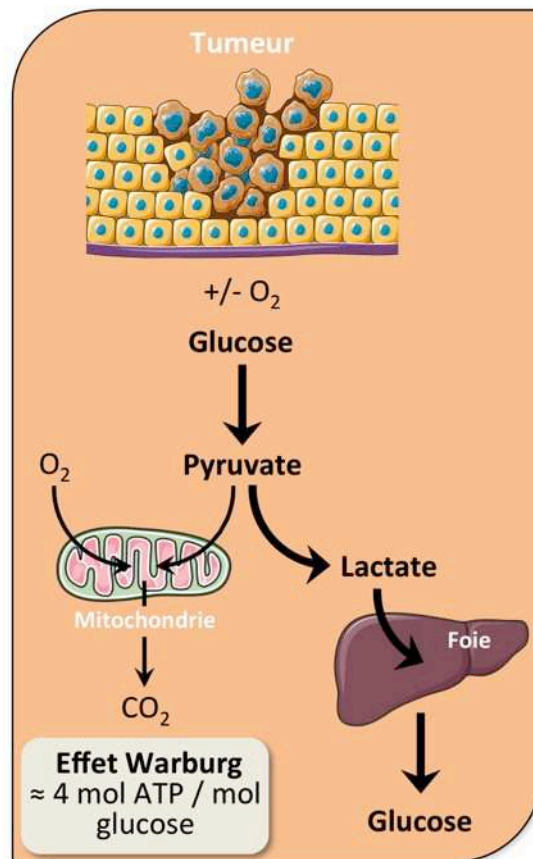


Figure 7 : Schématisation de l'effet Warburg et du devenir du lactate.

Les cellules cancéreuses convertissent préférentiellement le glucose en lactate. Ceci pourrait être dû à une altération de la fonction mitochondriale, limitant ainsi l'oxydation du pyruvate par les mitochondries. Le lactate produit est transféré au foie, où il sera converti en glucose par la néoglucogenèse [modifié d'après (Vander Heiden *et al.*, 2009)].

A. Métabolisme glucidique

Chez les patients cachectiques, il est observé des troubles marqués du métabolisme des glucides au niveau des organes sains et en particulier, au niveau du foie. Ces perturbations métaboliques proviennent probablement de l'utilisation du glucose par la tumeur comme principale source d'énergie (Holm *et al.*, 1995). Expérimentalement, chez des souris cachectiques, il a été montré que l'utilisation du glucose par les organes de l'organisme hôte était réduite, pour permettre une utilisation plus importante par la tumeur (Mulligan & Tisdale, 1991b). Au sein de la tumeur, le glucose est converti en lactate plutôt qu'en dioxyde de carbone (Warburg *et al.*, 1927) (Figure 7). La cause de ce phénomène, appelé effet Warburg, a été attribuée à un éventuel défaut mitochondrial provoquant une respiration détériorée (Warburg, 1956). En effet, dans des cellules de rhabdomyosarcome R1H, il a été mis en évidence un déficit fonctionnel des mitochondries et une augmentation de la production de lactate (Jahnke *et al.*, 2010). Cependant, d'autres travaux ont montré que la fonction mitochondriale n'était pas altérée dans la plupart des cellules cancéreuses (Weinhouse, 1976; Fantin *et al.*, 2006), suggérant ainsi une autre explication pour la production de lactate (Vander Heiden *et al.*, 2009) (Figure 7). Le lactate produit est transféré par la circulation au foie, où son squelette carboné est utilisé pour produire du glucose par la néoglucogenèse (Figure 7). Plusieurs études ont référencé une augmentation du taux de lactate circulant en cas de cancer (Burt *et al.*, 1983; Holroyde *et al.*, 1984; Lindmark *et al.*, 1986). Il était en moyenne 40% plus haut chez des patients atteints de cancer que chez des individus sains (Tayek, 1992).

Chez des patients cachectiques, il a été observé une augmentation de la formation hépatique de glucose (Waterhouse & Kemperman, 1971; Holroyde *et al.*, 1975), grâce à une augmentation de la néoglucogenèse (Reichard *et al.*, 1963; Waterhouse, 1974; Holroyde *et al.*, 1975). L'activité de cette dernière, qui représente 20% du renouvellement du glucose chez les sujets sains, est augmentée de 50% chez les patients atteints d'un cancer (Holroyde *et al.*, 1975). Elle serait responsable d'une perte d'énergie de 260 kilocalories par jour (Eden *et al.*, 1984). En plus du lactate, d'autres substrats participent à la production de glucose par le processus néoglucogénique. Ainsi, la conversion de l'alanine (Waterhouse *et al.*, 1979), et du glycérol (Lundholm *et al.*, 1982b), est également responsable de l'augmentation de la production de glucose hépatique. Chez la souris, en condition de cachexie associée au

cancer, il a également été observé une dégradation importante du glycogène hépatique, pouvant également participer à cette production de glucose (Rivera *et al.*, 1988).

La néoglucogénèse peut être en partie responsable de l'augmentation de la DER rapportée dans le cas de cancer du poumon ou pancréatique (Fredrix *et al.*, 1991; Falconer *et al.*, 1994). Une augmentation de la production de glucose hépatique chez des patients cancéreux serait sûrement la conséquence de la demande métabolique de la tumeur et ceci pourrait contribuer au processus cachectique (Holroyde *et al.*, 1975).

Au sein de l'organisme hôte, d'autres aspects du métabolisme glucidique peuvent être associés à la cachexie associée au cancer. En effet, il a été décrit que les patients sont souvent sujets à une insulino-résistance et à une intolérance au glucose (Bishop & Marks, 1959; Waterhouse & Kemperman, 1971; Schein *et al.*, 1979; Holroyde *et al.*, 1984; Tayek, 1992). Chez 37% des patients atteints de cancer, l'intolérance au glucose était similaire à celle observée chez des patients diabétiques (Glicksman & Rawson, 1956).

B. Métabolisme lipidique

En raison de leur fort pouvoir calorifique, les lipides constituent une source importante d'énergie pour l'organisme. Le tissu adipeux représente 14% du poids d'un homme pesant 65 kg (Passmore & Draper, 1964). Le tissu adipeux est stocké dans les adipocytes sous la forme de triglycérides (TG), constitués d'un squelette de glycérol estérifié par trois molécules d'acides gras. La perte de tissu adipeux est fréquemment observée expérimentalement chez les animaux avec une tumeur (Mider *et al.*, 1949; Costa & Holland, 1962; Thompson *et al.*, 1981; Rivera *et al.*, 1988), ainsi que chez les patients atteints d'un cancer (Preston *et al.*, 1987; Fearon & Preston, 1990; Fouladiun *et al.*, 2005). Cette fonte de tissu adipeux chez les patients atteints d'un cancer explique en grande partie la perte de poids observée (Warnold *et al.*, 1978; Watson & Sammon, 1980). Elle est également prédictive de la survie des patients (Murphy *et al.*, 2010b). La durée de vie de patients obèses atteints de cancer est plus importante que celle de patients atteints de cancer présentant un IMC normal (Halabi *et al.*, 2005). Par conséquent, un tissu adipeux développé augmenterait la survie. Ceci est connu sous le nom de paradoxe de l'obésité. Néanmoins, il a été montré qu'au moment du diagnostic, les patients en surpoids ou obèses pouvaient déjà avoir une importante atrophie musculaire (Prado *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2009). De plus, il a

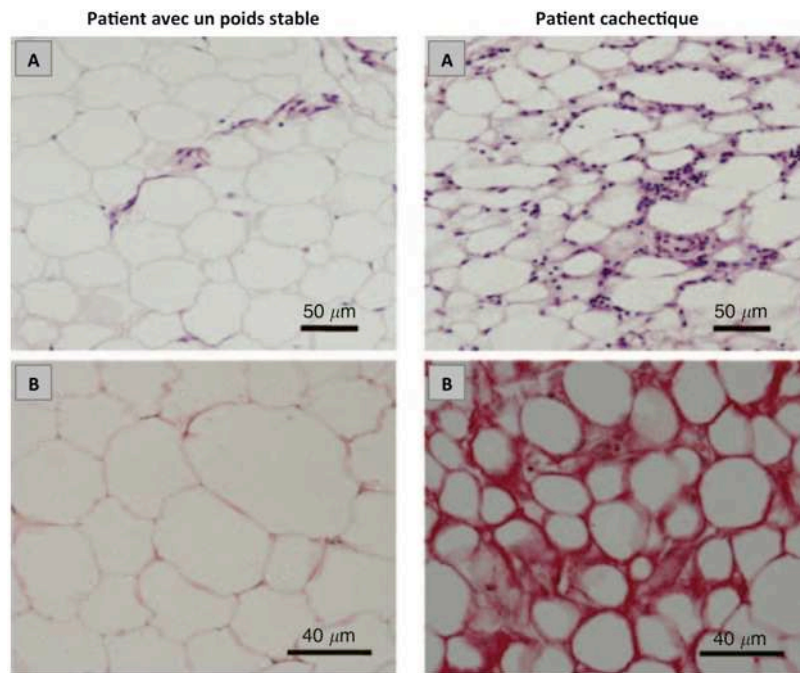


Figure 8 : Caractéristiques du tissu adipeux au cours de la cachexie associée au cancer. Sections représentatives du tissu adipeux sous-cutané de patients atteints de cancer avec un poids stable (à gauche) ou une cachexie (à droite), colorées à l'hématoxyline-éosine (A) ou au rouge Sirius (B) [modifié d'après (Mracek *et al.*, 2011)].

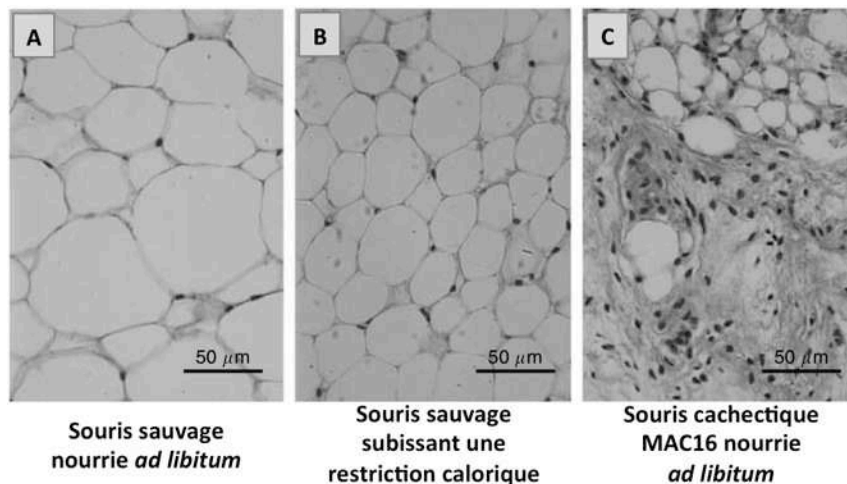


Figure 9 : Caractéristiques morphologiques du tissu adipeux. Sections de tissu adipeux épидидymal de souris sauvages (A), de souris sauvages subissant une restriction calorique (pair-feeding) (B), et de souris cachectiques MAC16 (C), en microscopie optique. Noter les adipocytes difformes et rétrécis présents dans le tissu adipeux de souris cachectiques dix-huit jours après l'inoculation des cellules tumorales [modifié d'après (Bing *et al.*, 2006)].

récemment été montré chez des patients en surpoids ou obèses atteints d'un cancer, que cet excès de masse grasse ne conférait aucun avantage, s'ils présentaient également une perte importante de masse musculaire (Martin *et al.*, 2013).

Des études réalisées chez l'animal indiquent que la perte de tissu adipeux n'est pas uniquement causée par une réduction des apports énergétiques. En effet, la fonte du tissu adipeux apparaît avant le début de l'anorexie chez la souris avec un carcinome Krebs-2 (Costa & Holland, 1962), et est plus sévère chez des rats transplantés avec des cellules du carcinome Walker-256 (rats cachectiques Walker-256) que chez le groupe témoin subissant une restriction calorique (pair-feeding) (Mider *et al.*, 1949). Chez l'homme, elle n'est pas due à une réduction du nombre d'adipocytes, mais est attribuée à une diminution de la quantité de lipides stockés à l'intérieur de ceux-ci (Ryden *et al.*, 2008; Dahlman *et al.*, 2010), et à leur remodelage (Mracek *et al.*, 2011) (Figure 8). Chez la souris, la fonte de tissu adipeux est associée à une réduction de la taille et à une modification morphologique des adipocytes (Bing *et al.*, 2006) (Figure 9). Trois processus différents mènent à cette perte de tissu adipeux.

a) Diminution de la lipogenèse

Premièrement, la fonte de tissu adipeux serait liée à une diminution de la lipogenèse. J.A. Trew et R. W. Berg ont été les premiers à identifier une dérégulation de ce processus dans le tissu adipeux en utilisant des rats cachectiques Walker-256 (Trew & Begg, 1959). Par la suite, ceci a été observé chez des rongeurs avec différents types de tumeurs (Kannan *et al.*, 1980; Thompson *et al.*, 1981; Lanza-Jacoby *et al.*, 1984; Penna *et al.*, 2013a). Chez des souris cachectiques MAC16, le cancer réprime l'adipogenèse. Ceci a été mis en évidence par une régulation négative de facteurs clés adipogéniques : CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α), C/EBP β , peroxyome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) et sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) (Bing *et al.*, 2006).

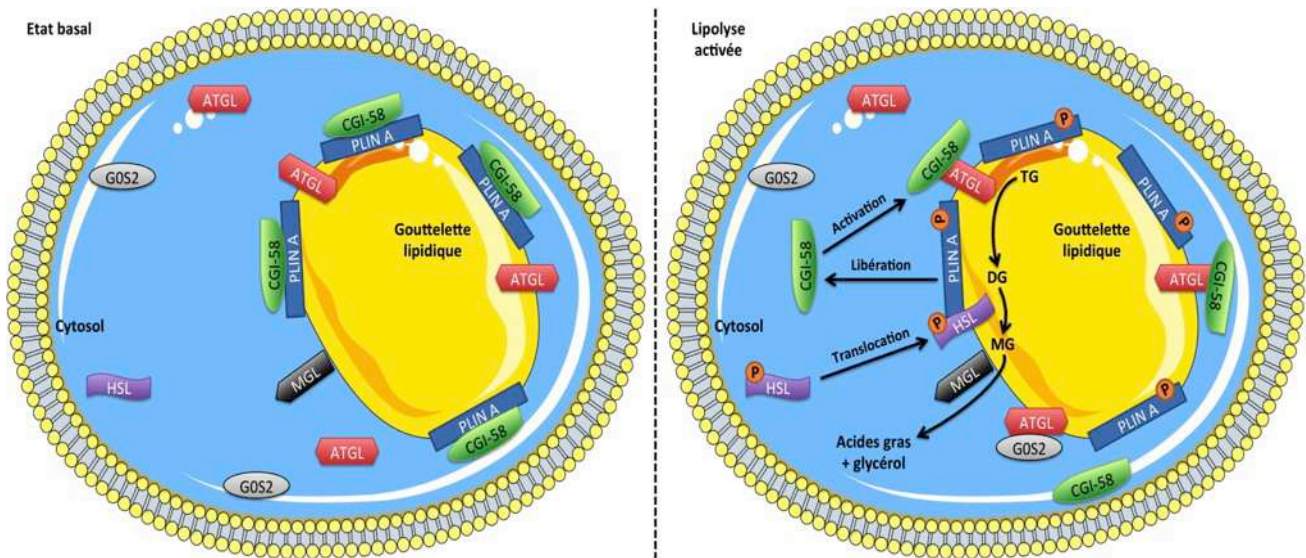


Figure 10 : Modèle proposé des mécanismes moléculaires régulant la lipolyse.

Suite à l'activation hormonale, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) active la protéine kinase A (PKA) (Corbin *et al.*, 1970), qui à son tour active la lipase hormonosensible (HSL pour hormone-sensible lipase) par phosphorylation (Stralfors *et al.*, 1984; Anthonson *et al.*, 1998; Krintel *et al.*, 2008). PKA phosphoryle et active également la périlipine A (PLIN A) située à la surface des gouttelettes lipidiques (Egan *et al.*, 1990; Greenberg *et al.*, 1991). Après son activation, HSL va être transloquée à la surface des gouttelettes lipidiques (Egan *et al.*, 1992; Brasaemle *et al.*, 2000; Clifford *et al.*, 2000), où elle s'associe étroitement à PLIN A (Granneman *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). HSL induit alors la conversion des triglycérides (TG) en glycérol et en acides gras (Hollenberg *et al.*, 1961; Belfrage *et al.*, 1977; Jocken & Blaak, 2008; Zimmermann *et al.*, 2009). L'activité de clivage principalement réalisée par HSL est celle des diglycérides (DG) en monoglycérides (MG) (Belfrage *et al.*, 1978; Fredrikson *et al.*, 1981; Haemmerle *et al.*, 2002; Schweiger *et al.*, 2012). Deux autres enzymes sont également impliquées dans le catabolisme lipidique. Il s'agit de la lipase monoglycéride (MGL pour monoglyceride lipase) qui est nécessaire à la dégradation des MG (Fredrikson *et al.*, 1986; Taschler *et al.*, 2011), et de la triglycéride lipase adipeuse (ATGL pour adipose triglyceride lipase), connue également sous le nom de desnutrine (Villena *et al.*, 2004) ou phospholipase A2 ξ (Jenkins *et al.*, 2004) qui démontre une grande spécificité pour l'hydrolyse des TG en DG (Zimmermann *et al.*, 2004; Haemmerle *et al.*, 2006; Schweiger *et al.*, 2012). ATGL est localisée dans le cytoplasme, et à la surface des gouttelettes lipidiques en condition basale et à l'état activé. Son activation est différente de celle de la HSL (Zimmermann *et al.*, 2004), et n'interagit pas avec PLIN A (Granneman *et al.*, 2007). Son activité est régulée par une protéine activatrice annotée α/β -hydrolase domain-containing protein 5 (ABHD5) (Lass *et al.*, 2006), connue aussi sous le nom de comparative gene identification 58 (CGI-58) (Lai *et al.*, 2000; Lefevre *et al.*, 2001). CGI-58 s'accroche aux gouttelettes lipidiques par une interaction avec PLIN A (Subramanian *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2004). Suite à l'activation de la lipolyse, PLIN A est phosphorylée, notamment sur son résidu sérine 517 (Miyoshi *et al.*, 2007), entraînant la libération de CGI-58 (Subramanian *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2007). CGI-58 libérée va alors activer ATGL (Lass *et al.*, 2006; Granneman *et al.*, 2009). Récemment, il a été montré que la protéine GOS2 (GO/G1 switch gene 2) (Russell & Forsdyke, 1991), régule négativement la lipolyse et l'activité d'ATGL (Schweiger *et al.*, 2012). En effet, elle interagit avec ATGL cytosolique, restreignant l'accès de l'enzyme aux gouttelettes lipidiques, et inhibant ainsi son activité. CGI-58 et GOS2 n'affectent ni l'expression, ni l'activité de HSL (Schweiger *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010). En combinaison, HSL et ATGL sont responsables de plus de 95% de la dégradation des TG chez la souris (Schweiger *et al.*, 2006).

b) Augmentation de la lipolyse

Deuxièmement, elle pourrait être due à une augmentation de la dégradation des lipides (Figure 10). En effet, il a été observé chez des rats et des souris avec une tumeur implantée, une augmentation de l'activité lipolytique (Kralovic et al., 1977; Thompson et al., 1981; Chung et al., 2011). Une fonte de la masse grasse liée à une augmentation importante de la lipolyse a également été rapporté chez des patients cancéreux ayant une perte de poids (Legaspi et al., 1987; Shaw & Wolfe, 1987; Klein & Wolfe, 1990; Zuijdggest-van Leeuwen et al., 2000; Agustsson et al., 2007; Ryden et al., 2008). Le glycérol libéré est généralement dirigé vers le foie où il servira de substrat néoglucogénique, et les acides gras seront utilisés par d'autres tissus comme substrats énergétiques alternatifs au glucose (Argiles et al., 1997). De plus, certains acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique et l'acide arachidonique semblent être essentiels à la croissance tumorale (Hussey & Tisdale, 1994). Dans les adipocytes de souris transplantées avec des cellules de l'adénocarcinome MAC16 (souris cachectiques MAC16), il a été montré une augmentation de l'expression de la protéine G stimulatrice et une réduction de la protéine G inhibitrice (Islam-Ali et al., 2001). Chez des patients cachectiques, une augmentation de l'expression et de l'action de la lipase hormonosensible (HSL pour hormone-sensitive lipase) a été démontrée (Thompson et al., 1993; Agustsson et al., 2007). Toutefois, aucune modification de l'expression de la triglycéride lipase adipeuse (ATGL pour adipose triglyceride lipase) n'était observée (Agustsson et al., 2007). Plus récemment, il a été montré chez des patients cachectiques une augmentation des activités enzymatiques ATGL et HSL, celles-ci étant significativement corrélées à la sévérité de la cachexie (Das et al., 2011). De plus, il a été observé chez des patients avec un cancer pancréatique, une augmentation de l'expression du transcrite de l'ATGL (Haugen et al., 2011).

Expérimentalement, une cachexie a été induite chez des souris déficientes en ATGL, *Atgl*^{-/-} (Haemmerle *et al.*, 2006), et des souris déficientes en HSL, *Hsl*^{-/-} (Haemmerle *et al.*, 2002), par l'inoculation de cellules cancéreuses (Das *et al.*, 2011). Dans cette étude, il a été mis en évidence que la délétion de ces lipases protégeait d'une perte de tissu adipeux, mettant en évidence leur rôle dans la dégradation des réserves de graisses au sein du tissu adipeux et leur contribution à la cachexie associée au cancer (Das *et al.*, 2011) (Figure 11, ci-après). Ces lipases ont également un effet sur la masse musculaire puisque les souris *Atgl*^{-/-}

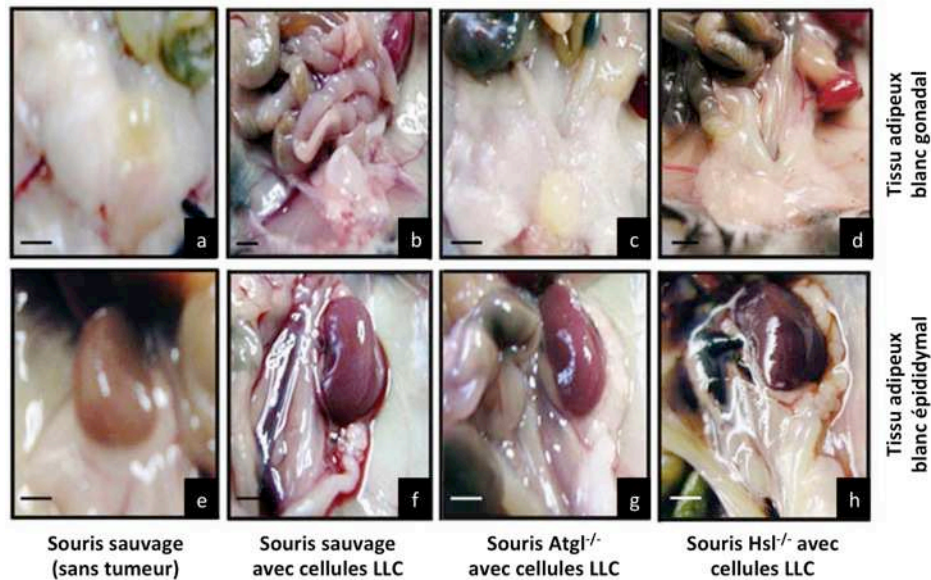


Figure 11 : Effets de la délétion de la lipase ATGL ou HSL sur le tissu adipeux de souris, vingt et un jours après la transplantation de cellules LLC.

Photographies du tissu adipeux blanc gonadal et épидидymal chez la souris sauvage (a et e), chez la souris sauvage transplantée avec des cellules LLC (b et f), chez la souris $Atgl^{-/-}$ transplantée avec des cellules LLC (c et g), et chez la souris $Hsl^{-/-}$ transplantée avec des cellules LLC (b et f). La délétion d'ATGL empêche la perte de tissu adipeux, et la délétion de HSL diminue la perte de tissu adipeux au cours de la cachexie associée au cancer [modifié d'après (Das *et al.*, 2011)].

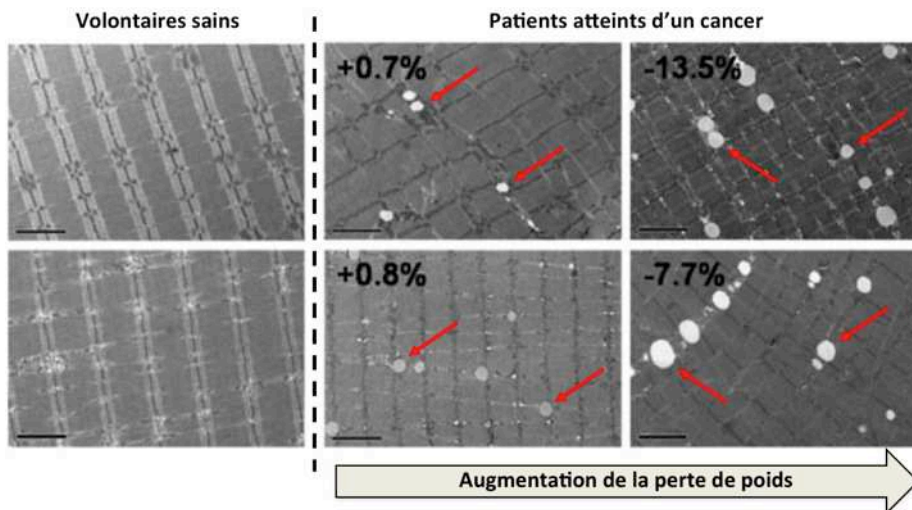


Figure 12 : Photographies du muscle *rectus abdominis* en microscopie électronique à transmission (grossissement x 2650).

Une absence de gouttelettes lipidiques est observée chez les volontaires sains (à gauche), et la présence de gouttelettes lipidiques (vacuoles blanches indiquées par des flèches rouges) est observée chez les patients cachectiques (à droite). Plus la perte de poids augmente, plus le nombre de gouttelettes lipidiques est important. Les valeurs en pourcentage chez les patients cachectiques, indiquent la variation de poids par rapport au poids stable avant le cancer [modifié d'après (Stephens *et al.*, 2011)].

et les souris *Hsl^{-/-}* présentent une atténuation de la perte de masse musculaire (Das *et al.*, 2011). Cette étude soulève la possibilité, jusqu'ici méconnue, qu'il existe une interrelation importante entre le tissu adipeux et le muscle squelettique dans le contexte de la cachexie associée au cancer (Zechner *et al.*, 2012). La nature du médiateur intracellulaire issu de l'hydrolyse des TG reste à déterminer. Récemment, il a été montré une quantité plus importante de gouttelettes lipidiques intramyocellulaires chez des patients cachectiques (Weber *et al.*, 2009; Stephens *et al.*, 2011) (Figure 12). Cette accumulation progressive de gouttelettes lipidiques intramyocellulaires était corrélée à la progression de la cachexie (Stephens *et al.*, 2011), soulignant à nouveau l'importance potentielle des lipides comme marqueurs et/ou médiateurs de l'atrophie musculaire.

c) Réduction de l'activité de la lipoprotéine lipase

Enfin, une réduction importante de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) a été expérimentalement observée dans le tissu adipeux chez des rats et des souris ayant une tumeur (Thompson *et al.*, 1981; Lanza-Jacoby *et al.*, 1982; Lanza-Jacoby *et al.*, 1984; Noguchi *et al.*, 1991; Lopez-Soriano *et al.*, 1997a; Penna *et al.*, 2013a). La LPL est une enzyme se trouvant à la surface des épithéliums vasculaires, au niveau du muscle strié squelettique et surtout au niveau du tissu adipeux. Elle hydrolyse les TG contenus dans les lipoprotéines de très faible densité et les chylomicrons. Sa perte d'activité freine la captation des acides gras plasmatiques et entrave sévèrement le stockage des lipides (Eckel, 1989). Ceci pourrait être à l'origine de l'hypertriglycéridémie parfois observée chez les patients (Viallet *et al.*, 1962; Lanza-Jacoby *et al.*, 1982). Un traitement utilisant le bézafibrate (un médicament hypolipémiant) a été utilisé chez des rats cachectiques (Nomura *et al.*, 1996). Il a été montré une augmentation de l'activité LPL, aboutissant à la préservation du tissu adipeux épидidymal (Nomura *et al.*, 1996). De plus, chez des animaux avec un fort degré de cachexie, il a été rapporté une interaction forte entre la diminution de l'activité de la LPL et l'hypertriglycéridémie (Evans & Williamson, 1988; Lopez-Soriano *et al.*, 1996, 1997a). Cette hypertriglycéridémie peut également être causée par l'augmentation de l'activité lipogénique dans le foie (Mulligan & Tisdale, 1991a; Lopez-Soriano *et al.*, 1995).

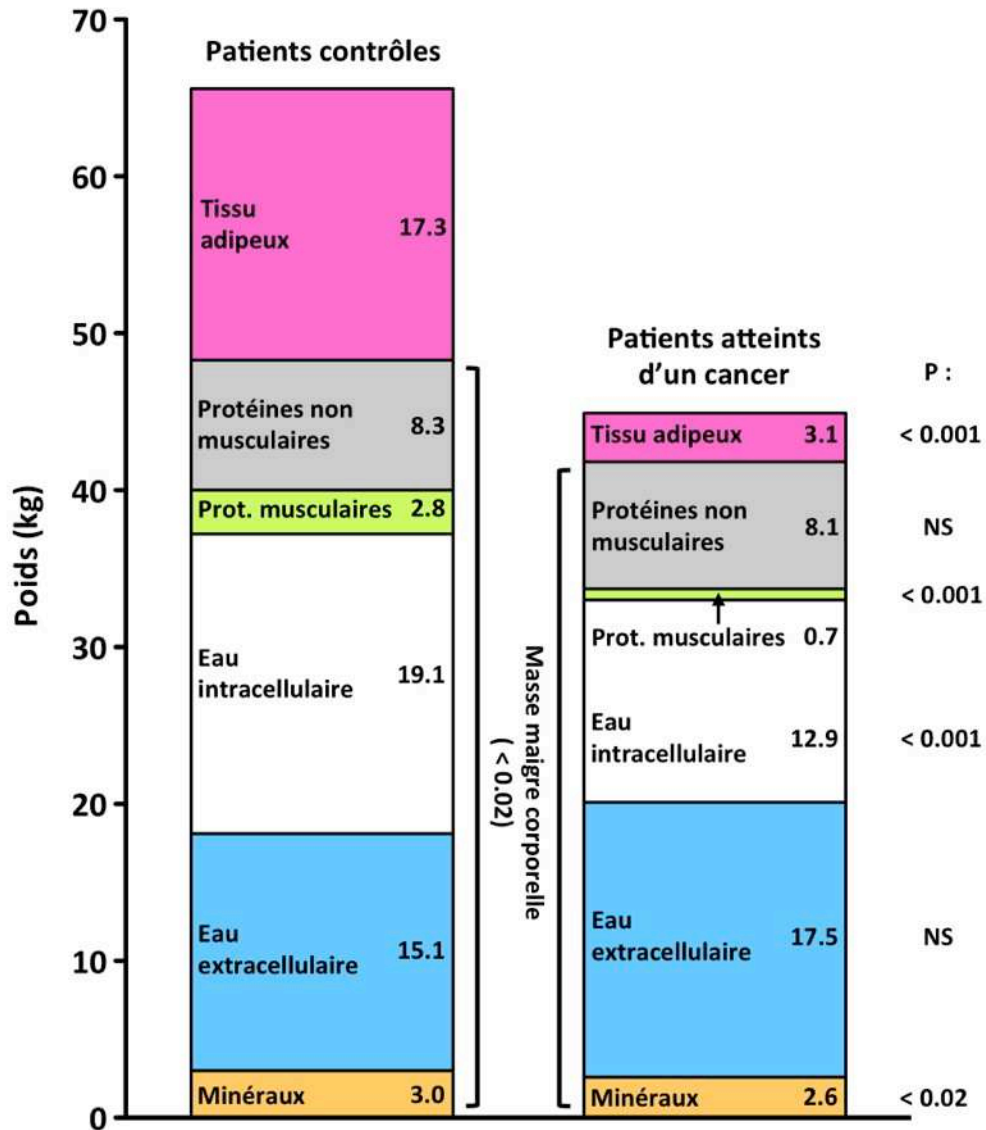


Figure 13 : Modifications de la composition corporelle associées au développement de la cachexie. Comparaison entre un groupe de patients atteints d'un cancer du poumon (n = 6), et un groupe de sujets sains contrôles (n = 24) [modifié d'après (Fearon & Preston, 1990)].

C. Métabolisme protéique

Le processus central de la cachexie associée au cancer est l'érosion progressive de la masse de protéines. Le site majeur de perte de protéines est la musculature squelettique (McMillan *et al.*, 1994). En effet, chez des patients atteints d'un cancer du poumon et perdant 29% de leur poids initial, il était observé une réduction de 74% de la masse protéique musculaire (Preston *et al.*, 1987; Fearon & Preston, 1990) (Figure 13). Dans l'étude de Tom Preston, la perte du contenu en protéines était estimée à 19% (Preston *et al.*, 1987). Contrastant avec cette fonte musculaire, la masse protéique viscérale était épargnée (Preston *et al.*, 1987; Fearon & Preston, 1990; Fearon, 1992). Ce résultat qui diffère de ceux observés en cas d'anorexie mentale ou de jeûne alimentaire prolongé (Heymsfield & McManus, 1985; Fearon, 1992), caractérisés par une perte proportionnelle de masse protéique musculaire et viscérale, met en évidence l'existence d'un facteur autre que la simple réduction des apports nutritionnels comme responsable des perturbations du métabolisme protéique observées au cours du cancer.

Principalement cinq dérégulations du métabolisme protéique sont généralement observées au cours de la cachexie associée au cancer.

a) Augmentation du renouvellement protéique de l'organisme

Une des perturbations du métabolisme protéique est la modification du renouvellement (turn-over) des protéines à l'échelle de l'organisme. En effet, il a été montré que le renouvellement protéique de patients atteints de divers types de cancer était plus important que chez des individus sains (Norton *et al.*, 1981; Kien & Camitta, 1987; Fearon *et al.*, 1991). La même observation a été faite chez des enfants gravement brûlés (Kien *et al.*, 1978), des patients septiques (Long *et al.*, 1977), ou encore des patients atteints de diverses défaillances organiques (Arnold *et al.*, 1993). En cas de cancer, le coût énergétique du renouvellement protéique est estimé à 100 kilocalories par jour pour un individu de 60 kg (Fearon *et al.*, 1988). Cependant, cette augmentation du renouvellement protéique n'était pas systématiquement mise en évidence. En effet, aucune augmentation du renouvellement protéique n'a été observée chez des sujets atteints de cancer dans plusieurs études (Glass *et al.*, 1983; Emery *et al.*, 1984a; Dworzak *et al.*, 1998). Ces divergences peuvent être expliquées par la méthodologie employée, ainsi que par la petite taille des groupes de patients ou encore l'hétérogénéité des patients inclus.

b) Augmentation de la synthèse protéique hépatique

Une augmentation de la synthèse hépatique constitue une perturbation importante du métabolisme protéique. Chez des patients atteints de divers types de cancer, la synthèse hépatique de protéines était augmentée (Lundholm *et al.*, 1978). *In vitro*, il a été mis en évidence une augmentation de la synthèse protéique dans des hépatocytes issus de patients atteints de cancer gastro-intestinal (Starnes *et al.*, 1987). Chez des souris transplantées avec des cellules de sarcome MCG-101 (souris cachectiques MCG-101), il a été observé une augmentation de la synthèse protéique dans le foie (Lundholm *et al.*, 1978). Chez un autre modèle murin (ascites du carcinome d'Ehrlich), il a été constaté une augmentation de la masse hépatique parallèlement à une augmentation de la synthèse de protéines hépatiques (Pain *et al.*, 1984). Cette augmentation de la synthèse hépatique reflétait uniquement la hausse de la production de protéines de phase aiguë (PPA), puisque la synthèse de protéines structurales du foie était réduite (Fearon *et al.*, 1991).

c) Réduction de la synthèse protéique musculaire

La diminution de la synthèse protéique et/ou l'augmentation de la dégradation protéique entraînant une fonte de la masse musculaire squelettique sont les deux principales perturbations du métabolisme protéique observées lors de la cachexie associée au cancer. Chez des patients cachectiques, il a été observé une diminution de la protéosynthèse dans le muscle (Lundholm *et al.*, 1976; Emery *et al.*, 1984a; Dworzak *et al.*, 1998). Chez des souris cachectiques MCG-101, des souris cachectiques MAC16, des souris cachectiques transplantées avec des cellules dérivées d'un hypernéphrome humain (XK1) ou des souris transplantées avec des cellules de l'adénocarcinome du côlon C26 (souris cachectiques C26), une réduction importante de la synthèse protéique a également été mise en évidence au sein du muscle (Lundholm *et al.*, 1981; Emery *et al.*, 1984b; Smith & Tisdale, 1993a; Samuels *et al.*, 2001). Une étude chez des souris cachectiques $Apc^{Min/+}$, ayant une mutation multiple intestinal neoplasia (Min) au sein de l'homologue murin du gène Adenomatous Polyposis Coli (APC), a montré une diminution d'environ 50% de la synthèse protéique (White *et al.*, 2011). Enfin, chez des rats transplantés avec des cellules de l'adénocarcinome AC33, la synthèse protéique dans le muscle était diminuée de 40% (Stein *et al.*, 1976).

De manière intéressante, la synthèse protéique musculaire peut parfois être élevée au cours de la cachexie associée au cancer, du fait d'une augmentation de la disponibilité en acides aminés due à l'augmentation du catabolisme musculaire (Fearon *et al.*, 2011). Cependant, celle-ci n'est pas suffisante pour compenser la perte nette de protéines.

d) Augmentation du catabolisme protéique musculaire

Chez des patients avec un carcinome hépatocellulaire, il a été observé une augmentation de la dégradation protéique dans le muscle (O'Keefe *et al.*, 1990), tout comme chez des patients avec une grande variété de tumeurs (Lundholm *et al.*, 1976). Une forte hausse du catabolisme protéique musculaire était également observée dans le muscle de différents modèles murins de cachexie associée au cancer (Beck *et al.*, 1991; Lorite *et al.*, 1997; Llovera *et al.*, 1998b; Llovera *et al.*, 1998c; Samuels *et al.*, 2001; White *et al.*, 2011), ou encore chez des rats cachectiques (Tessitore *et al.*, 1987; Costelli *et al.*, 1993; van Royen *et al.*, 2000). Parfois au contraire, il n'a été constaté aucune augmentation de la dégradation des protéines, comme chez des patients avec un cancer généralisé en phase avancée ou terminale (Lundholm *et al.*, 1982a).

e) Modifications du pool d'acides aminés

Le cancer va provoquer également des altérations au niveau du pool d'acides aminés (Kubota *et al.*, 1992). En effet, la protéolyse exacerbée va provoquer un important relargage d'acides aminés depuis le muscle vers la circulation. Cette libération des acides aminés est potentialisée par la diminution d'activité du transport des acides aminés vers le muscle en cas de cachexie associée au cancer (Argiles *et al.*, 1989; Garcia-Martinez *et al.*, 1995). Bien que la tumeur accapare principalement les acides aminés libres (Christensen & Henderson, 1952), les acides aminés glucogéniques vont également rejoindre le foie où ils seront utilisés pour la production de glucose (Argiles & Lopez-Soriano, 1991), et également la synthèse de protéines (Pain *et al.*, 1984). En effet, le foie présente une augmentation de l'activité de captation des acides aminés chez des rats cachectiques, et en particulier de l'alanine (Argiles *et al.*, 1989; Argiles & Lopez-Soriano, 1990a). De plus, chez des patients avec divers types de cancer, il a été remarqué une augmentation de la néoglucogénèse à partir de l'alanine (Waterhouse *et al.*, 1979). Le contenu intracellulaire en glutamine du tissu musculaire était également réduit chez des souris transplantées avec des cellules Lewis lung carcinoma (souris cachectiques LLC) (Rivera *et al.*, 1988). Les cellules tumorales utilisent avidement la

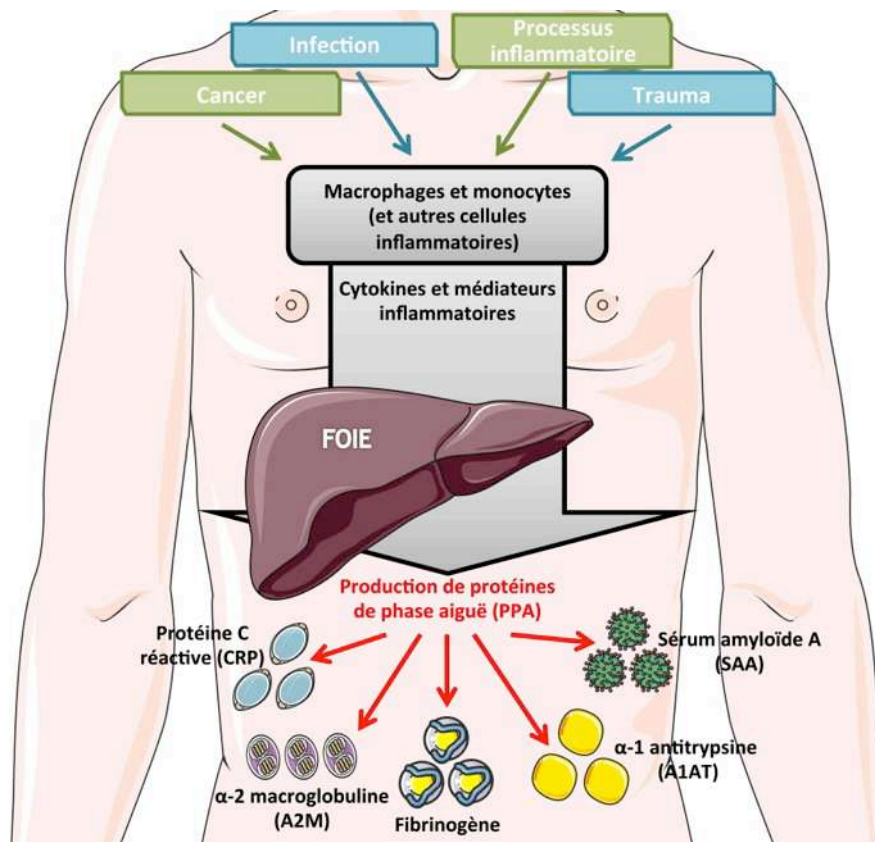


Figure 14 : Représentation schématique de la RPA.

glutamine, puisque cet acide aminé est un précurseur de la pyrimidine et de la purine, du nicotinamide adénine dinucléotide et de plusieurs autres composés azotés. En 1951, G. Burroughs Mider définissait les tumeurs comme des pièges à azote (Mider, 1951), où les acides aminés sont retenus et utilisés pour l'oxydation d'une part et d'autre part, la synthèse d'acides nucléiques et de protéines (Rivera *et al.*, 1988) nécessaires à la croissance tumorale. En cas de cancer, la concentration plasmatique en acides aminés branchés (BCAA pour branched-chain amino acids) est souvent augmentée (Argiles & Lopez-Soriano, 1992), et leur renouvellement est altéré (Argiles & Lopez-Soriano, 1990b). Il a notamment été montré que l'oxydation de la leucine est augmentée chez des animaux cachectiques (Argiles & Lopez-Soriano, 1990b; Costelli *et al.*, 1995c). La leucine est utilisée par la tumeur, mais la majeure partie des BCAA est oxydée par le muscle squelettique (Argiles & Lopez-Soriano, 1990b).

6. Réponse de phase aiguë

Le terme « phase aiguë » a été introduit en 1941 par Theodore J. Abernethy et Oswald T. Avery, qui ont décrit les propriétés de sérums de patients souffrant de maladies infectieuses fébriles (Abernethy & Avery, 1941). La réponse de phase aiguë (RPA) est une réaction systémique de l'organisme causée par des perturbations locales ou systémiques de l'homéostasie dues à une lésion tissulaire, une infection, une croissance néoplasique ou un processus inflammatoire (Skipworth *et al.*, 2007) (Figure 14). Les effets physiologiques de la RPA ont pour but d'aider à la réparation tissulaire, la coagulation sanguine, la prévention des lésions tissulaires en cours et la destruction des organismes infectieux (Lelbach *et al.*, 2007). Néanmoins, quand elle est sévère ou prolongée, elle peut provoquer des effets néfastes (Stephens *et al.*, 2008). La synthèse de protéines de phase aiguë (PPA) a lieu principalement dans le foie (Miller *et al.*, 1951). Elle a également lieu dans le muscle squelettique. En effet, il a été récemment montré chez des souris cachectiques C26, que les muscles *gastrocnemius* et *quadriceps* étaient capables de synthétiser des PPA comme le fibrinogène ou le sérum amyloïde A (SAA) (Bonetto *et al.*, 2011).

La RPA cause une série de modifications dans la synthèse des protéines hépatiques qui entraîne le passage de la production d'albumine à celle de PPA, telles que la protéine C réactive (CRP), le SAA, le fibrinogène, l' α -2 macroglobuline (A2M) et l' α -1 antitrypsine (A1AT) (Tisdale, 2009) (Figure 14). Les PPA sont dites positives, si leurs concentrations augmentent lors d'une inflammation, ou négatives dans le cas contraire.

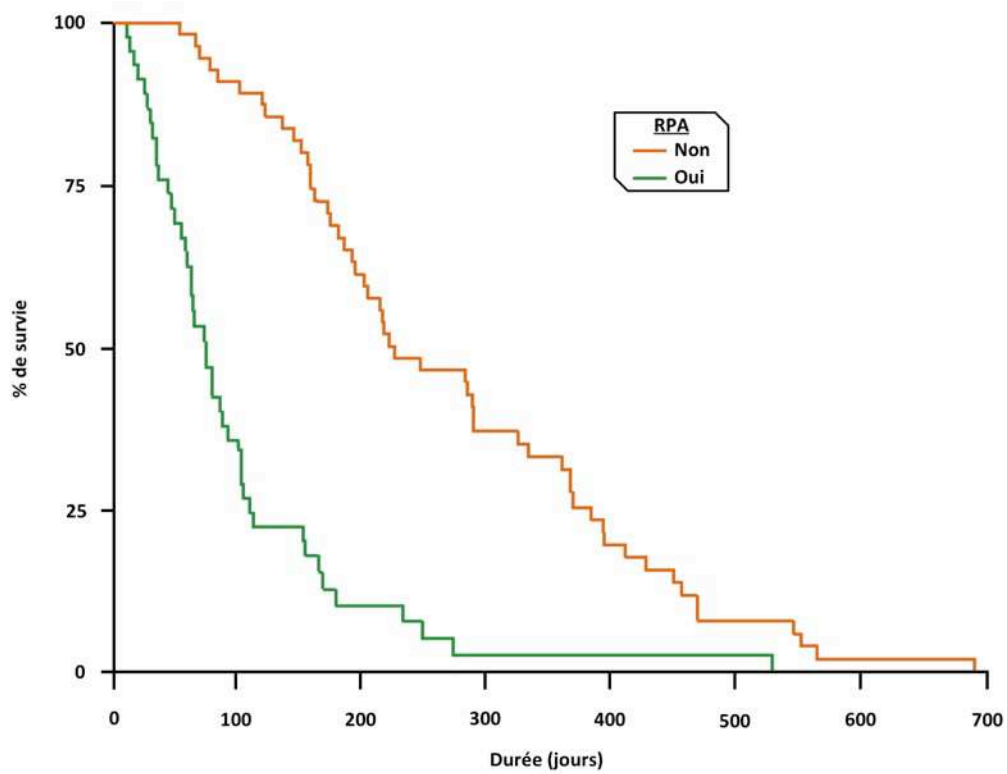


Figure 15 : Courbe de survie de patients atteints d'un cancer pancréatique, en présence (vert) ou en absence (orange) d'une RPA. [modifié d'après (Falconer *et al.*, 1995)].

Chez des patients avec un cancer pancréatique, l'incidence de la RPA est de 43% au moment du diagnostic et elle augmente jusqu'à 78% au moment de la mort (Falconer *et al.*, 1995). Une association a été mise en évidence entre la mise en place de la RPA et une perte de poids sévère chez des patients atteints de cancer gastro-intestinal ou pulmonaire (McMillan *et al.*, 1998). De plus, dans le cas d'un cancer pancréatique, un taux élevé de PPA est associé à une réduction de la durée de survie (Falconer *et al.*, 1995) (Figure 15).

La CRP a été isolée en 1930 dans le sérum de patients présentant une inflammation aiguë due à un pneumocoque (Tillett & Francis, 1930). Une augmentation du taux sérique de CRP est observée chez des patients présentant un stade avancé du cancer (Falconer *et al.*, 1994; Falconer *et al.*, 1995; Fearon *et al.*, 1999; Zuidgeest-van Leeuwen *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2003; DeJong *et al.*, 2005; Fouladiun *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2013; Op den Kamp *et al.*, 2013b). De plus, cette augmentation du taux sérique de CRP est un bon indicateur d'une diminution de la survie chez les patients atteints d'un cancer colorectal (Nozoe *et al.*, 1998), pancréatique (Falconer *et al.*, 1995), pulmonaire (Scott *et al.*, 2002), ou rénal (Ljungberg *et al.*, 1995). La concentration de SAA dans le sang, qui est largement augmentée dans le cas d'un cancer (Raynes & Cooper, 1983), est corrélée à celle de CRP (Raynes & Cooper, 1983). La concentration de fibrinogène circulant, ainsi que sa synthèse, sont augmentées en cas de cancer (Preston *et al.*, 1998; Fearon *et al.*, 1999; Pavey *et al.*, 2001). Enfin, il a été montré une augmentation du taux sérique d'A1AT en cas de cancer, et que l'A1AT était également définie comme un facteur pronostic significatif de survie (Ljungberg *et al.*, 1995).

Une hypoalbuminémie est généralement mise en évidence au cours de la cachexie associée au cancer (Knox *et al.*, 1983; Arbeit *et al.*, 1984; Preston *et al.*, 1987; Bruera, 1997; Zuidgeest-van Leeuwen *et al.*, 2000; Fouladiun *et al.*, 2005; Bachmann *et al.*, 2008; Stephens *et al.*, 2012). Néanmoins, la synthèse d'albumine ne semble pas être affectée en cas de cancer (Fearon *et al.*, 1998; Fearon *et al.*, 1999). Par conséquent, la chute de la concentration en albumine résulterait d'un autre mécanisme, tel que l'augmentation de son évaison transcapillaire (Fleck *et al.*, 1985), et de sa dégradation (Fearon *et al.*, 1998; Fearon *et al.*, 1999; Fearon *et al.*, 2012). Le taux sérique de cette PPA négative est un bon indicateur de survie (Utech *et al.*, 2012). En effet, le taux sérique d'albumine (Falconer *et al.*, 1995), ainsi que sa demi-vie, sont corrélés significativement au temps de survie de patients cancéreux (Chao *et al.*, 1975).

La RPA est notamment déclenchée et modulée par les cytokines (Figure 14). Il a été montré en particulier que l'interleukine-6 (IL-6) est le régulateur majeur de la synthèse de protéines de phase aiguë chez des hépatocytes humains adultes *in vitro* (Castell *et al.*, 1989). L'IL-6 est associée à une diminution du taux sérique d'albumine, et sa concentration est positivement corrélée au niveau sérique de CRP chez des patients cachectiques (Kuroda *et al.*, 2007). D'autres cytokines, comme l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le tumor necrosis factor- α (TNF- α) ont un effet, mais beaucoup plus modéré (Castell *et al.*, 1989).

Le lien entre la RPA et le développement de l'atrophie musculaire dans la cachexie associée au cancer n'est pas clair. Toutefois, il a été émis l'hypothèse que la synthèse hépatique de PPA positives représenterait un gouffre énergétique dans lequel les acides aminés mobilisés à partir du muscle squelettique sont perdus (Stephens *et al.*, 2008). En effet, pour produire 1 g de fibrinogène par jour, 2.6 g de protéines musculaires doivent être catabolisés (Preston *et al.*, 1998). Ceci montre comment la RPA pourrait contribuer à l'atrophie musculaire.

IV. Les médiateurs de la cachexie associée au cancer

Des expériences de transferts parabiotiques entre des animaux portant une tumeur et des animaux sains, ont entraîné le développement d'une cachexie chez les animaux sains, et mis en évidence la présence chez l'organisme ayant la tumeur, de facteurs circulants responsables de nombreuses perturbations métaboliques conduisant à la cachexie associée au cancer (Mordes & Rossini, 1981; Norton *et al.*, 1985). D'un point de vue étiologique, la tumeur est capable d'induire une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Deans *et al.*, 2006). De plus, elle produit des facteurs pro-cachectiques ayant des effets cataboliques directs sur les tissus de l'hôte (Todorov *et al.*, 1996a; Hirai *et al.*, 1998; Todorov *et al.*, 1998). Afin de faire face à la présence de la tumeur, une réponse inflammatoire généralisée se met en place au sein de l'organisme hôte (Deans *et al.*, 2006).

1. Les cytokines

Les cytokines sont un groupe hétérogène de petits polypeptides ou glycoprotéines solubles, sécrétées par différents types cellulaires dont les cellules endothéliales, épithéliales et gliales, mais en grande majorité par les cellules immunitaires de l'hôte en réponse à une infection, une blessure (macrophages, monocytes et lymphocytes), et en cas de croissance néoplasique, par les cellules tumorales elles-mêmes. En effet, il a été démontré que des

lignées cellulaires tumorales issues de patients cachectiques sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires (Gelin *et al.*, 1991; Strassmann *et al.*, 1993; Negri *et al.*, 2001; Wigmore *et al.*, 2002; Martignoni *et al.*, 2005). Toutefois, ces cytokines pro-inflammatoires ne sont pas détectées de manière fiable dans la circulation et doivent probablement agir localement pour promouvoir l'inflammation et activer les cellules inflammatoires de l'hôte (par exemple, les cellules mononucléées sanguines périphériques) (O'Riordain *et al.*, 1999; Martignoni *et al.*, 2005). Bien que la majorité des cytokines détectées chez les patients soient issues de cellules de l'organisme hôte, les cellules tumorales sont également à l'origine de cette production.

A. Les cytokines pro-inflammatoires

a) Le tumor necrosis factor (TNF)- α

La première cytokine à être associée à la cachexie a été mise en évidence dans une lignée cellulaire de macrophages en réponse à une endotoxine (Beutler *et al.*, 1985b). Cette cytokine dénommée cachectine supprimait l'activité de la LPL dans des cultures préadipocytaires (Price *et al.*, 1986). D'après Bruce Beutler et son équipe, la cachectine est identique au TNF (Beutler *et al.*, 1985a), une protéine qui provoquait la nécrose hémorragique des tumeurs chez des souris traitées avec une endotoxine (Carswell *et al.*, 1975). TNF a été ensuite renommé TNF- α pour être différencié de la protéine TNF- β ou lymphotoxine (Aggarwal *et al.*, 1984; Aggarwal *et al.*, 1985).

Même s'il a été observé que l'administration épisodique de TNF- α n'induisait pas une cachexie chez des rongeurs (Mahony & Tisdale, 1988; Stovroff *et al.*, 1988), la plupart des études indique un rôle de TNF- α comme médiateur de la cachexie associée au cancer. Ceci a été mis en évidence du fait que sa concentration plasmatique est élevée chez les patients cancéreux avec une cachexie (Balkwill *et al.*, 1987; Batista *et al.*, 2013), ou chez des rats transplantés avec des cellules d'ascite de l'hépatome de Yoshida AH-130 (rats cachectiques YAH-130) (Costelli *et al.*, 1993), bien que d'autres études n'ont pas montré ou détecté de modifications en cas de cachexie associée au cancer (Moldawer *et al.*, 1988; Socher *et al.*, 1988; Langstein *et al.*, 1991). Le TNF- α inhibait l'activité de la LPL chez des cellules préadipocytaires 3T3-L1 et stimulait la lipolyse *in vitro* (Kawakami *et al.*, 1987). De plus, des souris inoculées intramusculairement avec une lignée cellulaire sécrétant continuellement

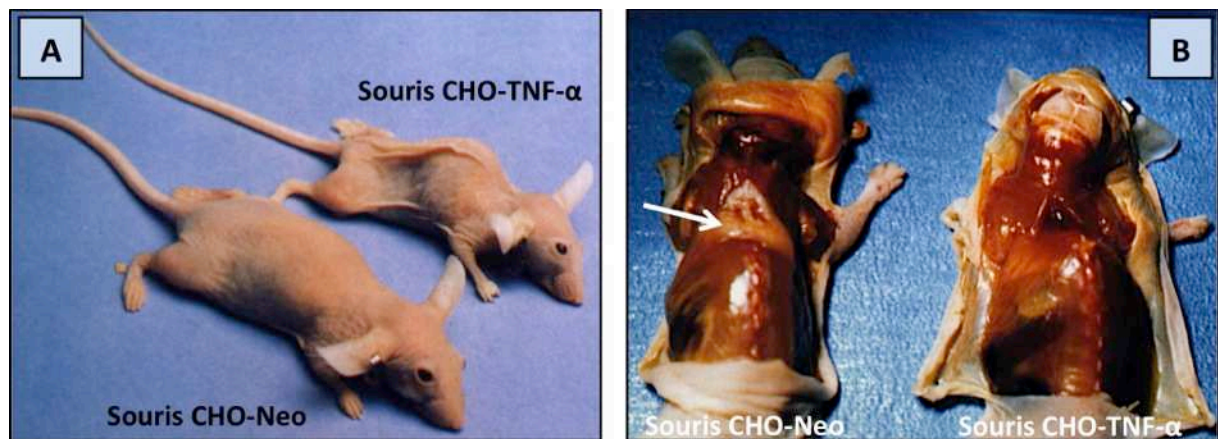


Figure 16 : Souris inoculées intramusculairement avec une lignée cellulaire sécrétant continuellement du TNF- α humain (CHO-TNF- α) ou surexprimant la néomycine (CHO-Neo).

A. La photographie a été prise vingt-six jours après l'inoculation.

B. La photographie a été prise trente-deux jours après l'inoculation. La peau des souris a été disséquée pour montrer la présence (flèche blanche ; souris CHO-Neo) ou l'absence (souris CHO-TNF- α) de tissu adipeux inter-scapulaire [modifié d'après (Oliff *et al.*, 1987)].

du TNF- α humain développaient une perte de poids et une cachexie sévère (Oliff *et al.*, 1987) (Figure 16). D'autres études utilisant une administration chronique de TNF- α recombinant humain ou des cellules sécrétant intramusculairement un TNF- α humain ont rapporté la capacité de cette cytokine à reproduire une cachexie *in vivo* (Tracey *et al.*, 1988; Flores *et al.*, 1989; Tracey *et al.*, 1990).

L'administration intrapéritonéale d'un anticorps contre le TNF- α chez un modèle murin de cachexie associée au cancer, prévenait la perte de tissu adipeux et de masse maigre, ainsi que la perte de poids de corps (Sherry *et al.*, 1989). Enfin, l'utilisation d'un modèle murin déficient pour le récepteur de type 1 du TNF- α confirmait, suite à l'inoculation de cellules Lewis lung carcinoma (LLC), que cette cytokine était impliquée dans le métabolisme lipidique en cas de cachexie associée au cancer (Lopez-Soriano *et al.*, 1997b).

b) L'interleukine (IL)-6

Des patients avec un cancer gastro-intestinal, ou avec un NSCLC, ou avec un cancer gastro-œsophagien présentaient une hausse du taux circulant d'IL-6 (Fearon *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1996; Krzystek-Korpacka *et al.*, 2007; Op den Kamp *et al.*, 2013b). De plus, il a été montré qu'un taux élevé d'IL-6 était corrélé à une durée de survie réduite chez les patients cachectiques (Scott *et al.*, 1996; Read *et al.*, 2007; Moses *et al.*, 2009; Suh *et al.*, 2013). Chez des animaux portant des tumeurs de différents types, une augmentation du taux circulant d'IL-6 était également observée (McIntosh *et al.*, 1989; Utsumi *et al.*, 1990; Mehl *et al.*, 2005b; Baltgalvis *et al.*, 2008; Penna *et al.*, 2010b; Bonetto *et al.*, 2011). L'injection de cellules CHO (Chinese hamster ovary) surexprimant le gène murin de l'IL-6 à des souris nude provoquait une perte de poids et une cachexie extrêmement sévère (Black *et al.*, 1991). En outre, une étude chez des souris cachectiques C26 a mis en évidence une augmentation du taux d'IL-6 corrélée au développement de la cachexie associée au cancer. Dans cette même étude, si la tumeur primaire était réséquée, les souris gagnaient du poids et le niveau sérique d'IL-6 était diminué (Strassmann *et al.*, 1992). Enfin, il a été montré que l'IL-6 était capable d'inhiber l'activité de la LPL dans le tissu adipeux de souris *in vivo* (Greenberg *et al.*, 1992), et qu'une atrophie musculaire était observée chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-6 (Tsujinaka *et al.*, 1996).

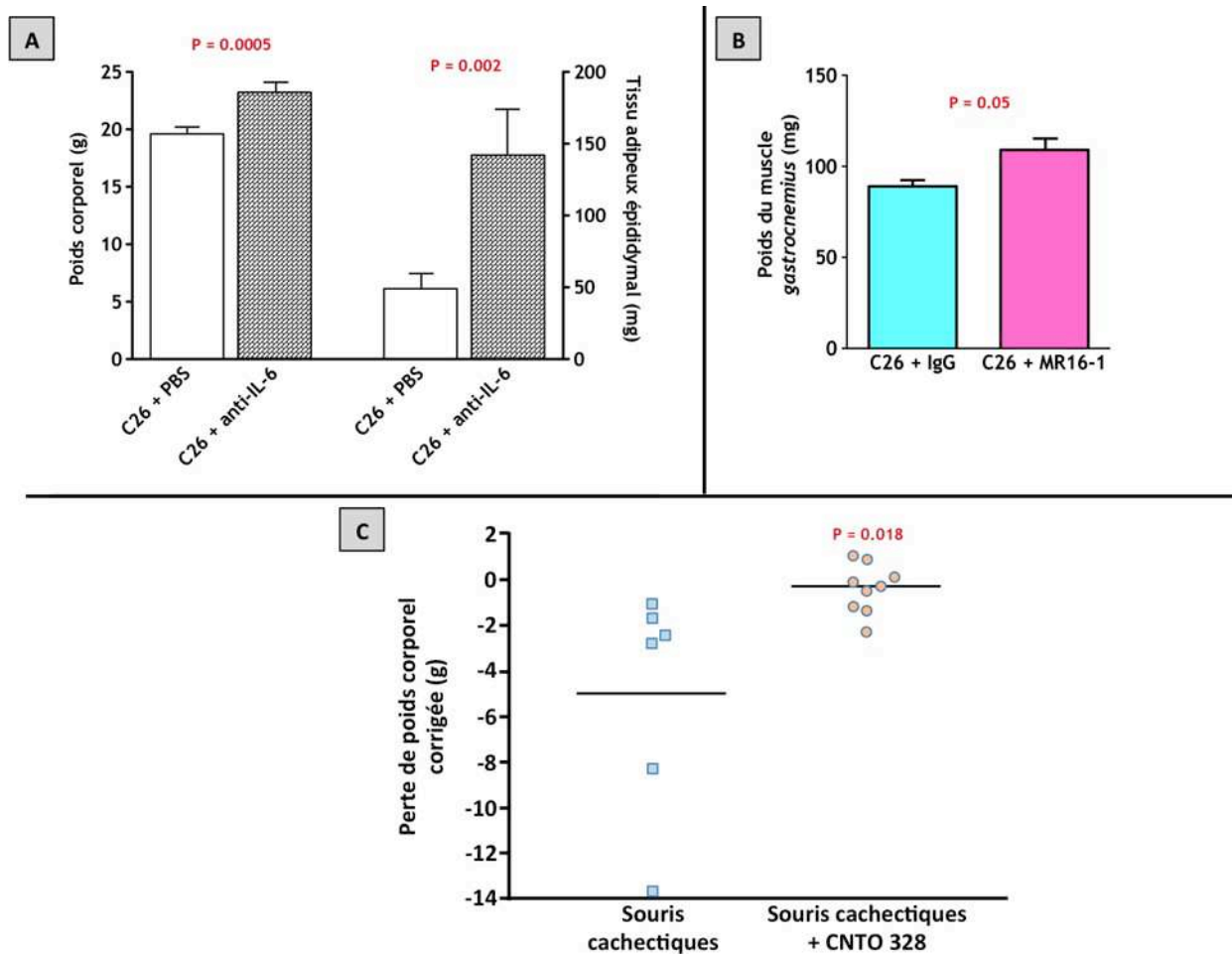


Figure 17 : L'utilisation d'anticorps anti-IL-6 ou d'inhibiteur d'IL-6 prévient le développement de la cachexie associée au cancer.

A. Souris cachectiques C26 subissant une injection intrapéritonéale d'une solution saline (PBS) ou subissant une injection d'un anticorps anti-IL-6. Poids de corps et poids du tissu adipeux épидidymal après seize jours de protocole [d'après (Strassmann *et al.*, 1992)].

B. Souris cachectiques C26 inoculées avec une immunoglobuline de type G ou avec anticorps contre le récepteur à l'IL-6 (MR16-1). Poids du muscle *gastrocnemius* après dix-sept jours de protocole [d'après (Fujita *et al.*, 1996)].

C. Souris cachectiques subissant l'injection ou non d'un anticorps monoclonal chimérique anti-IL-6 (CNTO 328). Perte de poids corporel corrigée après vingt-huit jours de protocole [d'après (Zaki *et al.*, 2004)].

L'utilisation d'un anticorps monoclonal murin contre l'IL-6 était capable de supprimer de façon significative le développement de paramètres clés (perte de poids et perte de tissu adipeux) de la cachexie chez des souris cachectiques C26 (Strassmann *et al.*, 1992) (Figure 17A). Chez le même modèle murin cachectique, l'utilisation d'un anticorps bloquant le récepteur à l'IL-6, provoquait une diminution de 69% de l'atrophie du muscle *gastrocnemius* (Fujita *et al.*, 1996) (Figure 17B). L'administration orale d'un inhibiteur de l'IL-6, le 20S,21-epoxy-resibufogenin-3 acétate connu sous l'acronyme ERBA, à des souris cachectiques C26 prévenait leur perte de poids (Enomoto *et al.*, 2004). Enfin, l'administration de CNTO 328, un anticorps monoclonal chimérique anti-IL-6, à des souris cachectiques, bloquait la perte de poids (Zaki *et al.*, 2004) (Figure 17C).

Une étude chez des souris cachectiques $Apc^{Min/+}$ a également mis en évidence la responsabilité de l'IL-6 dans la cachexie associée au cancer. En effet, dans ce modèle cachectique murin, l'inactivation du gène codant la protéine IL-6 prévenait le développement de la cachexie (Baltgalvis *et al.*, 2008), comme il avait été mis en évidence précédemment chez des souris déficientes pour l'IL-6 (Cahlin *et al.*, 2000). Néanmoins, la surexpression de l'IL-6 chez des souris sauvages n'induisait pas le développement d'une cachexie (Baltgalvis *et al.*, 2008), suggérant que l'IL-6 n'agit pas directement comme un facteur catabolique.

c) L'interleukine (IL)-1 β

Tout comme le TNF- α , l'IL-1 β inhibait l'activité de la LPL chez des cellules préadipocytaires 3T3-L1 (Beutler & Cerami, 1985; Kawakami *et al.*, 1987). De plus, l'IL-1 β semblerait avoir un rôle potentiel dans la cachexie associée au cancer, puisque l'injection intratumorale d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 β réduisait significativement le processus cachectique chez des souris cachectiques C26 (Strassmann *et al.*, 1993). Néanmoins, d'autres études utilisant la présence d'un antagoniste naturel du récepteur à l'IL-1 β (IL-1ra), n'ont pas réussi à mettre en évidence un rôle de l'IL-1 β chez des modèles de rongeurs cachectiques (Costelli *et al.*, 1995b; Yasumoto *et al.*, 1995). Le manque d'observations scientifiques claires ne permet pas de conclure quant à un rôle majeur d'IL-1 β dans la cachexie associée au cancer.

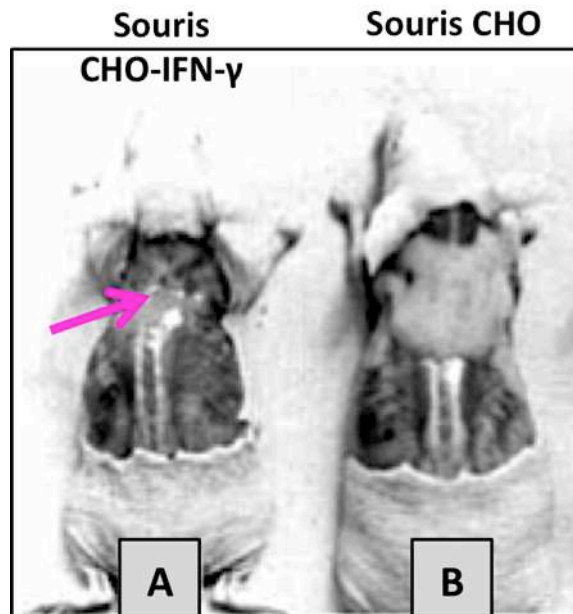


Figure 18 : Souris nude inoculées avec des cellules CHO surexprimant le gène murin de l'IFN- γ humain (A) ou avec des cellules CHO seules (B).

La photographie a été prise trois jours après le début du protocole. La peau des souris a été disséquée pour montrer la présence (souris CHO) ou l'absence (flèche rose ; souris CHO-IFN- γ) de tissu adipeux inter-scapulaire [modifié d'après (Matthys *et al.*, 1991a)].

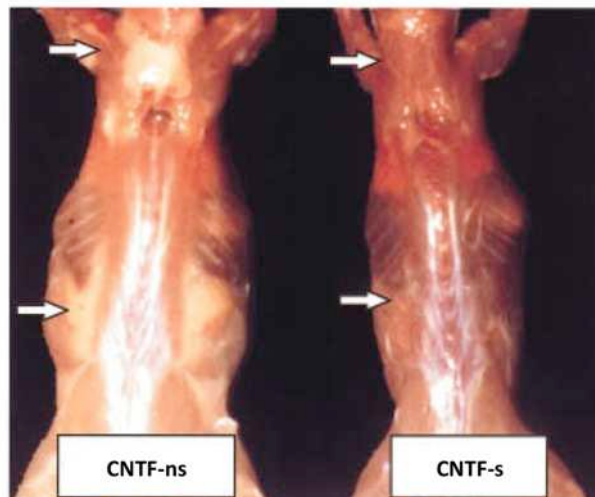


Figure 19 : Souris implantées avec des cellules de gliome C6 sécrétant le CNTF (CNTF-s) ou non (CNTF-ns).

La photographie a été prise sept jours après le début du protocole. La peau des souris a été disséquée pour montrer les structures sous-jacentes. Les flèches indiquent les sites de dépôt du tissu adipeux [modifié d'après (Henderson *et al.*, 1996)].

d) L'interféron (IFN)- γ

Comme cela a été décrit pour le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β , l'IFN- γ inhibe l'activité de la LPL (Patton *et al.*, 1986). De plus, il augmente également l'activité lipolytique *in vitro* (Patton *et al.*, 1986). Différentes études ont rapporté que l'IFN- γ avait un rôle central dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer. En effet, Patrick Matthys et son équipe ont montré que l'injection de cellules CHO surexprimant le gène murin de l'IFN- γ à des souris nude provoquait une cachexie extrêmement sévère (Matthys *et al.*, 1991a) (Figure 18). L'injection d'IFN- γ recombinant à des rats provoquait également des effets cachectiques tout au long de la période d'administration (Langstein *et al.*, 1991).

De plus, chez des souris cachectiques LLC, un traitement basé sur l'injection d'un anticorps monoclonal contre l'IFN- γ neutralisait le développement du processus cachectique (Matthys *et al.*, 1991b). Chez des rats transplantés avec des cellules de sarcome induit par le méthycholanthrène, l'injection d'un anticorps contre l'IFN- γ atténuait la cachexie (Langstein *et al.*, 1991).

e) Le ciliary neurotrophic factor (CNTF)

Une autre cytokine, le CNTF, a été proposée comme pouvant être impliquée dans la cachexie associée au cancer. En effet, l'implantation de cellules de gliome C6 sécrétant le CNTF ou l'injection de CNTF humain recombinant chez des rongeurs provoquaient le développement rapide d'une cachexie (Henderson *et al.*, 1994; Henderson *et al.*, 1996) (Figure 19).

f) Le leukemia inhibitory factor (LIF)

Le LIF aurait également un rôle dans la cachexie associée au cancer. Des souris cachectiques C26 présentaient une hausse du taux circulant de LIF (Bonetto *et al.*, 2011). De plus, des souris greffées avec une lignée cellulaire hématopoïétique modifiée pour sécréter le LIF développaient une cachexie conduisant à la mort des animaux (Metcalf & Gearing, 1989). Enfin, il a été montré que des souris transplantées avec des cellules de mélanome humain produisant constitutivement le LIF, présentaient une cachexie sévère (Mori *et al.*, 1991) (Figure 20, ci-après).

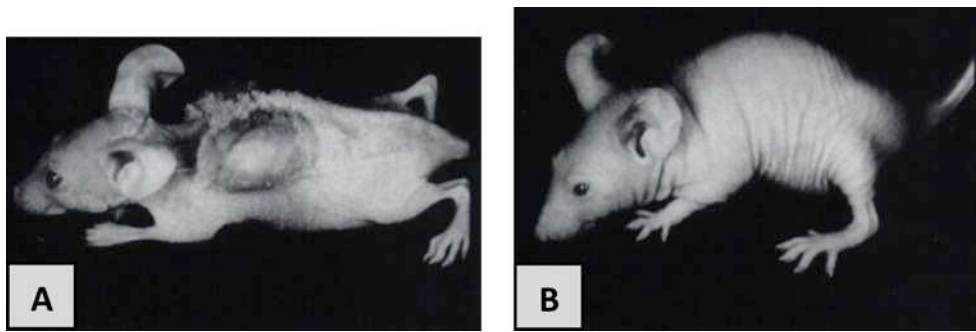


Figure 20 : Souris inoculée (A) ou non (B) avec une lignée cellulaire de mélanome humain sécrétant le LIF.
Les photographies ont été prises dix-huit jours après le début du protocole [modifié d'après (Mori *et al.*, 1991)].

Composé	Poids moléculaire	Référence
« LMF de Kitada »	Inférieur à 10 kDa	Kitada <i>et al.</i> , 1981
« LMF de Taylor »	6 kDa	Taylor <i>et al.</i> , 1992
Toxohormone-L	70-75 kDa	Masuno <i>et al.</i> , 1981 Masuno <i>et al.</i> , 1984
« LMF de Todorov »	43 kDa	Todorov <i>et al.</i> , 1998

Tableau 3 : Les divers types de LMF référencés.

B. Les cytokines anti-inflammatoires

Certaines cytokines sont connues pour avoir une activité anti-inflammatoire et anti-cachectique. Kazushige Mori et son équipe ont notamment montré que l'injection d'interleukine-12 (IL-12) recombinante à des souris cachectiques C26 empêchait le développement de la cachexie associée au cancer (Mori *et al.*, 1996). A l'aide du même modèle murin cachectique, il a été montré que la transfection du gène murin de l'interleukine-10 (IL-10) prévenait l'apparition de la cachexie (Fujiki *et al.*, 1997). Toujours à l'aide de souris cachectiques C26, il a été mis en évidence que la transfection du gène murin de l'interleukine-4 (IL-4) retardait le début des symptômes de la cachexie, réduisait l'anorexie et augmentait la survie (Sturlan *et al.*, 2002). L'interleukine-15 (IL-15) est connue pour ses effets anabolisants sur la masse musculaire squelettique (Quinn *et al.*, 1995; Quinn *et al.*, 2002). Chez des rats cachectiques YAH-130, il a été montré que l'IL-15 en inhibant directement la protéolyse (Busquets *et al.*, 2005), prévenait la fonte musculaire (Carbo *et al.*, 2000).

2. Les lipid mobilizing factor (LMF)

A partir de préparations non viables de cellules du carcinome Krebs-2, Giovanni Costa et James F. Holland ont pu provoquer *in vivo* une perte de poids, et en particulier une perte de tissu adipeux d'une manière similaire à celle provoquée par des préparations viables, suggérant ainsi que la fonte des réserves adipeuses n'est pas uniquement le fait du métabolisme tumoral (Costa & Holland, 1962). Une autre étude a montré que si du sérum de souris porteuses d'un lymphome, était injecté à des souris saines, cela produisait une mobilisation rapide des lipides (Kitada *et al.*, 1980). La purification de ce facteur mobilisant les lipides (LMF) a mis en évidence qu'il s'agissait d'une protéine thermostable ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa (Kitada *et al.*, 1981) (Tableau 3). Néanmoins, une étude ultérieure a suggéré la nécessité d'une agrégation de ce facteur à une fraction de haut poids moléculaire pour son activité (Kitada *et al.*, 1982). Un autre LMF d'une masse moléculaire de 6 kDa, qui était de nature acide, a été isolé à partir d'un milieu conditionné d'une lignée cellulaire de mélanome humain A375. Ce composé est également thermostable et résistant à la dégradation par les enzymes protéolytiques (Taylor *et al.*, 1992) (Tableau 3). Enfin, un LMF d'un poids moléculaire de 70-75 kDa, également de nature acide et converti par la trypsine en un matériau de faible poids moléculaire, a aussi été isolé à partir du liquide

d'ascites de patients avec un hépatome, et de souris transplantées avec des cellules d'ascite de sarcome 180 (Masuno *et al.*, 1981; Masuno *et al.*, 1984). Ce LMF a été appelé la toxohormone-L (Tableau 3).

La perte de poids et la mobilisation des lipides lors de la cachexie associée au cancer peuvent être attribuées à un facteur catabolique produit par la tumeur, qui agit directement sur le tissu adipeux (Beck & Tisdale, 1987). Chez des patients cachectiques, il a été montré que l'activité du LMF présent dans le sérum de patients est proportionnelle à la perte de poids (Groundwater *et al.*, 1990). Dans le but de caractériser et d'isoler le facteur mobilisant les lipides, Penio T. Todorov et ses collaborateurs ont identifié un facteur présent dans le sérum de souris cachectiques MAC16, ainsi que dans l'urine et le sérum de patients cachectiques (Todorov *et al.*, 1998). Ce facteur présente un poids moléculaire de 43 kDa et est homologue à une protéine isolée dans le plasma humain appelée Zn- α_2 -glycoprotéine (ZAG) (Burgi & Schmid, 1961), de part sa séquence en acides aminés, sa mobilité électrophorétique et son immuno-réactivité (Hirai *et al.*, 1998; Todorov *et al.*, 1998) (Tableau 3). ZAG est également exprimé dans le tissu adipeux blanc et brun, le foie, le cœur et le tissu pulmonaire (Tada *et al.*, 1991; Bing *et al.*, 2004), ainsi que par les cellules tumorales (Hale *et al.*, 2001). Malgré ces évidences, il existe un certain flou autour de l'identité du LMF. Le LMF le plus étudié est celui décrit par l'équipe de Penio T. Todorov (Todorov *et al.*, 1998). Comme nous l'avons décrit, le « LMF de Todorov » possède de nombreuses similarités avec le ZAG. Néanmoins, bien qu'il existe une séquence codante pour ZAG, aucune n'a été décrite pour le « LMF de Todorov ».

Quand le LMF est injecté à des souris, il provoque une augmentation de la lipolyse (Hirai *et al.*, 1998). Ce facteur agit directement sur les adipocytes de façon similaire aux hormones lipolytiques (Tisdale & Beck, 1991; Khan & Tisdale, 1999). Les effets lipolytiques du LMF chez les rongeurs semblent être principalement sous la commande des récepteurs β_3 -adrénergiques (Russell *et al.*, 2002) dans les adipocytes, un peu sous celle des récepteurs β_2 -adrénergiques et aucunement sous celle des récepteurs β_1 -adrénergiques (Russell & Tisdale, 2012), alors qu'ils seraient dépendants des récepteurs β_1 -adrénergiques dans les adipocytes chez l'humain (Cao *et al.*, 2010). Il a également été montré que le tissu adipeux de souris et de patients cachectiques présentait une sensibilité augmentée aux stimuli lipolytiques. Ceci était caractérisé par une augmentation de l'expression de la sous-unité

stimulatrice de la protéine G, $G\alpha_s$, et une inhibition de la sous-unité inhibitrice, $G\alpha_i$, induites par le LMF (Islam-Ali *et al.*, 2001).

Une étude a montré que LMF et ZAG causaient la stimulation de l'adénylate cyclase dans la membrane plasmique d'adipocytes murins et la libération de glycérol à partir d'adipocytes isolés (Hirai *et al.*, 1998). Dans le tissu adipeux de souris cachectiques MAC16, l'expression du gène et de la protéine ZAG est fortement augmentée (Bing *et al.*, 2004). De plus, l'administration de ZAG est responsable d'une réduction importante de la quantité de tissu adipeux chez des souris normales et dans un modèle murin d'obésité (Hirai *et al.*, 1998; Russell & Tisdale, 2010). Chez des souris déficientes pour le gène ZAG ($Zag^{-/-}$), il a été montré un gain de poids et une réduction de la lipolyse dans les adipocytes, par rapport à des souris sauvages (Rolli *et al.*, 2007). ZAG est également responsable d'une augmentation de l'expression protéique de HSL et d'ATGL dans les adipocytes et le tissu adipeux de souris (Russell & Tisdale, 2011b). Chez des patients atteints d'un cancer, la cachexie est associée à une augmentation de l'expression du gène et de la protéine ZAG (Haugen *et al.*, 2011; Mracek *et al.*, 2011). Récemment, une augmentation significative de la protéine ZAG dans le sérum a été rapportée chez des souris sauvages portant une tumeur et chez des souris $Atgl^{-/-}$ portant une tumeur (Das *et al.*, 2011). Néanmoins, les souris $Atgl^{-/-}$ ne présentaient aucune cachexie associée au cancer comparées aux souris sauvages (Das *et al.*, 2011). D'autres études montrent l'implication de ZAG dans l'utilisation des lipides. En effet, ZAG favorise une augmentation de l'expression des protéines découplantes (UCP pour uncoupling protein) dans le tissu adipeux brun (Bing *et al.*, 2002; Russell & Tisdale, 2011a), et améliore l'oxydation des acides gras (Russell & Tisdale, 2010, 2011a) dans des modèles de rongeurs cachectiques. ZAG pourrait donc être un facteur important de la modulation du métabolisme lipidique et de l'atrophie du tissu adipeux en cas de cachexie associée au cancer.

3. Le proteolysis-inducing factor (PIF)

En utilisant un anticorps monoclonal dérivé des splénocytes de souris cachectiques MAC16, Penio T. Todorov *et al.* ont identifié un antigène d'un poids moléculaire de 24 kDa. Cette molécule est identique d'un point de vue immunologique dans l'adénocarcinome murin MAC16 et dans l'urine de patients avec une cachexie associée au cancer (Todorov *et al.*, 1996a). Au contraire, cette molécule est absente chez les individus sains, chez les

patients non cachectiques mais atteints d'un cancer, chez les patients gravement brûlés ou encore chez les patients septiques (Todorov *et al.*, 1996a; Cariuk *et al.*, 1997). Cet antigène est une glycoprotéine sulfatée (Todorov *et al.*, 1997). Sa séquence en acides aminés est identique chez la souris (Todorov *et al.*, 1996a), et chez l'homme (Cariuk *et al.*, 1997). Cette molécule nommée Proteolysis-Inducing Factor (PIF), également connue chez l'humain sous le nom de Human Cachexia Associated Protein (HCAP) (Akerblom & Murry, 1998; Wang *et al.*, 2003b), produit *in vivo* une cachexie en induisant le catabolisme du muscle squelettique (Todorov *et al.*, 1996a). Elle est produite et sécrétée par les cellules tumorales chez l'humain (Todorov *et al.*, 1999; Hussey *et al.*, 2000; Cabal-Manzano *et al.*, 2001), et sa présence dans les urines est corrélée à la perte de poids des patients (Wigmore *et al.*, 2000). L'expression de PIF est négativement corrélée à la durée de survie chez des patients avec un NSCLC de stade II à IV (Wang *et al.*, 2010). Le PIF diffère des cytokines par son absence d'homologie de séquence avec celles-ci (Todorov *et al.*, 1996b), et par sa stabilité à une température de 60°C pendant cinq minutes (Smith & Tisdale, 1993b). Ce facteur a des effets directs sur l'homéostasie des protéines du muscle squelettique. En effet, il a été montré que l'administration de PIF chez des souris saines causait une perte de poids importante concomitante d'une perte de masse musculaire (Todorov *et al.*, 1996a; Lorite *et al.*, 1997). Cette perte de tissu musculaire était associée à une augmentation de 50% de la protéolyse et une réduction de 50 à 60% de la protéosynthèse *in vivo* (Todorov *et al.*, 1996a; Lorite *et al.*, 1997). Le muscle squelettique possède des récepteurs pour le PIF (Todorov *et al.*, 2007). PIF est capable d'induire une fonte musculaire *in vitro et in vivo* par un mécanisme impliquant la voie protéolytique ubiquitine-protéasome (Lorite *et al.*, 1998; Lorite *et al.*, 2001). En effet, PIF induit une augmentation de la transcription des gènes clés du système ubiquitine-protéasome *in vitro et in vivo* dans le muscle (Lorite *et al.*, 1998; Lorite *et al.*, 2001; Wyke & Tisdale, 2005), ainsi que l'induction hépatique de la RPA et de la production de cytokines pro-inflammatoires (Watchorn *et al.*, 2001; Watchorn *et al.*, 2002).

La prostaglandine E₂ (PGE₂) pourrait être un médiateur intracellulaire du processus protéolytique déclenché par PIF. En effet, l'incubation du muscle *gastrocnemius* isolé avec du sérum issu de souris cachectiques MAC16 contenant PIF entraîne une augmentation de la dégradation protéique et une augmentation significative du contenu en PGE₂ (Smith & Tisdale, 1993b). *In vivo*, chez les souris cachectiques MAC16, l'induction de la dégradation protéique était également accompagnée d'une augmentation de l'activité de la PGE₂

(Cariuk *et al.*, 1997; Lorite *et al.*, 1997). Un traitement avec un acide gras polyinsaturé, l'acide eicosapentaénoïque (EPA), empêchait la production de PGE₂ *in vitro* (Smith & Tisdale, 1993b), et *in vivo* (Lorite *et al.*, 1997), et inhibait la dégradation protéique *in vitro* (Smith & Tisdale, 1993b; Lorite *et al.*, 1997).

Malgré ces évidences, il existe un débat sur l'existence de PIF. En effet, plusieurs études ont été incapables d'identifier le facteur en dehors du modèle murin cachectique MAC16, et éprouvent des difficultés à identifier un homologue humain par les méthodes conventionnelles, jetant le doute quant à la pertinence d'un homologue de PIF dans un contexte clinique (Monitto *et al.*, 2004; Wieland *et al.*, 2007; Baracos, 2008).

En résumé, la cachexie associée au cancer peut être caractérisée par :

- La présence ou non d'une anorexie
- Une augmentation de la DER
- Une perte de poids au détriment des compartiments musculaires et adipeux
- Une altération du métabolisme glucidique
- Une augmentation du catabolisme lipidique
- Une augmentation du catabolisme protéique
- Une activation de la RPA
- Une production de cytokines pro- et anti-inflammatoires
- Une production de LMF/ZAG
- Une production de PIF

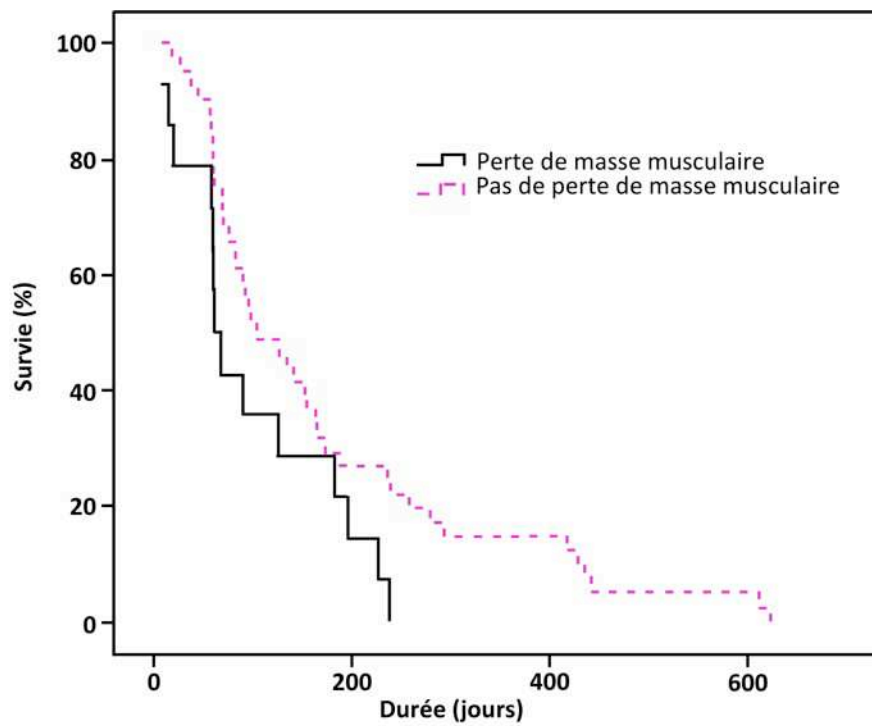


Figure 21 : Courbe de survie de patients atteints d'un cancer, présentant (en noir) ou non (en rose fuschia) une perte de masse musculaire. [modifié d'après (Prado *et al.*, 2009)].

Chapitre II : Mécanismes moléculaires mis en jeu dans la cachexie associée au cancer

Le muscle strié squelettique qui représente 30 à 40% du poids corporel de l'homme (Passmore & Draper, 1964; Janssen *et al.*, 2000), est un tissu essentiel à de nombreuses fonctions comme la respiration, la locomotion, le maintien postural, la thermorégulation et le métabolisme. Ce tissu constitue un énorme réservoir de protéines, notamment de protéines myofibrillaires, puisqu'elles représentent 75 à 80% du volume de la fibre musculaire (Hoppeler, 1986).

Dans le cas de la cachexie associée au cancer, la perte de masse musculaire est un puissant facteur pronostic (Martin *et al.*, 2013). En effet, une diminution de la masse musculaire est corrélée à une augmentation de la toxicité des traitements sur l'organisme et une réduction de la survie (Prado *et al.*, 2009) (Figure 21). Enfin, la perte de masse musculaire semble jouer un rôle dans la défaillance respiratoire observée en cas de cancer : il a été constaté chez des souris cachectiques C26, une atrophie et une faiblesse musculaire du diaphragme associées à un dysfonctionnement du système ventilatoire (Roberts *et al.*, 2013).

La régulation de la masse musculaire dépend de l'équilibre entre l'anabolisme et le catabolisme des protéines. La perte de masse musculaire peut être le résultat d'une diminution de la protéosynthèse, d'une augmentation de la protéolyse ou d'une combinaison de ces deux mécanismes (Favier *et al.*, 2008; Glass, 2010b). Comme nous l'avons décrit précédemment, il existe une interaction complexe entre la synthèse et la dégradation, au cours de la cachexie associée au cancer.

I. La balance synthèse / dégradation des protéines au cours de la cachexie associée au cancer

1. La voie PI3K/Akt/mTOR

Dans le muscle squelettique, il existe une voie initiatrice de la synthèse des protéines, la voie de signalisation phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR). Cette voie est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire, et plus spécifiquement dans la croissance des fibres musculaires (Bodine *et al.*, 2001b; Fingar *et al.*, 2002). Son activation conduit généralement à une hypertrophie musculaire, alors que

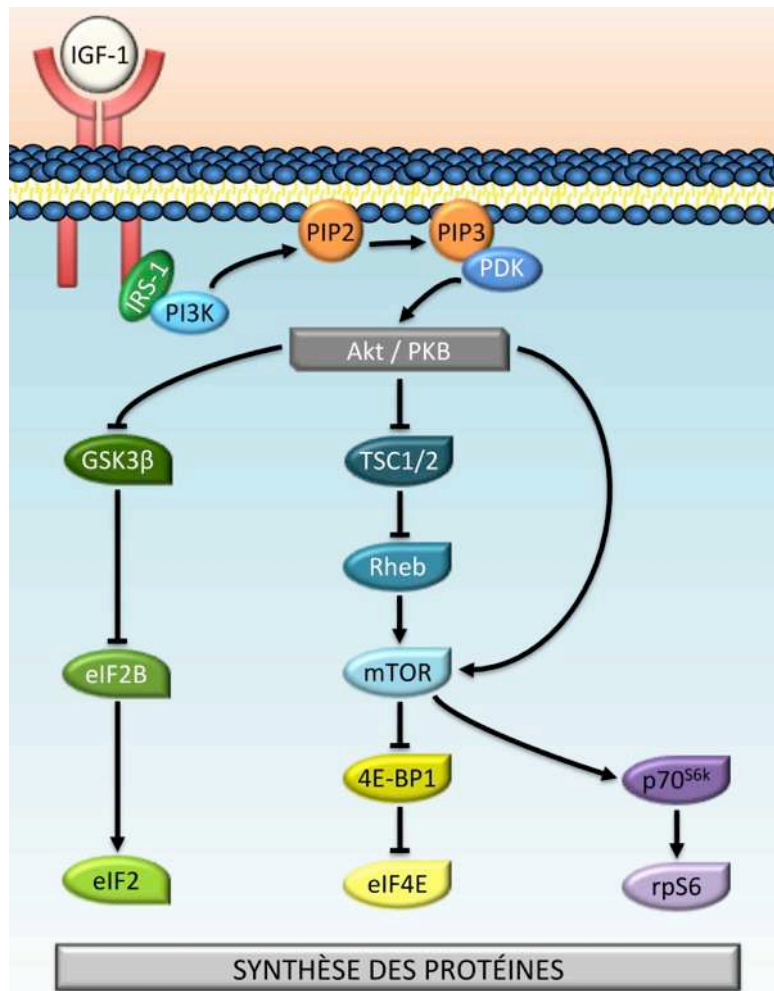


Figure 22 : Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.

Akt/PKB, protéine kinase B ; eIF2B, facteur d'initiation de la traduction 2B (ang., eukaryotic initiation factor 2B) ; eIF4E, facteur d'initiation de la traduction 4E (ang., eukaryotic initiation factor 4E) ; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; IGF-1, insulin-growth factor-1 ; IRS-1, substrat du récepteur à l'insuline (ang., insulin receptor substrate-1) ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; PDK, 3' phosphoinositide-dependant kinase ; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase ; PIP2, phosphatidylinositol 4,5 diphosphate ; PIP3, phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate ; Rheb, Ras homology enriched in brain ; rpS6, protéine ribosomale S6 (ang., ribosomal protein S6) ; p70S6k, protéine kinase de la protéine ribosomale S6 ; 4E-BP1, 4E-binding protein 1 ; TSC1/2, tuberous sclerosis complex 1/2.

son inhibition s'accompagne généralement d'une atrophie (Favier *et al.*, 2008; Glass, 2010b).

A. Généralités

Les événements moléculaires déclenchés par la fixation de l'insulin-like growth factor (IGF)-1 sur son récepteur membranaire sont maintenant bien connus (Figure 22). Cette fixation induit une modification de la conformation et une autophosphorylation du récepteur, puis la phosphorylation du substrat du récepteur à l'insuline (IRS-1 pour insulin receptor substrate-1) (Sun *et al.*, 1991). Ces événements conduisent à l'activation de PI3K, une kinase à lipide qui va phosphoryler le phosphatidylinositol 4,5 diphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate (PIP3), fournissant ainsi un site de fixation au niveau de la membrane pour la protéine sérine-thréonine kinase Akt (appelée aussi PKB pour protéine kinase B). Au contact de la membrane, Akt est phosphorylée sur son résidu thréonine 308 par 3' phosphoinositide-dépendant kinase (PDK) (Alessi *et al.*, 1997). Akt est également phosphorylée sur son résidu sérine 473 par la protéine kinase mTOR (Sarbassov *et al.*, 2005; Jacinto *et al.*, 2006). Sous forme phosphorylée active, Akt va phosphoryler en aval plusieurs substrats qui participent à la régulation de l'initiation de la synthèse des protéines. Akt phosphoryle et inactive la protéine tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) du complexe TSC1/TSC2 (Inoki *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002). TSC2 en association avec TSC1 inactive Ras homology enriched in brain (Rheb) (Tee *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). L'inactivation du complexe TSC1/TSC2 permet l'activation de mTOR (Inoki *et al.*, 2002; Tee *et al.*, 2002), par l'intermédiaire de Rheb (Inoki *et al.*, 2003). mTOR est à l'origine de l'activation de la protéine kinase de la protéine ribosomale S6 (p70^{S6k}) (von Manteuffel *et al.*, 1996), impliquée dans le contrôle de la traduction de certains ARNm codant pour des protéines régulatrices de la traduction. mTOR sera aussi à l'origine de l'inactivation de PHAS-1 appelé aussi 4E-binding protein 1 (4E-BP1), un répresseur de l'initiation de la traduction (Hara *et al.*, 1997). Enfin, l'activation d'Akt sera aussi à l'origine de la phosphorylation sur le résidu sérine 9 et de l'inhibition de la protéine glycogène synthase kinase 3 β (GSK3 β) (Cross *et al.*, 1995), la fonction naturelle de GSK3 β étant d'inhiber la traduction, notamment par la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction 2B (eIF2B pour eukaryotic initiation factor 2B) (Welsh *et al.*, 1998).

B. La voie PI3K/Akt/mTOR dans le muscle squelettique

La voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR a été caractérisée comme un régulateur clé de l'hypertrophie musculaire. Un des principaux régulateurs positifs de cette voie est l'IGF-1 (Rommel *et al.*, 2001). Dès 1991, il a été décrit *in vitro* sur des cellules musculaires différenciées, que l'IGF-1 augmentait d'environ 80% le diamètre des myotubes (Vandenberg *et al.*, 1991). La surexpression d'IGF-1 dans le muscle induit aussi une hypertrophie musculaire (Coleman *et al.*, 1995; Musaro *et al.*, 2001). Il a aussi été montré que l'expression d'une forme active de la protéine Akt dans le muscle squelettique est suffisante pour induire une hypertrophie musculaire aussi bien *in vitro* (Rommel *et al.*, 2001), qu'*in vivo* (Bodine *et al.*, 2001b; Pallafacchina *et al.*, 2002). *In vitro*, dans des myotubes C2C12, la rapamycine, un inhibiteur de mTOR, bloque l'activation de p70^{S6k} contrôlée par Akt et IGF-1 (Rommel *et al.*, 2001). *In vivo*, l'inhibition d'Akt par la rapamycine bloque l'hypertrophie compensatrice induite par un protocole de surcharge fonctionnelle chez le rat (Bodine *et al.*, 2001b). De façon similaire, la rapamycine bloque, *in vivo*, l'hypertrophie musculaire induite par une forme active d'Akt (Pallafacchina *et al.*, 2002). Des souris transgéniques surexprimant une forme constitutionnellement active de la protéine Akt présentent également une hypertrophie musculaire (Lai *et al.*, 2004). Enfin, l'expression d'une forme inactive de GSK3 β provoque *in vitro* une hypertrophie marquée de myotubes en culture (Rommel *et al.*, 2001).

Au contraire, au cours de protocoles de décharge fonctionnelle, de dénervation, d'hypoxie chronique ou de section du tendon, l'état de phosphorylation d'Akt, de mTOR, de p70^{S6k}, et de GSK3 β est diminué (Bodine *et al.*, 2001b; Hornberger *et al.*, 2001; Reynolds *et al.*, 2002; Favier *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012), tout comme la quantité des formes totales d'Akt et de mTOR (Bodine *et al.*, 2001b; Favier *et al.*, 2010). Chez des souris âgées, il a également été mis en évidence une diminution de la phosphorylation de p70^{S6k} et de GSK3 β (Penna *et al.*, 2010a). Chez l'humain, après une période de désentraînement, une atrophie musculaire est observée et est associée à une diminution de la phosphorylation d'Akt et de GSK3 β (Leger *et al.*, 2006). La voie PI3K/Akt/mTOR régule également les effecteurs de la protéolyse. En effet, il a été montré que l'augmentation de l'expression des transcrits de Muscle Atrophy F-box (MAFbx)/atrogen-1, et de Muscle RING Finger 1 (MuRF1) observée au cours d'une atrophie, peut être bloquée par un traitement à l'IGF-1 (Lee *et al.*, 2004; Satchek *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004). Il a également été observé que la

surexpression d'Akt était suffisante pour bloquer l'augmentation de la transcription de MAFbx/atrogin-1 et de MuRF1 au cours d'une atrophie (Stitt *et al.*, 2004). Le mécanisme par lequel Akt inhibe l'augmentation de l'expression des transcrits de MAFbx/atrogin-1 et de MuRF1, implique les facteurs de transcription forkhead box O (FoxO) (Lee *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2004; Stitt *et al.*, 2004).

C. Implication de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la cachexie associée au cancer

Chez des rats et des souris cachectiques, ainsi que sur des biopsies musculaires humaines de patients atteints d'un cancer gastrique, une diminution de l'expression du transcrit de l'IGF-1 dans le muscle a été mise en évidence (Costelli *et al.*, 2006; Penna *et al.*, 2010a; White *et al.*, 2011; Bonetto *et al.*, 2013). De plus, il a été montré qu'un traitement à l'IGF-1 réduisait la perte de poids et la perte de masse musculaire chez l'animal (Ng *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 2011), et améliorait la survie (Schmidt *et al.*, 2011). Chez des souris cachectiques, il a été observé une diminution de la quantité de la forme totale de p70^{S6k} (Murphy *et al.*, 2013b), de la phosphorylation d'Akt (Asp *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2013a), de mTOR (Eley *et al.*, 2007b; Russell *et al.*, 2009; White *et al.*, 2011), et de p70^{S6k} (Eley *et al.*, 2007b; White *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2013b). Il a également été mis en évidence une augmentation de la quantité du facteur d'initiation de la traduction 4E (eIF4E pour eukaryotic initiation factor 4E) lié à 4E-BP1 dans le muscle *gastrocnemius* (Eley *et al.*, 2007b; Russell *et al.*, 2009). Sur des biopsies musculaires de patients cachectiques, une réduction significative de la phosphorylation de mTOR, p70^{S6k} et de GSK3β a été observée, ainsi qu'une diminution de la quantité de la forme totale d'Akt (Schmitt *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données montre que l'atrophie musculaire observée au cours de la cachexie associée au cancer, implique une régulation négative de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR.

Néanmoins, au cours de la cachexie associée au cancer, une activation des substrats impliqués dans la voie de synthèse des protéines a pu être observée. Il a notamment été montré chez des animaux cachectiques une augmentation de l'expression du transcrit Akt (Bonetto *et al.*, 2011), de la phosphorylation d'Akt (Penna *et al.*, 2010a; White *et al.*, 2011; Padrao *et al.*, 2013; Puppa *et al.*, 2014), de GSK3β (Penna *et al.*, 2010a), de mTOR (Padrao *et al.*, 2013), et de p70^{S6k} (Acharyya *et al.*, 2005; Penna *et al.*, 2010a; Padrao *et al.*, 2013). Enfin sur des biopsies musculaires de patients cachectiques avec un NSCLC, une augmentation de

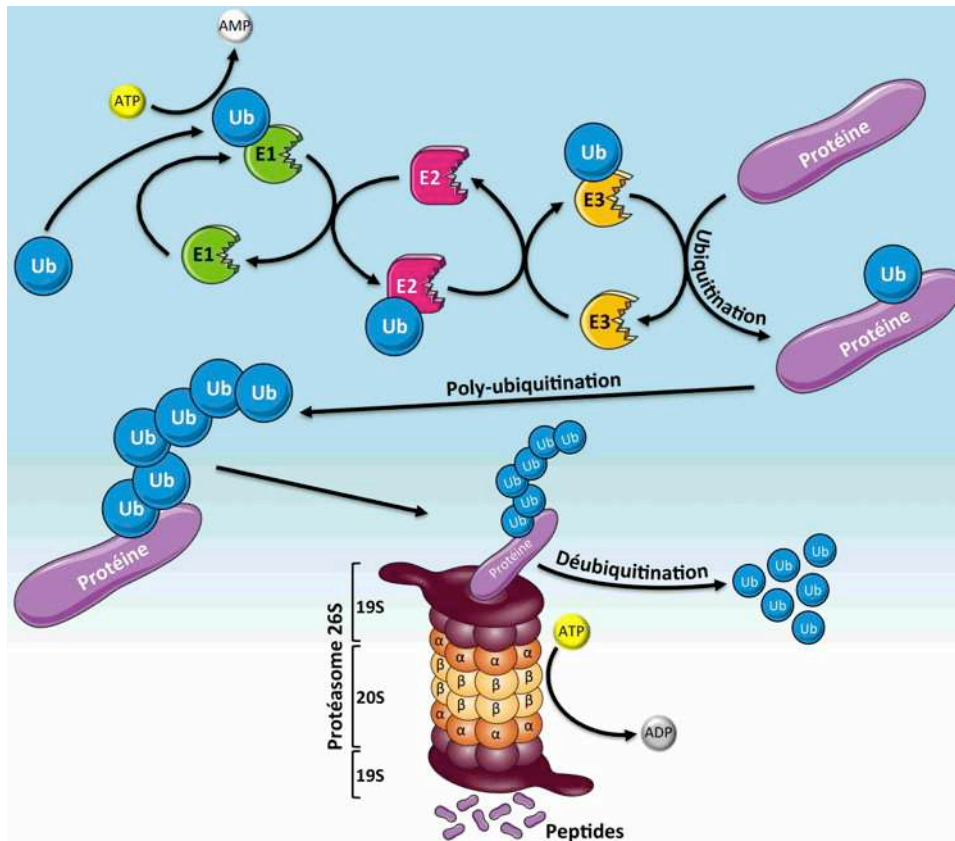


Figure 23 : Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome.

ADP, adénosine diphosphate ; AMP, adénosine monophosphate ; ATP, adénosine triphosphate ; E1, enzyme d'activation ; E2, enzyme de conjugaison ; E3, Ub ligase ; Ub, ubiquitine ; 19S, protéasome 19S ; 20S, protéasome 20S.

l'expression de la phosphorylation d'Akt a été mise en évidence (Op den Kamp *et al.*, 2013a). Les différences observées entre ces résultats et ceux des études précédentes peuvent s'expliquer en partie par la mise en place, au cours d'une atrophie musculaire, d'un processus compensatoire, afin de limiter, en vain, la perte de masse musculaire.

Dans le muscle squelettique, il existe trois systèmes protéolytiques majeurs responsables du catabolisme des protéines : le système ubiquitine-protéasome, le système autophagie-lysosome et les calpaïnes (Tisdale, 2009).

2. Le système protéolytique ubiquitine-protéasome

A. Généralités

Le système ubiquitine-protéasome est le responsable majeur de la dégradation des protéines musculaires, notamment chez les patients atteints de pathologies chroniques avec une perte de poids supérieure à 10% (Khal *et al.*, 2005a). Il dégrade les protéines myofibrillaires et la plupart des protéines solubles à durée de vie courte (Clarke *et al.*, 2007; Fielitz *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2009; Polge *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2012). Ce système fait intervenir deux étapes distinctes, dépendantes de l'adénosine triphosphate (ATP) : l'ubiquitination des substrats contrôlée par les enzymes d'ubiquitination, et la dégradation sélective des protéines (poly)ubiquitinées par le protéasome 26S (Figure 23).

L'ubiquitine (Ub), autrefois désignée par le nom APF1 pour ATP-dépendant Proteolysis Factor-1, est une protéine de 76 acides aminés et de 8.6 kDa (Ciechanover *et al.*, 1978). L'ubiquitination consiste en la conjugaison covalente d'une ou de plusieurs molécules d'Ub, sur un ou plusieurs résidus lysine de la protéine à dégrader, via une cascade enzymatique impliquant trois types d'enzymes : une enzyme d'activation (E1) qui active l'Ub de manière ATP-dépendante et se fixe à elle après la formation d'une liaison thiol-ester ; une enzyme de conjugaison (E2) sur laquelle est ensuite transférée l'Ub par trans-estérification ; et une Ub ligase (E3) qui permet le transfert de l'Ub sur son substrat protéique (Glickman & Ciechanover, 2002; Ciechanover, 2005) (Figure 23). Si une seule molécule d'Ub est associée à la protéine à dégrader, on parle de mono-ubiquitination. Dans le cas de la poly-ubiquitination, plusieurs molécules d'Ub sont associées à la protéine à dégrader, la première

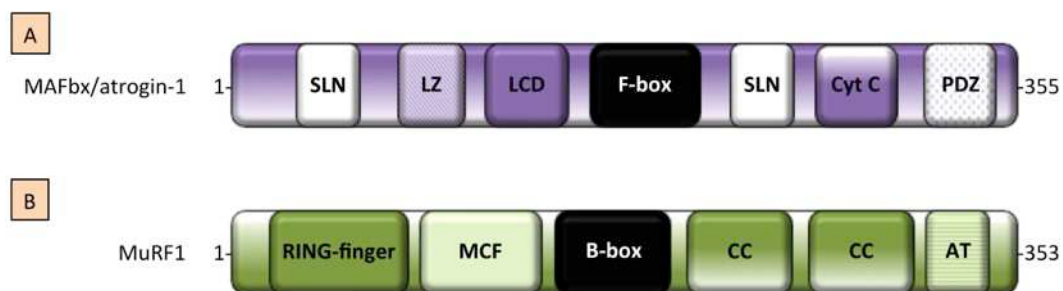


Figure 24 : Représentation schématique des protéines MAFbx/atrogin-1 et MuRF1 et de leurs domaines potentiels d'interaction protéine-protéine.

MAFbx/atrogin-1 et MuRF1 sont constituées respectivement de 355 et 353 acides aminés.

A. MAFbx/atrogin-1 comprend des signaux de localisation nucléaire (SLN), un motif de glissière à leucine (LZ), un domaine riche en résidus leucine (LCD), un domaine F-box et des domaines conservés comme PDZ et cytochrome C (Cyt C).

B. MuRF1 contient un domaine RING, une région conservée de la famille MuRF (MFC), un domaine B-box, deux domaines coiled-coil (CC) et une queue acide (AT).

molécule d'Ub est conjuguée à une lysine du substrat protéique, puis l'élongation de la chaîne de poly-ubiquitine se fait par l'addition successive de molécules d'Ub sur la lysine 11 (Baboshina & Haas, 1996), ou la lysine 48 (Chau *et al.*, 1989), de la molécule d'Ub précédemment conjuguée. Une fois l'étape de (poly)ubiquitination réalisée, l'Ub ou la chaîne de poly-ubiquitine sur la protéine à dégrader va servir de signal de reconnaissance pour la protéolyse par le protéasome 26S (Glickman & Ciechanover, 2002; Ciechanover, 2005) (Figure 23).

Le protéasome 26S est un complexe protéolytique multimérique de 2500 kDa, formé par l'association du protéasome 20S (le cœur protéolytique) à un complexe régulateur appelé protéasome 19S ou PA700, qui contrôle l'entrée du substrat (Glickman & Ciechanover, 2002; Ciechanover, 2005). Le protéasome 20S est une structure cylindrique composée de quatre anneaux. Les sous-unités α constituent les anneaux extérieurs et les sous-unités β constituent les anneaux intérieurs. Les anneaux α et β sont constitués de sept sous-unités, et les enzymes protéolytiques sont situées sur la face intérieure des anneaux β (Tanaka, 1998). Le substrat est déubiquitiné, ce qui permet le recyclage de l'Ub, puis il est dégradé en peptides (Glickman & Ciechanover, 2002; Ciechanover, 2005). Les produits finaux sont des peptides composés de six à neuf acides aminés (Kisselev *et al.*, 1999), qui sont ensuite dégradés par la tripeptidyl-peptidase II (Balow *et al.*, 1986).

B. Le système ubiquitine-protéasome dans le muscle squelettique

Les Ub ligases E3 sont les principaux déterminants de la spécificité de substrats et reconnaissent plusieurs motifs structuraux. Deux Ub ligases E3 (Figure 24), Muscle Atrophy F-box (MAFbx) appelée aussi atrogin-1, et Muscle RING Finger 1 (MuRF1), sont fortement exprimées au cours de l'atrophie musculaire dans un éventail de conditions (Bodine *et al.*, 2001a; Gomes *et al.*, 2001; Dehoux *et al.*, 2003; Lecker *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2006; Doucet *et al.*, 2007; Kline *et al.*, 2007; Sacheck *et al.*, 2007; Mittal *et al.*, 2010; Hayot *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Schakman *et al.*, 2012). La surexpression de MAFbx/atrogin-1 dans des myotubes C2C12 induit une atrophie, alors que les souris déficientes pour le gène codant la protéine (KO pour knock-out) MAFbx/atrogin-1 ou la protéine MuRF1 sont résistantes à l'atrophie induite par la dénervation (Bodine *et al.*, 2001a). En outre, le blocage de la traduction de MAFbx/atrogin-1 par un petit acide ribonucléique (ARN) formant des boucles en épingles à cheveux (shRNA pour short hairpin RNA) chez la souris empêche la perte de

masse musculaire associée au jeûne alimentaire (Cong *et al.*, 2011), alors que des souris KO MuRF1 sont résistantes à l'atrophie musculaire induite par la dexaméthasone (Baehr *et al.*, 2011). Néanmoins, chez des souris âgées, au lieu d'empêcher la perte de masse musculaire, l'inhibition chronique de MuRF1 ou de MAFbx/atrogin-1, est responsable d'une faiblesse musculaire (Sandri *et al.*, 2013).

MuRF1 ubiquitine plusieurs protéines structurales musculaires, telles que la troponine I (Kedar *et al.*, 2004), les chaînes lourdes de myosine (Clarke *et al.*, 2007; Fielitz *et al.*, 2007), l'actine (Polge *et al.*, 2011), la protéine C de liaison à la myosine (MYBPC pour myosin-binding protein C) et les chaînes légères de myosine 1 et 2 (Cohen *et al.*, 2009). MAFbx/atrogin-1 interagit et ubiquitine les chaînes lourdes et les chaînes légères de myosine (Lokireddy *et al.*, 2011a; Lokireddy *et al.*, 2011b). D'autres protéines musculaires, comme la desmine, la vimentine ou encore la vinculine, sont des cibles de cet atrogène (Lokireddy *et al.*, 2012b). MAFbx/atrogin-1 ubiquitine également MyoD (Tintignac *et al.*, 2005; Lagirand-Cantaloube *et al.*, 2009) et myogénine (Jogo *et al.*, 2009), des facteurs de transcription clés du développement musculaire, et le facteur d'initiation de la traduction 3 sous unité 5 (eIF3f pour eukaryotic initiation factor 3 subunit 5), un activateur important de la synthèse des protéines (Lagirand-Cantaloube *et al.*, 2008; Csibi *et al.*, 2009). En ce sens, MAFbx/atrogin-1 serait capable, en régulant la disponibilité d'eIF3f, de réguler la synthèse protéique (Attaix & Baracos, 2010).

Une autre Ub ligase E3, moins conventionnelle, joue un rôle critique dans l'atrophie musculaire. Il s'agit de TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6). TRAF6 interagit avec le complexe Ubc, formé de Ubc13 (une E2) et d'une protéine apparentée Uev1a (une E1), et catalyse la formation de chaînes de poly-ubiquitine sur la lysine 63 des protéines cibles, plutôt que sur la lysine 48 conventionnelle (Deng *et al.*, 2000). TRAF6 est également distincte des autres Ub ligases E3 puisqu'elle subit une auto-ubiquitination, ce qui active le complexe transforming growth factor β activated kinase-1 (TAK1) nécessaire pour l'activation de plusieurs protéines kinases en aval telles qu'I κ B kinase (IKK) (Wang *et al.*, 2001). TRAF6 étant un type d'Ub ligases E3 différent, elle n'est peut être pas directement impliquée dans le ciblage des protéines myofibrillaires pour la dégradation. Néanmoins, elle peut potentiellement être un régulateur en amont de la voie de signalisation conduisant finalement à la perte de protéines musculaires dans des conditions d'atrophie. En effet, l'expression de TRAF6 est augmentée dans le muscle de souris ayant subi une dénervation

Gène	ARN/protéine	Référence
MuRF1	ARN	(Acharyya <i>et al.</i> , 2004; Lecker <i>et al.</i> , 2004; Acharyya <i>et al.</i> , 2005; Mackenzie <i>et al.</i> , 2005; Costelli <i>et al.</i> , 2006; Mastrocola <i>et al.</i> , 2008; Bonetto <i>et al.</i> , 2009; Asp <i>et al.</i> , 2010; Busquets <i>et al.</i> , 2010; Zhou <i>et al.</i> , 2010; Bonetto <i>et al.</i> , 2011; White <i>et al.</i> , 2011; Busquets <i>et al.</i> , 2012b; Murphy <i>et al.</i> , 2012; Olivan <i>et al.</i> , 2012; Reed <i>et al.</i> , 2012; Braun <i>et al.</i> , 2013; Fontes-Oliveira <i>et al.</i> , 2013; Murphy <i>et al.</i> , 2013a; Murphy <i>et al.</i> , 2013b; Roberts <i>et al.</i> , 2013; Zhang <i>et al.</i> , 2013; Chen & Xiao, 2014; Ham <i>et al.</i> , 2014)
	Protéine	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
MAFbx/atrogin-1	ARN	(Gomes <i>et al.</i> , 2001; Acharyya <i>et al.</i> , 2004; Lecker <i>et al.</i> , 2004; Acharyya <i>et al.</i> , 2005; Mackenzie <i>et al.</i> , 2005; Costelli <i>et al.</i> , 2006; Mastrocola <i>et al.</i> , 2008; Bonetto <i>et al.</i> , 2009; Asp <i>et al.</i> , 2010; Aulino <i>et al.</i> , 2010; Busquets <i>et al.</i> , 2010; Penna <i>et al.</i> , 2010a; Zhou <i>et al.</i> , 2010; Bonetto <i>et al.</i> , 2011; White <i>et al.</i> , 2011; Murphy <i>et al.</i> , 2012; Olivan <i>et al.</i> , 2012; Reed <i>et al.</i> , 2012; Braun <i>et al.</i> , 2013; Fontes-Oliveira <i>et al.</i> , 2013; Murphy <i>et al.</i> , 2013a; Murphy <i>et al.</i> , 2013b; Roberts <i>et al.</i> , 2013; Zhang <i>et al.</i> , 2013; Chen & Xiao, 2014; Ham <i>et al.</i> , 2014; Honors & Kinzig, 2014)
	Protéine	(Penna <i>et al.</i> , 2010b; White <i>et al.</i> , 2011; Padrao <i>et al.</i> , 2013; Zhang <i>et al.</i> , 2013; Puppa <i>et al.</i> , 2014)
Ubiquitine	ARN	(Acharyya <i>et al.</i> , 2004; Lecker <i>et al.</i> , 2004; Costelli <i>et al.</i> , 2006; Aulino <i>et al.</i> , 2010; Fontes-Oliveira <i>et al.</i> , 2013) (Fujita <i>et al.</i> , 1996; Mackenzie <i>et al.</i> , 2005; Busquets <i>et al.</i> , 2010; Olivan <i>et al.</i> , 2012) (Llovera <i>et al.</i> , 1994; Temparis <i>et al.</i> , 1994; Baracos <i>et al.</i> , 1995; Costelli <i>et al.</i> , 1995a; Llovera <i>et al.</i> , 1998b; Llovera <i>et al.</i> , 1998c; Combaret <i>et al.</i> , 1999; Carbo <i>et al.</i> , 2000; Combaret <i>et al.</i> , 2002; Busquets <i>et al.</i> , 2004; Carbo <i>et al.</i> , 2004; Moore-Carrasco <i>et al.</i> , 2007; Segaud <i>et al.</i> , 2007; Zhou <i>et al.</i> , 2010; Busquets <i>et al.</i> , 2012a; Busquets <i>et al.</i> , 2012b)
E2 _{14kDa}	ARN	(Temparis <i>et al.</i> , 1994; Lorite <i>et al.</i> , 1998; Combaret <i>et al.</i> , 1999; Combaret <i>et al.</i> , 2002; Busquets <i>et al.</i> , 2004; Carbo <i>et al.</i> , 2004; Lecker <i>et al.</i> , 2004; Khal <i>et al.</i> , 2005b; Mackenzie <i>et al.</i> , 2005; Moore-Carrasco <i>et al.</i> , 2007; Segaud <i>et al.</i> , 2007; Busquets <i>et al.</i> , 2010; Olivan <i>et al.</i> , 2012)
Sous-unités α non catalytiques du protéasome 20 S	ARN	(Lecker <i>et al.</i> , 2004; Khal <i>et al.</i> , 2005b; Busquets <i>et al.</i> , 2010; White <i>et al.</i> , 2011); (Temparis <i>et al.</i> , 1994; Fujita <i>et al.</i> , 1996; Llovera <i>et al.</i> , 1998b; Llovera <i>et al.</i> , 1998c; Busquets <i>et al.</i> , 2004; Carbo <i>et al.</i> , 2004; Busquets <i>et al.</i> , 2012b) (Baracos <i>et al.</i> , 1995; Lorite <i>et al.</i> , 1998; Combaret <i>et al.</i> , 1999; Carbo <i>et al.</i> , 2000; Combaret <i>et al.</i> , 2002)
	Protéine	(Russell <i>et al.</i> , 2009)
Sous-unités β catalytiques du protéasome 20 S	ARN	(Lecker <i>et al.</i> , 2004; Khal <i>et al.</i> , 2005b; White <i>et al.</i> , 2011)
TRAF6	Protéine	(Padrao <i>et al.</i> , 2013)

Tableau 4 : Etudes mettant en évidence une augmentation de l'expression de certains composants du système-ubiquitine protéasome au cours de la cachexie associée au cancer.

(Paul *et al.*, 2010), un jeûne alimentaire (Paul *et al.*, 2012), ou dans le muscle de souris diabétiques (Paul *et al.*, 2010). Chez des souris déficientes pour le gène TRAF6, il a été observé que la perte de masse musculaire induite par une dénervation ou un jeûne alimentaire était réduite (Paul *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2012). La diminution du contenu en chaînes lourdes de myosine induite par la dénervation, était également réduite chez les souris déficientes pour le gène TRAF6 (Paul *et al.*, 2010). Ces études ont également montré que TRAF6 était un régulateur majeur de l'expression de MuRF1 et MAFbx/atrogin-1, ainsi que des autophagènes de la voie autophagie-lysosome, en cas de dénervation ou de jeûne alimentaire (Paul *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2012). Enfin, il a été mis en évidence que TRAF6 était nécessaire à l'activation des voies FoxO3 et nuclear factor kappa B (NF- κ B) (Paul *et al.*, 2012).

C. Implication du système ubiquitine-protéasome dans la cachexie associée au cancer

Un grand nombre d'études a montré l'implication du système protéolytique ubiquitine-protéasome dans la perte de masse musculaire observée au cours de la cachexie associée au cancer. Expérimentalement, il a été montré chez de nombreux modèles animaux cachectiques, une augmentation de l'expression de MuRF1 et/ou de MAFbx/atrogin-1, de TRAF6, ainsi que l'expression d'une E2 de 14 kDa (E2_{14kDa}) et de l'Ub (Tableau 4). Une augmentation de l'expression des sous-unités α non catalytiques et β catalytiques du protéasome 20S a aussi été mise en évidence chez des modèles animaux cachectiques (Tableau 4). De plus, chez des animaux cachectiques, une augmentation de la quantité de protéines conjuguées à l'Ub (Baracos *et al.*, 1995; Llovera *et al.*, 1995; Lorite *et al.*, 1998; Lazarus *et al.*, 1999; Combaret *et al.*, 2002; White *et al.*, 2011), de l'activité protéolytique du protéasome (Costelli *et al.*, 2002; Chand *et al.*, 2005; Khal *et al.*, 2005b; Russell *et al.*, 2009), ainsi que de l'activité de la tripeptidyl-peptidase II (Chand *et al.*, 2005) a été observée. Enfin, il a été montré que le traitement des souris cachectiques C26 par le MG132, un inhibiteur du protéasome, prévenait l'atrophie musculaire en inhibant le système protéolytique ubiquitine-protéasome (Zhang *et al.*, 2013).

Chez des patients cachectiques humains, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de l'Ub (Williams *et al.*, 1999a; Bossola *et al.*, 2001; Bossola *et al.*, 2003; DeJong *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2012), une augmentation de l'expression des sous-unités α et β du protéasome 20S (Williams *et al.*, 1999a; Khal *et al.*, 2005a), ainsi qu'une augmentation

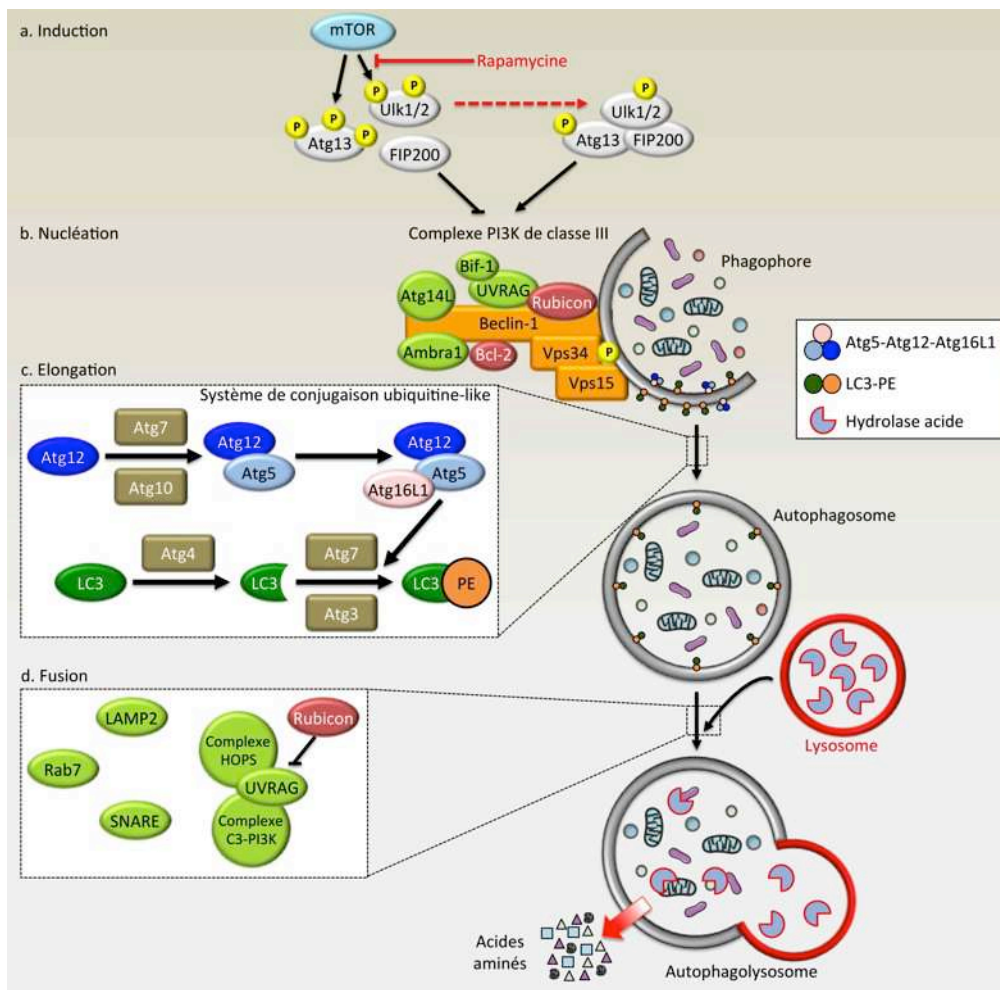


Figure 25 : Représentation schématique de la signalisation mise en jeu lors de l'autophagie.

a. mTOR joue un rôle central dans la suppression de l'induction de l'autophagie en liant et phosphorylant le complexe UIk1/2-Atg13-FIP200. Lorsque l'autophagie est stimulée (notamment, par de la rapamycine), mTOR est réprimée et ceci provoque une hypophosphorylation du complexe UIk1/2-Atg13-FIP200, menant à l'induction de l'autophagie.

b. La formation du phagophore est induite par le complexe PI3K de classe III, composé de trois protéines : Vps34, Vps15 et Beclin-1. L'activité de ce complexe dépend de nombreux régulateurs positifs (en vert) ou négatifs (en rouge) qui s'associent avec Beclin-1.

c. L'élongation de l'autophagosome implique deux systèmes de conjugaison ubiquitine-like, Atg12 et LC3, qui s'associent avec le phagophore et finalisent sa formation.

d. L'autophagosome fusionne avec le lysosome. Après maturation de cet ensemble, celui-ci forme un autophagolysosome sous l'action de régulateurs positifs (en vert) ou négatifs (en rouge). La membrane interne et les constituants de l'autophagolysosome sont dégradés par les hydrolases acides et exportés dans le cytoplasme pour une utilisation ultérieure.

Ambra1, activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy protein-1 ; Atg, autophagy related genes ; Bcl-2, B-cell lymphoma-2 ; Bif-1, Bax-interacting factor-1 ; FIP200, FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa ; HOPS, homotypic vacuole fusion and protein sorting ; LAMP2, lysosomal associated membrane protein 2 ; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3 ; mTOR, mammalian target of rapamycin ; PE, phosphatidylethanolamine ; (C3) PI3K, (class III) phosphatidylinositol 3-kinase ; Rab7, Ras-related GTPase 7 ; SNARE, N-ethyl-maleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor ; UIk1/2, Unc-51-like kinase 1/2 ; UVRAG, UV irradiation resistance-associated gene ; Vps, vacuolar protein sorting [modifié d'après (Kim *et al.*, 2010)].

de l'activité protéolytique du protéasome (Bossola *et al.*, 2003). Chez des patients atteints d'un cancer gastrique, il a également été décrit une augmentation de l'expression du transcrit et de la protéine TRAF6 (Sun *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données montre clairement l'implication du système protéolytique ubiquitine-protéasome dans la perte de masse musculaire observée au cours de la cachexie associée au cancer.

3. Le système autophagie-lysosome

A. Généralités

L'autophagie joue un rôle crucial dans le renouvellement des composants cellulaires, que ce soit en conditions normales ou en réponse à divers stimuli tels que le stress cellulaire, la carence en nutriments, la privation en acides aminés et l'exposition à des cytokines (Kuma *et al.*, 2004; Komatsu *et al.*, 2005; Mizushima *et al.*, 2008). Elle intervient notamment dans la dégradation des protéines à durée de vie longue et des organites (Mizushima *et al.*, 2008).

On peut distinguer la micro-autophagie (internalisation d'une protéine cible par un lysosome), l'autophagie réalisée par l'intermédiaire d'une protéine chaperone, et la macro-autophagie (dégradation non sélective d'une partie du cytoplasme). A ce jour, la majorité des données sur le mécanisme autophagique au sein du muscle concerne le processus macro-autophagique (Figure 25). Au cours de ce processus catabolique, des vésicules cytosoliques à double membrane appelées autophagosomes, séquestrent des portions de cytoplasme incluant des protéines agrégées et des organelles endommagées. Ces vésicules vont fusionner avec des lysosomes (Kim *et al.*, 2010; Mehrpour *et al.*, 2010). Les lysosomes sont des vésicules à pH acide (Ohkuma & Poole, 1978), qui permettent la dégradation des macromolécules extracellulaires et cytoplasmiques (de Duve, 1983). Ils contiennent des enzymes appelées hydrolases, et parmi elles, des protéases, des phosphatases, des lipases, des nucléases et des glycosidases (Bechet *et al.*, 2005). Quatre protéases ubiquitaires essentielles ont été identifiées : les cathepsines B, D, H et L (Turk *et al.*, 2001). Elles déterminent principalement la capacité protéolytique des lysosomes (Bechet *et al.*, 2005). La fusion des autophagosomes avec les lysosomes permet de former des autophagolysosomes, dans lesquels le matériel séquestré sera dégradé. Les acides aminés libérés dans le cytosol

seront recyclés pour la synthèse de macromolécules et la production d'énergie (Kim *et al.*, 2010; Mehrpour *et al.*, 2010) (Figure 25).

B. Le système autophagie-lysosome dans le muscle squelettique

Très tôt, il a été montré que la formation de vacuoles autophagiques et la dégradation lysosomale contribuent à la dégradation des protéines dans le muscle (Schiaffino & Hanzlikova, 1972; Zeman *et al.*, 1985; Furuno & Goldberg, 1986; Furuno *et al.*, 1990). L'activité de la cathepsine L, est régulée à la hausse au cours de l'atrophie musculaire chez le rat (Deval *et al.*, 2001). Chez des patients atteints de traumatismes crâniens, il a également été observé une augmentation de l'expression du transcrite de la cathepsine D (Mansoor *et al.*, 1996). L'expression d'un certain nombre de gènes appartenant à la voie autophagie-lysosome est également fortement stimulée dans différents modèles d'atrophie musculaire (Lecker *et al.*, 2004; Scheck *et al.*, 2007; Schakman *et al.*, 2012; Joshi *et al.*, 2014). Récemment, il a été mis en évidence que l'expression de microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) et de gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein (GABARAP), codant pour des protéines qui sont dégradées lorsque les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes, est fortement stimulée chez la souris lors d'un jeûne alimentaire ou suite à une dénervation (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). De plus, il a été démontré que la surexpression d'une forme constitutivement active de FoxO3 induisait l'autophagie, alors que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR bloquait l'autophagie induite par FoxO3 (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). L'expression de cette forme constitutivement active de FoxO3 conduisait à une augmentation de la protéolyse, dont 70% serait due au système autophagie-lysosome (Zhao *et al.*, 2007). Ces études montraient que les facteurs de transcription FoxO étaient les régulateurs clés de l'induction de l'autophagie dans le muscle squelettique. Néanmoins, il a été récemment observé que le régulateur majeur de l'induction de l'autophagie serait la protéine kinase mTOR, et plus particulièrement le complexe mTOR 1 (mTORC1) (Castets *et al.*, 2013). En effet, il a été montré dans un modèle murin avec une activation constante de mTORC1, que l'activation de l'autophagie, même après un jeûne alimentaire prolongé, était bloquée par mTORC1 en dépit de l'activation de FoxO3 (Castets *et al.*, 2013).

C. Implication du système autophagie-lysosome dans la cachexie associée au cancer

Au cours des dix dernières années, l'autophagie a commencé à être décrite dans la cachexie associée au cancer. Il a notamment été mis en évidence une augmentation de l'expression du transcrite de LC3 et de GABA(A) receptor-associated protein-like 1 (Gabarapl1) dans le muscle de rats cachectiques YAH-130 (Lecker *et al.*, 2004), et une augmentation du transcrite de Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3 (Bnip3) dans le muscle de rats et de souris cachectiques (Lecker *et al.*, 2004; Asp *et al.*, 2010; Reed *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2013). Récemment, une étude a clairement démontré le rôle de l'autophagie au sein du muscle squelettique dans trois modèles animaux de cachexie associée au cancer (Penna *et al.*, 2013b). En effet, il a été montré chez des souris cachectiques C26, une augmentation de l'expression du transcrite de LC3b et de p62/sequestosome 1 (SQSTM 1), ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de Beclin-1 et de la forme lipidée de LC3b (LC3b-II), et l'accumulation de p62 (Penna *et al.*, 2013b). Chez des souris cachectiques LLC, il a été observé une augmentation de l'expression protéique de Beclin-1 et l'accumulation de p62 (Penna *et al.*, 2013b). Chez des rats cachectiques YAH-130, il a été observé une augmentation de l'expression protéique de LC3b-II et l'accumulation de p62 (Penna *et al.*, 2013b). Chez des souris cachectiques C26, il a été décrit une augmentation de l'expression du transcrite Bnip3 (Roberts *et al.*, 2013; Ham *et al.*, 2014), et LC3b (Ham *et al.*, 2014). Enfin, chez des souris cachectiques *Apc*^{Min/+}, il avait été précédemment mis en évidence une augmentation de l'expression protéique de Atg7, de Beclin-1 et de LC3b (White *et al.*, 2011).

Expérimentalement, une augmentation de l'activité enzymatique de la cathepsine D a été décrite chez des souris transplantées avec des cellules tumorales L1210 (Greenbaum & Sutherland, 1983), et chez des rats cachectiques (Ferguson *et al.*, 1979; Tessitore *et al.*, 1993; Tessitore *et al.*, 1994). Une augmentation de l'activité enzymatique des cathepsines B et L a été mise en évidence chez des souris cachectiques (Fujita *et al.*, 1996; Lorite *et al.*, 1998). Une augmentation de l'expression des transcrits de la cathepsine L (Fujita *et al.*, 1996; Deval *et al.*, 2001; Lecker *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2006; Bonetto *et al.*, 2011; Reed *et al.*, 2012; Braun *et al.*, 2013; Penna *et al.*, 2013b; Roberts *et al.*, 2013), de la cathepsine B (Baracos *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1996; Busquets *et al.*, 2004; Busquets *et al.*, 2010; Busquets *et al.*, 2012b), et de la cathepsine D (Baracos *et al.*, 1995), a également été observée dans différents modèles d'animaux cachectiques.

Enfin, sur des biopsies musculaires de patients cachectiques avec un NSCLC, une augmentation de l'expression du transcrite de Bnip3, ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de LC3b-I et LC3b-II ont été montrées (Op den Kamp *et al.*, 2013a). Des études cliniques ont également rapporté dans le muscle squelettique, une élévation de l'activité enzymatique de la cathepsine D chez des patients atteints de cancer (Schersten & Lundholm, 1972), ainsi qu'une augmentation de l'expression du transcrite de la cathepsine B (Jagoe *et al.*, 2002). Récemment, une augmentation de l'expression protéique des cathepsines B et L, ainsi que de leur activité enzymatique ont été mises en évidence sur des biopsies musculaires de patients cachectiques (Tardif *et al.*, 2013).

Bien qu'il existe peu de données sur l'implication du système autophagie-lysosome, et en particulier du processus autophagique dans la cachexie associée au cancer, on retiendra que la récente étude de Fabio Penna et son équipe (Penna *et al.*, 2013b), impliquant trois modèles animaux cachectiques met en évidence un rôle important de cette voie dans la pathogenèse de l'atrophie musculaire associée au cancer. En outre, ces résultats indiquent que la présence d'un seul marqueur de la voie autophagie-lysosome, n'est pas suffisante pour décrire l'état d'activation de ce système de dégradation. Toutefois, d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats et définir le rôle exact du système autophagie-lysosome dans la cachexie associée au cancer.

4. Les calpaïnes

A. Généralités

Les premières études sur les calpaïnes, dans les années 1960, ont noté la présence d'une activité enzymatique protéolytique activée par le calcium dans des extraits solubles de cerveau de rat (Guroff, 1964) et de muscle squelettique (Huston & Krebs, 1968). Dans les années 1970, l'enzyme a été purifiée à partir de muscle squelettique (Dayton *et al.*, 1976a; Dayton *et al.*, 1976b), et a été appelée CANP (calcium-activated neutral protease), puis renommée calpaïne (en référence à calcium-dependent papain-like enzyme) (Murachi *et al.*, 1980). Les calpaïnes sont des protéases à cystéine non-lysosomales activées par le calcium (Ohno *et al.*, 1984). En plus de cette régulation directe par le calcium, l'activité des calpaïnes est modulée par la calpastatine, un inhibiteur endogène spécifique, de nature protéique (Murachi *et al.*, 1980).

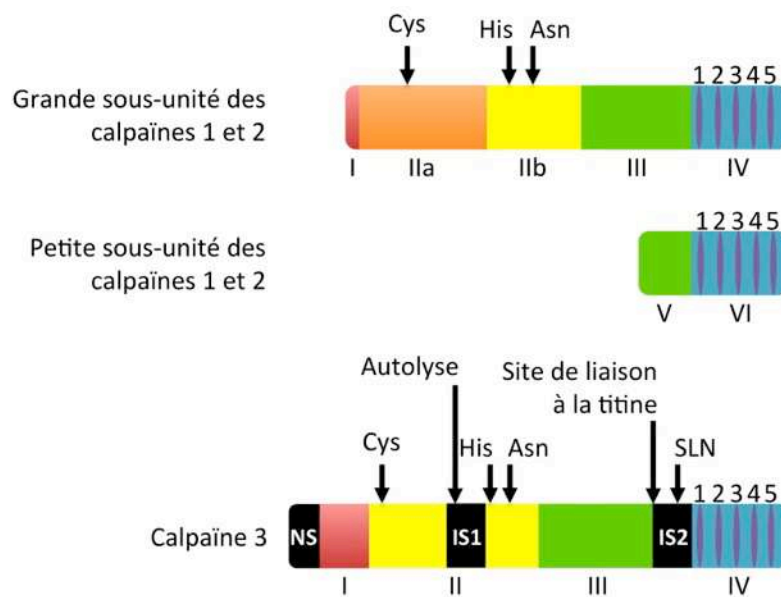


Figure 26 : Représentation schématique de la structure générale de la grande sous-unité des calpaïnes (calpaïne 1 ou 2), de la petite sous-unité des calpaïnes et de la calpaïnes 3.

La grande sous-unité des calpaïnes est divisée en quatre grands domaines caractéristiques : I, domaine N-terminal ; II, domaine catalytique divisé en deux parties IIa et IIb ; III, domaine régulateur ; IV, domaine caractérisé par la présence de 5 motifs EF-hand qui confèrent à la molécule sa sensibilité au calcium. Le domaine IV assure la liaison de la grande sous-unité à la petite sous-unité. Cette dernière possède deux domaines : le domaine V hydrophile riche en résidus glycine, et le domaine VI homologue au domaine IV des calpaïnes 1 et 2. La molécule de la calpaïne 3 est également divisée en quatre domaines. Elle possède trois courtes régions spécifiques : NS, IS1 et IS2, localisées respectivement en N-terminal, dans le domaine II et à la jonction des domaines III et IV. IS1 possède des sites autolytiques, IS2 comprend un signal de localisation nucléaire (SLN) et un site de liaison à titine [modifié d'après (Bartoli & Richard, 2005)].

Dans la cellule, la voie des calpaïnes couvre un large éventail de fonctions physiologiques. Ces fonctions incluent la protéolyse de protéines impliquées dans le cycle cellulaire, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette et la transduction du signal (Bartoli & Richard, 2005). Les cellules musculaires contiennent deux calpaïnes ubiquitaires, les calpaïnes-1 et -2, également appelées calpaïnes- μ et - m , respectivement (Figure 26). Il existe un troisième isoforme, spécifique du muscle, la calpaïne-3, également appelé p94 (Sorimachi *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1999) (Figure 26).

B. Les calpaïnes dans le muscle squelettique

Plusieurs études ont montré que l'expression des calpaïnes (Mansoor *et al.*, 1996; Voisin *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1999b; Haddad *et al.*, 2003), ainsi que leur activité (Voisin *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1999b; Purintrapiban *et al.*, 2003), étaient augmentées en conditions d'atrophie. L'implication des calpaïnes dans l'atrophie musculaire a également été mise en évidence, par l'effet protecteur de leur inhibition (Badalamente & Stracher, 2000; Whitehouse *et al.*, 2001). L'ajout d'un inhibiteur de la calpaïne (le CID pour calpastatin inhibitory domain) ou l'expression d'une forme dominante négative de la calpaïne- m entraînait respectivement, une réduction de 30% et de 63% de la dégradation globale des protéines *in vitro* (Huang & Forsberg, 1998). Enfin, dans un modèle murin transgénique, il a été montré que la surexpression muscle-spécifique de la calpastatine réduisait de 30% l'atrophie musculaire provoquée par une décharge fonctionnelle, suggérant qu'une approche thérapeutique ciblant le système calpaïnes-calpastatine pourrait être bénéfique dans la prévention de la perte de masse musculaire (Tidball & Spencer, 2002).

Les calpaïnes sont impliquées dans la dégradation de protéines myofibrillaires (titine, α -fodrine, troponine I, troponine C, α -actinine) au cours de l'atrophie musculaire (Barta *et al.*, 2005) (Figure 27, ci-après). Elles sont également impliquées dans la dégradation des protéines du cytosquelette (desmine et dystrophine), et des protéines sarcomériques (tropomyosine) dans des myotubes en culture (Purintrapiban *et al.*, 2003). Plusieurs études ont montré que le protéasome était incapable de dégrader des myofibrilles intactes, et que les protéines musculaires telles que l'actine et la myosine étaient libérées des sarcomères par un mécanisme impliquant les calpaïnes, avant de subir une ubiquitination et leur dégradation par le protéasome

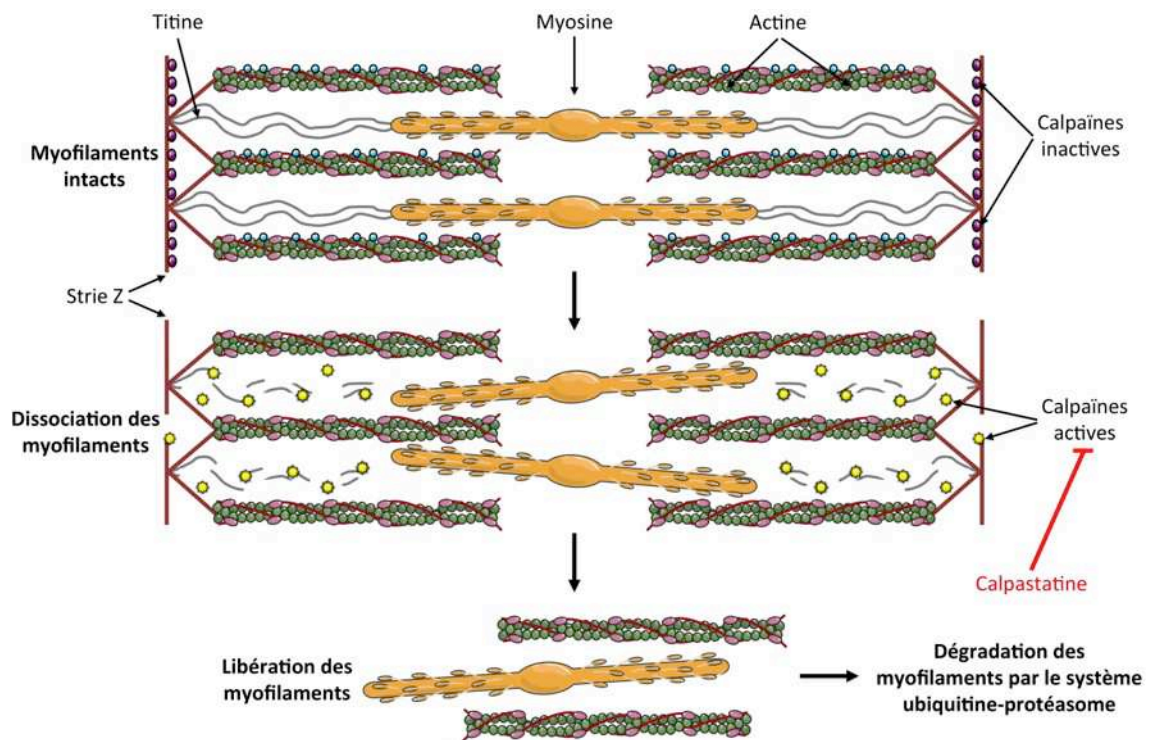


Figure 27 : Illustration de la libération des myofilaments induite par les calpaïnes en conditions d'atrophie.

Les myofilaments sont ensuite adressés au système ubiquitine-protéasome pour être dégradés.

(Koochmaraie, 1992; Solomon & Goldberg, 1996; Williams *et al.*, 1999b). Les calpaïnes peuvent donc être décrites comme les initiateurs de la dégradation myofibrillaire.

C. Induction des calpaïnes dans la cachexie associée au cancer

Une augmentation de l'expression du transcrite de la calpaïne-2 a été détectée dans le muscle squelettique de rats cachectiques (Temparis *et al.*, 1994; Busquets *et al.*, 2000; Busquets *et al.*, 2004; Fontes-Oliveira *et al.*, 2013), et de souris cachectiques (Busquets *et al.*, 2004; Carbo *et al.*, 2004; Busquets *et al.*, 2010; Busquets *et al.*, 2012b). Une augmentation de l'expression du transcrite de la calpaïne-1 a également été observée chez des souris cachectiques C26 (Ham *et al.*, 2014). De plus, une augmentation de l'activité des calpaïnes chez des rats cachectiques YAH-130 a été mise en évidence directement (Costelli *et al.*, 2002), et indirectement par l'intermédiaire d'une diminution de 20% de l'activité de la calpastatine (Costelli *et al.*, 2001). Enfin, il a été récemment montré une augmentation de l'activité des calpaïnes chez des patients atteints de cancer gastrique (Smith *et al.*, 2011). Néanmoins, comme il avait été précédemment observé chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-6 et présentant une atrophie musculaire (Tsujioka *et al.*, 1996), l'expression du transcrite de la calpaïne-3 était significativement chez des rats cachectiques YAH-130 (Busquets *et al.*, 2000).

II. Les facteurs de transcription impliqués

Dans le muscle squelettique, certains facteurs de transcription jouent un rôle particulièrement important dans la régulation de la synthèse et de la dégradation des protéines.

1. Le facteur de transcription nuclear factor kappa B (NF- κ B)

A. Généralités

NF- κ B a été découvert dans les lymphocytes B, en tant que protéine se liant spécifiquement à l'oligonucléotide décarnérique GGGACTTCC, présent dans l'élément activateur du gène codant pour la chaîne légère de l'immunoglobuline κ (Sen & Baltimore, 1986). NF- κ B est un facteur de transcription qui module la réponse immunitaire, la survie, ainsi que la prolifération et la différenciation cellulaires (Sen & Baltimore, 1986; Ghosh *et al.*, 1998). NF- κ B représente un groupe de protéines dimériques structurellement liées et évolutivement conservées, avec cinq membres chez les mammifères : Rel (c-Rel), RelA (p65),

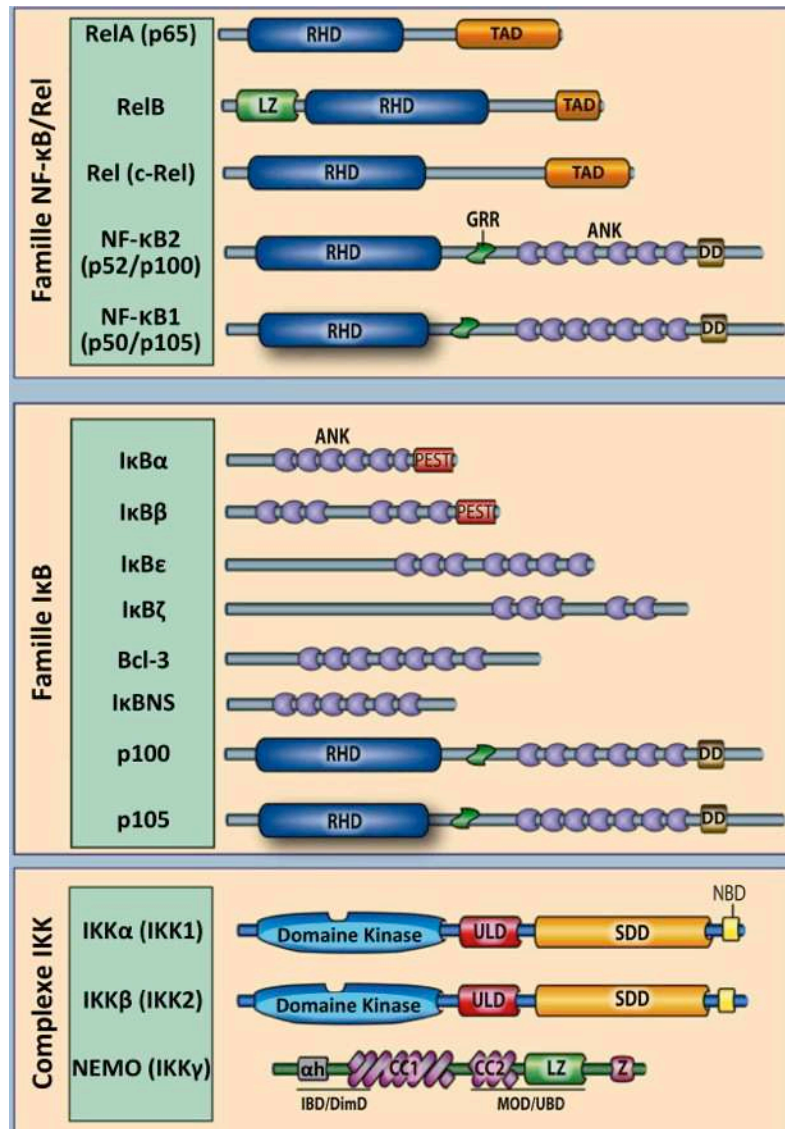


Figure 28 : Les membres de la famille des facteurs de transcription NF-κB, de la famille des protéines IκB et du complexe IKK.

Les domaines pertinents caractérisant chaque protéine sont indiqués. ANK, domaine de répétition ankyrine ; DD, domaine de mort ; RHD, domaine d'homologie REL ; TAD, domaine de transactivation ; LZ, motif de glissière à leucine ; GRR, domaine riche en glycine ; SDD, domaine d'échafaudage et de dimérisation ; ULD, domaine similaire à l'ubiquitine ; Z, domaine à doigt de zinc ; CC, domaine coiled-coil ; NBD, domaine de liaison à NEMO ; αh, domaine α-hélicoïdale ; IBD/DimD, domaine de liaison à IKK/domaine de dimérisation ; MOD/UBD, domaine minimal d'oligomérisation/domaine de liaison à l'ubiquitine ; PEST, domaine riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine [modifié d'après (Hayden & Ghosh, 2012)].

RelB, NF- κ B1 (p50 et son précurseur p105) et NF- κ B2 (p52 et son précurseur p100) (Ghosh *et al.*, 1998) (Figure 28). Ils sont tous exprimés dans le muscle squelettique (Hunter *et al.*, 2002).

Le facteur de transcription NF- κ B est régulé par la famille des protéines inhibitrices de kappa B (I κ B pour inhibitor of kappa B) (Baeuerle & Baltimore, 1988, 1989), qui comprend les membres I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B ζ , I κ BNS, B-cell leukemia/lymphoma 3 (Bcl-3) et les protéines précurseurs de NF- κ B, p100 et p105 (Hayden & Ghosh, 2012) (Figure 28). I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , p100 et p105 inhibent NF- κ B en le séquestrant sous forme inactive dans le cytoplasme (Hayden & Ghosh, 2012). Sous l'influence de divers stimuli (comme le TNF- α), les protéines I κ Bs sont phosphorylées, polyubiquitinées et dégradées par le protéasome, ce qui conduit à la libération de NF- κ B, qui pourra être exporté dans le noyau (Naumann & Scheidereit, 1994; Hayden & Ghosh, 2012) (Figure 29, ci-après). La localisation nucléaire ou cytosolique du facteur de transcription NF- κ B est essentiellement sous le contrôle des protéines kinases appelées I κ B kinases (IKK) (Figure 28). En effet, ces dernières vont phosphoryler et entraîner la dégradation des protéines inhibitrices I κ Bs (Yaron *et al.*, 1997; Birbach *et al.*, 2002). Une fois dans le noyau, le facteur de transcription NF- κ B va exercer son activité transcriptionnelle en régulant des gènes impliqués dans l'inflammation, dans la survie et la prolifération cellulaires, mais aussi dans l'apoptose (Hayden & Ghosh, 2012) (Figure 29, ci-après).

B. NF- κ B dans le muscle squelettique

Le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans la différenciation myogénique. En effet, il a été montré sur des myoblastes C2C12 qu'en régulant la transcription de la cycline D1, NF- κ B inhibait la myogenèse (Guttridge *et al.*, 1999; Guttridge *et al.*, 2000). *In vitro* et *in vivo*, il a également été mis en évidence que NF- κ B inhibait l'expression du transcrit et de la protéine MyoD (Guttridge *et al.*, 2000), et induisait l'expression du transcrit YinYang1, un répresseur transcriptionnel myogénique (Wang *et al.*, 2007).

Le facteur de transcription NF- κ B intervient également dans l'induction de la protéolyse. En effet, il a été décrit *in vitro*, et confirmé *in vivo*, que l'activation de NF- κ B était nécessaire à l'induction de l'expression du système ubiquitine-protéasome au cours de l'atrophie musculaire (Whitehouse & Tisdale, 2003; Wyke *et al.*, 2004; Wyke & Tisdale, 2005). Chez des souris transgéniques, il a été observé que la surexpression de IKK β causait

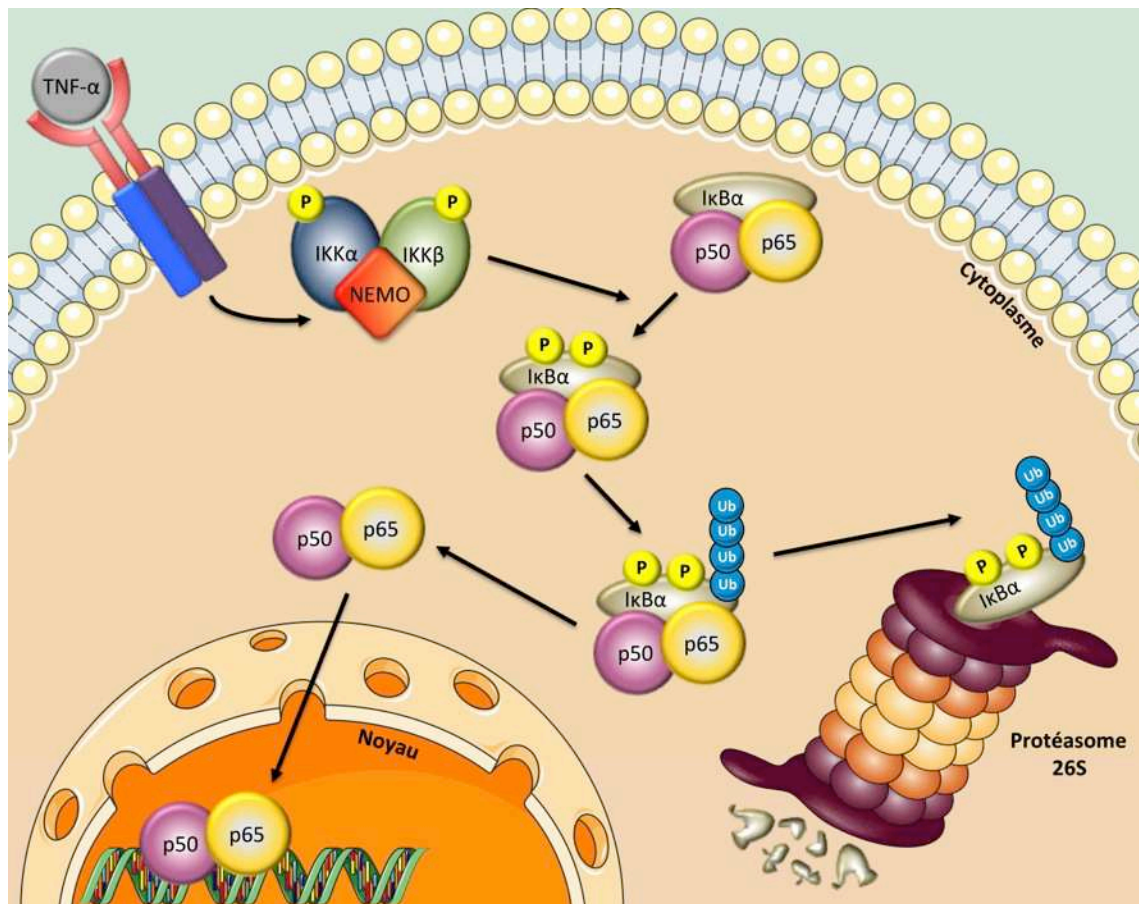


Figure 29 : Représentation schématique de la voie de signalisation canonique de NF-κB. Après l'activation cellulaire par le TNF-α, les résidus sérine 32 et 36 de IκBα sont phosphorylés par le complexe macromoléculaire contenant IKKα, IKKβ et NEMO. La protéine inhibitrice IκBα séquestre NF-κB (p50-p65) dans le cytoplasme, et sa phosphorylation conduit à son ubiquitination. Une fois ubiquitinée, IκBα est dégradée par le protéasome 26S. NF-κB se retrouve libéré, et est transloqué au noyau, où il régule la transcription de gènes cibles.

une augmentation de l'activité de NF- κ B, ainsi qu'une sévère atrophie musculaire (Cai *et al.*, 2004). Cette dernière était associée à une augmentation de la dégradation protéique, via une augmentation de l'expression du transcrite de MuRF1 et de l'activité du protéasome (Cai *et al.*, 2004). Au contraire, chez des souris déficientes pour le gène d'IKK β , il a été montré en réponse à une dénervation, une résistance à l'atrophie musculaire (Mourkioti *et al.*, 2006). Il a également été mis en évidence chez des souris déficientes pour le gène NF- κ B1, une résistance marquée à l'atrophie musculaire, suite à un protocole de décharge des membres postérieurs (Hunter & Kandarian, 2004). Dans ce modèle, il a été suggéré que cette résistance à l'atrophie était principalement due à la non activation de l'expression de MuRF1 et de MAFbx/atrogin-1 (Hunter & Kandarian, 2004). Dans le muscle squelettique, l'activité de NF- κ B est augmentée, en réponse à une immobilisation (Hunter *et al.*, 2002; Hunter & Kandarian, 2004), et à une dénervation (Cai *et al.*, 2004; Mittal *et al.*, 2010). MAFbx/atrogin-1, 4E-BP1, FoxO3a et la cathepsine L, semblent également être des cibles du facteur de transcription NF- κ B au cours de l'atrophie musculaire (Judge *et al.*, 2007).

C. Implication du facteur de transcription NF- κ B dans la cachexie associée au cancer

In vitro, le facteur de transcription NF- κ B a été démontré comme étant un médiateur de l'atrophie musculaire induite par les cytokines TNF- α et IL-1 β (Guttridge *et al.*, 2000; Li & Reid, 2000; Langen *et al.*, 2001), TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) (Dogra *et al.*, 2006), ainsi que par le PIF (Wyke & Tisdale, 2005), ou par un milieu conditionné issu de cellules tumorales C26 (Lokireddy *et al.*, 2012a). NF- κ B semble également être un élément important de l'atrophie musculaire observée au cours de la cachexie associée au cancer (Cai *et al.*, 2004). Il a ainsi été observé une augmentation de l'accumulation nucléaire de NF- κ B et de sa fixation à l'acide désoxyribonucléique (ADN), chez des souris cachectiques MAC16 (Eley *et al.*, 2007a), et chez des souris cachectiques C26 (Shadfar *et al.*, 2011). Dans divers modèles murins cachectiques, une augmentation de l'expression du transcrite de NF- κ B a été mise en évidence (Acharyya *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013), tout comme une augmentation de l'expression protéique de NF- κ B (Acharyya *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2013), ainsi qu'une diminution de l'expression du transcrite et de la protéine I κ B α (Zhang *et al.*, 2013). Néanmoins, d'autres études ont échoué à mettre en évidence un rôle du facteur de transcription NF- κ B chez des rats cachectiques YAH-130 (Costelli *et al.*, 2005; Moore-Carrasco *et al.*, 2007).

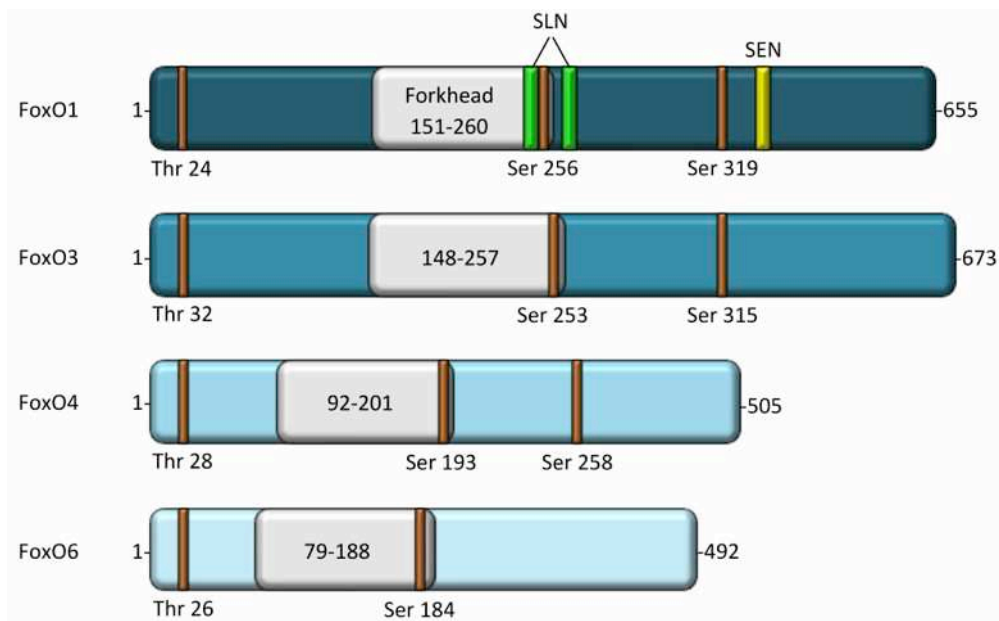


Figure 30 : Représentation schématique des sites de phosphorylation (en orange) des facteurs de transcription FoxO, par Akt. Les domaines forkhead sont indiqués, ainsi que les signaux de localisation nucléaire (SLN) et la séquence d'exportation nucléaire (SEN).

Ces divergences de résultats peuvent être expliquées par l'utilisation de modèles animaux cachectiques différents. Enfin, une activation de la voie NF- κ B a été décrite sur des biopsies musculaires de patients atteints d'un cancer gastrique ou d'un NSCLC (Rhoads *et al.*, 2010; Op den Kamp *et al.*, 2013a).

2. Les facteurs de transcription forkhead box O (FoxO)

A. Généralités

Le membre fondateur de la famille Fox est le facteur de transcription fork head (fkh). Il a été identifié chez la *Drosophila melanogaster*, où sa présence est essentielle à la bonne formation des structures terminales de l'embryon (Weigel *et al.*, 1989). Jusqu'à présent, plus de cent membres de cette famille de facteurs de transcription ont été identifiés, avec des rôles dans le développement, la différenciation, la prolifération, l'apoptose, la résistance au stress et le métabolisme (Carlsson & Mahlapuu, 2002). Chez les mammifères, la classe O des facteurs de transcription forkhead (FoxO) se compose de quatre membres : FoxO1 (connu aussi sous le nom de FKHR), FoxO3 (FKHRL1), FoxO4 (AFX1) et FoxO6 (Kaestner *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 2003). Des études biochimiques entreprises sur des cellules de mammifères ont montré qu'en réponse à l'induction de la voie de signalisation de l'insuline/IGF-1, la protéine kinase B (appelé aussi Akt) est activée et régule directement le facteur de transcription FoxO par phosphorylation (Biggs *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 1999; Kops *et al.*, 1999; Takaishi *et al.*, 1999). Cette phosphorylation concerne les résidus thréonine 24, sérine 256 et sérine 319 pour FoxO1 (Biggs *et al.*, 1999; Rena *et al.*, 1999), les résidus thréonine 32, sérine 253 et sérine 315 pour FoxO3 (Brunet *et al.*, 1999), les résidus thréonine 28, sérine 193 et sérine 258 pour FoxO4 (Kops *et al.*, 1999), et les résidus thréonine 26 et sérine 184 pour FoxO6 (Jacobs *et al.*, 2003) (Figure 30). La phosphorylation de FoxO inhibe sa fonction, en promouvant son interaction avec les protéines 14-3-3 et sa séquestration dans le cytoplasme (Brunet *et al.*, 1999). A l'inverse, en l'absence de stimulation, Akt est inactivé et les facteurs de transcription FoxO peuvent migrer dans le noyau, où ils agiront comme des activateurs de la transcription (Brunet *et al.*, 1999) (Figure 31, ci-après).

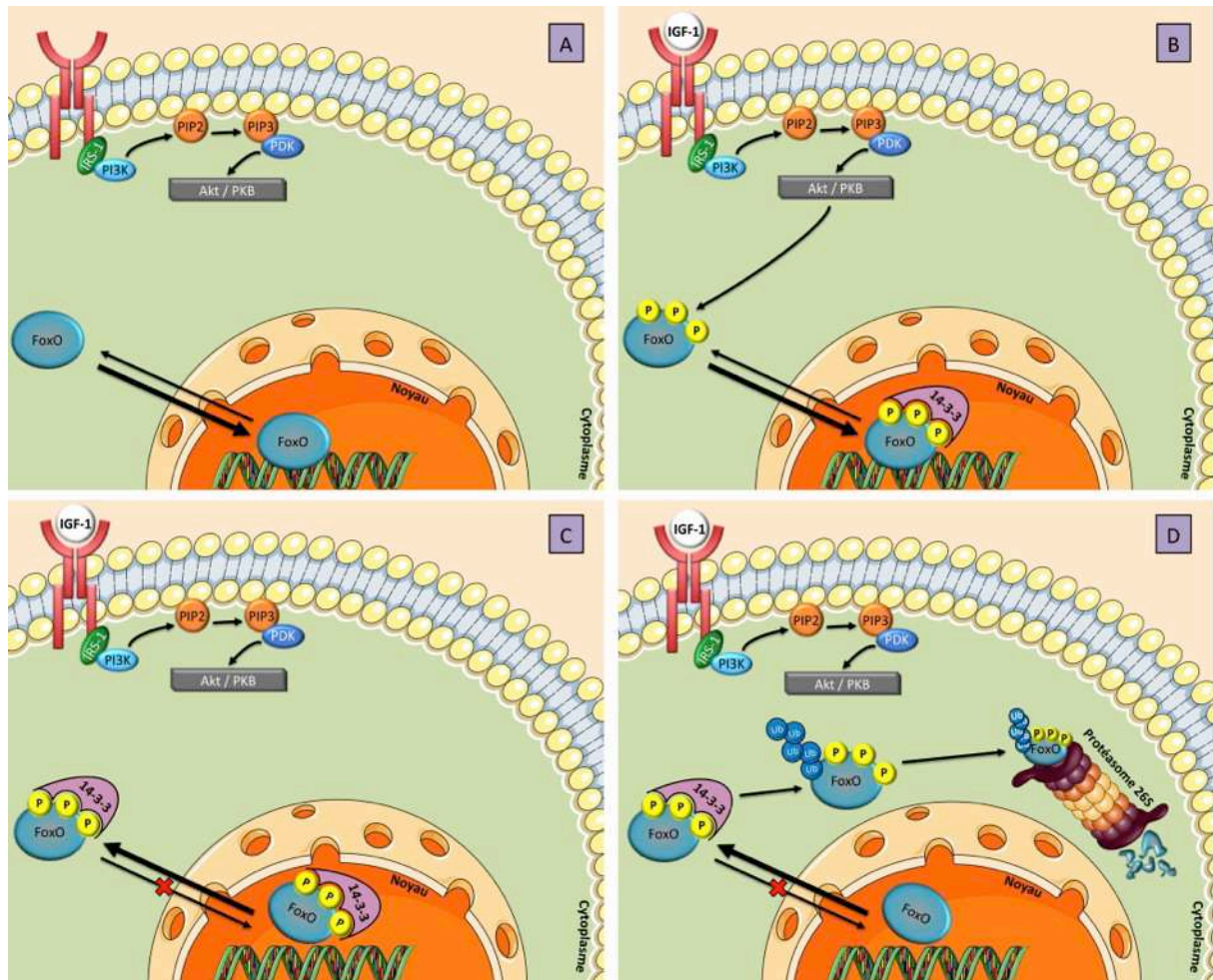


Figure 31 : Représentation schématique de la voie de signalisation Akt/FoxO.

A. En condition basale, les FoxO se trouvent dans le cytoplasme et ils vont migrer dans le noyau où ils activeront la transcription de gènes cibles.

B, D et D. Suite à la fixation d'IGF-1 sur son récepteur, Akt est activée. Akt va ensuite phosphoryler et inactiver les FoxO, en promouvant leur interaction avec les protéines 14-3-3. Les FoxO sont séquestrés dans le cytoplasme, où ils seront ensuite ubiquitinés et adressés au protéasome 26S, pour être dégradés.

B. Les facteurs de transcription FoxO dans le muscle squelettique

FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6 sont exprimés dans le muscle squelettique (Furuyama *et al.*, 2000; Biggs *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2013). La surexpression de FoxO1 provoque une atrophie des cellules C2C12 (Stitt *et al.*, 2004), et des fibres musculaires (Kamei *et al.*, 2004). De la même façon, la surexpression de FoxO3 provoque une atrophie des cellules C2C12 (Sandri *et al.*, 2004), et des fibres musculaires (Sandri *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2006). Cette atrophie musculaire est accompagnée d'une augmentation de l'expression des transcrits de MuRF1 et de MAFbx/atrogin-1 (Kamei *et al.*, 2004; Sandri *et al.*, 2004). Chez des rats diabétiques caractérisés par une atrophie musculaire, il a été observé une augmentation de l'expression du transcrit de FoxO3, de sa translocation nucléaire et de sa fixation au promoteur de MAFbx/atrogin-1 (Lee *et al.*, 2004). Dans divers modèles animaux d'atrophie musculaire, il a été montré une augmentation de l'expression du transcrit de FoxO1 (Lecker *et al.*, 2004; Scheck *et al.*, 2007; Schakman *et al.*, 2012). Enfin, au cours d'un entraînement en résistance chez l'humain, il a été mis en évidence une réduction de l'accumulation nucléaire de FoxO1, couplée à une augmentation de l'activation d'Akt (Leger *et al.*, 2006). En plus de son rôle dans la régulation de l'expression de certains composants du système ubiquitine-protéasome lors de l'atrophie musculaire, FoxO3a est également impliqué dans l'induction de l'autophagie (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). FoxO3 contrôle notamment l'expression des autophagènes Atg12, Bnip3, Gabarapl et LC3b (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007).

C. Implication des facteurs de transcription FoxO dans la cachexie associée au cancer

Tout comme chez des rats cachectiques YAH-130 (Lecker *et al.*, 2004), une augmentation de l'expression du transcrit de FoxO1 a été observée chez des souris cachectiques (Liu *et al.*, 2007). Dans cette dernière étude, l'injection d'un nucléotide d'ARN ciblant FoxO1, inhibait l'augmentation de l'expression du transcrit de FoxO1 et empêchait la perte de masse musculaire (Liu *et al.*, 2007). Récemment, dans des modèles murins de cachexie associée au cancer, il était décrit une augmentation de l'expression des transcrits de FoxO1 et FoxO3a (Lecker *et al.*, 2004; Reed *et al.*, 2012), une diminution de l'état de phosphorylation de FoxO3a (Zhou *et al.*, 2010; White *et al.*, 2011), ainsi qu'une augmentation de son activité transcriptionnelle (Reed *et al.*, 2012). Dans cette dernière étude, FoxO augmentait l'expression des transcrits de MuRF1, de MAFbx/atrogin-1, de Bnip3

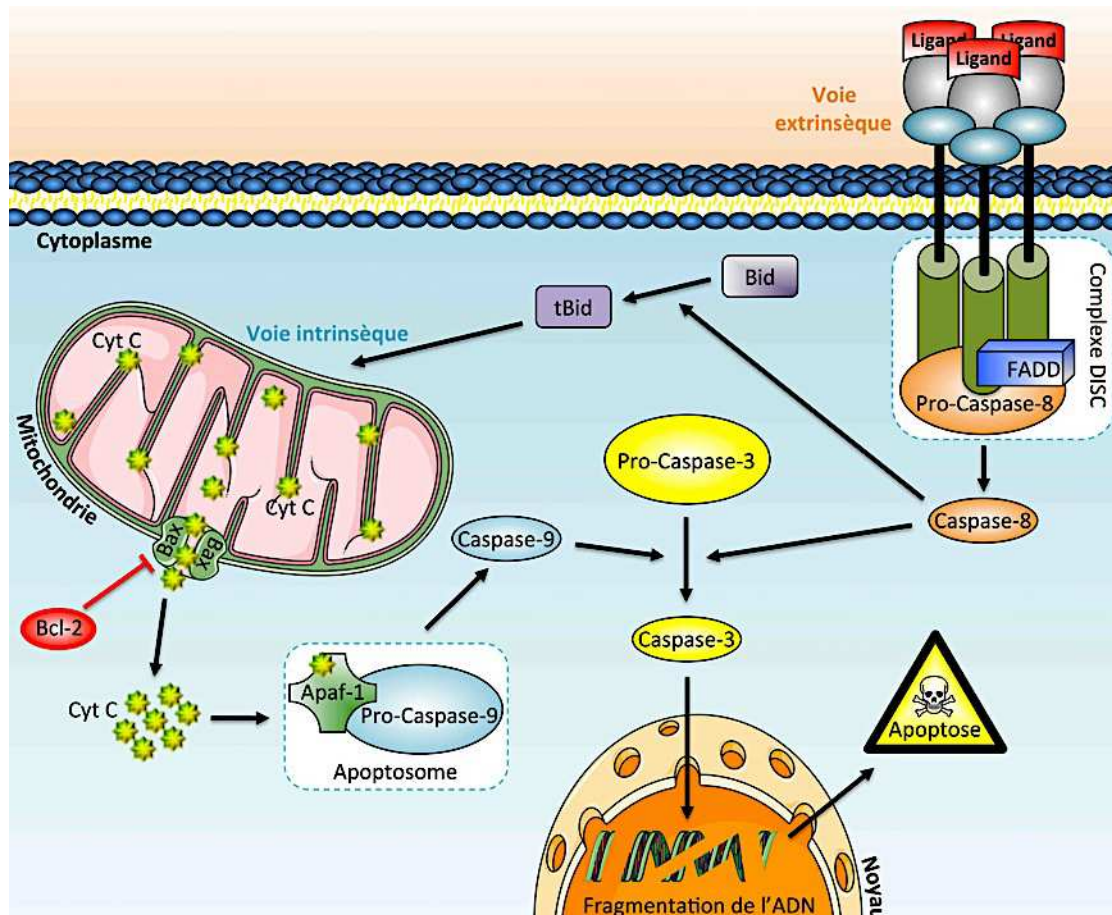


Figure 32 : Représentation schématique simplifiée des principales voies moléculaires conduisant à l'apoptose.

Voie extrinsèque : suite à la fixation de ligands (TNF- α , FasL, ...) sur les récepteurs de mort, le complexe Death Initiation Signalling Complex (DISC) est formé et la caspase-8 est activée.

Voie intrinsèque : la libération du cytochrome c (Cyt C) depuis les mitochondries résulte en la formation de l'apoptosome et l'activation de la caspase-9.

Les caspases-8 et -9 activent alors les caspases en aval, telles que la caspase-3, entraînant la fragmentation de l'ADN et la mort cellulaire.

et de la cathepsine L (Reed *et al.*, 2012). L'injection d'une forme dominante négative de FoxO à ces souris prévenait la survenue de ces modifications (Reed *et al.*, 2012). Ces études suggèrent donc un rôle important des facteurs de transcription FoxO dans la cachexie associée au cancer chez l'animal.

Chez l'humain, une étude a montré que l'expression protéique de la forme totale de FoxO3a n'était pas modifiée chez des patients cachectiques (Schmitt *et al.*, 2007). Néanmoins, une réduction significative de la phosphorylation de FoxO3a était rapportée (Schmitt *et al.*, 2007). D'après les auteurs, cette forte réduction pourrait conduire à une levée de l'inhibition de FoxO3a et à la stimulation de son activité transcriptionnelle. Cette étude suggérait un rôle important des facteurs de transcription FoxO dans l'atrophie musculaire observée en cas de cancer chez l'humain.

III. L'apoptose

En plus des trois systèmes protéolytiques décrits précédemment, l'apoptose des cellules musculaires peut jouer un rôle dans l'atrophie musculaire.

1. Généralités

Observée pour la première fois par Walther Flemming en 1885, l'apoptose n'a été clairement identifiée qu'en 1972 par John F. Kerr (Kerr *et al.*, 1972). Le mot « apoptose », utilisé en grec pour décrire la chute des pétales des fleurs ou la chute des feuilles des arbres, a été suggéré à John F. Kerr par James Cormack du département des Antiquités grecques de l'Université d'Aberdeen (Kerr *et al.*, 1972). L'apoptose est le processus normal d'autodestruction d'une cellule en réponse à un signal interne. Elle est aussi connue sous le nom de mort cellulaire programmée ou de suicide cellulaire.

Le mécanisme d'apoptose est gouverné par deux voies principales d'activation. La voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF, et la voie dite intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie. Cette seconde voie est régulée par des protéines appartenant à la superfamille des B-cell lymphoma 2 (Bcl-2). Ces deux voies conduisent finalement à l'activation de protéases à cystéine appelées caspases (Favaloro *et al.*, 2012) (Figure 32). Les caspases sont responsables du clivage de l'ADN en unités nucléosomiques, par l'intermédiaire d'une activation des désoxyribonucléases, d'une inhibition des enzymes de réparation de l'ADN, et de la dégradation des protéines structurales dans le noyau (Dupont-Versteegden, 2005).

2. L'apoptose dans le muscle squelettique

Le nombre de myonuclei est essentiel pour déterminer le potentiel de synthèse protéique d'une fibre musculaire. En effet, toute augmentation de ce nombre permettra potentiellement une augmentation de la capacité de transcription, et de façon ultime une augmentation de la capacité de traduction (Freyssenet, 2006; Favier *et al.*, 2008). La modulation du nombre de noyaux d'une fibre musculaire est donc un moyen de contrôler sa taille et ses caractéristiques (Allen *et al.*, 1999; Favier *et al.*, 2008). Dans diverses conditions, il a été montré que l'atrophie musculaire était associée à une réduction du nombre de myonuclei au sein de la fibre musculaire (Rodrigues Ade & Schmalbruch, 1995; Allen *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1997). L'apoptose serait responsable de la dégradation des noyaux, et donc de la diminution du nombre de noyaux au cours de l'atrophie (Siu & Alway, 2005; Siu *et al.*, 2005).

Parmi les différents mécanismes caractérisant l'apoptose, l'activité des caspases joue un rôle central. Au sein du muscle, une augmentation de l'expression de ces protéines est décrite dans plusieurs modèles d'atrophie. Les caspases sont régulées à la hausse dans le muscle soumis à une dénervation chez l'humain (Tews *et al.*, 2005), et chez la souris (Plant *et al.*, 2009), ainsi que dans le muscle squelettique d'un modèle d'insuffisance cardiaque chronique chez le rat (Vescovo & Dalla Libera, 2006). Chez des rats diabétiques et présentant une atrophie musculaire, il a été mis en évidence une activation de la caspase-3 (Lee *et al.*, 2004). L'activité enzymatique des caspases-3, -6 et -9 est également augmentée dans le muscle *soleus* après un protocole de décharge fonctionnelle de dix jours chez le rat (Berthon *et al.*, 2007). Chez des souris déficientes pour le gène de la caspase-3, une réduction de l'atrophie musculaire induite par une dénervation a été observée, comparées aux souris sauvages (Plant *et al.*, 2009). L'augmentation de l'activité des caspases serait directement impliquée dans le processus apoptotique, mais aussi responsable de la dégradation des composants des fibres musculaires. *In vitro*, la caspase-3 est notamment responsable du clivage de l'actomyosine, générant de l'actine monomérique et des fragments d'actine, qui sont ensuite dégradés par le protéasome (Du *et al.*, 2004). *In vivo*, il a été décrit que l'atrophie musculaire induite par l'angiotensine II, activait la caspase-3 dans le muscle *gastrocnemius*, conduisant au clivage de l'actine (Song *et al.*, 2005).

Enfin, le rapport Bcl-2–associated X protein (Bax)/Bcl-2 est souvent utilisé comme un indicateur du potentiel apoptotique. Un ratio bas protégerait de l'apoptose et un ratio élevé favoriserait l'apoptose (Antonsson *et al.*, 1997). Après un protocole de dénervation chez le rat, une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 a été montrée dans le muscle *gastrocnemius* (Siu *et al.*, 2005).

3. Implication de l'apoptose dans la cachexie associée au cancer

L'apoptose des cellules musculaires a été mise en évidence au cours de l'atrophie musculaire associée au cancer. Il a été montré une augmentation de l'index apoptotique, représenté par le nombre de cellules en apoptose, dans le muscle de la cuisse de lapins transplantés avec des cellules de carcinome VX2 (Sumi *et al.*, 1999; Ishiko *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001). Les cellules musculaires présentaient les caractéristiques de l'apoptose, à savoir, un retrait cytoplasmique et la condensation de la chromatine nucléaire (Sumi *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2001). Une fragmentation de l'ADN, caractéristique de la mort cellulaire programmée, a également été observée chez des rats cachectiques YAH-130 et des souris cachectiques LLC (van Royen *et al.*, 2000; Carbo *et al.*, 2002; Busquets *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2011a). Chez les souris cachectiques LLC, elle semblait être régulée par le TNF- α (Carbo *et al.*, 2002). L'expression de Bax, un facteur pro-apoptotique (Oltvai *et al.*, 1993), était également augmentée dans le muscle, chez le lapin lors d'une cachexie induite par l'inoculation de cellules du carcinome VX2 (Yoshida *et al.*, 2001), et chez des souris cachectiques Apc^{Min/+} (Baltgalvis *et al.*, 2010). Une augmentation de l'activité des caspases-1, -3, -6, -8 et -9 a été observée dans le muscle *gastrocnemius* de souris cachectiques MAC16 (Belizario *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2009). Une hausse de l'activité caspase-3 a également été décrite dans d'autres modèles murins cachectiques (Busquets *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2013a). En plus du dosage de l'activité protéolytique des caspases, le clivage de poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) est un bon indicateur de l'activation des caspases-3 et -7. La fragmentation de PARP a été observée chez des souris cachectiques MAC16 (Belizario *et al.*, 2001).

Malgré ces observations expérimentales, aucune augmentation de l'apoptose n'a été mise en évidence, dans des biopsies musculaires de patients cachectiques atteints de cancer gastrique (Bossola *et al.*, 2006). En effet, l'activité des caspases-1 et -3 n'était pas modifiée, aucune fragmentation de l'ADN n'était observée et PARP n'était pas clivée (Bossola *et al.*, 2006). Cependant, au cours d'une récente étude utilisant des biopsies musculaires de patients cachectiques atteints de cancer gastro-intestinal, il a été montré une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN, associée à une augmentation marquée du clivage de PARP (Busquets *et al.*, 2007). Cette divergence entre ces deux études peut être due à la différence de type de tumeur, de stade tumoral, ainsi qu'à l'ampleur de l'atrophie musculaire.

IV. Les médiateurs de la cachexie associée au cancer

1. Les cytokines pro-inflammatoires

L'implication des cytokines dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer ayant été décrite dans le Chapitre I, nous nous intéresserons essentiellement ici, à leur rôle dans le muscle squelettique en conditions d'atrophie.

A. Le tumor necrosis factor (TNF)- α

De multiples études se sont intéressées aux effets directs du TNF- α sur le muscle squelettique. Le traitement aigu de rats avec du TNF- α recombinant stimulait la dégradation protéique (Flores *et al.*, 1989; Goodman, 1991; Garcia-Martinez *et al.*, 1993b; Llovera *et al.*, 1993), et diminuait la synthèse protéique dans le muscle (Garcia-Martinez *et al.*, 1993b). L'administration intraveineuse aiguë de TNF- α recombinant était responsable d'une augmentation temps-dépendante du taux de protéines conjuguées à l'Ub (Garcia-Martinez *et al.*, 1993a), et de l'expression du transcrite de l'Ub (Garcia-Martinez *et al.*, 1994), dans le muscle squelettique de rat. Au cours d'une étude similaire, l'administration intraveineuse de TNF- α recombinant doublait l'expression du transcrite de l'Ub (Llovera *et al.*, 1997; Llovera *et al.*, 1998a). Il a également été montré que des cellules C2C12 ainsi que des cultures primaires de muscle squelettique de rat, traitées avec du TNF- α , présentaient une augmentation de la conjugaison des protéines à l'Ub (Li *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2003). Cette augmentation de l'activité de conjugaison se faisait par l'intermédiaire d'une augmentation de l'activité d'une E2 appelée Ubch2/E2_{20kDa} (Li *et al.*, 2003). Des cellules C2C12, ainsi que

des cultures primaires de muscle squelettique de rat, traitées avec du TNF- α présentaient une réduction temps- et dose-dépendante de la teneur totale en protéines et une diminution du contenu en chaînes lourdes de myosine rapide (Li *et al.*, 1998; Li & Reid, 2000).

Cette réduction de la protéosynthèse a été attribuée à une diminution de la phosphorylation de 4E-BP1, conduisant à une augmentation de la liaison à eIF4E, et à une réduction de la quantité d'eIF4E associé avec le facteur d'initiation de la traduction 4 gamma (eIF4G pour eukaryotic translation initiation factor 4 gamma) (Lang *et al.*, 2002). Il a également été mis en évidence que le TNF- α induisait la liaison du facteur de transcription NF- κ B sur sa séquence cible de l'ADN, et stimulait la phosphorylation et la dégradation protéasomale de κ B α (Li *et al.*, 1998). D'autres études ont montré que le TNF- α stimulait l'activation et la translocation nucléaire de NF- κ B dans les cellules musculaires squelettiques (Guttridge *et al.*, 2000; Li & Reid, 2000; Langen *et al.*, 2001). Il est également à noter que la voie de signalisation TNF- α /NF- κ B peut être régulée par les espèces réactives de l'oxygène (ou ROS pour reactive oxygen species) endogènes (Li *et al.*, 1998). TNF- α inhibe la myogenèse *in vitro* par un mécanisme au cours duquel l'activation de NF- κ B conduit à la dégradation du transcrit de MyoD (Guttridge *et al.*, 2000). La présence de TNF- α promeut l'atrophie des myotubes en culture, résultant de l'induction de l'expression des transcrits de MuRF1 et de MAFbx/atrogin-1, qui vont être à l'origine de la dégradation des protéines myofibrillaires par le système ubiquitine-protéasome (Li *et al.*, 2005; Frost *et al.*, 2007; Moylan *et al.*, 2008). Il a également été mis en évidence que la perte de protéines musculaires induite par le TNF- α se fait par l'intermédiaire du récepteur 1 au TNF- α (TNFR1) (Llovera *et al.*, 1998b; Llovera *et al.*, 1998c).

B. L'interleukine-6

L'administration intraveineuse aiguë d'IL-6 chez des rats, était responsable d'une augmentation de la dégradation des protéines totales et myofibrillaires dans le muscle squelettique (Goodman, 1994). La surexpression systémique d'IL-6 dans le muscle squelettique de souris provoquait une diminution du poids de corps et une atrophie musculaire (Franckhauser *et al.*, 2008; Baltgalvis *et al.*, 2009). Néanmoins, une étude a montré que la surexpression systémique d'IL-6 n'avait aucun effet sur la masse corporelle et

sur le poids du muscle *gastrocnemius* de souris (Baltgalvis *et al.*, 2008). Cette absence d'effet pourrait être expliquée par la faible quantité d'IL-6 injectée.

In vitro, l'administration d'IL-6 à des myotubes C2C12 entraînait une diminution de la demi-vie des protéines à longue durée de vie, par une augmentation de l'activité du protéasome 26S et des cathepsines B et L (Ebisui *et al.*, 1995). Chez des souris transgéniques surexprimant l'IL-6, l'atrophie musculaire observée était associée à une augmentation de l'expression des transcrits de la cathepsine B et de la cathepsine L, ainsi que de l'Ub (Tsujinaka *et al.*, 1995; Tsujinaka *et al.*, 1996). Néanmoins, contrairement au TNF- α , l'IL-6 ne produisait aucun changement dans l'expression de l'Ub, quand elle était administrée par voie intraveineuse à des rats (Llovera *et al.*, 1998a).

L'administration ciblée d'IL-6 sur le muscle de souris pendant quatorze jours ne modifiait pas l'expression des transcrits de MuRF1 et de MAFbx/atrogin-1 (Haddad *et al.*, 2005). Néanmoins, une étude utilisant les mêmes conditions, a montré une augmentation de l'expression du transcrit de MAFbx/atrogin-1 (Bodell *et al.*, 2009). Chez des souris cachectiques Apc^{Min/+} surexprimant l'IL-6, il a été observé une augmentation marquée de l'expression du transcrit et de la protéine MAFbx/atrogin-1 (Baltgalvis *et al.*, 2009). Chez ce même modèle murin, il a également été mis en évidence une réduction de l'expression du transcrit d'IGF-1, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de mTOR, de 4E-BP1 et de p70^{S6k} (White *et al.*, 2013). *In vitro*, des myotubes C2C12 traités avec de l'IL-6, présentaient une diminution de l'état de phosphorylation des protéines mTOR, 4E-BP1, et du facteur de transcription FoxO3a, ainsi qu'une augmentation de l'expression protéique de MAFbx/atrogin-1, et une réduction de l'expression protéique des chaînes lourdes de myosine (White *et al.*, 2013). Cette étude montrait enfin qu'une cible importante d'IL-6 dans les cellules musculaires était mTOR (White *et al.*, 2013).

C. L'interleukine-1 β

L'administration intraveineuse aiguë d'IL-1 β chez des rats est responsable d'une augmentation de l'expression du transcrit de l'Ub dans le muscle squelettique (Llovera *et al.*, 1998a).

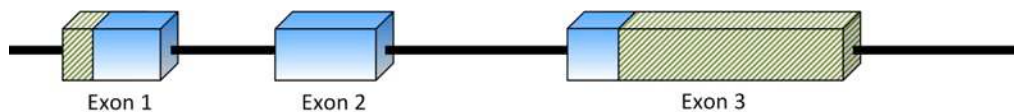


Figure 33 : Le gène de la Mstn.

Il comprend 3 exons, dont les régions codantes sont indiquées en bleu.

Site de production du transcrit de la Mstn	Animal / Homme	Référence
Cœur	Cochon Mouton Souris	(Jiao <i>et al.</i> , 2011) (Sharma <i>et al.</i> , 1999) (Sharma <i>et al.</i> , 1999)
Foie	Cochon	(Jiao <i>et al.</i> , 2011)
Glande mammaire	Souris Truie en lactation	(Manickam <i>et al.</i> , 2008) (Ji <i>et al.</i> , 1998)
Hypophyse antérieure	Porc	(Taketa <i>et al.</i> , 2008)
Muscle squelettique	Bovin Souris Porc Mouton	(Kambadur <i>et al.</i> , 1997) (McPherron <i>et al.</i> , 1997) (Ji <i>et al.</i> , 1998) (Sharma <i>et al.</i> , 1999)
Placenta	Homme	(Mitchell <i>et al.</i> , 2006)
Poumon	Cochon	(Jiao <i>et al.</i> , 2011)
Rate	Cochon Souris	(Jiao <i>et al.</i> , 2011) (Lyons <i>et al.</i> , 2010)
Rein	Cochon	(Jiao <i>et al.</i> , 2011)
Tissu adipeux	Souris	(McPherron <i>et al.</i> , 1997)
Utérus	Ratte	(Manickam <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 5 : Tissu/site d'expression du transcrit de la Mstn, en fonction de l'espèce.

D. L'interféron- γ

Tout comme le TNF- α et l'IL-1 β , l'administration intraveineuse aiguë d'IFN- γ chez des rats était responsable d'une augmentation de l'expression du transcrit de l'Ub dans le muscle squelettique (Llovera *et al.*, 1998a). Des myotubes et des muscles de souris traités avec du TNF- α en combinaison avec de l'IFN- γ , présentaient une diminution significative de l'expression des chaînes lourdes de myosine, indiquant que ces deux cytokines sont complémentaires pour l'initiation de la protéolyse musculaire (Acharyya *et al.*, 2004). De plus, la combinaison du TNF- α avec l'IFN- γ , était responsable *in vitro* et *in vivo* d'une diminution de l'expression de MyoD (Guttridge *et al.*, 2000).

Bien que l'IFN- γ puisse jouer un rôle synergique avec d'autres cytokines comme le TNF- α , afin de créer un environnement propice à la protéolyse musculaire observée lors de la cachexie associée au cancer, les données actuellement disponibles ne permettent pas de lui attribuer un rôle important dans ce phénomène.

2. La myostatine

A. Généralités

La myostatine (Mstn), également appelée growth and differentiation factor-8 (GDF-8) est une protéine de 376 acides aminés, appartenant à la superfamille des transforming growth factor- β (TGF- β) (McPherron *et al.*, 1997) (Figure 33). Son inactivation naturelle ou expérimentale provoque une augmentation de la masse musculaire des animaux (McPherron *et al.*, 1997), faisant de cette protéine un régulateur négatif de la masse musculaire. L'expression de la Mstn est essentiellement restreinte au muscle squelettique (Kambadur *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997; Ji *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1999). Néanmoins, des transcrits de Mstn ont également été détectés en plus faible quantité dans divers tissus (Tableau 5). Plus récemment, la Mstn a été détectée dans les cellules de l'adénocarcinome du côlon C26 (Lokireddy *et al.*, 2012a). La séquence de la Mstn est fortement conservée entre les espèces (rat, souris, poisson-zèbre, poule, dinde, porc et homme) (McPherron *et al.*, 1997). Des mutations naturelles associées à une perte de fonction de la Mstn et à une hypertrophie musculaire, ont été décrites chez les bovins (Grobet *et al.*, 1997; Kambadur *et al.*, 1997; McPherron & Lee, 1997), la souris (Szabo *et al.*, 1998), l'homme (Schuelke *et al.*, 2004), le mouton Texel (Clop *et al.*, 2006), et le lévrier Whippet (Mosher *et al.*, 2007) (Figure 2).

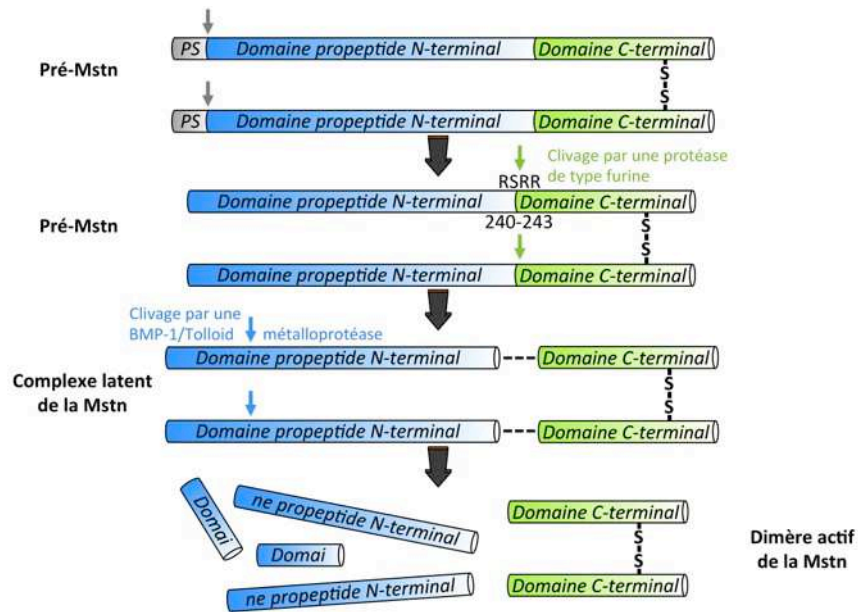


Figure 34 : Etapes d'activation de la Mstn.

Le précurseur de la myostatine (pré-Mstn) est composé d'un peptide signal (PS), d'un domaine propeptide N-terminal et d'un domaine C-terminal. Un premier clivage protéolytique (flèche grise) élimine le PS (24 acides aminés). Puis un second clivage (flèche verte), réalisé par une protéase de type furine, a lieu au niveau du site RSRR (arginine-sérine-arginine-arginine). Suite à ce clivage, le propeptide et le dimère inactif de domaine C-terminal sont générés, mais restent liés de manière non-covalente sous la forme d'un complexe latent. Enfin, un dernier clivage protéolytique (flèche bleue), par une BMP-1/Tolloid métalloprotéase, produit le dimère actif de la Mstn et le propeptide.

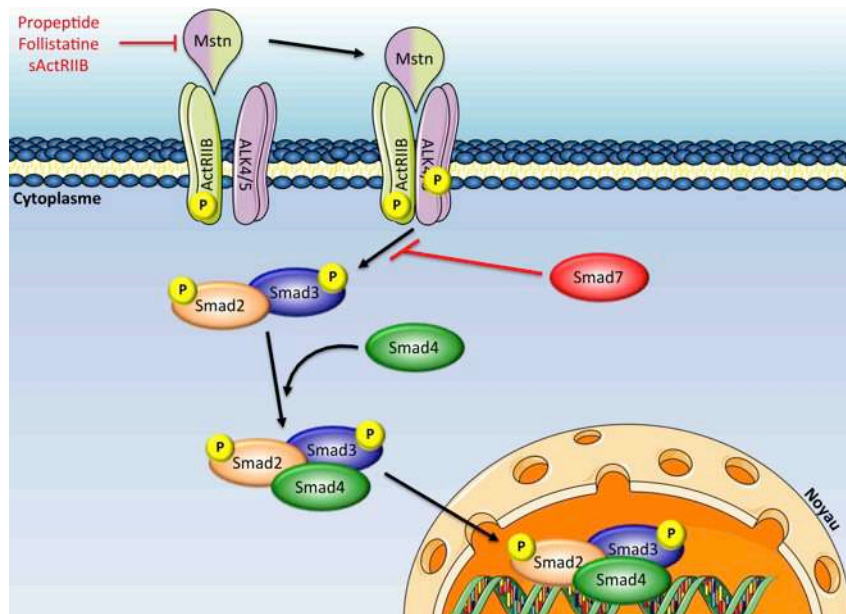


Figure 35 : Représentation schématique de la voie de signalisation de la Mstn.

Comme les autres membres de la famille TGF- β , la Mstn est synthétisée sous forme d'une protéine précurseur, qui subit deux clivages protéolytiques afin de générer un fragment N-terminal, le propeptide, et un fragment C-terminal (McPherron *et al.*, 1997). La dimérisation du fragment C-terminal par un pont disulfure conduit à la formation d'un dimère actif (McPherron *et al.*, 1997) (Figure 34). La Mstn active se fixe avec une grande affinité sur les récepteurs à l'activine IIB (ActRIIB), et avec une moindre affinité sur les récepteurs de l'activine à type IIA (ActRIIA) (Lee & McPherron, 2001; Rebbapragada *et al.*, 2003) (Figure 35). La liaison de la Mstn au récepteur ActRIIB entraîne la phosphorylation et l'activation d'un récepteur de type I activin-like kinase (ALK, de type 4 ou 5) (Rebbapragada *et al.*, 2003) (Figure 35). Le récepteur activé entraîne la phosphorylation des protéines Smad, Smad2 et Smad3 (Langley *et al.*, 2002; Rebbapragada *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2004) (Figure 35). A l'état phosphorylé, ces protéines interagissent avec Smad4 (Zhu *et al.*, 2004) (Figure 35). Le complexe Smad2/3/4 transcriptionnellement actif subit une translocation vers le noyau, où il régule l'expression de gènes cibles, tels que MyoD, myogénine et Myf-5 (Langley *et al.*, 2002; Rios *et al.*, 2002; Joulia *et al.*, 2003; Durieux *et al.*, 2007) (Figure 35). A l'heure actuelle, peu de gènes cibles de la Mstn ont été identifiés. De nombreuses protéines sont capables d'interagir avec la Mstn et d'inhiber son activité (Tableau 6, ci-après).

B. La myostatine et le contrôle de la masse musculaire

L'inactivation du gène de la Mstn chez la souris, conduit à un phénotype « hypermusclé » caractérisé par une hypertrophie et une hyperplasie des fibres musculaires (McPherron *et al.*, 1997). Fait intéressant, l'action de ce facteur de croissance n'est pas uniquement limitée à la période embryonnaire, puisque la myostatine régule la croissance et la taille des muscles chez l'adulte. En effet, l'invalidation post-natale du gène de la Mstn ou l'injection de différents inhibiteurs de la Mstn conduisent également à une hypertrophie de la masse musculaire (Grobet *et al.*, 2003; Whitemore *et al.*, 2003; Wolfman *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). *A contrario*, l'injection de cellules CHO surexprimant la Mstn provoquait chez des souris, une diminution très rapide (15 jours) et massive du poids de corps, principalement due à une perte musculaire marquée (-35 à 50%), conduisant dans certains cas à la mort des animaux (Zimmers *et al.*, 2002). De plus, la surexpression du gène de la Mstn dans le muscle squelettique au cours du développement embryonnaire ou

Protéine	Référence
Décorine	(Miura <i>et al.</i> , 2006)
Follistatine	(Lee & McPherron, 2001; Zimmers <i>et al.</i> , 2002; Amthor <i>et al.</i> , 2004)
FLRG	(Hill <i>et al.</i> , 2002; Lee, 2007)
GASP-1	(Hill <i>et al.</i> , 2003; Monestier <i>et al.</i> , 2012; Lee & Lee, 2013)
GASP-2	(Kondas <i>et al.</i> , 2008; Szlama <i>et al.</i> , 2010; Lee & Lee, 2013)
hSGT	(Wang <i>et al.</i> , 2003a)
Laminine	(Yasaka <i>et al.</i> , 2013)
Propeptide	(Lee & McPherron, 2001; Thies <i>et al.</i> , 2001; Pirottin <i>et al.</i> , 2005)
Titin-cap	(Nicholas <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 6 : Protéines interagissant avec la Mstn et inhibant son activité.

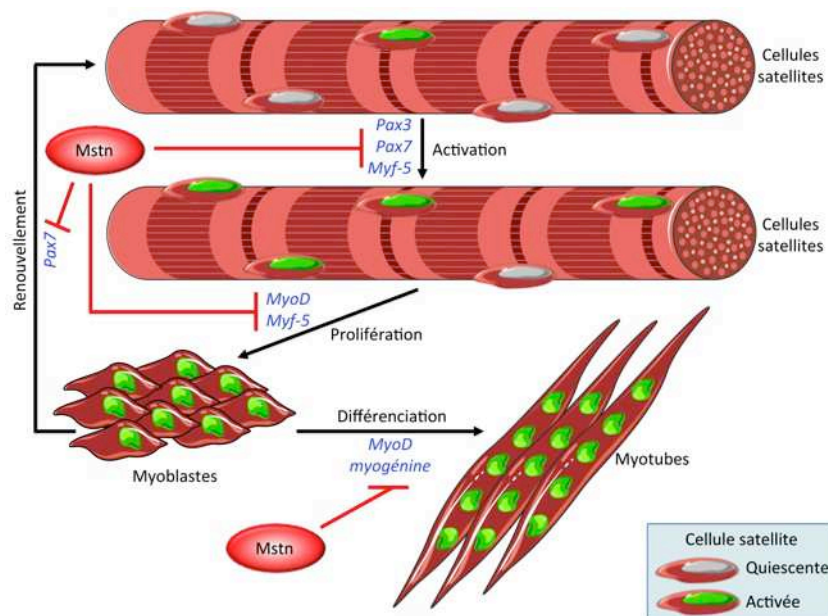


Figure 36 : Modèle proposé de l'action de la myostatine pendant la croissance et la différenciation musculaire.

l'électrotransfert du gène de la Mstn dans le muscle *tibialis anterior* de rat adulte, entraînait une atrophie musculaire sévère (Reisz-Porszasz *et al.*, 2003; Durieux *et al.*, 2007).

Un certain nombre d'étude a mis en évidence que la surexpression de la Mstn ou l'administration de Mstn recombinante induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 de myoblastes en culture (myoblastes primaires bovins, cellules satellites murines, myoblastes de la lignée C2C12), et inhibe la prolifération et la différenciation (Thomas *et al.*, 2000; Rios *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001; Langley *et al.*, 2002; Rios *et al.*, 2002; Joulia *et al.*, 2003; McCroskery *et al.*, 2003), en inhibant probablement les facteurs de régulation majeurs de la myogenèse, MyoD, Pax3 et Pax7 (Amthor *et al.*, 2002; Langley *et al.*, 2002; Amthor *et al.*, 2004; Amthor *et al.*, 2006; McFarlane *et al.*, 2008) (Figure 36). La déficience ou le blocage de la Mstn, permet l'activation et le renouvellement des cellules satellites, dans le muscle sain et le muscle atrophié (McCroskery *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2010), suggérant un rôle de la Mstn. L'ensemble de ces actions explique pourquoi les animaux déficients pour le gène de la Mstn présentent un phénotype « hypermusclé ». Chez l'individu adulte, la Mstn agit enfin comme un régulateur négatif de la voie PI3K/Akt/mTOR (Amirouche *et al.*, 2009; Morissette *et al.*, 2009; Lipina *et al.*, 2010). Ceci a également été montré *in vitro* (Morissette *et al.*, 2009; Trendelenburg *et al.*, 2009; Lokireddy *et al.*, 2011b; Rodriguez *et al.*, 2011). De plus, il a été mis en évidence que la Mstn augmentait l'expression des transcrits de MuRF1 et de MAFbx/atrogin-1 *in vitro*, par l'intermédiaire des facteurs de transcription FoxO (McFarlane *et al.*, 2006; Lokireddy *et al.*, 2011b). L'administration de dexaméthasone, un agent atrophiant, provoquant une augmentation de l'expression des transcrits de MuRF1, de MAFbx/atrogin-1 et de FoxO3a chez des souris sauvages, n'avait aucun effet sur l'expression de ces transcrits chez des souris déficientes pour le gène de la Mstn (Mstn^{-/-}) (Gilson *et al.*, 2007). Enfin, la Mstn est également capable d'induire l'autophagie *in vitro* (Lee *et al.*, 2011).

L'expression de la Mstn est augmentée dans de nombreuses conditions menant à l'atrophie musculaire (Tableau 7, ci-après). Une augmentation de son expression pourrait constituer une signature moléculaire de l'atrophie musculaire. Enfin, l'inhibition de la l'activité de la Mstn peut augmenter la masse musculaire chez le sujet sain (Attie *et al.*, 2013), ainsi que dans différents modèles de maladies associées à une fonte musculaire,

Condition	Animal / Homme	Référence
Accident vasculaire cérébral	Homme	(Ryan <i>et al.</i> , 2011)
BPCO	Homme	(Plant <i>et al.</i> , 2010) (Hayot <i>et al.</i> , 2011)
Immobilisation prolongée	Homme	(Reardon <i>et al.</i> , 2001)
Insuffisance cardiaque	Homme	(George <i>et al.</i> , 2010) (Gruson <i>et al.</i> , 2011)
SIDA	Homme	(Gonzalez-Cadavid <i>et al.</i> , 1998)
Vieillesse	Homme	(Yarasheski <i>et al.</i> , 2002) (McKay <i>et al.</i> , 2012)
Administration de glucocorticoïdes	Rat Souris	(Ma <i>et al.</i> , 2003) (Gilson <i>et al.</i> , 2007)
Diabète de type I	Souris	(Jeong <i>et al.</i> , 2013)
Hypoxie	Rat	(Hayot <i>et al.</i> , 2011)
Jeûne alimentaire	Souris	(Allen <i>et al.</i> , 2010a)
Insuffisance rénale	Souris	(Cheung <i>et al.</i> , 2008) (Zhang <i>et al.</i> , 2011)
Stress quotidien aigu	Souris	(Allen <i>et al.</i> , 2010b)

Tableau 7 : Augmentation de l'expression de Mstn dans diverses conditions conduisant à une atrophie musculaire.

incluant la sclérose latérale amyotrophique (Holzbaur *et al.*, 2006), les dystrophies musculaires (Bogdanovich *et al.*, 2002; Bogdanovich *et al.*, 2005; Wagner *et al.*, 2005; Morine *et al.*, 2010; Pistilli *et al.*, 2011), et la sarcopénie (Murphy *et al.*, 2010a; Arounleut *et al.*, 2013; Chiu *et al.*, 2013).

C. Implication de la Mstn dans la cachexie associée au cancer

La Mstn est un acteur important de l'atrophie musculaire observée au cours de la cachexie associée au cancer. En effet, il a été observé une augmentation de l'expression de la Mstn (Costelli *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Bonetto *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010; Busquets *et al.*, 2012b; Padrao *et al.*, 2013), ainsi que de la forme phosphorylée de Smad2 (Zhou *et al.*, 2010), et de Smad3 (Padrao *et al.*, 2013), dans le muscle de souris cachectiques. Il a également été rapporté une augmentation de l'expression du transcrite d'ActRIIB (Busquets *et al.*, 2012a), ainsi qu'une diminution de FLST288 et de FLST315, des isoformes de la follistatine, un inhibiteur endogène de la Mstn (Busquets *et al.*, 2012a). De plus, l'administration d'un récepteur soluble leurre du ActRIIB (sActRIIB) ou d'un anticorps anti-Mstn protégeait les souris d'une atrophie musculaire, ceci conduisant à une amélioration marquée de la masse et de la fonction musculaire chez les animaux cachectiques (Benny Klimek *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2011a; Busquets *et al.*, 2012b) (Tableau 8, ci-après). Il a également été mis en évidence un prolongement de la durée de vie de souris porteuses de tumeurs (Zhou *et al.*, 2010). Dans cette dernière étude, Xiaolan Zhou *et al.* ont administré le sActRIIB à des souris cachectiques C26, à des souris transplantées avec des cellules du carcinome de l'ovaire TOV-21G, à des souris transplantées avec des cellules du mélanome G361, ainsi qu'à des souris déficientes pour le gène de l'inhibine- α qui développent spontanément des tumeurs gonadiques et une cachexie marquée (Matzuk *et al.*, 1994). Dans chaque cas, le blocage de la Mstn et/ou de la signalisation de l'activine prévenait l'atrophie musculaire voire augmentait la masse musculaire (Zhou *et al.*, 2010). Enfin, il est à souligner que le sécrétome des cellules de l'adénocarcinome du côlon C26 a été caractérisé, et il a été observé que ces cellules sécrétaient abondamment la Mstn (Lokireddy *et al.*, 2012a).

Modèle	Inhibiteur	Principaux effets	Référence
Souris cachectiques C26	sActRIIB	- Prévention de la perte de masse musculaire voire gain - Prévention de la perte de force musculaire voire gain - Prolongement de la durée de vie	(Zhou <i>et al.</i> , 2010)
Souris cachectiques C26	sActRIIB	- Prévention de la perte de masse musculaire - Prévention de la perte de force musculaire	(Benny Klimek <i>et al.</i> , 2010)
Souris cachectiques LLC	Anticorps anti-Mstn	- Prévention de la perte de fonction musculaire	(Benny Klimek <i>et al.</i> , 2010; Murphy <i>et al.</i> , 2011a)
Souris cachectiques LLC	sActRIIB	- Amélioration de la masse musculaire - Prévention de l'activité physique	(Busquets <i>et al.</i> , 2012b)
Souris déficientes pour le gène de l'inhibine- α	sActRIIB	- Prévention de la perte de masse musculaire voire gain - Prévention de la perte de force musculaire voire gain - Prolongement de la durée de vie	(Zhou <i>et al.</i> , 2010)

Tableau 8 : Principaux effets obtenus au cours d'études ayant utilisé l'inhibition de la myostatine comme stratégie thérapeutique, au cours de la cachexie associée au cancer. [modifié d'après (Han *et al.*, 2013)].

Ces données soulignent clairement l'importance de la voie de signalisation de la Mstn dans la régulation de l'homéostasie musculaire, et également de son implication dans la pathogenèse de la fonte musculaire en cas de cancer. Le nombre grandissant de données pré-cliniques obtenues sur les animaux, suggère fortement les effets bénéfiques de l'antagonisme de cette signalisation dans les maladies humaines.

3. *Le TNF-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)*

A. Généralités

La cytokine TWEAK, connue aussi sous le nom TNFSF12, est une protéine membranaire, de la superfamille TNF (Chicheportiche *et al.*, 1997). Elle fut nommée TWEAK car elle possède une activité pro-apoptotique (Chicheportiche *et al.*, 1997). TWEAK est une cytokine multifonctionnelle puisqu'elle régule notamment la prolifération, la migration, la différenciation, la survie et la mort cellulaires, ainsi que l'angiogenèse et l'inflammation (Winkles, 2008). Elle est initialement synthétisée sous la forme d'une protéine de 249 acides aminés, puis est activée par la protéolyse de son domaine C-terminal (Chicheportiche *et al.*, 1997). Enfin, le produit restant de 156 acides aminés fonctionne comme une cytokine soluble (Chicheportiche *et al.*, 1997). Son récepteur, appelé protein fibroblast growth factor-inducible 14 (Fn14), a été cloné en 2001 (Wiley *et al.*, 2001), mais sa découverte est antérieure (Meighan-Mantha *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000). C'est une protéine transmembranaire, qui une fois activée par protéolyse, devient un récepteur membranaire (Meighan-Mantha *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 2000; Wiley *et al.*, 2001). La portion cytoplasmique du récepteur Fn14 présente des motifs d'accrochage pour les TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, 2, 3 et 5 (Wiley *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2003).

L'accrochage de TWEAK à Fn14 (Marsters *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003), conduit au recrutement de TRAF2 et/ou TRAF5 par l'intermédiaire des motifs d'accrochage cytoplasmique de Fn14 (Harada *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2003; Saitoh *et al.*, 2003). Un complexe formé de TRAF2 et de cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) se lie notamment à Fn14 (Vince *et al.*, 2008), et conduit à l'activation de protéines signalétiques comme NF- κ B inducing kinase (NIK), TAK1 ou TRAF6 (Winkles, 2008; Paul *et al.*, 2012). Enfin, en aval, la voie de signalisation TWEAK-Fn14 active en particulier la voie NF- κ B (Marsters *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2003; Dogra *et al.*, 2007; Winkles, 2008) (Figure 37, ci-après).

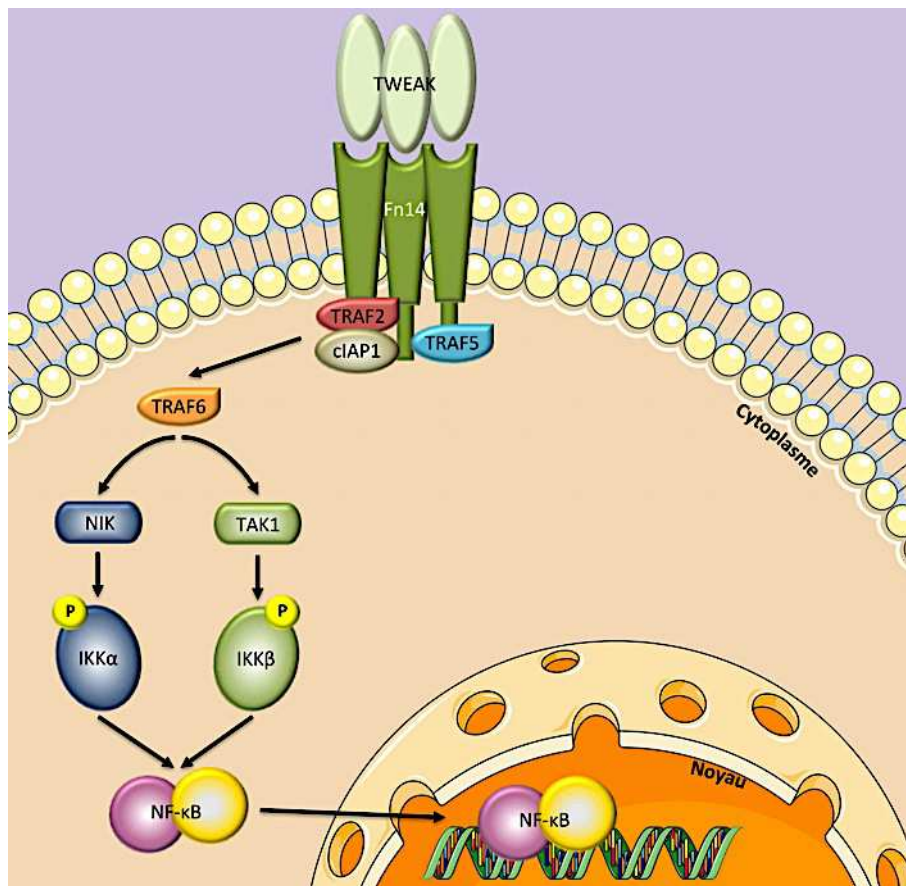


Figure 37 : Représentation schématique de la voie de signalisation TWEAK/Fn14.

B. TWEAK-Fn14 dans le muscle squelettique

In vitro, l'incubation de myotubes C2C12 avec TWEAK provoque une atrophie musculaire marquée par une diminution du contenu total en protéines, et une diminution du taux de chaînes lourdes de myosine rapides (Dogra *et al.*, 2007; Bhatnagar *et al.*, 2012). De plus, l'incubation avec TWEAK provoque une augmentation de l'ubiquitination des chaînes lourdes de myosine rapides (Dogra *et al.*, 2007; Bhatnagar *et al.*, 2012), ainsi qu'une augmentation de l'expression des transcrits de MuRF1 et de MAFbx/atrogin-1 (Dogra *et al.*, 2007), une augmentation de l'activité de NF- κ B (Dogra *et al.*, 2007), une augmentation de l'expression de composants majeurs du système autophagie-lysosome (Bhatnagar *et al.*, 2012), et de l'activité de la caspase-3 (Bhatnagar *et al.*, 2012). Il a également été montré que TWEAK inhibait la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, *in vitro* (Dogra *et al.*, 2007).

In vivo, l'injection de TWEAK soluble à des souris provoque une perte de masse musculaire importante, une augmentation de l'ubiquitination des chaînes lourdes de myosine rapides, ainsi qu'une augmentation de l'activité de NF- κ B (Dogra *et al.*, 2007). De plus, des souris surexprimant TWEAK dans le muscle présentent un poids corporel plus faible comparées à des souris sauvages (Dogra *et al.*, 2007), ainsi qu'une diminution de la masse musculaire (Dogra *et al.*, 2007; Mittal *et al.*, 2010), une réduction du contenu en chaînes lourdes de myosine (Mittal *et al.*, 2010), et une augmentation des voies de signalisation ubiquitine-protéasome et NF- κ B (Dogra *et al.*, 2007; Mittal *et al.*, 2010). Au contraire, des souris déficientes pour le gène TWEAK (TWEAK-KO), présentent une hypertrophie des fibres musculaires (Mittal *et al.*, 2010).

Dans différents modèles d'atrophie, il a été montré une augmentation de l'expression de Fn14 dans le muscle, mais aucun changement de l'expression de TWEAK (Mittal *et al.*, 2010). Au cours d'un protocole de dénervation chez la souris, la surexpression de TWEAK stimulait la perte de masse musculaire induite, alors que chez les souris TWEAK-KO, l'atrophie musculaire était réduite (Mittal *et al.*, 2010). Il a également été observé dans le muscle dénervé que TWEAK régulait l'activité de NF- κ B et de MuRF1, mais n'avait aucun effet sur le système autophagie-lysosome (Mittal *et al.*, 2010). Récemment, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression des transcrits de MuRF1 et de MAFbx/atrogin-1, ainsi que de TWEAK et de Fn14, dans des biopsies musculaires de patients gravement brûlés (Merritt *et al.*, 2013).

Les sphingolipides, et plus particulièrement le céramide, la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate (S1P), sont apparus ces dernières années comme des messagers primordiaux impliqués dans divers processus biologiques, et notamment la réponse cellulaire au stress, l'induction de l'apoptose, la différenciation et la régulation de la croissance cellulaire (Futerman & Hannun, 2004). Ce sont des molécules ubiquitaires présentes chez les cellules eucaryotes (Karlsson, 1970). Les sphingolipides ont été décrits pour la première fois en 1884 sous le nom de « sphingoid / sphingosin » par J. W. L. Thudichum (Thudichum, 1884), qui a utilisé le préfixe sphingo- en référence aux énigmes que le Sphinx posait aux voyageurs. C'est en 1947 que le terme de sphingolipide fut introduit par Herbert Carter (Carter *et al.*, 1947).

Ces lipides présentent une base sphingoïde commune, la sphingosine (Thudichum, 1882). Lorsque la sphingosine est liée à un acide gras par une liaison amide, on obtient alors une sphingosine N-acylée, communément appelée céramide. L'acide gras constitutif de ce céramide est une longue chaîne carbonée qui contient généralement de 16 à 26 atomes de carbone (Chester, 1998). Néanmoins, selon les tissus, la longueur de la chaîne carbonée peut varier de 12 à 36 atomes de carbone (Mizutani *et al.*, 2005; Masukawa *et al.*, 2008; Sassa *et al.*, 2013). L'acide gras et la sphingosine constituent la queue apolaire des sphingolipides (Futerman & Hannun, 2004). La tête polaire va définir en fonction de sa composition deux types de sphingolipides : les glycosphingolipides si la tête est un glucide, et les sphingophospholipides si un groupement phosphate est lié à l'alcool.

Les sphingolipides sont formés par deux voies différentes : la voie de synthèse de novo et la « voie de recyclage ».

La synthèse de novo (Figure 38, ci-après) commence par la condensation de la sérine et du palmitoyl-CoA, catalysée par la sérine palmitoyltransférase (Mandon *et al.*, 1992). Le produit, la 3-cétosphinganine est réduit en sphinganine par la 3-cétosphinganine réductase (Merrill & Wang, 1986). La sphinganine par l'intermédiaire de la dihydrocéramide synthase (connue aussi sous le nom de Lass ou CerS), génère le dihydrocéramide (Merrill & Wang, 1986). Enfin, le céramide est formé à partir du dihydrocéramide, par l'insertion d'une double liaison cis 4-5, par la dihydrocéramide désaturase (Rother *et al.*, 1992). Les céramides s'accumulent sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (Mandon *et al.*, 1992), où ils peuvent être réorientés vers d'autres compartiments subcellulaires (translocation à la membrane plasmique, ou transit intra-golgien notamment) et être utilisés comme précurseurs dans la synthèse de sphingolipides complexes comme les glycosphingolipides (Coste *et al.*, 1986), ou la sphingomyéline (Futerman *et al.*, 1990).

La « voie de recyclage » (Figure 38, ci-après), quant à elle, débute par la dégradation de la sphingomyéline en céramide par les sphingomyélinases membranaires (Gault *et al.*, 2010). Le céramide est hydrolysé par les céramidases (N-acylsphingosine déacylases) pour donner la sphingosine, dans les lysosomes/endosomes tardifs (Xu *et al.*, 2006; Gault *et al.*, 2010). Ce produit est phosphorylé par les sphingosines kinases et donne la S1P. Un flux inverse peut générer à nouveau le céramide à partir de la sphingosine, grâce à la céramide synthase, après déphosphorylation de la S1P par la sphingosine-1-phosphatase (Johnson *et al.*, 2003; Gault *et al.*, 2010). La contribution de cette voie dans la biosynthèse des sphingolipides est estimée à 50 à 90% (Gillard *et al.*, 1998)

Boîte 1 : Généralités sur les sphingolipides.

La structure des principaux sphingolipides impliqués dans la voie de « voie de recyclage » et la voie de synthèse de novo est indiquée en Figure 39 (ci-après).

C. Implication de TWEAK dans la cachexie associée au cancer

Chez des rats cachectiques, une augmentation de l'expression sérique et de l'expression protéique de TWEAK, a été décrite dans le muscle *gastrocnemius* (Padrao *et al.*, 2013).

Bien que la voie TWEAK-Fn14 semble jouer un rôle prépondérant dans différentes conditions d'atrophie, il n'existe pour le moment qu'une seule étude démontrant une augmentation de son expression lors de la cachexie associée au cancer. Son implication fonctionnelle reste donc à déterminer dans la cachexie associée au cancer.

4. Les céramides

A. Généralités

D'un point de vue structural, les céramides sont les sphingolipides (Boîte 1) les plus simples, puisqu'ils résultent de la condensation de la sphingosine et d'un acide gras. Ils diffèrent simplement par la nature de leur acide gras (nombre d'atomes de carbone, nombre d'insaturations) (Chester, 1998). Ils sont synthétisés à partir de la voie *de novo* ou de la « voie de recyclage » de la sphingosine, ou par l'hydrolyse de sphingolipides complexes par les sphingomyélinases (Figure 38, ci-après). Ils possèdent donc un rôle central au carrefour des différentes voies métaboliques, comme précurseur de sphingolipides complexes indispensables, et comme molécule clé dans la signalisation (Hannun & Obeid, 2002).

En plus de ce rôle d'intermédiaire métabolique, les céramides sont d'importants seconds messagers impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'induction de l'apoptose, la différenciation, l'inhibition de la prolifération et la régulation du processus inflammatoire (Mathias *et al.*, 1998). En particulier, il a été montré que la synthèse de céramides était stimulée par des cytokines, telles que le TNF- α chez des cellules pro-myéloïdes HL-60 ou dans un système acellulaire (Kim *et al.*, 1991; Dressler *et al.*, 1992), l'IL-1 β chez des cellules lymphomateuses T (EL4) ou dans un système acellulaire (Mathias *et al.*, 1993), et l'IFN- γ chez des cellules pro-myéloïdes HL-60 (Kim *et al.*, 1991). Il a également été observé que les céramides entraînaient la dégradation de I κ B (Machleidt *et al.*, 1994), et la translocation au noyau de NF- κ B (Yang *et al.*, 1993; Machleidt *et al.*, 1994). L'action des céramides sur NF- κ B est notamment régulée par la protéine kinase C ζ (PKC ζ) (Lozano *et al.*, 1994). Les céramides sont également capables de générer des ROS et d'induire un stress oxydatif (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997; Corda *et al.*, 2001). Enfin, les

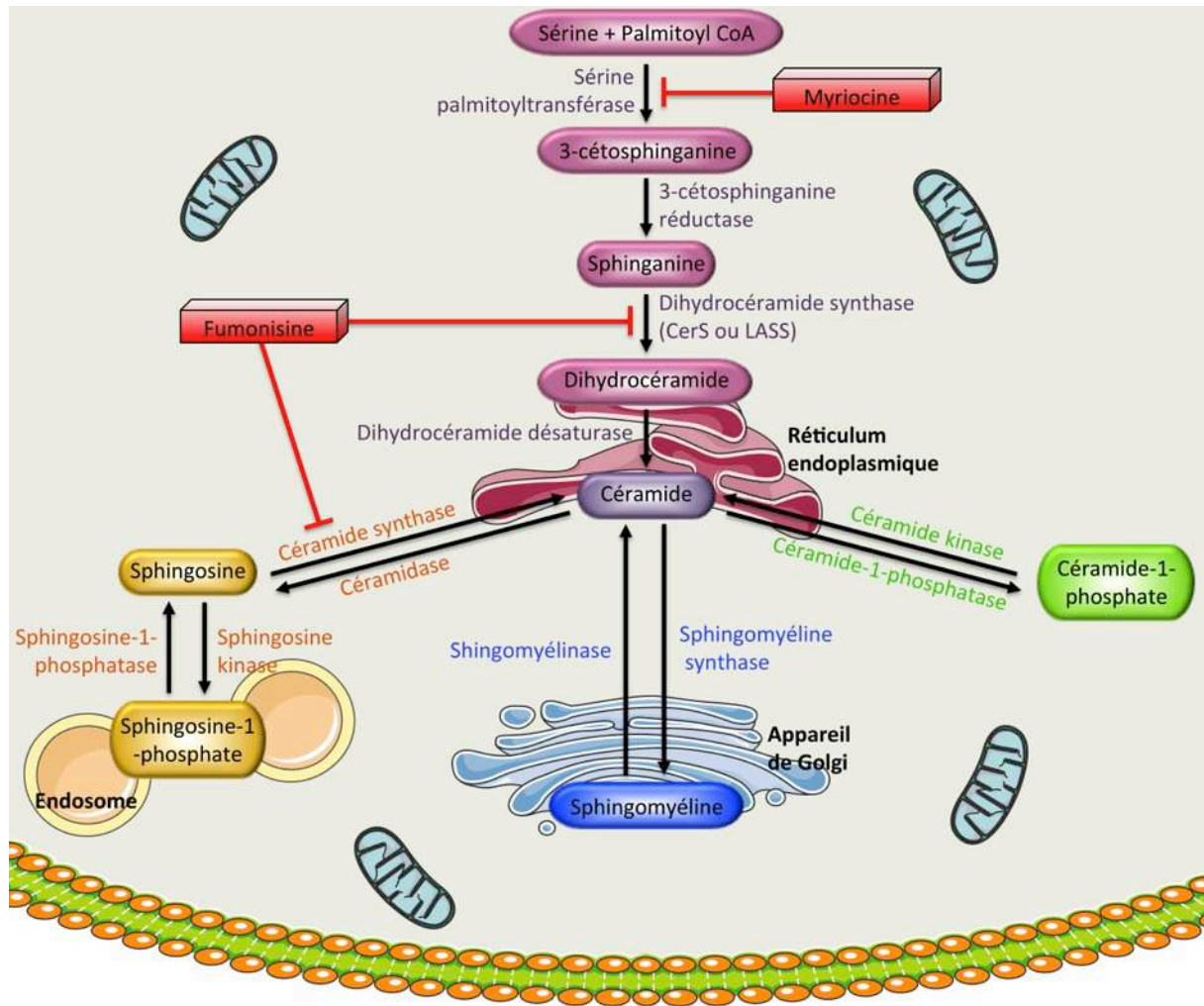


Figure 38 : Voies de synthèse des sphingolipides

Les céramides sont formés à partir de la sphingomyéline (bleu) et du céramide-1-phosphate (vert), ainsi qu'au cours de la « voie de recyclage » (orange) et de la voie de synthèse de novo (violet). Cette synthèse peut être bloquée par des inhibiteurs comme le fumonisine ou la myriocine.

céramides sont impliqués dans le contrôle de l'autophagie (Daido *et al.*, 2004; Scarlatti *et al.*, 2004).

B. Les céramides dans le muscle squelettique

In vitro, les céramides ont des propriétés anti-myogéniques puisqu'ils limitent la différenciation de lignées myogéniques et de cellules satellites (Meadows *et al.*, 2000; Mebarek *et al.*, 2007). Les céramides agissent sur la croissance des myotubes en bloquant la synthèse protéique, via l'inhibition du transport d'acides aminés et l'inhibition de la voie de synthèse PI3K/Akt/mTOR (Hyde *et al.*, 2005). L'administration de céramides sur des myotubes en culture provoque une atrophie musculaire (De Larichaudy *et al.*, 2012). Chez des myotubes L6 et C2C12, les céramides sont également responsables d'une diminution du contenu en chaînes lourdes de myosine (De Larichaudy *et al.*, 2012). Les céramides sont responsables d'une inhibition de l'expression et de l'activité de l'isoforme 1 de la phospholipase D (PLD) (Mebarek *et al.*, 2007). La PLD active la différenciation myogénique, ainsi que la voie PI3K/Akt/mTOR (Jaafar *et al.*, 2011; Jaafar *et al.*, 2013) (Figure 40, ci-après). Enfin, il a été montré que l'exposition directe de myotubes matures C2C12 à des céramides, provoquait une augmentation du stress oxydatif, due à une augmentation de la formation de ROS (Ferreira *et al.*, 2010).

La grande majorité (environ 75%) des céramides est constituée d'un acide palmitique (16 atomes de carbone et aucune double liaison), d'un acide stéarique (18 atomes de carbone et aucune double liaison), ou d'un acide oléique (18 atomes de carbone et une double liaison) (Dobrzyn & Gorski, 2002). La teneur du muscle *in vivo* en céramides a été étudiée dès le début des années 1990. Il a notamment été mis en évidence une hausse des taux de céramides chez des rats Zucker obèses, ainsi que chez des rats Sprague-Dawley ayant subi une dénervation (Turinsky *et al.*, 1990), ou une période de jeûne alimentaire (Turinsky *et al.*, 1991). Il a également été observé que le taux de céramides dans les muscles était fortement réduit par l'exercice prolongé chez le rat (Dobrzyn & Gorski, 2002).

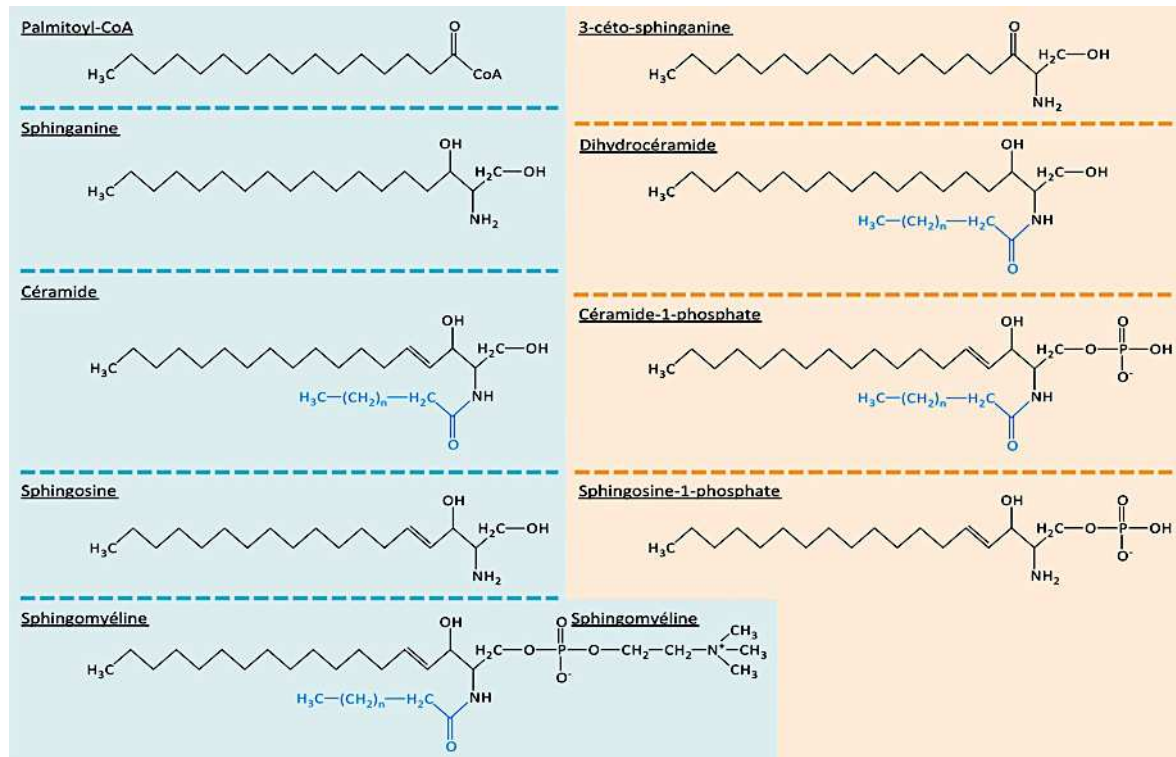


Figure 39 : Structures des principaux sphingolipides impliqués dans la voie de « voie de recyclage » et la voie de synthèse *de novo*.

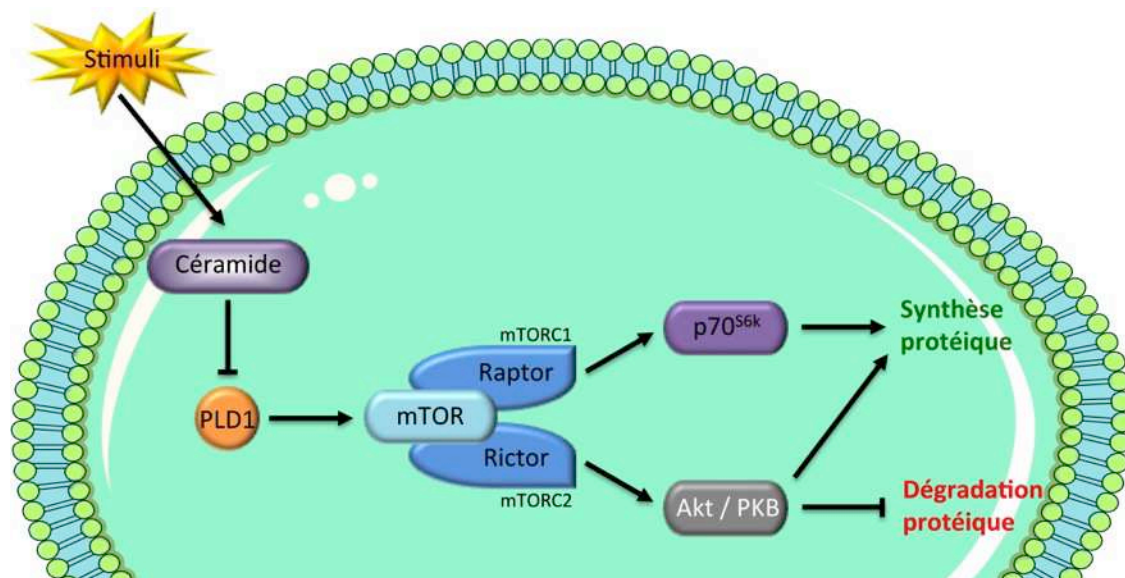


Figure 40 : Modèle proposé de l'implication des céramides sur la voie PI3K/Akt/mTOR.

Suite à des stimuli (TNF- α par exemple), des céramides sont produits. Les céramides régulent négativement la phospholipase D1 (PLD1), qui est connue pour activer mTORC1 et mTORC2. L'activation de mTORC1 conduit à l'activation de la protéine p70S6k, impliquée dans la synthèse protéique. L'activation de mTORC2 conduit à l'activation d'Akt, impliquée dans la synthèse et la dégradation protéique.

C. Implication des céramides dans la cachexie associée au cancer

A l'heure actuelle, une seule étude s'est intéressée au rôle des céramides dans la cachexie associée au cancer. Chez des souris cachectiques C26, il était décrit une augmentation de 53% du taux de céramides dans le muscle (De Larichaudy *et al.*, 2012). Chez ce même modèle animal, l'ajout de la myriocine, un inhibiteur de la sérine palmitoyltransférase, protégeait de l'atrophie musculaire (De Larichaudy *et al.*, 2012). De plus, en présence de myriocine, il était observé une diminution de l'expression des transcrits de MAFbx/atrogin-1 et de FoxO3 (De Larichaudy *et al.*, 2012).

Bien qu'il existe peu de données sur l'implication des sphingolipides, et en particulier des céramides dans la cachexie associée au cancer, la récente étude de Jeffrey De Larichaudy et ses collaborateurs (De Larichaudy *et al.*, 2012), a mis en évidence un rôle majeur des céramides dans la pathogenèse de l'atrophie musculaire. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour confirmer ces résultats et définir le rôle exact des céramides dans la cachexie associée au cancer. Dans l'étude menée par Suman K. Das et son équipe (Das *et al.*, 2011), la prévention de la perte de tissu adipeux et de tissu musculaire observée chez des souris *Atgl*^{-/-} ou *Hsl*^{-/-} lors de la cachexie associée au cancer, pourrait être due à une diminution de la production intracellulaire de céramides chez la souris.

En résumé, différents processus moléculaires sont mis en jeu lors de la perte de masse musculaire observée au cours de la cachexie associée au cancer. D'après cette revue de littérature, le système protéolytique autophagie-lysosome et surtout le système protéolytique ubiquitine-protéasome sont les principaux contributeurs menant à la fonte musculaire. La voie PI3K/Akt/mTOR est généralement inhibée, contribuant à cette perte de masse musculaire. Toutefois, certaines études ont montré la mise en place d'un processus compensatoire afin de lutter contre cette atrophie, par une activation de la voie PI3K/Akt/mTOR. Un rôle des calpaïnes et de l'apoptose n'est pas à exclure, mais davantage de travaux expérimentaux sont nécessaires pour évaluer leurs implications. De plus, la balance entre anabolisme et catabolisme est aussi régulée par l'intermédiaire de facteurs de transcriptions, tels que NF- κ B et FoxO, qui contrôlent l'expression des gènes impliqués dans le système ubiquitine-protéasome. En amont, des médiateurs comme la Mstn, le TWEAK et/ou les céramides semblent jouer un rôle important. Enfin, le blocage de la Mstn et/ou de sa voie de signalisation, constitue une piste thérapeutique très intéressante dont les effets bénéfiques au cours de la cachexie associée au cancer sont maintenant connus. Néanmoins, il reste à déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Chapitre III : Prise en charge clinique de la cachexie associée au cancer

En plus des multiples effets décrits précédemment, la cachexie associée au cancer va avoir des effets psychologiques et sociaux sur les patients. En effet, ils sont confrontés à la maladie, aux regards de leurs proches, ainsi qu'à leur propre regard. Les patients font généralement l'expérience d'une réduction de leur cercle social et d'un isolement. Leur apparence va être pour eux la cause d'une situation d'embarras lors d'interactions sociales, mais aussi d'une perte d'identité, et par conséquent d'une distance avec eux-mêmes. Ils sont également confrontés à la méconnaissance ou au manque de connaissance du personnel de santé ainsi que de leurs proches au sujet du processus cachectique. Enfin, les familles exhortant généralement le patient à se battre contre sa perte de poids irréversible et son manque d'appétit, provoquent une importante frustration et un immense désespoir (Reid *et al.*, 2009). Il est donc nécessaire de trouver et de mettre en place des stratégies thérapeutiques afin de lutter contre la cachexie associée au cancer.

Bien que de nombreuses stratégies de prise en charge de la cachexie associée au cancer soient proposées, aucune n'est efficace. Les recherches dans ce domaine se poursuivent donc afin de déterminer laquelle (nutritionnelle, pharmacologique, utilisant l'exercice, utilisant une combinaison de ces différentes stratégies) serait la plus à même pour réduire les symptômes.

I. Soutien nutritionnel

Chez les personnes atteintes de cancer et perdant du poids, le déficit calorique moyen est estimé à environ 200 kilocalories par jour (Moses *et al.*, 2004). De nombreux facteurs contribuant à cet apport nutritionnel sous-optimal existent : l'anorexie associée aux altérations métaboliques, le cancer, les thérapies anti-cancéreuses et les aspects psychosociaux de la maladie. La mise en place d'un soutien nutritionnel doit être considérée chez les patients souffrant de ce déficit. Ce soutien doit être adapté à l'individu et peut varier, de simples conseils (sur l'enrichissement des aliments, sur la modification de la texture des aliments, sur les habitudes alimentaires et sur les compléments nutritionnels oraux), à la prescription d'une nutrition entérale ou parentérale artificielle.

1. Soutien nutritionnel oral

La première étape du soutien nutritionnel est l'aide à la prise des repas. Lorsque les besoins nutritionnels ne sont pas satisfaits, l'étape suivante est la fortification alimentaire (ou enrichissement des aliments) c'est à dire l'utilisation d'aliments riches en énergie et en protéines, et la fourniture de substances liquides nutritives. Les diététiciens possèdent les compétences nécessaires pour fournir ce type de conseils personnalisés.

Chez des patients recevant une chimiothérapie pour le cancer du poumon, du sein ou de l'ovaire, il a été observé une aucune augmentation significative de l'épaisseur du pli cutané du *triceps* dans le groupe recevant des conseils diététiques (Ovesen *et al.*, 1993). Néanmoins, du fait de l'absence d'effets sur d'autres paramètres évalués (survie, qualité de vie, poids), la conclusion des auteurs était qu'il n'y avait aucun bénéfice clinique à fournir des conseils diététiques à ce groupe de patients (Ovesen *et al.*, 1993). En revanche, un soutien nutritionnel individualisé permettait un gain de poids significatif après douze mois, chez des patients avec un cancer gastrique ou colorectal (Persson *et al.*, 2002). Chez des patients souffrant d'un cancer gastro-intestinal ou d'un cancer de la tête et du cou et traités par radiothérapie, ces conseils diététiques minimisaient la perte de poids et la dégradation de la qualité de vie (Isenring *et al.*, 2004). Ce type de prise de charge améliorait également l'apport énergétique et protéique, ainsi que la qualité de vie de patients atteints d'un cancer colorectal ou d'un cancer de la tête et du cou et traités par radiothérapie (Ravasco *et al.*, 2005a; Ravasco *et al.*, 2005b). L'étude portant sur les patients souffrant d'un cancer colorectal a mis en évidence que les bénéfices observés trois mois après la fin de la radiothérapie, perduraient après plus de six ans, et que ces conseils diététiques personnalisés augmentaient le temps de survie (Ravasco *et al.*, 2012).

Pour certaines personnes, indépendamment du fait d'être conseillées sur les différents moyens de maximiser leur apport en macronutriments et micronutriments, l'augmentation souhaitée de l'ingestion d'aliments n'est pas réalisable. A ce stade, la fourniture de compléments nutritionnels oraux doit être étudiée. Une vaste gamme de compléments existe sous différentes formes : en bouteille, en brique et en pot. Le choix des saveurs (sucré, salé, aromatisé ou nature) et des textures (boisson, crème dessert, compote, plat préparé, potage) permet de trouver les produits adaptés aux besoins et aux goûts des patients et d'éviter les aversions et la lassitude (Demoor-Goldschmidt & Raynard, 2009). De plus, des glucides, des lipides et des protéines en poudre, à ajouter aux aliments et aux

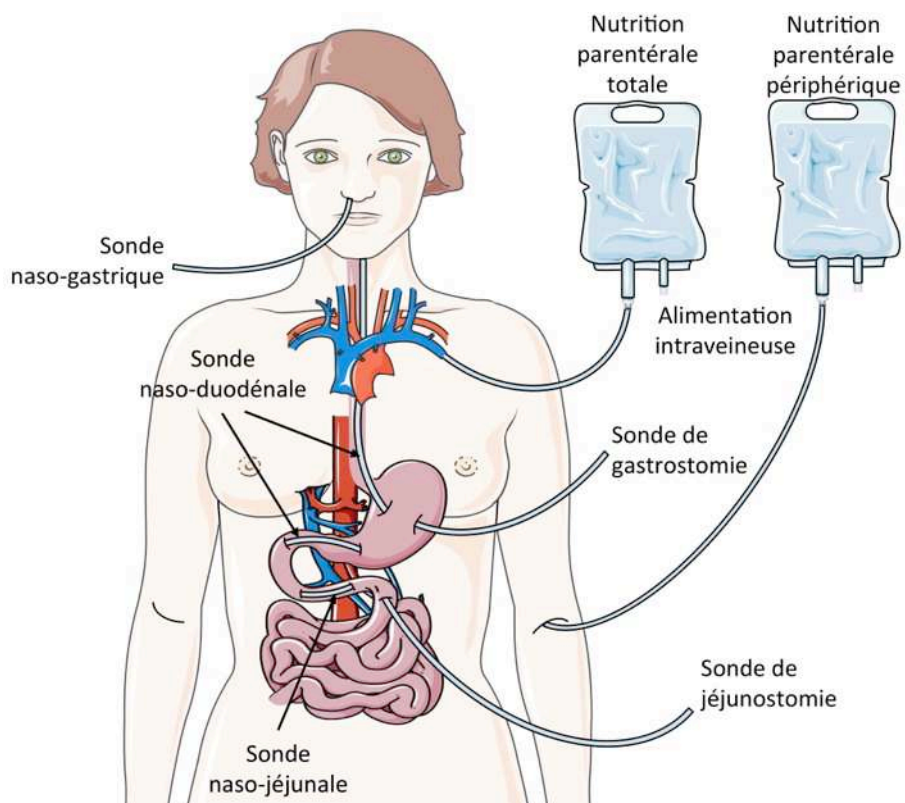


Figure 41 : Les différents types de soutien nutritionnel artificiel.

La nutrition entérale peut se faire par l'intermédiaire de sondes naso-gastriques, de sondes naso-jejunales ou de sondes naso-duodénales. Ce type de prise en charge peut également se faire par l'intermédiaire de sondes de gastrostomie ou de sondes de jéjunostomie.

La nutrition parentérale se fait par voie intraveineuse.

liquides, peuvent également être prescrits.

Une étude systématique a suggéré que dans diverses populations souffrant de pathologies causant une perte de poids, une supplémentation nutritionnelle orale peut réduire les complications et le taux de mortalité, par rapport aux soins cliniques de routine (Stratton & Elia, 2000). Des études plus spécifiques sur des patients atteints de divers types de cancer, ont mis en évidence que la prise de suppléments nutritionnels oraux améliorerait l'apport énergétique et protéique, ainsi que la qualité de vie (Ravasco *et al.*, 2005a; Ravasco *et al.*, 2005b). Chez des patients souffrant d'un cancer pancréatique, ce type de prise en charge conduisait également à une moindre perte de masse musculaire (Di Sebastiano *et al.*, 2013). Bien qu'une étude menée sur des patients atteints de divers types de cancer montrait qu'une intervention nutritionnelle orale n'améliorait pas la qualité de vie (Baldwin *et al.*, 2011), et n'entraînait aucun bénéfice clinique et nutritionnel (Baldwin *et al.*, 2011), une méta-analyse récente a mis en évidence que la supplémentation nutritionnelle orale était efficace pour augmenter l'apport énergétique, engendrer un gain de poids et améliorer la qualité de vie (Baldwin *et al.*, 2012).

Il est probable que les conseils diététiques et la prise de compléments nutritionnels oraux peuvent être bénéfiques pour les patients cachectiques atteints de cancer, avec cependant des différences en fonction du type de cancer. Néanmoins, des études contrôlées randomisées plus vastes sont nécessaires pour déterminer leur efficacité et les avantages à long terme.

2. Soutien nutritionnel artificiel

Lorsque moins de 60% des besoins en macronutriments et micronutriments ne peuvent être satisfaits par voie orale, il convient d'utiliser la nutrition artificielle (Tran *et al.*, 2006) (Figure 41). Il existe deux types de nutrition artificielle : entérale et parentérale. La nutrition entérale implique le placement d'un tube d'alimentation dans l'estomac ou l'intestin grêle, généralement via la cavité nasale ou directement via une stomie (déviation chirurgicale d'un conduit naturel). Une alimentation liquide nutritionnellement complète est ensuite délivrée dans le tractus gastro-intestinal. La nutrition parentérale est la fourniture de nutriments par voie intraveineuse via un cathéter central ou périphérique. Lorsque le tractus gastro-intestinal fonctionne, l'alimentation entérale est considérée comme la voie de choix (Akbulut, 2011). Cependant, les deux formes de soutien nutritionnel comportent un certain

Référence	Nombre de patients	Durée	Types de cancer	Traitement(s) pouvant être associé(s)	Principaux effets observés
<i>Nixon et al., 1981</i>	9	17 à 26 jours	Divers	Chimiothérapie	- Gain de poids
<i>Burt et al., 1984</i>	11	2 semaines	Carcinome épidermoïde localisée de l'œsophage distal	Radiothérapie	- Gain de poids - Balance azotée positive - Diminution du catabolisme protéique au sein du muscle squelettique
<i>Shamberger et al., 1984</i>	14	De la 1ère dose de chimiothérapie au retour à la normale de l'activité hématopoïétique	Divers types de sarcome	Chimiothérapie	- Amélioration de la balance azotée
<i>Hyltander et al., 1991</i>	19	Plus de 8 semaines	Cancer du testicule	Chimiothérapie	- Maintien voire gain de poids attribué à une accumulation de tissu adipeux - Amélioration de la prise énergétique
<i>Cozzaglio et al., 1997</i>	75	Médiane de 4 mois	Divers	Chimiothérapie et radiothérapie	- Amélioration légère du poids - Stabilisation du statut nutritionnel
<i>Bozzetti et al., 2002</i>	69	Médiane de 4 mois	Divers	Chimiothérapie	- Stabilisation du poids - Stabilisation des indices de la qualité de vie
<i>Lundholm et al., 2004a</i>	134	Jusqu'à la mort	Divers	/	- Amélioration de l'équilibre énergétique - Augmentation de la masse grasse - Augmentation de la capacité maximale d'exercice - Allongement de la durée de vie
<i>Richter et al., 2012</i>	17	Jusqu'à la mort	Cancer pancréatique	Chimiothérapie	- Gain de poids - Amélioration de la qualité de vie

Tableau 9 : Etudes examinant les effets de la nutrition parentérale sur le développement de la cachexie associée au cancer.

nombre de risques, tels que la possibilité d'infection ou de troubles métaboliques (Cataldi-Betcher *et al.*, 1983; Gomez *et al.*, 2008). D'après Federico Bozzetti, la nutrition parentérale semblait être mieux tolérée par les patients atteints de cancer gastro-intestinal (Bozzetti *et al.*, 2001). Cependant, une méta-analyse plus récente a conclu que chez les patients atteints de cancer et ayant subi une chirurgie, une alimentation post-opératoire entérale donnait lieu à une hospitalisation plus courte et à moins de complications par rapport à la nutrition parentérale (Elia *et al.*, 2006).

A. La nutrition entérale

La nutrition entérale (Figure 41) doit être utilisée dans le but de minimiser la perte de poids (Arends *et al.*, 2006). Chez des patients atteints d'une leucémie et traités par chimiothérapie, une nutrition entérale par l'intermédiaire d'un tube naso-gastrique ralentissait la perte de poids et empêchait une hypoalbuminémie (de Vries *et al.*, 1982). Une étude sur cinq patients atteints de cancer a montré que la nutrition entérale entraînait un gain de poids et supprimait le catabolisme protéique, après deux semaines de suivi (Dresler *et al.*, 1987). L'utilisation de ce type de prise en charge à long terme chez des patients guéris d'un cancer de la tête et du cou, a permis d'optimiser (augmenter ou maintenir) leur poids (Schattner *et al.*, 2005). Cependant, peu d'éléments démontraient que la composition corporelle ou l'état fonctionnel était amélioré (Schattner *et al.*, 2005).

B. La nutrition parentérale

Chez les patients ne pouvant être nourris par voie entérale, l'utilisation de la voie parentérale (Figure 41) est conseillée. Les buts de cette prise en charge sont une stabilisation de l'état nutritionnel, une prévention ou une réduction de la perte de poids, et un maintien ou une amélioration de la qualité de vie (Arends *et al.*, 2009). Globalement, les études que nous avons référencé ici (Tableau 9), indiquaient que la nutrition parentérale provoquait une stabilisation voire un gain de poids corporel chez les patients, quelque soit le type de cancer étudié (Nixon *et al.*, 1981; Burt *et al.*, 1984; Hyltander *et al.*, 1991; Cozzaglio *et al.*, 1997; Bozzetti *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2012). Ce mode de prise en charge pouvait également augmenter la masse grasse corporelle (Lundholm *et al.*, 2004a), améliorer la balance azotée (Burt *et al.*, 1984; Shamberger *et al.*, 1984), diminuer le catabolisme protéique (Burt *et al.*, 1984), améliorer la prise énergétique (Hyltander *et al.*, 1991),

Acides gras oméga-3	Formule chimique	Source alimentaire
Acide α -linoléique (C18:3n-3)	$\text{CH}_3 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{COOH}$	Certaines huiles végétales (colza, soja), fruits à coque (noix), graines (lin)
Acide eicosapentaénoïque (C20:5n-3)	$\text{CH}_3 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{COOH}$	Poissons et fruits de mer
Acide docosahexaénoïque (C22:6n-3)	$\text{CH}_3 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}=\text{CH} \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{CH}_2 \text{---} \text{COOH}$	Poissons et fruits de mer

Figure 42 : Représentation des trois principaux acides gras oméga-3. [modifié d'après (Rosenberg, 2002)].

améliorer l'équilibre énergétique (Lundholm *et al.*, 2004a), stabiliser le statut nutritionnel (Cozzaglio *et al.*, 1997), améliorer ou stabiliser la qualité de vie (Bozzetti *et al.*, 2002; Richter *et al.*, 2012), augmenter la capacité maximale d'exercice (Lundholm *et al.*, 2004a), et enfin allonger la durée de vie (Lundholm *et al.*, 2004a).

Malgré cela, plus de trente-cinq ans après les premiers travaux menés par Stanley J. Dudrick et son équipe (Dudrick *et al.*, 1977), de nombreuses questions subsistent quant à l'application de la nutrition parentérale chez les patients atteints de cancer et si ce type de thérapie conduit à une amélioration de l'état fonctionnel. Néanmoins, dans une population où la détérioration de l'état nutritionnel est presque inévitable, l'entretien de la nutrition et des paramètres de la qualité de vie sont susceptibles d'avoir des résultats bénéfiques.

3. Les nutraceutiques

En plus des conseils de fortification alimentaire et de l'utilisation de compléments nutritionnels, il a été développé ces dernières années le concept d'immunonutrition ou de pharmaconutrition (Demoor-Goldschmidt & Raynard, 2009). Il s'agit en fait de « nutraceutiques » qui sont des nutriments utilisés comme agents pharmaceutiques dans le but d'influencer les voies métaboliques du processus cachectique (Demoor-Goldschmidt & Raynard, 2009).

A. Les acides gras oméga-3

Les acides gras oméga-3 sont dits polyinsaturés car leur chaîne carbonée comprend plusieurs doubles liaisons. Les principaux acides gras du groupe oméga-3 sont l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) qui proviennent en grande partie des espèces marines, en particulier les poissons gras (le saumon, le tassergal, le maquereau, l'omble chevalier et l'espadon), et l'acide α -linoléique qui est présent dans certaines huiles végétales, les noix et les graines (Rosenberg, 2002) (Figure 42).

Chez des souris cachectiques MAC16, un traitement avec de l'EPA inhibait la perte de poids et diminuait la croissance tumorale (Beck *et al.*, 1991). De plus, il réduisait l'augmentation de la dégradation protéique dans le muscle *in vivo* (Beck *et al.*, 1991), et *in vitro* (Smith & Tisdale, 1993b; Lorite *et al.*, 1997). La diminution du catabolisme protéique musculaire *in vivo* se faisait par une régulation négative de la voie ubiquitine-protéasome (Whitehouse *et al.*, 2001).

Ces acides gras polyinsaturés ont également été utilisés en clinique. Une

Référence	Nombre de patients traités	Durée	Types de cancer	Traitement(s) pouvant être associé(s)	Consommation d'acides gras oméga-3 par jour	Principaux effets observés
Wigmore et al., 1996	18	3 mois	Cancer pancréatique	/	2.2 g EPA et 1.4 g DHA	- Stabilisation voire gain de poids - Diminution de la RPA - Stabilisation de la DER
Barber et al., 1999	20	3 et 7 semaines	Cancer pancréatique	/	2.2 g EPA et 0.96 g DHA	- Amélioration de l'apport calorique - Gain de poids - Augmentation de la masse maigre
Bauer & Capra, 2005	8	8 semaines	Cancer pancréatique et NSCLC	Chimiothérapie Conseils nutritionnels	1.1 g EPA	- Amélioration de l'apport énergétique et protéique - Amélioration de la capacité fonctionnelle - Amélioration de l'état nutritionnel - Amélioration de la qualité de vie
Bruera et al., 2003	30	2 semaines	Divers	Chimiothérapie	1.8 g EPA et 1.2 g DHA	/
Fearon et al., 2003	95	8 semaines	Cancer pancréatique	/	2.2 g EPA	/
Jatoi et al., 2004	141	Plus de 3 mois	Divers	Chimiothérapie Radiothérapie	1.09 g EPA et 0.46 g DHA	/
Fearon et al., 2006	175 ou 172	8 semaines	Cancer gastro-intestinal et du poumon	/	2 ou 4 g EPA	/
Read et al., 2007	23	3 et 9 semaines	Cancer colorectal	Chimiothérapie	2.2 g EPA et 0.92 g DHA	- Gain de poids - Maintien de la masse maigre - Réduction de l'inflammation
Bayram et al., 2009	33	3 mois	Divers	Chimiothérapie	2.2 g EPA et 0.96 g DHA	- Réduction de la perte de poids
Ryan et al., 2009	28	26 jours	Cancer de l'œsophage	Oesophagectomie Chimiothérapie Radiothérapie	2.2 g EPA	- Prévention de la perte de masse maigre
van der Meij et al., 2010	20	1, 2 et 4 semaines	NSCLC	Chimiothérapie Radiothérapie	2.02 g EPA et 0.92 g DHA	- Stabilisation du poids - Réduction de la production d'IL-6
Murphy et al., 2011b	16	/	NSCLC	Chimiothérapie	2.2 g EPA	- Stabilisation du poids - Stabilisation de la masse musculaire
Weed et al., 2011	31	/	Cancer de la tête et du cou	Réséction	Env. 1.62 g EPA et 0.69 g DHA	- Prévention de la perte de poids - Prévention de la perte de masse maigre

Tableau 10 : Etudes examinant les effets d'une supplémentation nutritionnelle riche en acides gras oméga-3, sur le développement de la cachexie associée au cancer.

supplémentation en acides gras oméga-3 issus d'huiles de poissons, ingérée sous forme de capsules ou de liquide, à des doses cliniquement pertinentes est généralement bien tolérée par les patients atteints de cancer (Burns *et al.*, 1999). Dans cette étude, il a été établi que la dose maximale tolérée était de 0.3 g/kg de poids de corps/par jour. Cela signifie qu'un patient de 70 kg peut généralement tolérer jusqu'à 21.1 g/jour (dont 7.9 g d'EPA et 5.2 g de DHA) (Burns *et al.*, 1999). Une étude s'intéressant spécifiquement à l'EPA, a montré que des patients souffrant d'un cancer pancréatique pouvaient tolérer une prise quotidienne d'environ 18 g (Barber & Fearon, 2001). Des doses plus élevées en acides gras oméga-3 provoquaient des effets secondaires bénins tels que des nausées, des ballonnements ou encore des arrière-goûts de poisson (Burns *et al.*, 1999; Barber & Fearon, 2001).

Très tôt, les essais expérimentaux sur la supplémentation en acides gras oméga-3 avec soit des huiles de poissons, soit de l'EPA seul, ont donné des résultats prometteurs chez les patients cancéreux ayant une perte de poids. Les avantages pour les patients incluaient une préservation de la masse maigre (Barber *et al.*, 1999), une augmentation de l'activité physique (Bauer & Capra, 2005), une amélioration de l'apport énergétique (Barber *et al.*, 1999; Bauer & Capra, 2005), une amélioration de la qualité de vie (Bauer & Capra, 2005), et une stabilisation voire une prise de poids (Wigmore *et al.*, 1996; Barber *et al.*, 1999) (Tableau 10). Cependant, ces études comprenaient un faible nombre de patients, et étaient non randomisées et/ou non contrôlées. Par la suite, des essais cliniques constitués d'un plus grand nombre de patients et randomisés n'ont pas réussi à confirmer les avantages de la supplémentation en acides gras oméga-3 précédemment observés (Bruera *et al.*, 2003; Fearon *et al.*, 2003; Jatoi *et al.*, 2004; Fearon *et al.*, 2006) (Tableau 10). Une revue systématique sur le sujet a encore plus refroidi l'enthousiasme pour les acides gras oméga-3 comme agent thérapeutique, en concluant qu'il n'existait pas suffisamment de données pour définir si leur prise était plus efficace que celle d'un placebo (Dewey *et al.*, 2007). Au cours des six dernières années, plusieurs études ont à nouveau montré les avantages potentiels de la prise d'acides gras oméga-3 sur le poids de corps et de la masse maigre (Read *et al.*, 2007; Bayram *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2009; van der Meij *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2011b; Weed *et al.*, 2011) (Tableau 10). Néanmoins, une récente revue systématique sur le rôle des huiles de poissons comme solutions thérapeutiques a conclu qu'il n'existait pas assez de preuves pour soutenir un bénéfice net de la prise d'acides gras oméga-3 dans la cachexie associée au cancer (Ries *et al.*, 2012).

B. Les acides aminés

La protéolyse musculaire qui apparaît lors de la cachexie associée au cancer produit des acides aminés nécessaires pour la synthèse de protéines hépatiques et tumorales (Inui 2002). La synthèse des protéines musculaires étant tributaire d'un apport optimal en acides aminés, l'administration exogène d'acides aminés peut théoriquement servir de carburant métabolique, en fournissant des substrats pour le métabolisme musculaire et la néoglucogénèse (Lainscak *et al.*, 2008; Pasini *et al.*, 2008).

Les BCAA, en particulier la leucine, et dans une moindre mesure l'isoleucine et la valine, jouent un rôle important dans la régulation des voies de synthèse et de dégradation des protéines (Kadowaki & Kanazawa, 2003; Yoshizawa, 2004). Récemment, une étude utilisant des souris cachectiques MAC16 a montré que la leucine et la valine augmentaient la synthèse des protéines et diminuaient le catabolisme des protéines dans le muscle squelettique, résultant en la réduction significative de la perte de poids (Eley *et al.*, 2007b). Les BCAA ont été utilisés en clinique dans le but d'améliorer la balance azotée, en particulier le métabolisme des protéines musculaires. Chez des patients avec un adénocarcinome intra-abdominal, une nutrition parentérale totale enrichie en BCAA augmentait la synthèse et l'accumulation de protéines (Tayek *et al.*, 1986; Hunter *et al.*, 1989), leur utilisation (Hunter *et al.*, 1989), et la synthèse de l'albumine (Tayek *et al.*, 1986; Hunter *et al.*, 1989).

Les BCAA peuvent également être utilisés pour lutter contre l'anorexie qui peut s'installer lors de la cachexie associée au cancer. Une augmentation de l'activité sérotoninergique dans le cerveau crée une diminution de l'appétit (Inui, 2002; Davis *et al.*, 2004a). La production de sérotonine dans le cerveau varie en fonction du transport du tryptophane (Trp) à travers la barrière hémato-encéphalique. Le taux de transport du Trp est inversement proportionnel aux concentrations des grands acides aminés neutres (large neutral amino acids ou LNAA) dont font partie les BCAA, avec qui le Trp est en compétition à l'entrée du cerveau (Fernstrom, 1985). Le Trp, précurseur de la sérotonine, possède donc un rôle dans la pathogenèse de l'anorexie. Chez des rats cachectiques Walker-256, il a été mis en évidence une anorexie, une augmentation de la concentration circulante de Trp libre, ainsi qu'un taux élevé de sérotonine dans le cerveau (Krause *et al.*, 1979). Chez des patients souffrant de cancer et présentant une anorexie, une augmentation du taux circulant de Trp libre était également répertoriée (Rossi Fanelli *et al.*, 1986; Cangiano *et al.*, 1990). Dans l'étude de Carlo Cangiano, il était également observé une augmentation du ratio Trp/LNAA

ainsi qu'une augmentation du niveau de Trp dans le liquide céphalo-rachidien (Cangiano *et al.*, 1990). Par conséquent, un apport complémentaire en BCAA pourrait réduire l'entrée du Trp dans le cerveau et diminuer l'activité sérotoninergique (Fernstrom, 1985). Dans un groupe de quinze patients atteints de cancer, une supplémentation orale en BCAA compétiteurs du Trp (leucine, isoleucine et valine) entraînait une réduction significative de l'anorexie et une augmentation de l'apport énergétique (Cangiano *et al.*, 1996).

Les effets d'autres acides aminés sur le processus cachectique ont également été étudiés. Chez des patients souffrant d'un cancer avancé et recevant une supplémentation enrichie en glutamine, en arginine et en β -hydroxy- β -méthylbutyrate (un métabolite de la leucine) pendant quatre semaines, il a été mis en évidence une augmentation de la masse maigre (May *et al.*, 2002). Néanmoins une étude utilisant le même type de supplémentation n'a pas réussi à confirmer ces résultats (Berk *et al.*, 2008). Au cours d'un essai clinique contrôlé randomisé en double aveugle, il a été récemment montré qu'une nutrition entérale péri-opératoire avec une formule enrichie en arginine augmentait la survie à long terme des patients atteints de cancer de la tête et du cou subissant une chirurgie et une chimiothérapie (Buijs *et al.*, 2010). Chez des patients ayant des cancers inopérables, une supplémentation orale en N-acétyl-cystéine améliorait la qualité de vie, et augmentait le taux plasmatique d'albumine et la masse cellulaire corporelle (Hack *et al.*, 1998). Enfin, chez des patients atteints d'un cancer du poumon et recevant une chimiothérapie ou une radiothérapie, une formulation nutritionnelle protéique riche en cystéine améliorait la force de préhension et certains paramètres de la qualité de vie, et provoquait un gain de poids (Tozer *et al.*, 2008).

II. Traitement pharmacologique

Etant donné que la cachexie associée au cancer est un syndrome multifactoriel, il est peu probable qu'un seul médicament parvienne à lutter efficacement contre cette maladie. Les investigations menées sur la prise en charge pharmacologique mettent donc l'accent sur les différents aspects de la cachexie associée au cancer (Argiles *et al.*, 2010). Dans cette section, je m'intéresserai aux agents stimulants l'appétit, aux approches thérapeutiques basées sur les cytokines, aux agents anti-inflammatoires non stéroïdiens et à certains agents anabolisants.

1. Les agents stimulant l'appétit

A. Les cannabinoïdes

Le chanvre cultivé (*Cannabis sativa*) contient des cannabinoïdes, en particulier le Δ -9-tétrahydrocannabinol (THC ou dronabinol) (Grotenhermen, 2003). Les cannabinoïdes sont réputés pour stimuler l'appétit chez des sujets sains (Foltin *et al.*, 1986; Foltin *et al.*, 1988), comme chez des patients atteints du SIDA (Beal *et al.*, 1995). Des effets stabilisateurs du poids ont également été rapportés après leur prise (Beal *et al.*, 1995). Par conséquent, les cannabinoïdes pourraient avoir un rôle dans le traitement de la cachexie associée au cancer. Chez des patients atteints d'un cancer, il a été montré que le dronabinol améliorait légèrement l'appétit. Néanmoins, aucun effet bénéfique de ce cannabinoïde sur la perte de poids n'était observé (Jatoi *et al.*, 2002). Enfin, au cours d'un essai clinique multicentrique, randomisé, en double aveugle et contrôlé par un placebo, il a été mis en évidence une faible efficacité de la prise d'extrait de cannabis ou de THC sur l'appétit et la qualité de vie, et aucun effet sur la perte de poids chez les patients atteints d'un cancer (Strasser *et al.*, 2006).

B. La cyproheptadine

Comme il a été décrit précédemment, la sérotonine joue un rôle dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer. Par conséquent, un blocage de l'activité sérotoninergique pourrait être une solution thérapeutique. La cyproheptadine, un antagoniste de la sérotonine aux propriétés antihistaminiques, est généralement utilisée pour le traitement des allergies. Il a également été rapporté que la cyproheptadine entraînait un gain de poids en conditions pathologiques, comme lors de la mucoviscidose (Homnick *et al.*, 2004; Homnick *et al.*, 2005), en cas d'asthme (Lavenstein *et al.*, 1962), ou en cas d'anorexie nerveuse (Goldberg *et al.*, 1979). Un essai clinique en double aveugle, randomisé et contrôlé par un placebo a mis en évidence que la prise orale de cyproheptadine tendait à améliorer l'appétit, mais n'avait aucun effet sur la perte de poids des patients atteints d'un cancer (Kardinal *et al.*, 1990). Néanmoins, un récent essai clinique de phase II chez des patients ayant une cachexie consécutive à un cancer, a montré que la cyproheptadine provoquait un gain de poids après quatre semaines de traitement (Couluris *et al.*, 2008).

C. Les corticostéroïdes

Les corticostéroïdes comptent parmi les stimulants de l'appétit les plus utilisés dans le cas du cancer (Lelbach *et al.*, 2007). Parmi eux, on retrouve notamment la dexaméthasone, la prednisolone et la méthylprednisolone.

Le premier essai clinique utilisant la dexaméthasone (0.75 mg quatre fois par jour ou 1.5 mg quatre fois par jour), a mis en évidence chez des patients avec un cancer gastro-intestinal, une amélioration de l'appétit (Moertel *et al.*, 1974). Au cours d'un essai clinique de phase III randomisée, la prise de dexaméthasone (0.75 mg quatre fois par jour) provoquait une amélioration significative de l'appétit, sans avoir d'effets sur le poids de corps (Loprinzi *et al.*, 1999). Enfin, la prise de dexaméthasone (8 mg par jour) entraînait une réduction de la perte d'appétit et de la perte de poids, chez des patients avec un cancer du poumon et subissant une chimiothérapie (Sarcev *et al.*, 2008).

La prise de prednisolone (5 mg trois fois par jour) améliorait l'appétit et le bien-être de patients souffrant d'un cancer, mais n'avait aucune incidence sur le poids corporel (Willox *et al.*, 1984). Chez des patients ayant des tumeurs solides métastatiques, il a été mis en évidence que la prise de prednisolone (10 mg deux fois par jour) provoquait un gain de poids concomitant d'une augmentation de la circonférence des muscles du bras comparés aux patients recevant un placebo. Toutefois, la durée de survie n'était pas modifiée (Lundholm *et al.*, 1994).

La prise orale de méthylprednisolone, chez des patients atteints d'un cancer en phase terminale, améliorait l'appétit et la prise alimentaire (Bruera *et al.*, 1985). Deux études ont également montré que l'administration intraveineuse de succinate sodique de méthylprednisolone à des patients atteints de cancer en phase préterminale ou terminale améliorait l'appétit, le bien-être et la qualité de vie, soulageait la douleur, et diminuait les vomissements (Della Cuna *et al.*, 1989; Popiela *et al.*, 1989).

Malgré des résultats prometteurs, l'utilisation des corticostéroïdes dans la prise en charge clinique de la cachexie associée au cancer, n'est probablement pas la meilleure alternative thérapeutique. En effet, il a été montré que la signalisation associée aux glucocorticoïdes joue un rôle important dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer (Braun *et al.*, 2013). De plus, il a été observé que les corticostéroïdes, en particulier la dexaméthasone, pouvaient provoquer une atrophie musculaire sévère (Kelly & Goldspink, 1982; Dardevet *et al.*, 1995).

Référence	Nombre de patients	Durée	Types de cancer	Traitement(s) pouvant être associé(s)	Principaux effets observés
<i>Tchekmedyan et al., 1987</i>	28	Plus de 6 semaines	Cancer du sein	/	- Gain de poids - Amélioration de l'appétit
<i>Bruera et al., 1990</i>	31	15 jours	Divers	/	- Amélioration de l'appétit - Amélioration de la prise calorique - Induction d'un gain de poids
<i>Loprinzi et al., 1990</i>	66	Médiane de 1.6 mois	Divers	Chimiothérapie	- Amélioration de l'appétit - Amélioration de la prise alimentaire - Gain de poids
<i>Tchekmedyan et al., 1992a</i>	37	1 mois	Divers	Chimiothérapie Radiothérapie	- Amélioration de l'appétit - Amélioration de la prise alimentaire - Gain de poids
<i>Loprinzi et al., 1993a</i>	342	/	Divers	Chimiothérapie Radiothérapie	- Stimulation de l'appétit - Gain de poids
<i>Loprinzi et al., 1993b</i>	12	/	Cancer du sein	/	- Gain de poids attribué à une augmentation de la masse de tissu adipeux
<i>Beller et al., 1997</i>	161	12 semaines	Divers	Chimiothérapie	- Amélioration de l'appétit - Amélioration du bien-être - Amélioration de la qualité de vie
<i>McMillan et al., 1997</i>	15	6 semaines	Cancer gastro-intestinal	Ibuprofène	- Gain de poids - Réduction de la concentration circulante de CRP
<i>Bruera et al., 1998</i>	53	10 jours	Divers	/	- Amélioration de l'appétit - Amélioration du bien-être - Amélioration de la qualité de vie
<i>De Conno et al., 1998</i>	17	7 et 14 jours	Divers	/	- Amélioration de l'appétit
<i>McQuellon et al., 2002</i>	28	12 semaines	Cancer de la tête et du cou, et cancer du poumon	Chimiothérapie Radiothérapie	- Amélioration de l'appétit - Réduction de la perte de poids

Tableau 11 : Etudes examinant les effets de l'acétate de mégestrol, sur le développement de la cachexie associée au cancer.

D. Les progestatifs

Ce sont les premiers agents à avoir été utilisés pour le traitement de la cachexie associée au cancer, et ce sont actuellement les seuls agents approuvés en Europe (Argiles *et al.*, 2013; Mantovani *et al.*, 2013).

a) L'acétate de mégestrol

L'acétate de mégestrol (MA) est un agent progestatif de synthèse, développé en Angleterre en 1963 (David *et al.*, 1963). Ce puissant contraceptif oral a d'abord été testé dans le traitement du cancer du sein (Stoll, 1967), puis dans le traitement du cancer de l'endomètre (Wentz, 1974). Il agit principalement comme un puissant agoniste des récepteurs à la progestérone, aux androgènes et aux glucocorticoïdes (Teulings *et al.*, 1980).

Dans le cadre du traitement du cancer du sein, l'utilisation du MA a montré très tôt des effets bénéfiques, puisque cet agent entraînait une amélioration de l'appétit, ainsi qu'un gain de poids (Tchekmedyian *et al.*, 1987). Par la suite, la prise de MA a donné des résultats très intéressants chez les patients cancéreux ayant une perte de poids. Dans la plupart des études que nous avons référencé, le MA entraînait un gain de poids (Bruera *et al.*, 1990; Loprinzi *et al.*, 1990; Tchekmedyian *et al.*, 1992a; Loprinzi *et al.*, 1993a; Loprinzi *et al.*, 1993b; McMillan *et al.*, 1997) (Tableau 11). Il était également responsable d'une amélioration de l'appétit (Bruera *et al.*, 1990; Loprinzi *et al.*, 1990; Tchekmedyian *et al.*, 1992a; Loprinzi *et al.*, 1993a; Beller *et al.*, 1997; Bruera *et al.*, 1998; De Conno *et al.*, 1998; McQuellon *et al.*, 2002) et de la prise alimentaire (Bruera *et al.*, 1990; Loprinzi *et al.*, 1990; Tchekmedyian *et al.*, 1992a), ainsi que du bien-être (Beller *et al.*, 1997; Bruera *et al.*, 1998), et de la qualité de vie (Beller *et al.*, 1997; Bruera *et al.*, 1998) (Tableau 11). Une revue systématique incluant vingt études sur des patients atteints de cancer a montré que le MA comparé à un placebo, augmentait l'appétit et conduisait à un gain de poids (Pascual Lopez *et al.*, 2004). Enfin, deux méta-analyses récentes ont mis en évidence que le MA améliorait l'appétit et provoquait un gain de poids, mais n'avait aucun effet sur la qualité de vie et la survie des patients atteints de cancer (Lesniak *et al.*, 2008; Ruiz Garcia *et al.*, 2013).

Depuis le mois de septembre de 1993, le MA est approuvé par la Federal Drug Administration aux Etats-Unis pour le traitement de la cachexie associée au cancer. À ce jour, aucun traitement pharmacologique n'a montré une efficacité et une tolérance supérieures au MA (Tuca *et al.*, 2013). Les effets bénéfiques du MA sur le poids et le

bien-être des patients ont été observés pour une dose orale allant de 160 à 1600 mg par jour (Mantovani *et al.*, 2013). Néanmoins, à l'heure actuelle, aucune étude n'a rapporté les effets bénéfiques du MA sur la masse maigre. Enfin, les résultats obtenus sont à pondérer par le fait que la prise de MA est parfois associée à des effets indésirables, tels que l'apparition de problèmes thromboemboliques (Loprinzi *et al.*, 1993a; Loprinzi *et al.*, 1999).

b) L'acétate de médroxyprogestérone

L'acétate de médroxyprogestérone (MPA) est un progestatif stéroïdien synthétique, développé en 1958 (Babcock *et al.*, 1958), et utilisé dans les années 1960, comme agent thérapeutique dans le cas du cancer du sein (Segaloff *et al.*, 1967; Stoll, 1967; Muggia *et al.*, 1968). Le MPA agit comme un agoniste des récepteurs à la progestérone, aux androgènes et aux glucocorticoïdes (Teulings *et al.*, 1980; Hackenberg *et al.*, 1990).

Un essai clinique en double aveugle contrôlé par un placebo, a montré que la prise de MPA pendant six semaines chez des patients atteints de divers types de cancer améliorait l'appétit, mais ne modifiait pas la perte de poids (Downer *et al.*, 1993). Au contraire, une étude menée chez des patients avec un cancer avancé insensible aux hormones, a mis en évidence qu'un traitement de douze semaines avec le MPA, en plus d'améliorer l'appétit, provoquait un gain de poids (Simons *et al.*, 1996). Au cours d'une étude menée chez des patients atteints de cancer subissant une chimiothérapie et/ou une radiothérapie, un traitement de douze semaines avec une dose quotidienne de 1000 mg de MPA augmentait la qualité de vie et provoquait un gain de poids corporel (Neri *et al.*, 1997). Enfin, chez des patients avec un cancer avancé insensible aux hormones, il a été observé qu'un traitement de douze semaines avec le MPA augmentait la prise alimentaire et augmentait la masse grasse (Simons *et al.*, 1998).

Plus récemment, certaines études ont montré l'efficacité du MPA lors d'approche combinée, pour le traitement de la cachexie associée au cancer. Il a notamment été montré qu'un traitement combinant le MPA (500 mg deux fois par jour), un agent anti-inflammatoire non stéroïdien appelé le célécoxib (200 mg deux fois par jour) et une supplémentation nutritionnelle orale, administré pendant 6 semaines a été en mesure de contrer la perte de poids de corps et de réduire considérablement les nausées, la satiété précoce, l'état de fatigue, l'appétit et l'indice de performance dans une population de patients atteints d'un cancer du poumon (Cerchiatti *et al.*, 2004). Enfin, une étude ouverte

de phase II a démontré l'efficacité d'un traitement de quatre mois, composé de MPA, d'un soutien nutritionnel oral, d'antioxydants et de célécoxib, dans une population de patients néoplasiques. Le poids corporel augmentait de manière significative, tout comme la masse maigre et l'appétit (Mantovani *et al.*, 2006). Il était également référencé une diminution importante du taux sérique des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α , et une nette amélioration de la qualité de vie (Mantovani *et al.*, 2006).

E. La ghréline

La ghréline est une hormone libérée par l'estomac, qui a la capacité de se fixer au récepteur sécrétagogue de l'hormone de croissance (GHS-R pour growth hormone secretagogue receptor) (Kojima *et al.*, 1999). C'est un puissant stimulant de l'appétit et de la prise alimentaire (Wren *et al.*, 2001). L'administration de ghréline à des rats cachectiques, en plus de stimuler la prise alimentaire, entraîne un gain de poids marqué par une augmentation de la masse de tissu adipeux, ce qui fait de cette hormone un possible agent thérapeutique (Hanada *et al.*, 2003).

Chez des patients ayant un cancer métastatique, l'administration de ghréline par perfusion, augmentait la prise énergétique de 30% et améliorait l'appréciation du repas (Neary *et al.*, 2004). Cependant, chez des patients avec un cancer avancé, il a été montré qu'une perfusion administrant de la ghréline, ne modifiait ni la prise alimentaire ni le poids de corps (Strasser *et al.*, 2008). Récemment, au cours d'un essai clinique de deux mois chez des patients atteints d'un cancer gastro-intestinal, il a été observé que l'injection de ghréline à forte dose (13 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{jour}$) améliorait l'appétit, réduisait la perte de tissu adipeux et tendait à améliorer la balance énergétique et la masse maigre (Lundholm *et al.*, 2010).

Au cours d'une étude pilote chez des volontaires sains, l'utilisation du RC-1291, un agent mimétique de la ghréline, provoquait un gain de poids dose-dépendant (Garcia & Polvino, 2007). Une étude randomisée contrôlée par un placebo chez des patients sains, a montré que l'utilisation de l'anamoréline (RC-1291), entraînait un gain de poids et augmentait la concentration d'IGF-1 circulant (Garcia & Polvino, 2009). Récemment, une étude pilote randomisée en double aveugle, a mis en évidence que l'anamoréline augmentait le poids de corps et la concentration d'IGF-1 circulant, et améliorait la prise énergétique ainsi que l'appétit de patients atteints d'un cancer incurable (Garcia *et al.*, 2013).

Malgré des résultats encourageants, d'autres essais sont nécessaires pour évaluer l'efficacité de ces agents comme thérapies potentielles pour la cachexie associée au cancer.

2. Les approches thérapeutiques basées sur les cytokines

La production et l'action des cytokines jouant un rôle essentiel dans la cachexie associée au cancer, les acteurs du monde médical ont donc cherché des stratégies thérapeutiques visant à limiter ou inhiber leurs effets.

A. La pentoxifylline

La pentoxifylline, un dérivé de la méthylxanthine, a la capacité d'inhiber *in vitro* la synthèse de TNF- α par une diminution de la transcription du gène (Strieter *et al.*, 1988). A partir de cellules mononucléaires de patients atteints de divers types de cancer et traités avec de la pentoxifylline, il a été observé que ce composé pouvait réduire l'expression du transcrit de TNF- α (Dezube *et al.*, 1993). Dans un modèle de rat cachectique, il a été montré que la pentoxifylline prévenait l'atrophie musculaire en inhibant le système ubiquitine-protéasome, suggérant ainsi qu'elle pourrait être un agent thérapeutique dans la cachexie associée au cancer (Combaret *et al.*, 1999).

Au cours d'une étude pilote, il a été mis en évidence que la pentoxifylline améliorait le sentiment de bien-être chez les patients atteints de cancer (Dezube *et al.*, 1993). De plus, au cours d'une étude clinique randomisée, en double aveugle, il a été montré que la pentoxifylline (400 mg trois fois par jour) n'améliorait pas l'appétit et n'entraînait pas de gain de poids chez des patients atteints de cancer (Goldberg *et al.*, 1995).

Les essais cliniques effectués avec la pentoxifylline étant au nombre de deux, un plus grand nombre d'études est nécessaire pour évaluer son efficacité dans le traitement de la cachexie associée au cancer.

B. Le thalidomide

Le thalidomide ou α -N-phthalimidoglutaramide (Somers, 1960), est un médicament qui possède une histoire tragique due à ses effets tératogènes. En effet, il fut utilisé comme sédatif chez les femmes enceintes et a causé plus de 8000 cas de malformations graves chez les enfants nouveau-nés (Annas & Elias, 1999). A l'aide de monocytes humains, il a été montré *in vitro* que le thalidomide inhibait sélectivement la production de TNF- α (Sampaio *et al.*, 1991), en augmentant la dégradation du transcrit de TNF- α (Moreira *et al.*, 1993). Le

thalidomide est également un inhibiteur du facteur de transcription NF- κ B (Keifer *et al.*, 2001).

Au cours d'une étude clinique ouverte, chez des patients atteints de cancer métastatique, il a été observé que la prise de thalidomide (100 mg par nuit pendant dix jours), améliorait l'appétit et la sensation de bien-être, ainsi que la prise alimentaire (Bruera *et al.*, 1999). Une étude clinique réalisée chez des patients atteints d'un cancer inopérable de l'œsophage, a mis en évidence que la prise de thalidomide (200 mg par jour pendant quatorze jours) entraînait un gain de poids et un gain de masse maigre (Khan *et al.*, 2003). Au cours d'un essai clinique randomisé, contrôlé par placebo, la prise de thalidomide (200 mg par jour pendant vingt-quatre semaines) atténuait la perte de poids et de masse maigre, chez des patients atteints d'un cancer pancréatique inopérable (Gordon *et al.*, 2005). Enfin dans une récente étude, il a été montré que la prise de thalidomide (50 mg par jour pendant quatorze jours) améliorait l'appétit et la qualité de vie des patients atteints de cancer avancé, mais n'affectait pas la perte de poids (Davis *et al.*, 2012).

À l'heure actuelle, il n'existe pas de preuves suffisantes pour réfuter ou soutenir l'utilisation du thalidomide dans la prise en charge de la cachexie chez les patients atteints d'un cancer (Reid *et al.*, 2012).

C. La mélatonine

La mélatonine est une hormone sécrétée par l'épiphyse (Lerner *et al.*, 1960), capable de diminuer le niveau de TNF- α circulant chez les patients atteints de cancer avancé (Lissoni *et al.*, 1994; Lissoni *et al.*, 1996). La mélatonine peut donc être une stratégie d'intervention thérapeutique dans la cachexie associée au cancer.

Dans un essai contrôlé de cent patients atteints de tumeurs solides métastatiques, la perte de plus de 10% du poids corporel était moins fréquente chez ceux traités avec la mélatonine (20 mg par jour) que chez les patients traités avec le placebo (Lissoni *et al.*, 1996). Une étude réalisée chez des patients avec un NSCLC avancé recevant une chimiothérapie associant le cisplatine et l'étoposide, a montré que la prise orale de mélatonine (20 mg par jour) améliorait le taux de réponse au traitement et la survie, et réduisait la perte de poids et l'asthénie (Lissoni *et al.*, 1997). Plus récemment, une étude chez des patients atteints de divers types de cancer et recevant diverses combinaisons d'agents chimiothérapeutiques a mis en évidence que la prise concomitante de mélatonine

améliorait le taux de réponse au traitement et la survie (Lissoni, 2007). Malgré ces observations satisfaisantes, deux études ont montré des résultats contraires. En effet, au cours d'une étude pilote randomisée, chez des patients atteints d'un cancer gastro-intestinal avancé, la prise de mélatonine (18 mg par jour) n'induisait pas d'effets sur le statut inflammatoire et sur la perte de poids (Persson *et al.*, 2005). De plus, un essai clinique en double aveugle a récemment montré que la prise de mélatonine (20 mg par jour) n'améliorait ni l'appétit, ni la perte de poids, ni la survie de patients atteints d'un cancer gastro-intestinal ou du poumon (Del Fabbro *et al.*, 2013).

Davantage de recherches sont donc nécessaires afin de déterminer si la mélatonine a un rôle potentiel dans le traitement symptomatique des patients atteints de cachexie associée au cancer.

D. Anticorps et récepteurs solubles

L'utilisation d'anticorps ou de récepteurs solubles anti-cytokines pourraient être une solution thérapeutique envisageable. En effet, des études réalisées chez l'animal ont démontré une certaine efficacité. Chez des rats cachectiques YAH-130, il a été mis en évidence que l'injection d'un anticorps polyclonal anti-TNF- α provoquait une diminution du taux de dégradation des protéines dans le muscle squelettique. Néanmoins, ce traitement était incapable d'éviter la réduction de poids (Costelli *et al.*, 1993). Dans des modèles murins cachectiques, l'injection d'un anticorps monoclonal anti-IL-6 inhibait la perte de poids provoquée par la tumeur (Yasumoto *et al.*, 1995; Zaki *et al.*, 2004). Chez des souris cachectiques LLC, l'injection d'un anticorps monoclonal anti-IFN- γ conduisait à une réduction de la perte de poids et de la masse grasse (Matthys *et al.*, 1991b).

Chez l'humain, un nombre très limité d'études cliniques a été réalisé. L'utilisation d'un composé, l'éta nercept, a été testée. C'est une protéine de fusion associant la fraction p75 du récepteur soluble du TNF- α avec un fragment Fc d'une immunoglobuline de type G (Mohler *et al.*, 1993). Elle se fixe au TNF- α *in vivo* et bloque ainsi son interaction avec ses récepteurs à la surface cellulaire (Mohler *et al.*, 1993). Au cours d'une clinique pilote, il a été observé que les patients atteints de cancer avancé et traités par l'éta nercept, associé à un agent antitumoral (le docetaxel), étaient moins fatigués et présentaient une meilleure tolérance au traitement (Monk *et al.*, 2006). Cependant, un essai clinique réalisé sur des patients atteints de divers cancers solides, a mis en évidence qu'un traitement par

l'étanercept n'avait aucun effet sur l'appétit, la perte de poids et la survie (Jatoi *et al.*, 2007).

Récemment, il a été mis en évidence chez des patients avec un NSCLC qu'un anticorps humanisé anti-IL-6 (appelé ALD518), diminuait la perte de masse maigre par rapport à un placebo (Bayliss *et al.*, 2011). Enfin, une autre stratégie thérapeutique utilisant un antagoniste du récepteur à l'IL-6, le tocilizumab, a montré sur trois patients des effets prometteurs, comme un gain de poids ou une diminution de la RPA (Ando *et al.*, 2013; Hirata *et al.*, 2013). Néanmoins, la mise en place d'essais cliniques à plus grande échelle est nécessaire pour évaluer leur sécurité et leur efficacité.

L'utilisation systématique de ces diverses stratégies thérapeutiques, à l'heure actuelle, est trop coûteuse en raison du fait que ce type de traitement nécessite un très grand nombre de molécules d'anticorps afin de bloquer totalement l'action des cytokines.

3. Les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

A. L'ibuprofène

L'aspirine et les agents anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) tels que l'ibuprofène sont des agents bloquants de la voie de la cyclo-oxygénase (COX) (Solheim *et al.*, 2013). Ils inhibent la production de prostaglandines (Ferreira *et al.*, 1971; Vane, 1971), qui causent l'inflammation et la douleur (voie de signalisation COX-2). L'administration d'ibuprofène (1.2 g par jour pendant sept jours) à des patients atteints de cancer du pancréas non résecable se traduisait par une réduction de la DER et du niveau sérique en CRP (Wigmore *et al.*, 1995). De plus, il a été montré chez des patients ayant un cancer métastatique que la prise d'ibuprofène pendant trois jours, atténuait la RPA et ralentissait le renouvellement protéique (Preston *et al.*, 1995). Ceci suggère une action potentielle des AINS sur les symptômes de la cachexie associée au cancer. Au cours d'une étude pilote menée chez des patients atteints d'un cancer gastro-intestinal, l'administration d'ibuprofène (1.2 g par jour pendant six semaines) combiné à du MA, entraînait un gain de poids et une réduction de la concentration sérique en CRP (McMillan *et al.*, 1997). Une étude prospective randomisée a mis en évidence que l'ibuprofène (1.2 g par jour pendant douze semaines), en combinaison avec du MA, augmentait significativement le poids et la qualité de vie des personnes atteintes de cancer gastro-intestinal, comparées aux patients traités avec du MA combiné à un placebo (McMillan *et al.*, 1999).

B. L'indométacine

L'indométacine (anciennement orthographiée indométhacine) est un AINS découvert en 1963 (Hart & Boardman, 1963). Chez des souris cachectiques C26, il a été observé qu'un traitement par l'indométacine prévenait le développement de la cachexie et augmentait le temps de survie (Tanaka *et al.*, 1989). Cette molécule peut donc être une stratégie d'intervention thérapeutique dans la cachexie associée au cancer. Bien que n'ayant aucun effet sur le poids corporel, l'indométacine comparée à un placebo, prolongeait le temps moyen de survie chez les patients cancéreux cachectiques (Lundholm *et al.*, 1994). Au cours d'une étude menée sur des patients atteints d'un cancer avancé, il a été mis en évidence qu'un traitement par l'indométacine était à l'origine d'une réduction de la DER et d'une augmentation de la prise alimentaire, et provoquait une réduction de la perte de poids due à un tissu adipeux plus développé, comparés aux patients ayant reçu le placebo (Lundholm *et al.*, 2004b).

C. Le célécoxib

Le célécoxib est un AINS, qui inhibe sélectivement la COX-2 (Penning *et al.*, 1997). Il a été observé expérimentalement chez des souris cachectiques C26, qu'un traitement par le célécoxib prévenait le développement de la cachexie (Davis *et al.*, 2004b), suggérant ainsi un probable bénéfice à son utilisation en clinique. Au cours d'une étude pilote randomisée, il a été montré que les patients atteints de cancer recevant du célécoxib, en plus de capsules d'huiles de poissons, présentaient un gain de masse maigre et de masse grasse, une force de préhension plus élevée, et une baisse de la concentration circulante en CRP, comparés aux patients traités uniquement avec les capsules d'huiles de poissons (Cerchietti *et al.*, 2007). Un essai clinique pilote, chez des patients atteints de cancer de la tête et du cou, et du tractus gastro-intestinal, a mis en évidence que l'administration de célécoxib provoquait un gain de poids marqué dû à une légère augmentation de la masse maigre, et améliorait la qualité de vie (Lai *et al.*, 2008). Une étude non randomisée de phase II a montré qu'après un traitement par le célécoxib, la masse maigre était augmentée, la concentration en TNF- α circulant était diminuée, la force de préhension et la qualité de vie étaient améliorées (Mantovani *et al.*, 2010). Enfin, chez des patients avec un cancer gynécologique, il a été observé que la prise d'un traitement combinant du MA, de la carnitine, des antioxydants et du célécoxib augmentait la masse maigre, réduisait la DER, diminuait les concentrations en

IL-6 et TNF- α circulants, et améliorerait la qualité de vie, comparés aux patients traités uniquement avec le MA (Maccio *et al.*, 2012).

Sur la base de ces résultats, il existe donc des preuves que les AINS peuvent améliorer le poids des patients cachectiques. Ils peuvent également améliorer l'état de performance, la qualité de vie et le statut inflammatoire. Néanmoins, les études sont composées généralement d'un faible nombre de patients et quelques unes sont méthodologiquement imparfaites. Par conséquent, les connaissances actuelles sont insuffisantes pour recommander les AINS dans le traitement de la cachexie associée au cancer en dehors des essais cliniques.

4. Les agents anabolisants

A. Les stéroïdes anabolisants et les SARM

Des patients avec un NSCLC subissant une chimiothérapie ont été traités avec de la nandrolone décanoate (200 mg par semaine pendant quatre semaines), et il a été mis en évidence que ce stéroïde anabolisant dérivé de la testostérone tendait à diminuer la perte de poids et à augmenter la durée de survie (Chlebowski *et al.*, 1986). Au cours d'un essai randomisé chez des patients atteints d'un cancer de l'œsophage ayant subi une résection, il a été montré qu'un traitement par la nandrolone décanoate n'entraînait aucun effet bénéfique sur le statut nutritionnel (Darnton *et al.*, 1999).

L'utilisation des stéroïdes anabolisants, tels que la testostérone, est contraignante du fait de leur incapacité à séparer les effets anaboliques recherchés des stéroïdes sur le muscle, des effets secondaires androgènes non désirés (Bhasin *et al.*, 2006). Par conséquent, il est nécessaire de trouver des substituts n'entraînant préférentiellement qu'un effet anabolique. Le besoin de tels agents a stimulé le développement de modulateurs sélectifs des récepteurs androgènes (SARM pour selective androgen receptor modulators). L'éénobosarm connu aussi sous les noms ostarine ou Gtx-024, est un SARM non stéroïdien qui a une activité pharmacologique anabolique et androgénique spécifique d'un tissu donné (Negro-Vilar, 1999; Mohler *et al.*, 2009). Au cours d'une étude de phase II en double aveugle et contrôlée par un placebo, il a été observé chez des sujets sains qu'un traitement par l'éénobosarm augmentait de manière dose-dépendante la masse maigre et améliorait le niveau d'activité physique, sans évidence d'effets secondaires androgéniques

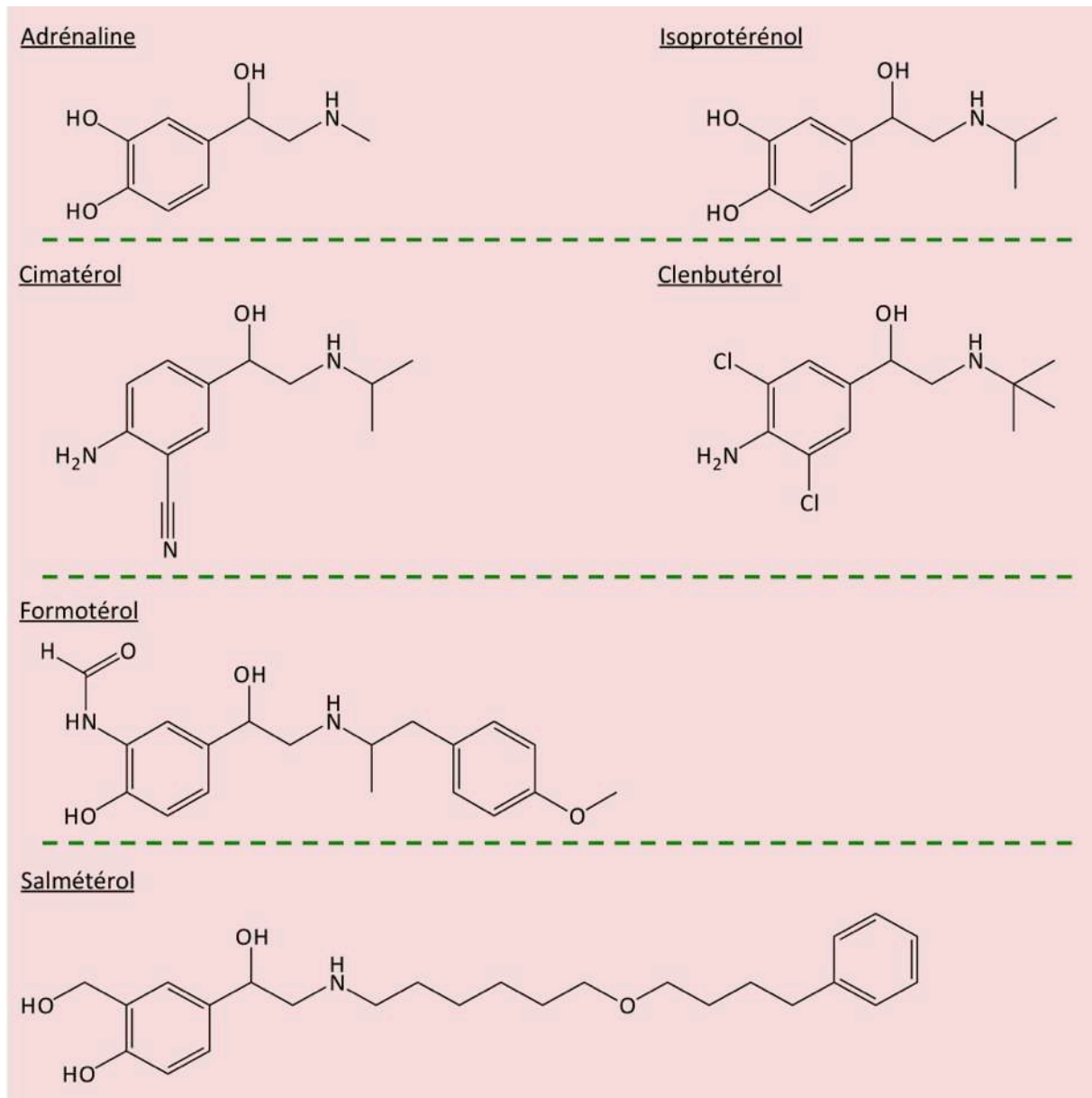


Figure 43 : Structure chimique de certains β 2-agonistes.

(Dalton *et al.*, 2011). Au cours d'un essai clinique de phase II randomisé, en double aveugle, et contrôlé par un placebo, le traitement de patients cancéreux par l'éribosarm générait un gain de masse maigre et améliorait l'activité physique, sans engendrer d'effets toxiques associés à l'activité androgénique (Dobs *et al.*, 2013).

Ces résultats préliminaires laissent penser que les agents anabolisants tels que les SARM peuvent être une approche thérapeutique efficace puisqu'ils peuvent augmenter la masse maigre en relation avec une amélioration de la fonction physique et de la qualité de vie. De plus, le profil d'effets secondaires rapportés semble être favorable.

B. Les β_2 -agonistes

En 1900, le docteur Solomon Solis-Cohen a administré à ses patients souffrant d'asthme et de rhume des foins, « un extrait d'adrénaline brut » issu des glandes surrénales de bovins. Le statut de ses patients asthmatiques s'est amélioré de façon significative suite à l'ingestion quotidienne de cette « substance surrénalienne » (Solis-Cohen, 1900). Par la suite, il a été montré que l'injection d'adrénaline soulageait l'asthme (Bullowa & Kaplan, 1903), par l'intermédiaire d'un effet bronchodilatateur (Kahn, 1907). L'adrénaline (Figure 43) agit en se liant à une variété de récepteurs adrénergiques, et notamment les récepteurs β_2 adrénergiques (Ahlquist, 1948; Lands *et al.*, 1967). Dans le même temps, des composés synthétiques appelés agonistes β_2 adrénergiques (ou β_2 -agonistes), agissant par l'intermédiaire des mêmes récepteurs que l'adrénaline ont été développés et utilisés comme bronchodilatateurs dans le traitement de l'asthme (Lands *et al.*, 1958; Salorinne *et al.*, 1975).

Il a été décrit pour la première fois en 1981, un effet anabolique de l'isoprotérénol (connu également sous le nom d'isoprénaline ; Figure 43), un $\beta_{1/2}$ -agoniste, sur le muscle squelettique chez le rat (Deshaies *et al.*, 1981). De nombreuses études menées au cours de ces trente dernières années ont décrit une hypertrophie du muscle squelettique consécutive à l'administration de β_2 -agonistes (Emery *et al.*, 1984c; Carbo *et al.*, 1997; Hinkle *et al.*, 2002; Busquets *et al.*, 2004; Joassard *et al.*, 2013a). Le gain de masse musculaire chez la souris et le rat était de 10 à 30% selon le muscle étudié (Joassard *et al.*, 2013b).

Les β_2 -agonistes agissent sur la cellule musculaire par l'intermédiaire de la voie de signalisation mettant en jeu les récepteurs β_2 -adrénergiques, PKA et le facteur de transcription cAMP response element binding protein (CREB) (Joassard *et al.*, 2013b). La voie

de signalisation PI3K/Akt/mTOR est également impliquée dans la réponse biologique du tissu musculaire à la prise de β_2 -agonistes (Kline *et al.*, 2007; Koopman *et al.*, 2010; Douillard *et al.*, 2012; Joassard *et al.*, 2013b).

Les effets des β_2 -agonistes dans la cachexie associée au cancer sont étudiés depuis le début des années 1990 (Chance *et al.*, 1991a; Chance *et al.*, 1991b; Stallion *et al.*, 1991). De nombreux travaux expérimentaux ont mis en évidence que les β_2 -agonistes (cimatérol, clenbutérol, formotérol et salmétérol ; [Figure 43](#)) atténuaient la perte de masse musculaire et/ou augmentaient celle-ci (Hyltander *et al.*, 1993; Stallion *et al.*, 1993; Costelli *et al.*, 1995a; Costelli *et al.*, 1995c; Stallion *et al.*, 1995; Carbo *et al.*, 1997; Chance *et al.*, 1998; Busquets *et al.*, 2004; Fuster *et al.*, 2007; Busquets *et al.*, 2011), avec une amélioration de la fonction musculaire et des capacités d'exercice (Busquets *et al.*, 2011). Enfin, utilisés en combinaison avec d'autres agents anti-cancéreux comme l'acicivine, le naproxène ou la roxithromycine, les β_2 -agonistes peuvent avoir également des effets bénéfiques (Chance *et al.*, 1991a; Piffar *et al.*, 2003; Kenley *et al.*, 2008).

A l'heure actuelle, aucun résultat issu d'essais cliniques n'a été publié quant à l'effet des β_2 -agonistes dans la cachexie associée au cancer chez l'humain. Toutefois, deux études sont actuellement en cours. L'une d'elles s'intéresse à l'effet de l'ADP209 (un traitement oral combinant le formotérol et le MA, développé par la société Acacia Pharma au Royaume Uni) sur treize patients ayant une cachexie associée au cancer. Des résultats parus dans une communication par affiche, ont montré que six patients sur sept ayant terminé cette étude clinique, présentaient une amélioration de la taille et de la force musculaire du muscle *quadriceps*, et que trois patients avaient une augmentation du niveau quotidien d'activité physique. Néanmoins, certains patients rapportaient la présence d'effets secondaires tels que des tremblements, des œdèmes périphériques, une tachycardie, des brûlures d'estomac et des indigestions (Greig *et al.*, 2012). La seconde étude s'intéresse à l'effet du MT-102 (développé par la société PsiOxus Therapeutics au Royaume Uni), qui combine différents effets pharmacologiques pour produire un agent de transformation anabolique/anti-catabolique (possédant notamment des propriétés agonistes des récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques). Il a été mis en évidence que l'utilisation du MT-102 chez des rats cachectiques, provoquait une augmentation de la prise alimentaire, du poids corporel, de la masse grasse et de la masse maigre, de l'activité physique, et du temps de survie (von Haehling *et al.*, 2010). Un essai clinique de phase II, multicentrique, randomisé, en double

aveugle a été lancé au moins d'avril 2011, afin de déterminer si un maximum de 16 semaines de traitement avec le MT-102 permettrait d'améliorer le taux de variation de la masse corporelle, par rapport au placebo, chez des patients atteints de cancer de stade III et IV (Stewart Coats *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données expérimentales illustre clairement les effets bénéfiques potentiels de l'administration des β_2 -agonistes. Même s'ils sont bien étudiés et semblent être prometteurs, les stratégies thérapeutiques impliquant les β_2 -agonistes chez les patients cachectiques humains demeurent à l'heure actuelle peu nombreuses, en particulier, en raison de leurs effets secondaires (Joassard *et al.*, 2013b).

L'efficacité globale et la sécurité de tout traitement pharmacologique doivent être déterminées. Dans le cas des médicaments utilisés pour traiter l'anorexie et la cachexie, il est souvent difficile de déterminer si l'état nutritionnel et la fonction physique ont réellement été améliorés, plus précisément, à savoir si les participants gagnent de la masse maigre et/ou de la masse grasse. Les effets secondaires potentiels des médicaments doivent également être pris en compte et, dans certains cas, peuvent augmenter le fardeau des symptômes à un niveau inacceptable. Il est évident que davantage d'essais contrôlés prospectifs randomisés sont nécessaires dans tous ces domaines afin de déterminer une stratégie pharmacologique optimale pour le traitement de la cachexie associée au cancer.

III. Exercice

Environ un quart des cas de cancer est généralement dû à un excès de poids et à un style de vie sédentaire (McTiernan, 2008). Inversement, une activité physique régulière protègerait contre certains type de cancer. En effet, après avoir analysé plus de cinquante études démontrant des liens entre l'activité physique et le cancer, le Fonds Mondial de Recherche contre le Cancer a conclu que l'activité physique réduisait le risque moyen de développer un cancer du côlon ou du sein (après la ménopause) de 20 à 25% (WCRF, 2007). Ces données épidémiologiques ont conduit le Fonds Mondial de Recherche contre le Cancer à proposer une recommandation de trente minutes de sport quotidien.

L'atrophie du muscle squelettique chez les patients atteints de cancer est en partie une conséquence du processus cachectique. La cause probable est une combinaison de processus métaboliques, aggravée par l'inactivité, entraînant une réduction de la synthèse des protéines et une augmentation de la dégradation des protéines (Tisdale, 2009). Au-delà des approches pharmacologiques, l'exercice a été suggéré comme une contre-mesure prometteuse pour prévenir la cachexie associée au cancer (Lenk *et al.*, 2010). Malheureusement, un petit nombre d'études cliniques a été réalisé afin de définir l'efficacité de l'exercice contre la cachexie associée au cancer. La justification de l'utilisation de l'exercice est assez simple, puisqu'il a été démontré que pendant la cachexie associée au cancer, la force musculaire et l'endurance sont considérablement réduites (Weber *et al.*, 2009). Ces modifications limitent sévèrement la capacité à effectuer des activités quotidiennes et par conséquent, compromettent la qualité de vie du patient (Argiles *et al.*, 2012).

Il a été montré que l'exercice d'endurance réduisait la fatigue et l'état de détresse psychologique de patients atteints de cancer recevant une chimiothérapie (Dimeo *et al.*, 1999), et qu'il conduisait à une amélioration de la capacité physique de patientes atteintes d'un cancer du sein (Nieman *et al.*, 1995).

Des études se sont également intéressées à l'effet de l'exercice de résistance en cas de cachexie associée au cancer. Chez des patients atteints de cancer de la prostate recevant un traitement anti-androgénique, il a été observé que l'exercice de résistance réduisait la fatigue et améliorait la qualité de vie (Segal *et al.*, 2003), augmentait la force musculaire et l'endurance musculaire (Galvao *et al.*, 2006), et provoquait une stabilisation de la masse maigre (Galvao *et al.*, 2006). Chez des patients atteints de cancer et traités par chimiothérapie, il a été mis en évidence que l'exercice de résistance augmentait la force musculaire et provoquait un gain de poids (Quist *et al.*, 2006). Au cours d'un essai clinique randomisé contrôlé et multicentrique, il a été montré chez des patientes atteints d'un cancer du sein recevant une chimiothérapie que l'exercice de résistance provoquait un gain de masse maigre et un gain de force musculaire (Courneya *et al.*, 2007). Enfin, il a été montré dans un essai contrôlé et randomisé, que l'exercice de résistance diminuait la fatigue et améliorait la qualité de vie ainsi que la force musculaire chez des patients atteints de cancer pancréatique (Segal *et al.*, 2009).

Récemment, une revue systématique réalisée sur un ensemble de seize essais cliniques randomisés et contrôlés, a mis en évidence que l'exercice d'endurance et l'exercice de résistance amélioraient plus la force musculaire que ne le faisaient des soins de routine (Stene *et al.*, 2013). Seulement six études s'intéressaient à l'effet sur la masse musculaire. Néanmoins, elles montraient une tendance à un effet positif de l'exercice physique sur le maintien de la masse musculaire (Stene *et al.*, 2013).

Bien que très prometteur, il est néanmoins difficile de tirer des conclusions générales quant à l'effet de l'exercice d'endurance ou de l'exercice de résistance chez les patients présentant une cachexie associée au cancer, en raison de la faible quantité d'essais clinique.

En résumé, diverses stratégies thérapeutiques plus ou moins efficaces existent pour lutter contre la cachexie associée au cancer. Néanmoins, aucune d'entre elles n'a permis de stopper la progression de ce processus qui semble irréversible. L'interaction complexe entre l'inflammation, les altérations métaboliques systémiques, ainsi que la présence de nombreux facteurs qui sont maintenant connus pour jouer un rôle important dans le développement et la progression de la cachexie associée au cancer, rendent peu probable l'utilisation d'une seule stratégie thérapeutique ciblée comme moyen de lutter contre la cachexie associée au cancer. Au contraire, une approche multi-ciblée doit être considérée lors de l'élaboration des plans de traitement pour les patients cachectiques.

Objectifs

La cachexie est définie comme un syndrome clinique et métabolique avec une perte de poids progressive aux dépens du tissu adipeux et du tissu musculaire squelettique, à l'origine d'un syndrome d'épuisement musculaire. Ce syndrome est présent chez environ 50% des patients atteints d'un cancer, et sa prévalence est supérieure dans certains types de cancer tels que le cancer du poumon ou le cancer du tractus gastro-intestinal. De plus, il serait responsable du décès d'environ 25% des patients atteints d'un cancer.

La cachexie associée au cancer induit une dérégulation profonde du métabolisme protéique dans le tissu musculaire en affectant à la fois le contrôle de la synthèse et de la dégradation protéique. La Mstn, un membre de la famille TGF- β , régule négativement la masse musculaire chez l'adulte, notamment par une inhibition des synthèses protéiques. L'augmentation de son expression a été récemment montrée dans plusieurs modèles de souris cachectiques.

Notre hypothèse générale est que l'inhibition de la Mstn permet de limiter ou de bloquer le développement de la cachexie associée au cancer et de contribuer ainsi à une amélioration de la durée de vie.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail est de déterminer les bénéfices de l'inactivation du gène de la Mstn sur le développement de la cachexie associée au cancer. Nous nous intéresserons notamment aux mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la croissance tumorale. De plus, nous chercherons à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la masse musculaire, à savoir le rôle de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR, et des systèmes ubiquitine-protéasome et autophagolysosome. Enfin, nous chercherons à définir quelle est la place des sphingolipides, et en particulier des céramides, dans la cachexie associée au cancer.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire : Lewis lung carcinoma

Références

- Cellules LLC – Lewis lung carcinoma cells (ATCC® – CRL-1642™)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC® – 30-2002)
- FBS – Fetal Bovine Serum "Gold" (PAA – A15-151)
- P/S – Pénicilline/Streptomycine (PAA – P11-010)
- DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x with Ca & Mg (PAA – H15-001)
- DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x without Ca & Mg (PAA – H15-002)
- Trypsine-EDTA 10X (PAA – L11-003)
- Bleu trypan – Trypan blue solution (0.4%) (Sigma-Aldrich – T8154)
- DMSO – Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich – D5879)
- Flasque T-25 (25 cm²) (BD Falcon™ – 353109)
- Flasque T-75 (75 cm²) (BD Falcon™ – 353135)
- Flasque T-175 (175 cm²) (BD Falcon™ – 353028)

Principe

Les cellules LLC (Figure 44) sont une lignée cellulaire établie à partir du développement spontané de carcinome pulmonaire de souris C57BL. Les cellules LLC sont fortement tumorigènes, mais faiblement métastatiques chez la souris.

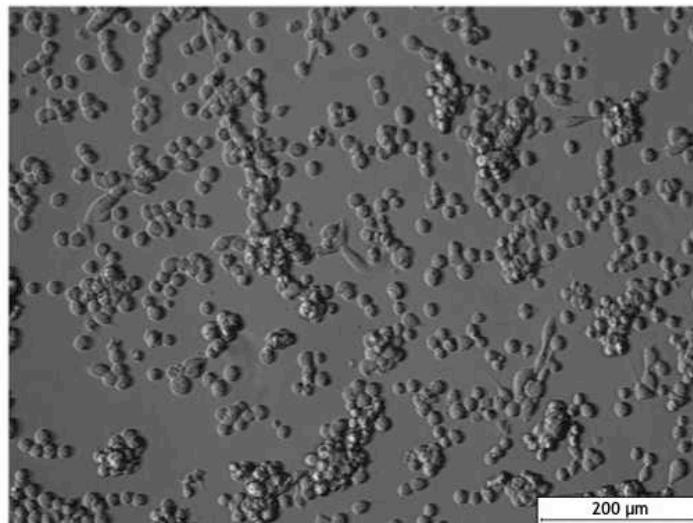


Figure 44 : Cellules LLC en microscopie à un grossissement x 10.

Solutions

› A préparer :

Milieu de culture (prolifération)
Milieu de congélation
DPBS sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + Trypsine

DMEM + 10% FBS + 1% P/S
Milieu de culture + 5% (v/v) de DMSO
1/10 (v/v) de Trypsine-EDTA dans du DPBS
sans $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$

Protocole

› Décongélation et ensemencement des cellules :

1. Décongeler l'ampoule contenant les 3.8 millions de cellules LLC par une agitation douce au bain-marie (37°C) pendant 2 minutes. Transvaser le contenu cellulaire (1 ml) dans un tube Falcon 15 ml. Ajouter 9 ml de milieu de culture.
2. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 7 minutes afin d'éliminer le milieu de congélation.
3. Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules avec du milieu de culture.
4. Ensemencer les 3.8 millions de cellules dans une flasque de T-25 avec une dilution de 1:10 (v/v) ou dans une flasque de T-75 avec une dilution de 1:15 (v/v).
5. Incuber à 37°C et à 5% de CO₂ dans l'incubateur.

› Trypsination des cellules :

1. Récupérer les cellules non adhérentes (surnageant) et les mettre dans un tube Falcon. Récupérer les cellules adhérentes par trypsination.
2. Rincer avec 3 ml de DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ pour une flasque T-25, ou avec 5 ml pour une flasque T-75. *Préalablement, rincer « l'aspirateur » avec de l'éthanol.* Aspirer.
3. Rincer avec 3 ml de DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ pour une flasque T-25, ou avec 5 ml pour une flasque T-75. *Préalablement, rincer « l'aspirateur » avec de l'éthanol.* Aspirer.
4. Ajouter 3 ml de DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ + Trypsine (2.7 ml de DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ et 300 µl de Trypsine-EDTA) pour une flasque T-25, ou 5 ml de DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ + Trypsine (4.5 ml de DPBS sans Ca²⁺/Mg²⁺ et 500 µl de Trypsine-EDTA) pour une flasque T-75. Répartir la solution sur toute la surface de la flasque par un mouvement circulaire.
5. Incuber la flasque pendant 3 minutes à 37°C dans l'incubateur.
6. Choquer la flasque afin de bien décoller les cellules adhérentes restantes. Récupérer les cellules de la flasque et les verser dans le tube Falcon précédemment utilisé.
7. Rincer avec 3 ml de DPBS avec Ca²⁺/Mg²⁺ pour inhiber l'activité de la trypsin pour une flasque T-25, ou avec 5 ml de DPBS avec Ca²⁺/Mg²⁺ pour une flasque T-75. Verser le contenu dans le tube Falcon précédemment utilisé. Répéter cette étape une seconde fois.
8. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 7 minutes.
9. Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules avec du milieu de culture.

› Numération cellulaire :

1. Dans un tube Eppendorf, ajouter 12.5 µl de bleu trypan et 12.5 µl de suspension cellulaire (dilution 1:2). Le bleu trypan permet de différencier les cellules mortes (bleues) des cellules vivantes. Bien agiter la suspension cellulaire lors du pipetage afin que la prise reflète au mieux la concentration réelle dans le tube. Déposer 12.5 µl par capillarité entre lame et lamelle sur une lame de Neubauer.
2. Calculer la moyenne de x comptages de la façon suivante : $C = n/Vc$ où C est la concentration cellulaire (cellules/ml), n le nombre moyen de cellules comptées et Vc le volume de comptage sur la lame. Ce volume est de 0.1 mm³ soit 10⁻⁴ ml pour une lame de Neubauer. La formule devient : $C = n \times 10000 \times 2 \times Vt$. Le facteur 2 tient compte de la dilution lors de la préparation des cellules et le facteur Vt tient compte du volume total de reprise des cellules au terme de la trypsination.

› Congélation des cellules :

1. Centrifuger les cellules à 120 g (850 rpm) pendant 7 minutes.

2. Resuspendre le culot cellulaire avec le milieu de congélation afin d'obtenir une concentration finale de 4 millions de cellules LLC/ml de milieu de congélation.
3. *Préalablement, écrire sur un cryotube stérile : le nom des cellules, le passage des cellules, le nom de la personne et la date.* Transférer les cellules dans le cryotube stérile.
4. Conserver le cryotube à -20°C pendant 24 heures, puis à -80°C pendant 24 heures et enfin le stocker dans l'azote liquide.

Inoculation des cellules LLC

Références

- Kétamine – Kétamine 500 (Virbac)
- Xylazine – Rompum[®] 2% (Bayer Healthcare)
- Sérum physiologique – Chlorure de sodium (NaCl) 0.9% (Aguettant – 228365)
- Cellules LLC – Lewis lung carcinoma cells (ATCC[®] – CRL-1642TM)
- DPBS stérile – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x with Ca & Mg (PAA– H15-001)
- Seringue 1 ml (TERUMO[®] – BS01T)
- Aiguille de 0.3 mm de diamètre (BD MicrolanceTM 3 – 304000)
- Souris WT – Souris sauvages C57BL/6 (UMR 0866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, Montpellier)
- Souris Mstn^{-/-} – Souris C57BL/6 déficientes pour le gène de la Mstn (Mstn^{Δ/Δ}) (Grobet *et al.*, 2003) (UMR 0866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, Montpellier)

Principe

L'injection de cellules LLC dans le flanc droit de la souris entraîne le développement d'une tumeur et d'un cancer. Le but est de créer un modèle animal d'étude de la cachexie associée au cancer.

Protocole

› *Récupération des cellules LLC :*

1. Récolter et trypsiner les cellules LLC.
2. Compter les cellules LLC.

› *Conditionnement des seringues pour l'injection des cellules LLC ou du DPBS :*

1. Reprendre les cellules LLC dans du DPBS stérile.
2. Conditionner des seringues 1 ml (avec des aiguilles de 0.3 mm de diamètre), avec 5 millions de cellules LLC repris dans 150 µl de DPBS stérile.
3. Conditionner des seringues 1 ml (avec des aiguilles de 0.3 mm de diamètre), avec 150 µl de DPBS stérile.

› *Mode opératoire :*

Préalablement, constituer 4 groupes de souris :

- WT : injection de 150 µl de DPBS stérile.
- WT+LLC : injection de 5 millions de cellules LLC repris dans 150 µl de DPBS stérile.
- Mstn^{-/-} : une injection de 150 µl de DPBS stérile.
- Mstn^{-/-}+LLC : injection de 5 millions de cellules LLC repris dans 150 µl de DPBS stérile.

1. Anesthésier les souris par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (100 mg/kg de poids de corps) et de xylazine (10 mg/kg de poids de corps) repris dans du sérum physiologique.
2. Tondre le pelage du flanc droit des souris pour dégager au maximum le lieu de l'injection.
3. Inoculer en sous-cutanée les cellules LLC repris dans le DBPS stérile ou le DPBS stérile seul dans le flanc droit, à l'aide des seringues préalablement conditionnées (Figure 45).

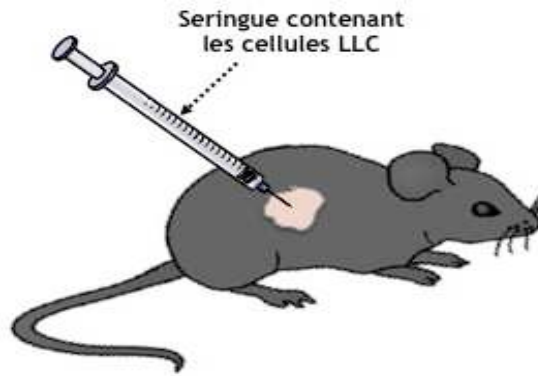


Figure 45 : Illustration de l'inoculation de cellules LLC chez la souris.

Prélèvement et conditionnement des échantillons tissulaires

Références

- Kétamine – Kétamine 500 (Virbac)
- Xylazine – Rompum[®] 2% (Bayer Healthcare)
- Sérum physiologique – Chlorure de sodium (NaCl) 0.9% (Aguettant – 228365)
- Scalpel – Sterile Disposable Scalpel (Sovereign – 0434)
- Milieu cryoprotecteur – Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound (Sakura[®] Finetek – 4583)
- Isopentane – Méthyl-2 Butane (Prolabo – 24872)
- RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen – 76104)

Principe

A la fin du protocole de 35 jours, les muscles des souris sont prélevés pour des analyses histochimiques et biochimiques. Pour ce faire, les muscles sont prélevés sur des animaux vivants profondément anesthésiés.

L'anesthésie est réalisée par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (100 mg/kg de poids de corps) et de xylazine (10 mg/kg de poids de corps) repris dans du sérum physiologique. La peau des pattes postérieures est retirée afin de prélever les muscles. Sur la face antérieure de la patte postérieure, on prélève le muscle *tibialis anterior*, puis le muscle *extensor digitorum longus*. Sur la face postérieure de la patte postérieure, on prélève le muscle *gastrocnemius*, puis le muscle *soleus*. Une fois les muscles retirés, ils sont pesés dans leur intégralité puis conditionnés.

A la fin du prélèvement, les animaux sont sacrifiés par une excision du cœur.

Protocole

› Conditionnement histologique :

La portion centrale (\approx 4 mm) des muscles TA droit et GAS droit est isolée à l'aide d'un scalpel. Elle est déposée sur un morceau de liège, et enrobée dans un milieu cryoprotecteur afin d'assurer la protection du muscle au cours de la congélation. L'ensemble est plongé dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide, et est conservé au congélateur à -80°C jusqu'à l'analyse.

› Conditionnement ARN (Figure 46) :

Les deux extrémités des muscles TA droit et GAS droit, dépourvues de tendons sont isolées à l'aide d'un scalpel. Elles sont ensuite immergées dans le RNAlater RNA Stabilization Reagent afin de stabiliser l'acide ribonucléique (ARN) et de préserver le profil d'expression des gènes, et sont conservées au congélateur à -20°C jusqu'à l'analyse.

› *Conditionnement protéique (Figure 46) :*

Les muscles TA gauche et GAS gauche, ainsi que les muscles EDL droit et gauche, et SOL droit et gauche, dépourvus de tendons sont isolés à l'aide d'un scalpel. Ils sont ensuite plongés dans de l'azote liquide et conservés au congélateur à -80°C jusqu'à l'analyse.

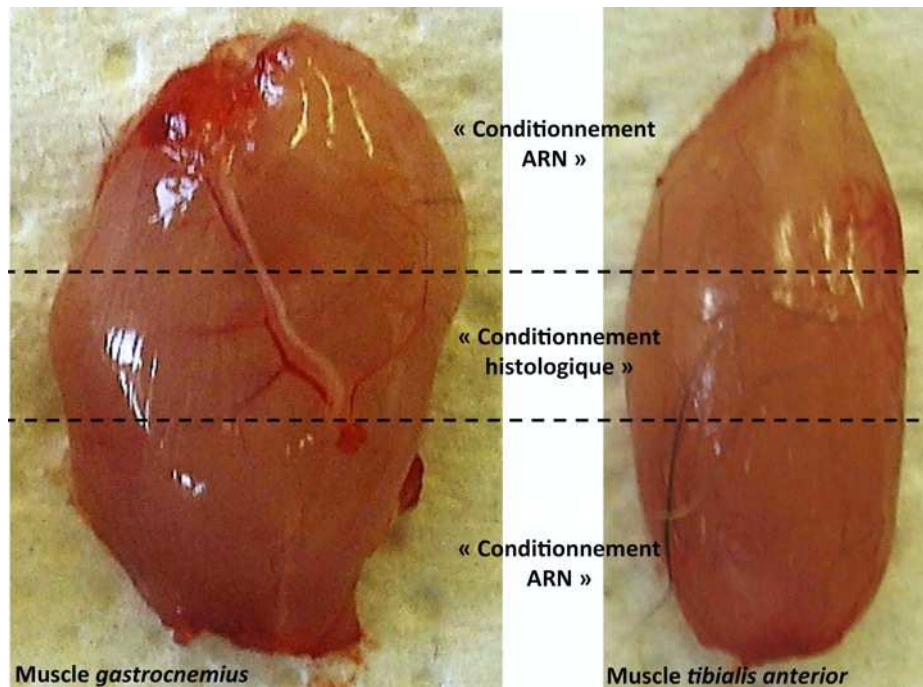


Figure 46 : Illustration du conditionnement des muscles prélevés.

Extraction protéique avec tampon complet sur tissu musculaire congelé

Références

- Tris HCl – Trizma[®] hydrochloride (Sigma-Aldrich – T3253)
- NaCl – Sodium chloride (BDH Prolabo – 27800.291)
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich – EDS)
- EGTA – Ethylene glycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Sigma-Aldrich – E4378)
- β -glycérophosphate disodium salt hydrate (Sigma-Aldrich – G6251)
- Sodium fluorure – Sodium fluoride (Sigma-Aldrich – S7920)
- Na_3VO_4 – Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich – S6508)
- Acide okadaïque – Okadaic acid sodium salt (Sigma-Aldrich – O7760)
- Benzamidine hydrochloride hydrate (Sigma-Aldrich – B6506)
- PMSF – Phenylmethanesulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich – P7626)
- Aprotinine (Sigma-Aldrich – A1153)
- Leupeptine – Leupeptin hemisulfate salt (Sigma-Aldrich – L8511)
- Triton[®] X-100 (Sigma-Aldrich – T8532)
- Ultra-turrax[®] – Homogénéiseur Ultra-Turrax[®] T8 (IKA – 8002000)

Solutions

› A préparer :

EDTA	200 mM	pH = 8.0
EGTA	200 mM	
Na_3VO_4	100 mM	
Acide okadaïque	100 mM	
Benzamidine	100 mM	
PMSF	100 mM	
Aprotinine	100 mM	
Leupeptine	100 mM	

Protocole

› Préparation du tampon complet :

1. Combiner les différents réactifs :

Concentration solution finale	Concentration solution mère	Volume de la solution finale, ml					
		5 ml	10 ml	20 ml	30 ml	40 ml	50 ml
Tris HCl 50 mM, mg		39.4	78.8	157.6	236.4	315.2	394
NaCl 100 mM, mg		29.22	58.44	116.88	175.32	233.76	292.2
EDTA 2 mM, µl	200 mM	50	100	200	300	400	500
EGTA 2 mM, µl	200 mM	50	100	200	300	400	500
β-glycérophosphate 50 mM, mg		54	108	216	324	432	540
Sodium fluorure 50 mM, mg		10.5	21	42	63	84	105
Na ₃ VO ₄ 1mM, µl	100 mM	50	100	200	300	400	500
Acide okadaïque 120 nM, µl	605 µM	1	2	4	6	8	10
Benzamidine 3 mM, µl	300 mM	50	100	200	300	400	500
PMSF 1 mM, µl	100 mM	50	100	200	300	400	500
Aprotinine 10 µg/ml, µl	1 µg/µl	50	100	200	300	400	500
Leupeptine 10 µg/ml, µl	1 µg/µl	50	100	200	300	400	500
Triton® X-100 1%, µl		100	200	400	600	800	1000

Inhibiteurs de protéases :

Benzamidine
PMSF
Aprotinine
Leupeptine

Inhibiteurs de phosphatases :

Sodium fluorure
Na₃VO₄
Acide okadaïque

2. Ajuster le pH à 7.4. Ajuster le volume final dans une éprouvette graduée. Conserver à 4°C.

› Mode opératoire pour le tissu musculaire :

1. Peser environ 20-30 mg de tissu musculaire, dans un tube Eppendorf refroidi (dans la glace).
2. Ajouter le tampon complet de façon à réaliser une dilution finale (poids/volume) au 1/20 (ex : 400 µl de tampon complet pour 20 mg de muscle).
3. Homogénéiser le tissu, 2 fois pendant 10 secondes, dans la glace, à l'ultra-turrax®.
4. Centrifuger à 12000 g pendant 20 minutes à 4°C.
5. Récupérer le surnageant. Aliquoter sous 100 µl. Conserver à -80°C.

Mesure de la concentration en protéines totales

Références

- BSA – Bovine Serum Albumin (PAA – K41-001)
- Solution A – Protein Assay Reagent A (Bio-Rad – 500-0113)
- Solution B – Protein Assay Reagent B (Bio-Rad – 500-0114)

Principe

Le kit Bio-Rad DC™ (Detergent Compatible) Protein Assay permet la mesure de la concentration en protéines (réaction similaire à celle du Lowry) d'extraits par colorimétrie. Il comprend 2 solutions :



Solutions

- › A préparer :
- | | |
|-----|---------|
| BSA | 2 mg/ml |
|-----|---------|

Protocole

- › Courbe étalon :

Ajouter les différentes solutions dans l'ordre décrit ci-dessous directement dans la cuve de spectrophotométrie.

Protéines, μg	0	10	20	30	40	50	60
$\Delta\text{H}_2\text{O}$, μl	195	190	185	180	175	170	165
Tampon d'extraction, μl	←————— 5 —————→						
BSA 2 mg/ml, μl	0	5	10	15	20	25	30
Solution A, μl	←————— 100 —————→						
Solution B, μl	←————— 800 —————→						

Afin d'obtenir une coloration homogène, l'addition de la solution B doit se faire tout en vortexant.

Incuber 15 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm.

› *Mode opératoire :*

1. Mettre 195 μl de $\Delta\text{H}_2\text{O}$.
2. Ajouter 5 μl d'extrait.
3. Ajouter 100 μl de solution A.
4. Ajouter 800 μl de solution B.
5. Incuber 15 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.
6. Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 750 nm.

Electrophorèse SDS-PAGE / Western Blot

Références

- APS – Ammonium persulfate (Sigma-Aldrich – A3678)
- Glycérol (Prolabo – 24387.292)
- SDS – Sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich – L5750)
- Tris – Trizma[®] base (Sigma-Aldrich – T1503 ou Prolabo – 443864E)
- Bleu de bromophénol – Bromophenol Blue sodium salt (Sigma-Aldrich – B5525)
- Solution A : acrylamide/bis-acrylamide 40% – Acrylamide/bis-acrylamide 40% solution (Sigma-Aldrich – T1503 ou Applichem – 443864E)
- TEMED – N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Sigma-Aldrich – T9281)
- β-mercaptoéthanol – 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich – M7154)
- Glycine (Sigma-Aldrich – G8898 ou Prolabo – 24403.298)
- Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich – B0770 ou Merck – 1.15444.0025)
- Méthanol (Prolabo – 20864.320)
- Acide acétique glacial – Acide acétique 99% (Prolabo – 20103.295)
- Poids moléculaire – Color Protein Markers (Lonza – 50550)
- NaCl – Sodium chloride (Sigma-Aldrich – S5886 ou Prolabo – 27800.291)
- Tween[®] 20 (Prolabo – 28829.296)
- Rouge Ponceau – Ponceau S solution (Fluka – 81462)
- Papier de transfert – Gel-blotting paper GB 005 (Whatman – 10 426 994)
- Membrane de nitrocellulose – Protran[®] Nitrocellulose Transfert Membrane (Whatman – 10 401 196)
- Régilait délipidé – Lait écrémé en poudre à dissolution instantanée (Régilait)
- BSA – Bovine Serum Albumin (PAA – K41-001)
- Développeur – GBX developer/replenisher (Sigma-Aldrich – P7042)
- Fixateur – GBX fixer/replenisher (Sigma-Aldrich – P7167)
- Solution de révélation A et B – Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare – RPN 2109)
- Film – Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare – 28906835)

Principe

Cette technique regroupe deux étapes : une électrophorèse suivie d'un Western Blot. L'électrophorèse permet de séparer les protéines, préalablement dénaturées, selon leur poids moléculaire. Le Western Blot permet le transfert de ces protéines sur une membrane de nitrocellulose où elles seront exposées à un anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. À l'aide d'un anticorps secondaire spécifique de l'anticorps primaire, il est possible de détecter la présence et la concentration de la protéine d'intérêt. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase (HorseRadish Peroxidase, HRP), dont l'activité en présence de son substrat s'accompagne d'une chimioluminescence liée à l'oxydation du luminol en présence d'eau oxygénée (Figure 47).

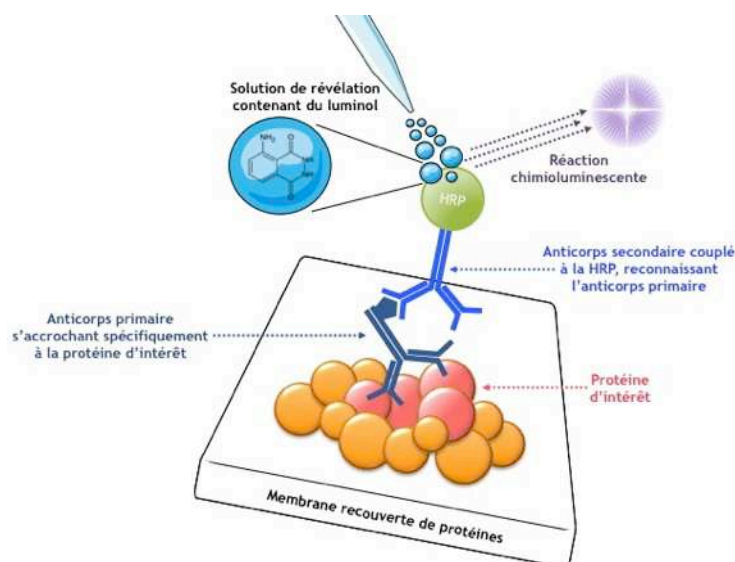


Figure 47 : Illustration de la détection de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps primaire (spécifique de la protéine d'intérêt) et d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase.

Solutions

> A préparer :

APS	10%
Glycérol	50%
SDS	10%

Tampon 4X pour gel de séparation (Tris 1.5 M)

Peser 18.15 g de Tris. Ajuster le pH à 8.8 avec HCl. Ajuster le volume final à 100 ml avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$.

Tampon 4X pour gel de concentration (Tris 0.5 M)

Peser 6 g de Tris. Ajuster le pH à 6.8 avec HCl. Ajuster le volume final à 100 ml avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$.

Tampon d'échantillon 4X

Tris 250 mM	1.51 g de Tris
Glycérol 20%	20 ml de glycérol 50%
SDS 4%	20 ml de SDS 10%
Bleu de bromophénol 0.04%	20 mg de bleu de bromophénol

Ajuster le pH à 6.8 avec HCl. Compléter le volume final à 45 ml avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée. Le jour de l'expérimentation, ajouter 10% (v/v) de β -mercaptoéthanol.

Tampon d'électrophorèse 1X

Tris 25 mM	3.03 g de Tris
Glycine 192 mM	14.41 g de glycine
SDS 0.1%	10 ml de SDS 10%
Bleu de bromophénol 0.04%	20 mg de bleu de bromophénol

Ajouter 950 ml de $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Vérifier le pH qui doit être autour de 8.3-8.4 sans ajustement. Ajuster le volume final à 1 litre avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Le méthanol améliore l'absorption sur une membrane de nitrocellulose, mais diminue l'efficacité du transfert. L'ajout de SDS 0.1% (soit

1 g) augmente l'efficacité du transfert, mais diminue la capacité de la membrane à fixer les protéines.

Tampon de transfert 1X

Tris 25 mM	3.03 g
Glycine 192 mM	14.41 g
Méthanol	200 ml

Ajouter 950 ml de $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Ajuster le pH à 8.6 ± 0.2 . Ajuster le volume final à 1 litre avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$.

Solution de coloration au bleu de Coomassie

Brilliant Blue G	1 g
Méthanol	450 ml
$\Delta\text{H}_2\text{O}$	450 ml
Acide acétique glacial	100 ml

Agiter toute la nuit et filtrer pour enlever les particules de colorant non dissoutes.

Solution de décoloration

Méthanol	100 ml
Acide acétique glacial	100 ml
$\Delta\text{H}_2\text{O}$	800 ml

Tris Buffered Saline 10X (TBS 10X)

Tris 100 mM	12.11 g
NaCl 1.5 M	87.66 g

Ajouter 950 ml de $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Ajuster le pH à 7.5. Ajuster le volume final à 1 litre avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Diluer au 1/10 pour faire du TBS 1X (100 ml de TBS 10X + 900 ml de $\Delta\text{H}_2\text{O}$).

Tris Buffered Saline 1X-Tween 20 0.05%

Tris 10 mM	1.21 g
NaCl 150 mM	8.76 g
Tween [®] 20 0.05%	500 μl (préalablement chauffé à 40°C)

Ajouter 950 ml de $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Ajuster le pH à 7.5. Ajuster le volume final à 1 litre avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$.

Protocole

> Préparation du gel :

- Mise en place des plaques d'électrophorèse :

Nettoyer les plaques au Micro-90[®] (Sigma-Aldrich – Z281565) en vérifiant l'absence d'impuretés à leurs surfaces (possibilité d'utiliser également de l'acétone). Rincer abondamment avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$. Enlever les dernières impuretés à l'aide de l'air comprimé. Mettre les plaques en place en suivant les indications du fournisseur (Bio-Rad). Vérifier l'ajustement des plaques et des spacers afin d'éviter les fuites lors du coulage.

- Préparation et coulage du gel de séparation :

Le pourcentage en acrylamide/bis-acrylamide du gel de séparation est déterminé en fonction de la taille des protéines d'intérêt.

% en acrylamide	Résolution
15%	15 à 70 kDa
12%	15 à 90 kDa
10%	30 à 100 kDa
7.5%	40 à 200 kDa
gradient progressif	60 à 212 kDa

Pour 1 mini-gel, ajouter dans l'ordre :

	7.5%	10%	12.5%	15%
Solution A : acrylamide/bis-acrylamide 40%, ml	1.5	2	2.5	3
Tampon 4X pour gel de séparation, ml	← 2 →			
SDS 10%, µl	← 80 →			
ΔH ₂ O, ml	4.42	3.92	3.42	2.92

Les concentrations finales de Tris et SDS sont respectivement de 0.375 M et 0.1%.

La copolymérisation de l'acrylamide et du bis-acrylamide est initiée par l'addition d'APS au 1/200 (v/v) et d'un accélérateur, le tétraméthyléthyléthylènediamine (TEMED) au 1/2000 (v/v).

Attendre que les réactifs soient à température ambiante, puis préparer le gel comme indiqué ci-dessous, en ajoutant dans l'ordre :

<i>Solutions</i>	<i>1 mini-gel</i>
Solution gel de séparation, ml	8
APS, µl	80
TEMED, µl	4

La polymérisation complète nécessite environ 45 minutes.

- Préparation et coulage du gel de concentration :

Le gel de concentration est un gel à 4%.

Pour 1 mini-gel, ajouter dans l'ordre :

Solution A : acrylamide/bis-acrylamide 40%, μl	250
Tampon 4X pour gel de concentration, μl	625
SDS 10%, μl	25
Bleu de bromophénol 1%, μl	100
$\Delta\text{H}_2\text{O}$, ml	1.5

Les concentrations finales de Tris, de SDS et de bleu de bromophénol sont respectivement de 0.125 M, 0.1% et 0.04%.

La copolymérisation de l'acrylamide et du bis-acrylamide est initiée par l'addition d'APS au 1/100 (v/v) et d'un accélérateur, le TEMED au 1/1000 (v/v). Attendre que les réactifs soient à température ambiante, puis préparer le gel comme indiqué ci-dessous, en ajoutant dans l'ordre :

<i>Solutions</i>	<i>1 mini-gel</i>
Solution gel de concentration, ml	2.5
APS, μl	25
TEMED, μl	2.5

Verser le gel de concentration avec une pipette, puis mettre le peigne en position. Laisser polymériser au moins 30 minutes.

- Mise en place des plaques d'électrophorèse :

Dégager le cadre de coulage. Avec une feuille de papier, enlever les débris polymérisés au bas du gel. Mettre en place les plaques avec leurs supports dans la cuve d'électrophorèse. Verser le tampon d'électrophorèse 1X, de façon à égaliser les niveaux de part et d'autre des plaques. À ce stade, le gel peut être conservé 24 heures au frigo à 4°C.

Enlever délicatement les peignes, puis nettoyer les puits à la pipette de façon à enlever les débris de gel qui pourraient affecter la migration.

› *Préparation, chargement et migration des échantillons :*

- Préparation des échantillons :

Dans un tube Eppendorf 0.5 ml, combiner 3 volumes d'échantillon protéique à 1 volume de tampon d'échantillon 4X contenant du β -mercaptoéthanol 10 % (v/v). Vortexer. En général, 30 μg d'échantillon protéique par puits sont suffisants.

Chauffer à 100°C pendant 3 minutes.

Centrifuger brièvement (3 secondes) pour récupérer le volume. Charger ensuite rapidement les échantillons dans les puits.

- Chargement des échantillons :

Charger délicatement l'échantillon dans le puits en utilisant les cônes prévus à cet effet. Faire attention à ne pas introduire de bulles d'air. Prévoir un puits pour le marqueur de poids moléculaire (4 µl). Mettre en place la cuve d'électrophorèse dans le bac de glace.

- Migration des échantillons :

Fixer les électrodes. Des bulles d'air doivent se former lorsque le courant passe. Le front de migration est indiqué par le bleu de bromophénol contenu dans le tampon d'échantillon 4X et le gel de concentration.

Faire migrer à 80 V pendant 15 minutes, puis à 90 V pendant 30 minutes, puis augmenter la tension (110 V) et laisser migrer plusieurs heures (à adapter selon la protéine d'intérêt).

Couper l'alimentation. Enlever les plaques délicatement.

› Transfert liquide sur membrane des protéines :

- Préparation de la membrane de transfert :

Mesurer la taille exacte du gel qui devra être transféré.

Pour 1 mini-gel, découper 2 morceaux de papier de transfert (blotting paper) légèrement supérieurs à la taille du gel soit 10 x 7 cm, et découper un morceau de membrane de nitrocellulose de la taille des papiers de transfert. Faire un repère pour orienter la membrane en coupant un coin de la membrane.

Tremper très progressivement la membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert 1X, à température ambiante pendant 30 minutes. Cette étape est importante car elle permet d'éviter la formation de micro-bulles qui pourraient affecter le transfert.

- Transfert :

Enlever le gel de concentration. Faire un repère afin d'orienter le gel en coupant le coin supérieur gauche. Tremper le gel pendant 30 min dans le tampon de transfert 1X à température ambiante afin d'éliminer l'excès de SDS.

Faire tremper les feuilles de papier de transfert (blotting paper) dans le tampon de transfert 1X.

Tremper un pad mousse dans le tampon de transfert 1X. Le disposer sur la face négative noire du « sandwich », proche du côté avec les charnières.

Prendre une feuille de papier de transfert (blotting paper) et la disposer sur le pad mousse. Chasser les bulles en roulant une pipette sur le papier de transfert.

Déposer délicatement le gel en mettant le coin coupé en haut à droite.

Disposer la membrane de transfert sur le gel en faisant correspondre les entailles. Ne pas enfermer de bulles entre le gel et la membrane.

Prendre une feuille de papier de transfert (blotting paper) et la disposer sur la membrane. Chasser les bulles en roulant une pipette sur le papier de transfert sans trop appuyer pour ne pas dilater le gel.

Tremper un pad mousse dans le tampon de transfert 1X. Le disposer sur le haut du « sandwich ».

Fermer délicatement le « sandwich ». Le mettre en place dans son support, noir contre noir et blanc contre blanc.

Mettre en place la cuve de transfert dans la glace. Mettre en place le support dans la cuve de transfert, puis verser du tampon de transfert 1X jusqu'à ce que le gel soit complètement immergé. Positionner ensuite le système réfrigérant contenant de la glace.

Transférer à ampérage constant à 4°C pendant plusieurs heures, généralement 400 mA pendant 2 heures.

Au terme du transfert, prélever délicatement le gel et la membrane pour les mettre à colorer dans 2 solutions : rouge Ponceau pour la membrane et bleu de Coomassie pour le gel.

- Coloration :

- Membrane au rouge Ponceau

Cette étape est facultative. Elle permet cependant de vérifier que le transfert des protéines du gel sur la membrane a correctement fonctionné.

Tremper pendant 5 minutes la membrane dans la solution de rouge Ponceau sous agitation. Sauver la solution de Ponceau et rincer la membrane avec du TBS 1X pendant 5 minutes. Observer les bandes de protéines colorées en rouge.

Laver deux fois la membrane avec du TBS 1X pendant 5 minutes (2 x 5 min) de façon à décolorer complètement la membrane. Les bandes rouges ont alors complètement disparu.

- Gel au bleu de Coomassie

Le processus de coloration/décoloration permet de visualiser les bandes protéiques du gel. Après coloration, tout transfert sera impossible car les protéines ont été fixées par le colorant.

Laisser incuber le gel pendant 4 heures sous agitation dans la solution de bleu de Coomassie. Sauver la solution de coloration et ajouter la solution de décoloration. Mettre une feuille de papier absorbant ce qui permettra de piéger le colorant qui est libéré.

Réaliser un autre bain lorsque la solution de décoloration est saturée par le colorant.

Répéter l'opération jusqu'à ce que le gel soit complètement décoloré (ou laisser sous agitation toute la nuit en recouvrant de papier d'aluminium pour emprisonner l'odeur). Sauver les derniers bains de décoloration pour une réutilisation.

› *Blocage de la membrane :*

Cette étape permet de bloquer les sites de fixation potentiels non spécifiques des anticorps sur la membrane en la saturant avec des protéines du lait (caséine). Il en résultera une diminution du bruit de fond lors de la révélation.

Préparer une solution 5% Régilait délipidé dans du TBS 1X (5 g de Régilait délipidé / 100 ml de TBS 1X). Agiter pendant 5 minutes pour dissoudre le Régilait délipidé.

Faire tremper la membrane pendant au moins une heure sous agitation à température ambiante dans la solution TBS 1X-Régilait 5%.

Laver la membrane avec du TBS 1X pendant 10 minutes.

› *Marquage de la membrane avec les anticorps :*

- Anticorps primaire (Ac 1^{re}) :

Recouvrir une plaque en verre avec du parafilm. La disposer dans un plateau.

Préparer une solution 5% BSA dans du TBS 1X (0.5 g de BSA / 10 ml de TBS 1X) ou une solution 1% Régilait délipidé dans du TBS 1X (0.5 g de Régilait délipidé / 50 ml de TBS 1X) selon la fiche technique de l'anticorps.

Préparer l'anticorps primaire (Ac 1^{re}) à la dilution appropriée dans du TBS 1X-BSA 5% ou dans du TBS 1X-Régilait 1%. Les anticorps primaires sont généralement préparés pour être utilisés

à des dilutions allant de 1/250 à 1/1000. Compter environ 4 ml de TBS 1X-BSA 5% ou de TBS 1X-Régilait 1% pour une membrane entière.

Déposer la solution contenant l'Ac I^{re} sur le parafilm, puis disposer la membrane de telle sorte que la face protéique soit au contact du parafilm. Eviter la formation de bulles qui pourraient prévenir la fixation de l'anticorps. Recouvrir le plateau avec du papier aluminium. Laisser incuber une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Laver ensuite 2 fois la membrane avec du TBS 1X-Tween 20 0.05% pendant 5 minutes (2 x 5 minutes). Laver la membrane avec du TBS 1X pendant 10 minutes.

- Anticorps primaire (Ac II^{re}) :

Recouvrir une plaque en verre avec du parafilm. La disposer dans un plateau.

Préparer l'anticorps secondaire (Ac II^{re}) à la dilution appropriée dans du TBS 1X-Régilait 1%. Les anticorps secondaires sont généralement préparés à des dilutions s'étendant de 1/2500 à 1/5000 (en fonction du système de révélation). Vérifier la compatibilité de l'anticorps secondaire avec l'hôte dans lequel a été produit l'anticorps primaire.

Déposer ensuite 2 ml de TBS 1X-Régilait 1% avec l'Ac II^{re} sur la face protéique de la membrane. S'assurer que la totalité de la membrane est recouverte. Recouvrir le plateau avec du papier aluminium.

Laisser incuber une heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C.

Laver ensuite 2 fois la membrane avec du TBS 1X-Tween 20 0.05% pendant 5 minutes (2 x 5 minutes). Laver la membrane avec TBS 1X pendant 10 minutes.

› Révélation de la membrane (chambre noire) :

- Préparation des réactifs de développement et de révélation :

Développeur : 50 ml de développeur + 200 ml de ΔH_2O . Conserver à l'abri de la lumière dans un flacon bouché recouvert de papier aluminium.

Fixateur : 50 ml de fixateur + 200 ml ΔH_2O . Conserver à l'abri de la lumière dans un flacon bouché recouvert de papier aluminium.

- Réaction de révélation :

Préparer la solution de révélation en ajoutant un volume de solution A et un volume de solution B. Compter environ 2 ml au total par mini-gel.

Enlever l'excès de la dernière solution de rinçage (TBS 1X). Déposer la membrane face protéique en avant sur une plaque de verre.

Recouvrir complètement la membrane avec la solution de révélation. Laisser incuber 1 minute. La technique de révélation est basée sur la réaction chimioluminescente catalysée par la péroxydase (HorseRadish Peroxidase, HRP) en présence du substrat luminol.

Enlever rapidement l'excès de solution de révélation, puis recouvrir la membrane avec un transparent type rétroprojecteur en évitant la formation de bulles. Ne pas sécher complètement la membrane qui doit toujours rester humide.

Placer la membrane et son support dans la cassette, face protéique en avant. Placer le film directement contre la membrane recouverte du transparent. Fermer la cassette.

NB : Attention ne pas exposer les films à la lumière blanche.

Les temps d'exposition sont variables et dépendent de l'abondance de la protéine d'intérêt, de l'activité HRP et de la sensibilité du système de révélation. Généralement, se fixer un temps d'exposition de 3 à 5 minutes, puis l'ajuster en fonction de l'intensité du signal.

- Développement du film :

Placer en série 3 bacs d'incubation contenant dans l'ordre : le développeur, de l'eau du robinet et le fixateur.

Sortir le film de la cassette. Le tremper entièrement pendant 1 minute dans le développeur. Rincer ensuite le film dans le bac contenant de l'eau du robinet. Tremper ensuite entièrement le film dans la solution de fixation pendant 3 minutes. Rincer abondamment le film à l'eau du robinet. Laisser sécher.

Vérifier que le signal n'est pas surexposé. Sinon recommencer l'exposition avec un temps plus court, ou attendre une dizaine de minutes avant de remettre le film au contact de la membrane.

Scanner le film. Réaliser l'analyse de la surface et de l'intensité des bandes d'intérêt en utilisant le logiciel ImageJ 1.45s.

Anticorps primaires et secondaires utilisés

Anticorps primaires

› Muscle :

<i>Protéine d'intérêt</i>	<i>Poids moléculaire</i>	<i>Référence</i>	<i>Dilution</i>
4E-BP1	15 à 20 kDa	Cell Signaling Technology – 9452	1/500
Complexe Atg5-Atg12	56 kDa	Sigma-Aldrich – A0856	1/800
LC3b	16, 18 kDa	Sigma-Aldrich – L7543	1/800
NF-κB p65	65 kDa	Cell Signaling Technology – 3034	1/600
NF-κB p65 ^{Ser536}	65 kDa	Cell Signaling Technology – 3031	1/200
rpS6	32 kDa	Cell Signaling Technology – 2217	1/600
rpS6 ^{Ser235/236}	32 kDa	Cell Signaling Technology – 4856	1/800
α-tubuline	50 kDa	Sigma-Aldrich – T5168	1/2000

› Tumeur :

<i>Protéine d'intérêt</i>	<i>Poids moléculaire</i>	<i>Référence</i>	<i>Dilution</i>
Bax	23 kDa	Santa Cruz Biotechnology – sc-6236	1/1000
Bcl-2	26 kDa	Santa Cruz Biotechnology – sc-7382	1/800
PTEN	54 kDa	Cell Signaling Technology – 9559	1/800
α-tubuline	50 kDa	Sigma-Aldrich – T5168	1/2000

Anticorps secondaires

› Muscle et tumeur :

- Anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplé à la peroxydase (HorseRadish Peroxidase, HRP) (Dako – P0448)
- Anticorps secondaire lapin anti-souris couplé à la peroxydase (HorseRadish Peroxidase, HRP) (Dako – P0181)

Quantification des bandes de Western Blot

Références

- Scanner (Epson – 1640SU)
- Logiciel d'analyse d'image ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, USA)

Principe

Après avoir scanné les films, la surface et l'intensité de la bande correspondant à la protéine d'intérêt sont quantifiées à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ 1.45s.

Protocole

› *Scanner du film :*

1. Paramétrer le scanner :

Type d'image	48-bits Couleur
Résolution	300 dpi

2. Scanner et enregistrer l'acquisition au format JPEG.

› *Paramétrage du logiciel ImageJ 1.45s :*

1. Cliquer sur *File*, puis *Open...* Choisir le film à quantifier.
2. Cliquer sur *Edit*, puis *Invert* pour inverser les couleurs.
3. Cliquer sur *Image*, puis *Type*, puis *8-bit*.
4. Cliquer sur *Analyze*, puis *Set Measurements...* :
 - Cocher « *Area* »
 - Cocher « *Mean gray value* »
 - Décocher « *Min & Max gray value* »
5. Cliquer sur *OK*.
6. Cliquer sur *Analyze*, puis *Set Scale...* pour définir l'échelle de mesure :
 - Régler « *Distance in pixels* » sur 1
 - Régler « *Known distance* » sur 1
 - Régler « *Pixel aspect ratio* » sur 1
 - Régler « *Unit of length* » sur mm
 - ⇒ 1 pixel correspond à 1 mm.
7. Cliquer sur *OK*.

› *Quantification :*

1. Afin d'obtenir la mesure de la surface et de l'intensité de la bande, cliquer sur « *Polygon selections* ».
2. Définir manuellement le contour de la bande d'intérêt.
3. Une fois le contour effectué, cliquer sur *Analyze*, puis *Measure* ou sur le raccourci clavier Ctrl + M, pour obtenir et conserver le résultat de la mesure.
4. Effectuer à nouveau les étapes 2 et 3, deux fois. Pour chaque bande d'intérêt, nous avons donc 3 mesures.
5. Réaliser un 'blanc' qui représentera l'intensité moyenne du bruit de fond, pour normaliser les valeurs obtenues. Cliquer sur « *Rectangular* ».
6. Définir manuellement un rectangle dans le bruit de fond au dessus ou au dessous de chaque bande d'intérêt.

7. Une fois le contour effectué, cliquer sur *Analyze*, puis *Measure* ou sur le raccourci clavier Ctrl + M, pour obtenir et conserver le résultat de la mesure.
8. Effectuer à nouveau les étapes 6 et 7, deux fois. Pour chaque bande d'intérêt, nous avons donc 3 mesures du 'blanc'.
9. Entrer les valeurs dans le tableau.

Protéine d'intérêt			Nom du muscle utilisé										
Date													
Numéro du gel													
Temps d'exposition (minutes)													
Bande	Intensité bande (1)	Aire bande (1)	Intensité 'blanc' (1)	Intensité bande (2)	Aire bande (2)	Intensité 'blanc' (2)	Intensité bande (3)	Aire bande (3)	Intensité 'blanc' (3)	(Int 1-Blc 1) x Aire 1	(Int 2-Blc 2) x Aire 2	(Int 3-Blc 3) x Aire 3	Moyenne
1													
2													
3													
4													
5													
6													
7													
8													
10													

10. Calculer pour chacune des 3 mesures de chaque bande : (intensité de la bande n°x – intensité du 'blanc' n°x) x aire de la bande n°x.
11. Faire la moyenne des 3 mesures.

Dessin des couples d'amorces

Références

- NCBI – National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)
- IDT – Integrated DNA Technologies® (www.idtdna.com)

Principe

Créer un couple d'amorces valide pour la quantification de l'expression d'un gène d'intérêt.

Protocole

› *Obtenir la séquence nucléotidique du transcrit du gène (sur NCBI) :*

1. Dans le menu déroulant, sélectionner « Gene ». Dans la barre de recherche, taper le nom du gène d'intérêt, et cliquer sur « Search ».
2. Sélectionner l'espèce désirée.
3. Cliquer sur « GenBank », puis sélectionner l'ARNm désiré dans « Features – mRNA ».
4. Cliquer sur « FASTA », puis noter la séquence codante obtenue.

› *Dessiner les couples d'amorces (sur Primer-Blast) :*

1. Copier la séquence codante obtenue précédemment.
2. Dans la section « Primer Parameters », fixer les paramètres suivants : taille de l'amplicon, température d'hybridation de l'amorce (T_m).
3. Dans la section « Exon/intron selection », fixer le paramètre suivant : présence ou non d'un saut d'exon.
4. Cliquer sur « Get Primers » pour lancer la recherche.
5. Dans la section « Graphical view of primer pairs », vérifier que l'amorce se trouve à cheval sur 2 exons.
6. Dans la section « Detailed primer reports », vérifier que :
 - Les amorces aient une taille d'environ 20 paires de bases (pb).
 - La taille de l'amplicon soit comprise entre 70 et 120 (voire 150) pb.
 - La température d'hybridation de l'amorce (T_m) à la séquence codante soit le plus proche de 60°C (température optimale).
 - La différence de T_m des amorces forward et reverse n'excède pas 4°C.
 - L'amorce se termine par une base forte (G ou C) en 3'.
 - Il n'y ait pas :
 - plus de 2 bases fortes (G ou C) dans les 3 dernières bases en 3'.
 - plus de 3 bases fortes (G ou C) dans les 6 dernières bases en 3'.
 - de G en 5'.
 - Il y ait plus de C que de G dans l'amorce.
 - Le pourcentage de GC soit inférieur à 60%.
 - La self complémentarité soit inférieure à 6.
 - Le pourcentage de GC soit approximativement le même dans les amorces forward et reverse.

- › *Vérifier les repliements potentiels de la séquence des amorces (sur IDT) :*
- 1.** Dans le menu, sélectionner « SciTools » puis « OligoAnalyzer ».
 - 2.** Vérifier les repliements potentiels de la séquence des amorces.

Amorces PCR

Amorces PCR

> *Muscle* :

Gène	Séquence 5' - 3'	Référence GenBank [®]	Longueur de l'amplicon (pb)
<i>ActR11B</i> (<i>Acvr2b</i>)	Fwd : ATC AGG AGG TCG GTC AAC Rev : GAC TCT TTA GGG AGC AGG TC	NM_007397.2	89
<i>Atg5</i> (<i>Atg5</i>)	Fwd : TGA AAG AGT GTG TCC TCC TC Rev : GCC TCC ACT GAA CTT GAC TG	NM_053069.5	91
<i>Atgl</i> (<i>Pnp1a2</i>)	Fwd : TGT GCA AAC AGG GCT ACA G Rev : AAG GGT TGG GTT GGT TCA G	NM_001163689.1	72
<i>Gapdh</i> (<i>Gapdh</i>)	Fwd : ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG Rev : CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	NM_008084.2	171
<i>Hprt</i> (<i>Hprt</i>)	Fwd : CAG GCC AGA CTT TGT TGG AT Rev : TTG CGC TCA TCT TAG GCT TT	NM_013556.2	147
<i>IL-1β</i> (<i>Il1b</i>)	Fwd : TGT AAT GAA AGA CGG CAC AC Rev : TCC ACT TTG CTC TTG ACT TC	NM_008361.3	120
<i>MAFbx/Atrogin-1</i> (<i>Fbxo32</i>)	Fwd : GTT TTC AGC AGG CCA AGA AG Rev : TTG CCA GAG AAC ACG CTA TG	NM_026346.3	115
<i>MuRF1</i> (<i>Trim63</i>)	Fwd : ACC TGC TGG TGG AAA ACA TC Rev : AGG AGC AAG TAG GCA CCT CA	NM_001039048.2	147
<i>Myostatin</i> (<i>Mstn</i>)	Fwd : ACG TCC AGA GGG ATG ACA GCA G Rev : ACA TTT GGG CTT GCC ATC CGC	NM_010834.2	128
<i>Ppia</i> (<i>Ppia</i>)	Fwd : AGC ATA CAG GTC CTG GCA TC Rev : TTC ACC TTC CCA AAG ACC AC	NM_008907.1	127
<i>P0</i> (<i>Rplp0</i>)	Fwd : CTC CAA GCA GAT GCA GCA GA Rev : ATA GCC TTG CGC ATC ATG GT	NM_007475.5	87
<i>Scd1</i> (<i>Scd1</i>)	Fwd : TGG AGC CAC AGA ACT TAC AAG Rev : CCA TTC GTA CAC GTC ATT CTG	NM_009127.4	93
<i>Traf6</i> (<i>Traf6</i>)	Fwd : TGC TGA GCC ACA ATA CTC AC Rev : CCA TCC GTG TTA GCA GTT AG	NM_009424.2	73
<i>Tubulin</i> (<i>Tuba1a</i>)	Fwd : TGA GGA GGT TGG TGT GGA TTC Rev : AAA CAT CCC TGT GGA AGC AG	NM_011653.2	99
<i>Tweak</i> (<i>Tnfsf12</i>)	Fwd : GCT ACG ACC GCC AGA TTG GG Rev : GCC AGC ACA CCG TTC ACC AG	NM_011614.3	130
<i>Ulk1</i> (<i>Ulk1</i>)	Fwd : TTC CTG TCA GTC TGG CTC CT Rev : TGA ACA GAG CCG TGA CAA AG	NM_009469.3	137

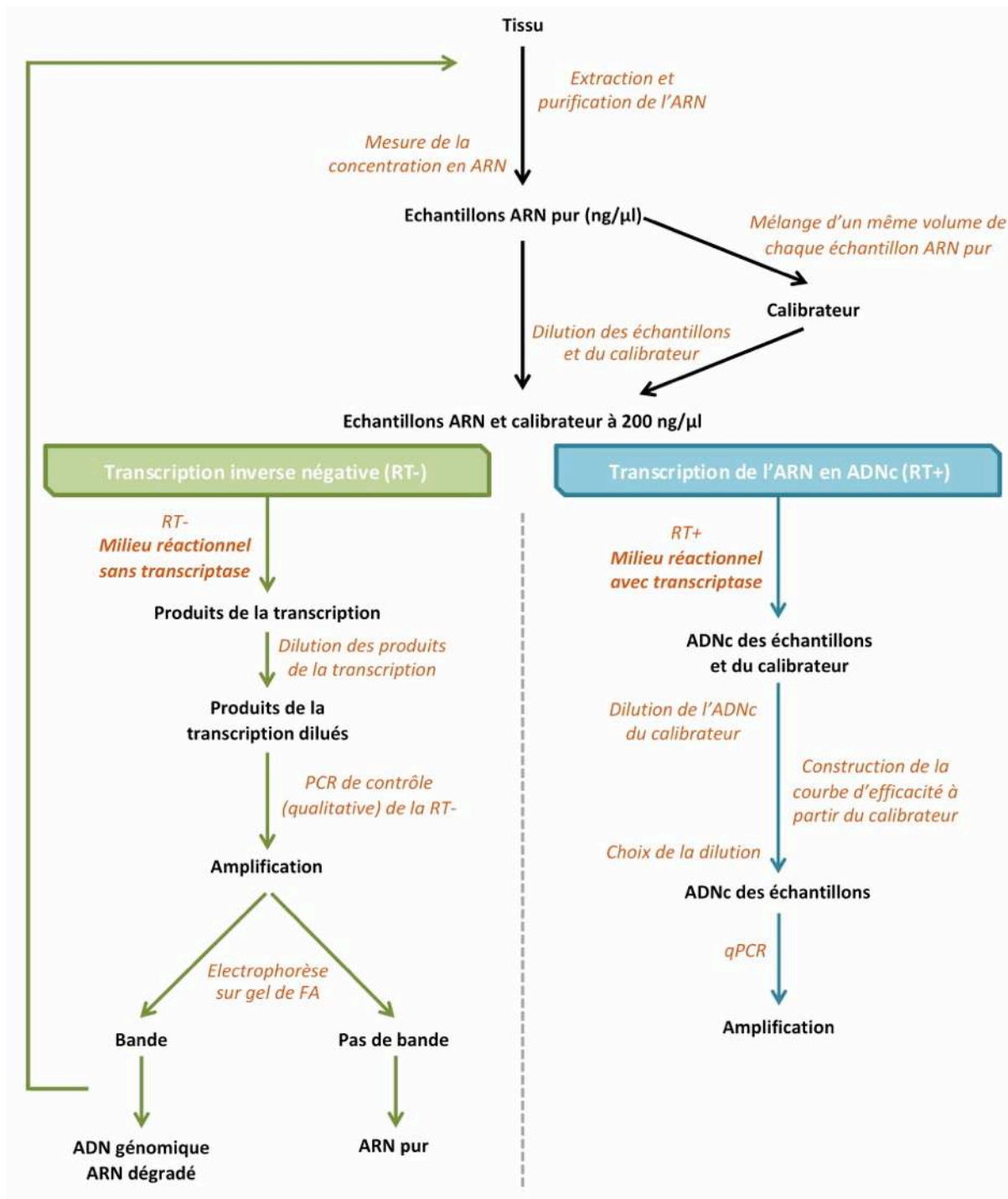
> *Tissu adipeux :*

Gène	Séquence 5' - 3'	Référence GenBank®	Longueur de l'amplicon (pb)
<i>Atgl</i> (<i>Pnpla2</i>)	Fwd : TGT GCA AAC AGG GCT ACA G Rev : AAG GGT TGG GTT GGT TCA G	NM_001163689.1	72
<i>Gpld1</i> (<i>Glpd1</i>)	Fwd : TCA GCA CAT TCA GTG GAG AC Rev : GGG CAG CCA TGA TGA TTT C	NM_008156.2	102
<i>Hprt</i> (<i>Hprt</i>)	Fwd : CAG GCC AGA CTT TGT TGG AT Rev : TTG CGC TCA TCT TAG GCT TT	NM_013556.2	147
<i>Hsl</i> (<i>Lipe</i>)	Fwd : AAT GAG ATG GCG AGG GTC AG Rev : GCC CTC ACA GCA GGA ATA GT	NM_010719.5	96
<i>Ppia</i> (<i>Ppia</i>)	Fwd : AGC ATA CAG GTC CTG GCA TC Rev : TTC ACC TTC CCA AAG ACC AC	NM_008907.1	127
<i>P0</i> (<i>Rplp0</i>)	Fwd : CTC CAA GCA GAT GCA GCA GA Rev : ATA GCC TTG CGC ATC ATG GT	NM_007475.5	87
<i>Scd1</i> (<i>Scd1</i>)	Fwd : TGG AGC CAC AGA ACT TAC AAG Rev : CCA TTC GTA CAC GTC ATT CTG	NM_009127.4	93
<i>Sptlc1</i> (<i>Sptlc1</i>)	Fwd : GCA GGA GCG TTC TGA TCT TAC Rev : ACG ATG TTG TGG GTT GGA G	NM_009269.2	144
<i>Tweak</i> (<i>Tnfsf12</i>)	Fwd : GCT ACG ACC GCC AGA TTG GG Rev : GCC AGC ACA CCG TTC ACC AG	NM_011614.3	130

> *Tumeur :*

Gène	Séquence 5' - 3'	Référence GenBank®	Longueur de l'amplicon (pb)
<i>Glut1</i> (<i>Slc2a1</i>)	Fwd : TGC CTT GGA TGT CCT ATC TG Rev : ACC AGG GCC TAC TTC AAA GA	NM_011400.3	71
<i>Hprt</i> (<i>Hprt</i>)	Fwd : CAG GCC AGA CTT TGT TGG AT Rev : TTG CGC TCA TCT TAG GCT TT	NM_013556.2	147
<i>Ppia</i> (<i>Ppia</i>)	Fwd : AGC ATA CAG GTC CTG GCA TC Rev : TTC ACC TTC CCA AAG ACC AC	NM_008907.1	127
<i>Tweak</i> (<i>Tnfsf12</i>)	Fwd : GCT ACG ACC GCC AGA TTG GG Rev : GCC AGC ACA CCG TTC ACC AG	NM_011614.3	130
<i>Vegfa</i> (<i>Vegfa</i>)	Fwd : CAC CCA CGA CAG AAG GAG AG Rev : TCT CAA TCG GAC GGC AGT AG	NM_001025250.3	87

Quantification de l'expression des gènes d'intérêt



Extraction et purification de l'ARN – Muscle

Références

- RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen – 74704)
- β -mercaptoéthanol – 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich – M7154)
- DTT – DL-Dithiothreitol (Sigma-Aldrich – D9163)
- Ethanol absolu – Ethanol (Fluka – 51976)
- RNeasy RNA Stabilization Reagent (Qiagen – 76104)
- Ultra-turrax[®] – Homogénéiseur Ultra-Turrax[®] T8 (IKA – 8002000)

Principe

Le RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit comprend la protéinase K pour éliminer l'abondance de protéines dans les échantillons tissulaires riches en fibres, de la DNase, et des colonnes permettant la purification de l'ARN.

Solutions

› A préparer :

Tampon RLT	1 ml de tampon RLT + 10 μ l de β -mercaptoéthanol
Tampon RPE	11 ml de tampon RPE + 44 ml d'éthanol absolu
Solution stock de DNase 1	550 μ l d'eau RNase-free dans la solution stock de DNase 1
Mélange DNase 1-RDD	10 μ l de solution stock de DNase 1 + 70 μ l de tampon RDD

Protocole

› Mode opératoire :

1. Ajouter 300 μ l de tampon RLT, dans un tube Eppendorf 2 ml refroidi (dans la glace).
2. Ajouter le muscle conservé dans le RNeasy (≈ 30 mg) et noter la pesée (après la tare du tube).
3. Homogénéiser le tissu, pendant 20 à 40 secondes, à l'ultra-turrax[®].
4. Ajouter 590 μ l d'eau RNase-free.
5. Ajouter 10 μ l de Protéinase K. Mélanger par pipetage en flux-reflux.
6. Incuber 10 minutes à 55°C.
7. Centrifuger à 10000 g (rcf) pendant 3 minutes à température ambiante.
8. Transférer le surnageant obtenu (≈ 900 μ l) dans un nouveau tube Eppendorf 2 ml.
9. Ajouter 450 μ l d'éthanol absolu au lysat. Mélanger par pipetage en flux-reflux.
10. Transférer 700 μ l de l'échantillon sur la colonne RNeasy (sur un tube collecteur de 2 ml).
11. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Éliminer l'éluat.
12. Transférer le reste de l'échantillon sur la même colonne RNeasy.
13. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Éliminer l'éluat.
14. Ajouter 350 μ l de tampon RW1 sur la colonne RNeasy.
15. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante, pour laver la membrane. Éliminer l'éluat.
16. Ajouter 80 μ l du mélange DNase 1-RDD directement sur la membrane de la colonne RNeasy. Incuber 15 minutes à température ambiante.
17. Ajouter 350 μ l de tampon RW1 sur la colonne RNeasy.
18. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Éliminer l'éluat.
19. Ajouter 500 μ l de tampon RPE sur la colonne RNeasy.

20. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante, pour laver la membrane. Eliminer l'éluât.
21. Ajouter 500 µl de tampon RPE sur la colonne RNeasy.
22. Centrifuger à 10000 g pendant 2 minutes à température ambiante, pour laver la membrane.
23. Changer le tube collecteur de la colonne RNeasy.
24. Centrifuger à 10000 g pendant 1 minute à température ambiante, pour éliminer toutes traces d'éthanol absolu.
25. Enlever soigneusement la colonne du tube collecteur afin d'éviter tout contact avec l'éluât. Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 1.5 ml.
26. Ajouter 40 µl d'eau RNase-free directement sur la membrane de la colonne RNeasy. Incuber 2 minutes à température ambiante, avec le couvercle de la colonne ouvert, afin de faciliter la dilution de l'ARN dans l'eau.
27. Centrifuger à 10000 g pendant 1 minute à température ambiante, pour éluer l'ARN.
28. Séparer l'éluât en 2 aliquots de 20 µl. Conserver à 4°C en attendant la mesure de la concentration en ARN le jour même.
29. Lire l'absorbance de l'échantillon au spectrophotomètre :
 - à 260 nm pour l'ARN.
 - à 280 nm pour les protéines.

Extraction et purification de l'ARN – Tissu Adipeux

Références

- RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen – 74804)
- Chloroforme – Chloroforme (Trichlorométhane) (Prolabo – 22711.290)
- Ethanol absolu – Ethanol (Fluka – 51976)
- Ultra-turrax® – Homogénéiseur Ultra-Turrax® T8 (IKA – 8002000)

Principe

Le RNeasy Lipid Tissue Mini Kit comprend le QIAzol Lysis Reagent pour lysér les tissus adipeux, et des colonnes permettant la purification de l'ARN.

Solutions

- › A préparer :
- | | |
|---------|------|
| Ethanol | 70 % |
|---------|------|

Protocole

- › Mode opératoire :

Sous la sorbonne

1. Ajouter 1 ml de QIAzol Lysis Reagent, dans un tube Eppendorf 2 ml (à fond arrondi). Tarer le tube.
2. Ajouter le tissu adipeux (≤ 100 mg) et noter la pesée.
3. Homogénéiser le tissu, à la pipette puis à l'ultra-turrax®.

Sur la paillasse

4. Incuber 5 minutes à température ambiante : étape de dissociation des complexes nucléoprotéiques. Vortexer pendant 15 secondes.
5. Ajouter 200 μ l de chloroforme. Vortexer pendant 15 secondes.
6. Incuber 2 à 3 minutes à température ambiante.
7. Centrifuger à 12000 g (rcf) pendant 15 minutes à 4°C.

Après centrifugation, obtention de 3 phases :

- La phase aqueuse supérieure incolore contenant l'ARN.
- La phase intermédiaire blanche contenant les protéines.
- La phase organique inférieure rouge contenant les débris cellulaires.

Le volume de la phase aqueuse est ≈ 600 μ l.

8. Transférer le contenu de la phase aqueuse dans un nouveau tube Eppendorf 2 ml, sans toucher la phase intermédiaire.
9. Ajouter 1 volume d'éthanol à 70% (≈ 600 μ l). Vortexer.
10. Transférer 700 μ l de l'échantillon (bien au centre) sur la colonne RNeasy (sur un tube collecteur de 2 ml).
11. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante. L'ARN se fixe sur la colonne. Eliminer l'éluat.
12. Répéter une deuxième fois les étapes **10** et **11** avec le reste de l'échantillon.

- 13.** Ajouter 700 µl de tampon RW1 sur la colonne RNeasy. Incuber 1 minute à température ambiante.
- 14.** Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante, pour laver la membrane. Eliminer l'éluât.
- 15.** Ajouter 500 µl de tampon RPE sur la colonne RNeasy.
- 16.** Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante, pour laver la membrane. Eliminer l'éluât.
- 17.** Ajouter 500 µl de tampon RPE sur la colonne RNeasy.
- 18.** Centrifuger à 10000 g pendant 2 minutes à température ambiante, pour laver la membrane. Eliminer l'éluât.
- 19.** Changer le tube collecteur de la colonne RNeasy.
- 20.** Centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute à température ambiante.
- 21.** Enlever soigneusement la colonne du tube collecteur afin d'éviter tout contact avec l'éluât. Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 1.5 ml.
- 22.** Ajouter 40 µl d'eau RNase-free directement sur la membrane de la colonne RNeasy. Incuber 10 minutes à température ambiante.
- 23.** Centrifuger à 10000 g pendant 1 minute à température ambiante, pour éluer l'ARN.
- 24.** Conserver l'aliquot à 4°C en attendant la mesure de la concentration en ARN le jour même.
- 25.** Lire l'absorbance de l'échantillon au spectrophotomètre :
 - à 260 nm pour l'ARN.
 - à 280 nm pour les protéines.

Extraction et purification de l'ARN – Tumeur

Références

- RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen – 74704)
- β -mercaptoéthanol – 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich – M7154)
- Ethanol absolu – Ethanol (Fluka – 51976)
- Seringue 1 ml (TERUMO® – BS01T)
- Aiguille de 0.5 mm de diamètre (BD Microlance™ 3 – 300600)

Principe

Le RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit comprend la protéinase K pour éliminer l'abondance de protéines dans les échantillons tissulaires riches en fibres, de la DNase, et des colonnes permettant la purification de l'ARN.

Solutions

› *A préparer :*

Tampon RLT	1 ml de tampon RLT + 10 μ l de β -mercaptoéthanol
Tampon RPE	11 ml de tampon RPE + 44 ml d'éthanol absolu
Solution stock de DNase 1	550 μ l d'eau RNase-free dans la solution stock de DNase 1
Mélange DNase 1-RDD	10 μ l de solution stock de DNase 1 + 70 μ l de tampon RDD

Protocole

› *Mode opératoire :*

1. Ajouter 300 μ l de tampon RLT, dans un tube Eppendorf 2 ml refroidi (dans la glace).
2. Ajouter la poudre de tumeur (\approx 15-20 mg) et noter la pesée (après la tare du tube).
3. Homogénéiser le tissu, par flux-reflux au moyen d'une seringue 1 ml et d'une aiguille de 0.5 mm de diamètre.
4. Ajouter 590 μ l d'eau RNase-free.
5. Ajouter 10 μ l de Protéinase K. Mélanger par pipetage en flux-reflux.
6. Incuber 10 minutes à 55°C.
7. Centrifuger à 12000 g (rcf) pendant 3 minutes à température ambiante.
8. Transférer le surnageant obtenu (\approx 900 μ l) dans un nouveau tube Eppendorf 1.5 ml.
9. Ajouter 450 μ l d'éthanol absolu au lysat. Mélanger par pipetage en flux-reflux.
10. Transférer 700 μ l de l'échantillon sur la colonne RNeasy (sur un tube collecteur de 2 ml).
11. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Eliminer l'éluât.
12. Transférer le reste de l'échantillon sur la même colonne RNeasy.
13. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Eliminer l'éluât.
14. Ajouter 350 μ l de tampon RW1 sur la colonne RNeasy.
15. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante, pour laver la membrane. Eliminer l'éluât.
16. Ajouter 80 μ l du mélange DNase 1-RDD directement sur la membrane de la colonne RNeasy. Incuber 15 minutes à température ambiante.
17. Ajouter 350 μ l de tampon RW1 sur la colonne RNeasy.
18. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante. Eliminer l'éluât.
19. Ajouter 500 μ l de tampon RPE sur la colonne RNeasy.

20. Centrifuger à 10000 g pendant 15 secondes à température ambiante, pour laver la membrane. Eliminer l'éluât.
21. Ajouter 500 µl de tampon RPE sur la colonne RNeasy.
22. Centrifuger à 10000 g pendant 2 minutes à température ambiante, pour laver la membrane et éliminer toutes traces d'éthanol absolu. Eliminer l'éluât.
23. Enlever soigneusement la colonne du tube collecteur afin d'éviter tout contact avec l'éluât. Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 2 ml.
24. Centrifuger à 10000 g pendant 1 minute à température ambiante, pour éliminer toutes traces résiduelles de tampon ou d'éluât.
25. Placer la colonne RNeasy dans un nouveau tube collecteur de 1.5 ml.
26. Ajouter 40 µl d'eau RNase-free directement sur la membrane de la colonne RNeasy. Incuber 5 minutes à température ambiante.
27. Centrifuger à 10000 g pendant 1 minute à température ambiante, pour éluer l'ARN.
28. Séparer l'éluât en 2 aliquots de 20 µl. Conserver à 4°C en attendant la mesure de la concentration en ARN le jour même.
29. Lire l'absorbance de l'échantillon au spectrophotomètre :
 - à 260 nm pour l'ARN.
 - à 280 nm pour les protéines.

Mesure de la concentration en acide ribonucléique (ARN)

Références

- Spectrophotomètre – Spectrophotometer UV-1800 (Shimadzu – UV-1800)

Principe

Le spectrophotomètre permet la mesure de la concentration en acide ribonucléique (ARN) en mesurant l'absorbance à 260 nm et la concentration en protéines en mesurant l'absorbance à 280 nm.

Protocole

› *Mode opératoire :*

1. Dans le menu, choisir le programme *Bio-Method*, puis *DNA Quantitation*.
2. Faire une correction de base pour les deux longueurs d'onde sur le compartiment de mesure vide, en sélectionnant *BaseCorr*.
3. Mettre 98 µl d' Δ H₂O autoclavée dans chaque UVette.
4. Mesurer l'absorbance de Δ H₂O autoclavée, à 260 nm (DO_{260nm}) et à 280 nm (DO_{280nm}), en sélectionnant *MeasScr*.
5. Ajouter 2 µl d'échantillon dans l'UVette (soit une dilution au 1/50^{ème}) et homogénéiser.
6. Mesurer l'absorbance de l'échantillon, à 260 nm (DO_{260nm}) et à 280 nm (DO_{280nm}), en sélectionnant *MeasScr*.
7. Déterminer Δ DO_{260nm} (= DO_{260nm} échantillon - DO_{260nm} Δ H₂O) et Δ DO_{280nm} (= DO_{280nm} échantillon - DO_{280nm} Δ H₂O) pour l'échantillon.
8. Calculer le rapport Δ DO_{260nm}/ Δ DO_{280nm}, qui doit être compris entre 1.8 et 2. Si le rapport est inférieur à 1.8, alors le contenu en protéines est trop important.
9. Calculer la concentration en ARN en sachant qu'une DO = 1 équivaut à une concentration en ARN de 40 µg/ml à une dilution au 1/50^{ème}.

Electrophorèse sur gel de formaldéhyde-agarose (FA) – ARN totaux

Références

- Bleu de bromophénol – Bromophenol Blue sodium salt (Sigma-Aldrich – B5525)
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich – EDS)
- Formaldéhyde – Formaldéhyde 36% (Prolabo – 20909.290)
- Glycérol – Glycerol 99.5+ % electrophoresis (Fisher Scientific – W0352R)
- Formamide – N,N-Diméthylformamide (Prolabo – 23446.298)
- MOPS (Sigma-Aldrich – M3183)
- Acétate de sodium – Sodium acetate (Sigma-Aldrich – S2889)
- Agarose – Agarose (Sigma-Aldrich – A6013)
- Bromure d'éthidium – Ethidium bromide solution (Sigma-Aldrich – E1510)
- GelRed – GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium – 41003)

Principe

Cette technique permet l'identification de fragments d'ARN. Leur présence est vérifiée par migration en électrophorèse de formaldéhyde-agarose 1.2% contenant du bromure d'éthidium (ou du GelRed) pouvant s'intercaler entre les bases nucléiques de l'ARN. Ainsi les molécules d'ARN sont fluorescentes lors d'un éclairage aux rayons ultraviolets.

Solutions

› *A préparer :*

Tampon 10xFA

MOPS 200 mM	20.93 g de MOPS
Acétate de sodium 50 mM	2.05 g d'acétate de sodium
EDTA 10 mM	1.86 g d'EDTA

Dissoudre avec 400 ml d'eau RNase-free. Ajuster le pH à 7.0. Compléter le volume final à 500 ml avec de l'eau RNase-free dans une éprouvette graduée.

Tampon de migration 1xFA

Tampon 10xFA	100 ml de tampon 10xFA
Formaldéhyde 36% 12.3 M	20 ml de formaldéhyde 36% (sous la hotte)
Eau RNase-free	880 ml d'eau RNase-free

Solution aqueuse de bleu de bromophénol saturée
Ajouter le bleu de bromophénol à un petit volume d'eau RNase-free, jusqu'à ce qu'il ne se dissolve plus. Centrifuger et récupérer le surnageant saturé.

Tampon de charge 5X

Bleu de bromophénol	16 µl de solution aqueuse de bleu de bromophénol saturé
EDTA 500 mM, pH = 8.0	80 µl d'EDTA
Formaldéhyde 36% 12.3 M	720 µl de formaldéhyde 36% (sous la hotte)
Glycérol 100%	2 ml de glycérol
Formamide	3084 µl de formamide
Tampon 10xFA	4 ml de tampon 10xFA
Eau RNase-free	100 µl d'eau RNase-free

Solution 1.2% FA

Pour un gel de 10 x 14 x 0.7 cm, ajouter 1.2 g d'agarose et 10 ml de tampon 10xFA. Compléter le volume final à 100 ml avec de l'eau RNase-free dans une éprouvette graduée.

Protocole

› Préparation du gel 1.2% FA :

1. Chauffer la solution 1.2% FA, pour faire fondre l'agarose.
2. Refroidir à 65°C dans un bain d'eau froide.
Sous la hotte
3. Ajouter 1.8 ml de formaldéhyde 36%.
4. Ajouter 1 µl de bromure d'éthidium ou de GelRed. Bien mélanger.
5. Mettre en place la chambre de coulage.
6. Couler le mélange dans la chambre de coulage. Placer le peigne et laisser solidifier. Ne pas faire de bulles qui pourraient perturber la migration de l'ARN.
7. Une fois le mélange solidifié, disposer le chambre de coulage et le gel dans la cuve d'électrophorèse.
8. Equilibrer le gel 1.2% FA avec le tampon 1xFA dans la cuve, pendant au moins 30 minutes, avant de procéder à l'électrophorèse. (Autre possibilité : faire une électrophorèse à vide, à 200 V pendant 10 minutes).
9. Retirer le peigne.

› Préparation, chargement et migration des échantillons d'ARN :

1. Ajouter un volume de tampon de charge 5X à 4 volumes d'échantillon d'ARN (si possible, essayer d'avoir 2 µg d'ARN dans le puits). Mélanger.
2. Incuber les échantillons d'ARN à 65°C au bloc chauffant pendant 3 à 5 minutes.
3. Refroidir les échantillons d'ARN dans la glace.
4. Charger les échantillons d'ARN dans les puits.
5. Faire migrer pendant 60 minutes à 90 V.
6. Arrêter la migration.

› Photographie du gel :

1. Placer le gel sur la table à UV, allumer la lampe à UV et prendre la photographie du gel.
2. Analyser la photographie du gel :
 - la présence de bandes indique la présence d'ADN génomique ou d'ARN dégradé.
 - l'absence de bandes indique la présence d'ARN pur.

Quantification de l'expression des gènes d'intérêt

Références

- Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec – 05-RTCK-03)
- Mastercycler[®] gradient (Eppendorf – 5331 000.010)
- HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen – 203203)
- dNTP Mix, PCR Grade (Qiagen – 201900)
- iScript[™] cDNA Synthesis (Bio-Rad – 170-8890)
- SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad – 172-5204)
- CFX96[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad – 3990)

Principe

Quantifier l'expression d'un gène d'intérêt revient à mesurer la quantité de son ARN messager présent dans un tissu donné. Au préalable, il est nécessaire de réaliser une étape de transcription inverse.

Protocole

› *Extraction et purification de l'ARN :*

1. Se référer à la fiche technique spécifique du tissu d'intérêt (muscle, tissu adipeux ou tumeur).

› *Mesure de la concentration en ARN :*

1. Se référer à la fiche technique.

› *Préparation du calibrateur pur :*

Le calibrateur est un mélange de l'ARN de tous les échantillons. Il est spécifique de chaque tissu de chaque étude. Il est utilisé pour établir la courbe d'efficacité.

1. Prélever un même volume de chaque échantillon d'ARN à étudier.
2. Transférer chaque volume prélevé dans un même tube Eppendorf 0.5 ml stérile pour constituer le calibrateur pur.

› *Dilution des échantillons et du calibrateur :*

1. Avec de l'eau RNase-free ou de l' Δ H₂O autoclavée, ramener tous les échantillons d'ARN à une concentration de 200 ng d'ARN/ μ l.

› *Transcription inverse négative (RT-) – vérification de la pureté de l'ARN :*

1. Préparer les tubes selon le tableau suivant pour chaque échantillon d'ARN, y compris le calibrateur :

	RT-
Tampon 10x, µl	2
MgCl ₂ 25 mM, µl	4
dNTP Mix 2.5 mM, µl	4
Random nonamers 50 µM ou Oligo d(T)15 50 µM, µl	1
RNase Inhibitor 20 U/µl, µl	0.4
EuroScript RT 50 U/µl, µl	0
Eau RNase-free, µl	6.6
Volume échantillon ARN ou calibrateur, µl	2
Volume total, µl	20
Concentration en ARN de chaque échantillon, ng/µl	200
Quantité d'ARN de chaque échantillon, ng dans un volume final de 20 µl	400

Le milieu réactionnel contient tous les composants du Reverse Transcriptase Core Kit excepté l'enzyme Reverse Transcriptase (EuroScript RT). Elle est remplacée par de l'eau RNase-free.

2. Préparer un tube pour l'eau RNase-free, selon le tableau ci-dessus, en remplaçant l'échantillon d'ARN par de l'eau RNase-free.
3. Utiliser le Mastercycler[®] gradient pour réaliser la RT-. Programmer le selon les paramètres suivant :
 - Activation de l'enzyme EuroScript RT : 10 minutes à 25°C.
 - Elongation : 30 minutes à 48°C.
 - Inactivation de l'enzyme EuroScript RT : 5 minutes à 95°C.
 - Maintien et conservation des échantillons dans le Mastercycler[®] gradient : à 4°C, puis à -20°C.

Au terme de la RT-, aucun ADN complémentaire (ADNc) ne doit être produit. Dans le cas inverse, l'échantillon d'ARN de départ n'était pas pur.

› PCR de contrôle (qualitative) de la RT- :

1. Préparer les tubes selon le tableau suivant :

	RT-	Eau	Concentration / tube
Tampon PCR 10x, µl	2	2	1
MgCl ₂ 25 mM, µl	1.92	1.92	2.40 mM
Solution Q 5x, µl	4	4	1
dNTP Mix, PCR Grade 10 mM, µl	0.96	0.96	0.48 mM
Oligo right 10 µM, µl	0.4	0.4	0.40 µM
Oligo left 10 µM, µl	0,4	0,4	0.40 µM
HotStarTaq DNA Polymerase 5U/µl	0.2	0.2	0.05 U/µL
Eau milliQ, µl	7.99	7.99	
Volume de produit de RT (dilué au 1/50 ^{ème}), µl	2	2	
Volume total, µl	20	20	

Le kit HotStarTaq DNA Polymerase contient le tampon PCR 10x, la solution Q 5x et le MgCl₂, ainsi que la HotStarTaq DNA Polymerase.

Les amorces (oligo right et oligo left) sont celles du gène de référence utilisé.

Le volume total ainsi que les concentrations en amorces sont les mêmes que celles utilisées dans la qPCR.

2. Utiliser le Mastercycler[®] gradient pour réaliser une PCR qualitative. Programmer le selon les paramètres suivant :

- Activation de la HotStarTaq DNA Polymerase : 15 minutes à 95°C.
- 45 cycles de '5 secondes à 95°C (dénaturation), puis 20 secondes à 60°C (appariement/hybridation), puis 30 secondes à 72°C (élongation)'
- Elongation finale : 10 minutes à 72°C.
- Maintien et conservation des échantillons dans le Mastercycler[®] gradient : à 4°C.

› Electrophorèse sur gel de formaldéhyde-agarose (FA) des ARN totaux :

1. Se référer à la fiche technique.

› *Transcription de l'ARN en ADNc (RT+)* :

C'est la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN à l'aide d'une polymérase ARN dépendante (iScript™ Reverse Transcriptase).

1. Préparer les tubes selon le tableau suivant pour chaque échantillon d'ARN, y compris le calibrateur (pour ce dernier, prévoir plusieurs tubes) :

	<i>RT+</i>
Tampon 5x, µl	4
iScript™ Reverse Transcriptase, µl	1
Eau RNase-free, µl	13
Volume échantillon ARN, µl	2
Volume total, µl	20
Concentration en ARN de chaque échantillon, ng/µl	200
Quantité d'ARN de chaque échantillon, ng dans un volume final de 20 µl	400

2. Préparer un tube pour l'eau RNase-free, selon le tableau ci-dessus, en remplaçant l'échantillon d'ARN par l'eau RNase-free.
3. Utiliser le Mastercycler® gradient pour réaliser la RT+. Programmer le selon les paramètres suivant :
 - Activation de l'enzyme iScript™ Reverse Transcriptase : 5 minutes à 25°C.
 - Elongation : 30 minutes à 42°C.
 - Inactivation de l'enzyme iScript™ Reverse Transcriptase: 5 minutes à 85°C.
 - Maintien et conservation des échantillons dans le Mastercycler® gradient : à 4°C, puis à -20°C.

› *qPCR (quantitative) – réplification et quantification de l'ADNc* :

- *Courbe d'efficacité du gène d'intérêt et/ou du gène de référence*

Préparer des dilutions en cascade de l'ADNc pur du calibrateur avec de l'eau RNase-free ou de l' $\Delta\text{H}_2\text{O}$ autoclavée (par exemple, de 1/5^{ème} à 1/320^{ème}).

1. Préparer les tubes selon le tableau suivant :

<i>ADNc – Dilution du calibrateur</i>	<i>1/5</i>	<i>1/320</i>	<i>Eau</i>	<i>Concentration / tube</i>
Nombre de répétitions	3	3	3	
SsoFast™ EvaGreen® Supermix 2x, µl	10	10	10	
Oligo forward 10 µM, µl	0.8	0.8	0.8	0.40 µM
Oligo reverse 10 µM, µl	0.8	0.8	0.8	0.40 µM
Eau milliQ, µl	6.4	6.4	8.4	
Volume de calibrateur, µl	2	2	0	
Volume total, µl	20	20	20	

Chaque gène de référence et chaque gène d'intérêt fait l'objet d'une courbe d'efficacité en utilisant les 7 dilutions du calibrateur.

2. Utiliser le CFX96™ Real-Time PCR Detection System pour réaliser la courbe d'efficacité. Programmer le selon les paramètres suivant :
 - Activation de l'enzyme contenue dans le SsoFast™ EvaGreen® Supermix 2x : de 30 secondes à 2 minutes à 95°C.
 - 45 cycles de '5 secondes à 95°C (dénaturation), puis 5 secondes à 60°C (appariement/hybridation), puis 5 secondes à 72°C (élongation), puis acquisition'
 - Courbe de fusion de 65°C à 95°C (avec un pas de 0.5°C pendant 5 secondes), puis acquisition.

La température d'hybridation varie avec le T_m (melting temperature) des amorces. Dans certains cas le temps d'élongation peut varier. Cette étape peut éventuellement être supprimée.

La température d'hybridation et/ou la concentration en amorces sont ajustées pour les essais suivants si l'efficacité n'est pas satisfaisante.

Valeurs recevables :

Efficacité : de 95 à 105%. La courbe d'efficacité reflète la duplication de l'ADN à chaque cycle.

Le r^2 de la courbe doit être le plus proche possible de 1, et la pente de 3.33 à 3.60.

Lorsque les courbes d'efficacité sont satisfaisantes, réaliser la qPCR des échantillons, du calibrateur et de l'eau.

○ *qPCR sur les échantillons*

Lorsque les courbes d'efficacité sont satisfaisantes, réaliser la qPCR des échantillons, suivant la même grille, avec les mêmes paramètres de concentrations en amorces, et le même programme sur le CFX96™ Real-Time PCR Detection System.

Afin de conditionner les échantillons d'ADNc, se référer à la courbe d'efficacité obtenue précédemment, afin de choisir la dilution la plus judicieuse donnant un cycle de sortie (C_q) autour de 30.

Pour chaque échantillon réaliser les mesures en triplicata.

Utiliser la dernière ligne de la plaque 96 puits pour les contrôles internes : un point du calibrateur avec le gène d'intérêt de la plaque (triplicata) et un puits pour l'eau.

Dosage des acides aminés libres

Références

- Acide sulfosalicylique (SSA) – 5-Sulfosalicylic acid dehydrate (Sigma-Aldrich – S2130)
- Thiodiglycol (TDG) – 2,2'-Thiodiethanol (Sigma-Aldrich – 88559)
- Norleucine (NL) – DL-Norleucine (Sigma-Aldrich – N1398)
- Acide D-Glucosaminique (D-Glu) – D-Glucosaminic acid (Sigma-Aldrich – G0259)
- Tampon de pose pH 2.2 (0.1 M) Li⁺ (Bioritech SA – 14451)
- Ethanol absolu (Riedel-de Haën – 32221)
- Acide chlorhydrique (HCl) – Hydrochloric acid (Sigma-Aldrich – 320331)
- Evaporateur concentrateur "SpeedVac" – SpeedVac Concentrator (Savant – SC100)

Principe

Cette méthode permet d'obtenir les acides aminés libres du plasma en vue de leur dosage quantitatif à l'analyseur d'acides aminés.

Tout d'abord, il faut réaliser une déprotéinisation et une solubilisation des acides aminés libres (AAL) du plasma par l'acide sulfosalicylique (SSA) en présence de thiodiglycol (TDG). La présence de TDG (antioxydant) dans la solution de SSA va protéger les acides aminés libres soufrés (méthionine, cystéine) de l'oxydation. Un standard interne, la norleucine (NL) est ajouté au plasma et permet le calcul des concentrations. Après centrifugation, les protéines se retrouvent dans le culot et les AAL dans le surnageant ou l'extrait SSA. Le surnageant SSA recueilli est ensuite dilué avec du tampon de pose compatible avec l'analyse des AAL à l'analyseur.

Solutions

› A préparer :

HCl	0.1N
Norleucine	1 mM
D-Glu	12.5 mM
Tampon de pose/D-Glu	125 µM

Protocole

› Préparation des cupules SSA/TDG :

1. Combiner les différents réactifs :

SSA	2.33 g
TDG	1.02 ml

2. Compléter à volume final de 10 ml avec l'éthanol absolu dans une éprouvette graduée, pour obtenir la solution SSA/TDG.

3. Distribuer 50 µl de la solution de SSA/TDG dans des cupules Eppendorf 1.5 ml.

4. Evaporer l'éthanol absolu des cupules au "SpeedVac" à 40°C pendant 2 heures.

5. Identifier les cupules et peser.

› *Mode opératoire :*

1. Dans chaque cupule SSA/TDG, ajouter 50 µl de norleucine 1 mM. Peser
2. Dans la cupule SSA/TDG, ajouter 250 µl de plasma. Peser.
3. Agiter les cupules à l'aide du vortex pendant 1 minute, de manière à homogénéiser le fond de la cupule SSA/TDG avec le plasma et la norleucine.
4. Incuber les cupules dans la glace pendant 15 minutes.
5. Centrifuger les cupules à 10000 g pendant 15 minutes à 4°C.
6. Reprendre 200 µl de surnageant dans de nouvelles cupules.
7. Ajouter (au distributeur) 100 µl de tampon de pose/D-Glu (soit 2/3 de surnageant + 1/3 de tampon de pose/D-Glu). Vortexer.
8. Passer les échantillons plasmatiques à l'analyseur et quantifier les concentrations en acides aminés libres.

Dosage des céramides musculaires

Références

- Céramides C16:0 D31 – 16:0 D31 Ceramide N-palmitoyl(d31)-D-*erythro*-sphingosine (Avanti Polar Lipids – 868516P)
- Chloroforme – Chloroform (Sigma-Aldrich – C2432)
- Méthanol (Prolabo – 20864.320)
- Acide chlorhydrique (HCl) – Hydrochloric acid (Sigma-Aldrich – 320331)
- Tubes à billes de céramique pour broyage Precellys® 24 (Bertin Technologies – 03119.200.RD000)
- Tubes en verre de 11.5 ml fermés par des bouchons phénoliques avec joints en téflon (Corning – 99449-16)
- DPBS stérile – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (PAA – H15-002)
- Spectromètre de masse en tandem API 3200™ Triple Quadrupole LC-MS/MS (Sciex Applied Biosystems)
- Automate Agilent 1200 Series (Agilent Technologies)

Principe

Cette méthode permet d'extraire la fraction lipidique des tissus musculaires en vue du dosage des céramides d'intérêt par spectrométrie de masse en tandem.

Solutions

› *A préparer :*

Solution standard de céramides C16:0 D31	8 µM
Chloroforme/méthanol (1/2 v/v)-HCl 0.1N	

Protocole

› *Extraction lipidique :*

1. Peser environ 20 mg de poudre de muscle.
2. Dans un tube à billes de céramique, déposer 1 ml de chloroforme/méthanol (1/2 v/v)-HCl 0.1N.
3. Déposer l'échantillon de muscle à l'intérieur du tube à billes de céramique.
4. Homogénéiser le tissu à l'aide d'un broyeur de tissus à billes de céramique Precellys® 24 (programme : 5500-2x20s) puis transférer le lysat dans un tube à hémolyse.
5. Ajouter 1 ml de chloroforme/méthanol (1/2 v/v)-HCl 0.1N dans le tube à billes de céramique pour le rincer et le verser dans le tube à hémolyse, pour obtenir 2 ml.
Déposer 1 ml dans un tube en verre spécial solvant de 10 ml.
Conserver 1 ml dans un tube à hémolyse à -20°C.
6. Ajouter 100 µl de solution standard de céramides C16:0 D31 à 8 µM à chaque 1 ml de lysat. Préparer un tube contrôle avec la solution standard de céramides C16:0 D31 seul.

› *Séparation de phases :*

1. Vortexer 30 secondes chaque tube en verre et laisser reposer 30 minutes à température ambiante.
2. Ajouter 500 µl de DPBS stérile et 500 µl de chloroforme (volumes à adapter avec le volume du solvant d'extraction). On obtient 2 phases distinctes.
3. Vortexer 1 minute.
4. Centrifuger 5 min à 2500 rpm (750 g) pour séparer les 2 phases.
5. Prélever la phase organique inférieure contenant les lipides à l'aide d'une pipette pasteur.
6. Transférer dans un tube en verre propre et évaporer à sec sous azote à température ambiante.
7. Remplir le tube d'azote et le fermer.
8. Conserver l'extrait lipidique à -20°C, pour empêcher les phénomènes d'oxydation.

› *Quantification des céramides par spectrométrie de masse en tandem :*

1. Reprendre chaque extrait sec dans 1 ml de phase mobile chloroforme/méthanol (2/1 v/v). La concentration finale en standard est donc : céramides C16:0 D31 à 800 nM soit 800 pmoles.
2. Injecter chaque échantillon à une vitesse de 200 µl/min pour un temps d'analyse de 3 minutes.

Paramètres du spectromètre de masse en tandem

Le spectromètre de masse en tandem est équipé d'une source d'ionisation Turbolon Spray de type electrospray chauffée à 500°C et couplé à un analyseur quadripolaire. Il est également couplé à un automate pour l'injection des solvants et des échantillons. L'acquisition des résultats se fait à l'aide du logiciel Analyst version 1.5 (Sciex Applied Biosystems).

Les mesures des taux de céramides sont réalisées en mode d'ionisation positif. Les paramètres spécifiques utilisés sont :

- voltage du spray d'ions : +5500 V
- potentiel d'entrée : -10 V
- potentiel de désintégration : 100 V
- énergie de collision : 40 eV

Le dosage des céramides est réalisé en mode MRM (multiple reaction monitoring) sur les échantillons dilués au 1/10. Les céramides sont analysés avec un mode d'injection de 5 µl avec une vitesse d'injection de 200 µl/min.

La concentration de chacune des espèces est calculée en fonction du rapport du signal (aire du pic) au standard interne correspondant. La concentration totale en céramides est la somme des concentrations de toutes les espèces de céramides.

Dosage des phosphoprotéines, des protéines totales et des cytokines en Luminex

Références

- Bio-Plex Pro™ Phosphoprotein Detection (Bio-Rad)
- Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Standard (Bio-Rad – M60-009RDPD)
- Luminex – Bio-Plex™ 200 System instrument (Bio-Rad)

Principe

Ce système multi-analytique allie les compétences de la technique de cytométrie en flux à deux lasers et une utilisation de microsphères ou microbilles en polystyrène. La puissance de ce système réside dans le fait qu'il est possible d'analyser simultanément jusqu'à cent microbilles différentes par puits. Les applications sont nombreuses. Les deux grands domaines concernés sont la génétique grâce à la réaction d'hybridation moléculaire, et l'immunologie, grâce à la réaction antigène-anticorps. C'est cette dernière réaction que nous utiliserons pour la révélation de protéines d'intérêt.

› *Les microsphères :*

Il s'agit de billes de polystyrène de 5.6 µm de diamètre marquées par incubation dans des bains renfermant un mélange de deux solutions fluorescentes. Les deux fluorochromes sont incorporés à l'intérieur des billes. Pour chaque bille, il existe un ratio précis de la quantité des deux fluorochromes incorporés. Les billes sont excitées par un laser rouge et vont réémettre une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). Chaque bille réémettant d'une façon différente, elle sera identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge. Chaque bille possède donc son propre code couleur d'identification, et ainsi plusieurs billes différentes peuvent être mélangées dans un même puits.

› *Le cytomètre :*

Il comporte un laser rouge à diode (633 nm) qui excite les fluorochromes incorporés aux billes de polystyrène, permettant ainsi l'identification précise de la microsphère et ainsi de la protéine d'intérêt ; un laser vert (532 nm) qui excite le fluorochrome – la phycoérythrine (PE ; 575 nm) – qui est couplé à une molécule reporter – la biotine –, permettant dans ce cas de quantifier la protéine d'intérêt.

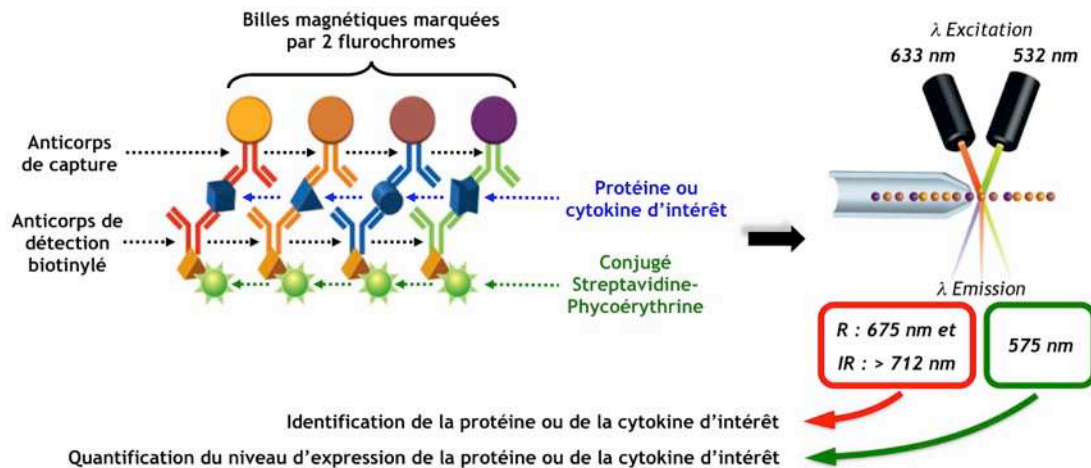


Figure 48 : Illustration de la détection de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps de capture (couplé à des billes magnétiques marquées par deux fluorochromes) et d'un anticorps de détection biotinylé (couplé à un conjugué streptavidine-phycoérythrine).

Solutions

> Dilution :

Echantillons protéiques (protéines totales)	1/10
Echantillons protéiques (phosphoprotéines)	1/5

Protocole de dosage des phosphoprotéines et des protéines totales

A l'aide du Bio-Plex Pro™ Phosphoprotein Detection :

1. Distribuer 100 µl de Wash buffer dans chaque puits.
2. Aspirer le Wash buffer avec la pompe à vide (programme *RUN 1 :PREVAC*) et éponger la plaque avec un essuie-tout.
3. Charger les billes (50 µl par puits).
4. Aspirer avec la pompe à vide. Laver la plaque avec le Wash buffer et aspirer avec la pompe à vide (programme *RUN 2 :VAC_2*). Eponger la plaque avec un essuie-tout.
5. Charger les échantillons protéiques et contrôles (50 µl par puits).
6. Agiter 30 secondes à 1100 rpm, puis 2 heures à 300 rpm à l'abri de la lumière.
7. Aspirer avec la pompe à vide. Laver la plaque avec le Wash buffer et aspirer avec la pompe à vide (programme *RUN 3 :VAC_3*). Eponger la plaque avec un essuie-tout.
8. Charger l'anticorps biotinylé (25 µl par puits).
9. Agiter 30 secondes à 1100 rpm, puis 30 minutes à 300 rpm à l'abri de la lumière.
10. Aspirer avec la pompe à vide. Laver la plaque avec le Wash buffer et aspirer avec la pompe à vide (programme *RUN 3 :VAC_3*). Eponger la plaque avec un essuie-tout.
11. Charger la SA-PE (50 µl par puits).
12. Agiter 30 secondes à 1100 rpm, puis 10 minutes à 300 rpm à l'abri de la lumière.
13. Aspirer avec la pompe à vide. Laver la plaque avec le Resuspension buffer et aspirer avec la pompe à vide (programme *RUN 3 :VAC_3*). Eponger la plaque avec un essuie-tout.
14. Distribuer 125 µl de Resuspension buffer dans chaque puits.
15. Agiter 30 secondes à 1100 rpm, puis 30 secondes à 300 rpm.
16. Lire au Luminex.

Solutions

› Dilution :

Sérum	1/4 dans le Sample diluent
Gamme standard	1/4 dans le Standard diluent
Billes magnétiques	1/10 dans l'Assay buffer
Anticorps biotinylé	1/10
Streptavidine-Phycoérythrine (SA-PE)	1/100

Protocole de dosage des cytokines dans le sérum

A l'aide du Bio-Plex Pro™ Mouse Cytokine Standard :

1. Distribuer les billes sur la plaque 96 puits (50 µl par puits).
2. Laver 2 fois la plaque avec le Wash buffer.
3. Charger le blanc, la gamme standard et les sérums (50 µl par puits).
4. Agiter 1 minute à 1100 rpm, puis 30 minutes à 300 rpm à l'abri de la lumière.
5. Laver 3 fois la plaque avec le Wash buffer.
6. Charger l'anticorps biotinylé (25 µl par puits).
7. Agiter 1 minute à 1100 rpm, puis 30 minutes à 300 rpm à l'abri de la lumière.
8. Laver 3 fois la plaque avec le Wash buffer.
9. Charger la SA-PE (50 µl par puits).
10. Agiter 1 minute à 1100 rpm, puis 30 minutes à 300 rpm à l'abri de la lumière.
11. Laver 3 fois la plaque avec le Wash buffer.
12. Ajouter 125 µl par puits d'Assay buffer.
13. Agiter 1 minute à 1100 rpm à l'abri de la lumière.
14. Lire au Luminex.

Activité enzymatique de la caspase-3

Références

- HEPES – 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ylethanesulphonic acid (Sigma-Aldrich – H0891)
- EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich – EDS)
- AMC – 7 amino-4-methylcoumarin (Sigma-Aldrich – A9891)
- DMSO – Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich – D5879)
- Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Bachem – I1660)
- Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO (Bachem – H2496)

Principe

L'initiation de tous les événements intracellulaires semble être caractérisée par l'activation de protéases spécifiques appelées caspases. L'activation de la caspase-3 semble jouer un rôle clé dans le processus apoptotique. La caspase-3 active est responsable du clivage, et donc la rupture, de plusieurs composants cellulaires associées à la réparation et la régulation de l'ADN.

Afin de mesurer l'activité de la protéine caspase-3, le peptide Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC est utilisé comme substrat fluorogénique. La reconnaissance du substrat par le site actif de l'enzyme détermine la coupure de la liaison entre l'AMC et le tétrapeptide. La fluorescence de la molécule d'AMC, qui est alors libérée, peut être suivie au fluorimètre à 460 nm. La spécificité de la réaction peut être vérifiée à l'aide d'un inhibiteur spécifique de la caspase-3, le peptide Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO.



Solutions

› A préparer :

AMC	4 mM dans du DMSO
Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC	10 mM dans du DMSO

Protocole

› Préparation du milieu réactionnel (MR) (HEPES 10 mM / EDTA 2 mM) :

1. Peser :

HEPES	238.4 mg
EDTA	58.4 mg

2. Ajuster le pH à 7.4 et compléter à volume final de 100 ml avec $\Delta\text{H}_2\text{O}$ dans une éprouvette graduée.

› *Courbe étalon :*

Faire une dilution de l'AMC 4 mM au 1/400 pour avoir une solution finale d'AMC à 10 μ M.

pmoles AMC	0	20	40	60	80	100
AMC 10 μ M, μ l	0	2	4	6	8	10
MR, μ l	1000	998	996	994	992	990

Faire le point haut de l'étalonnage sur le milieu contenant 100 pmoles d'AMC.

Faire le point bas de l'étalonnage sur le milieu sans AMC.

Mesurer au fluorimètre avec : $\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{émission}} = 460 \text{ nm}$

› *Mode opératoire :*

1. Mettre 980 μ l de MR.
2. Ajouter 10 μ l d'extrait protéique (pur ou à la dilution appropriée).
3. Déclencher la réaction en ajoutant 10 μ l de Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC 10 mM.
4. Suivre la réaction au fluorimètre ($\lambda_{\text{excitation}} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 460 \text{ nm}$) pendant plusieurs minutes (entre 10 et 20 minutes).

Introduction à la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet de réaliser, sur une population cellulaire en suspension, des mesures simultanées, cellule à cellule, de la taille, de la complexité (deux paramètres de morphologie) et des réémissions de fluorescence (jusqu'à six). De plus, le paramètre temps est disponible pour les études cinétiques. Donc huit paramètres et le temps sont quantifiables simultanément.

Les expérimentations ont été réalisées au Centre Commun de Cytométrie en Flux de la Faculté de Médecine de Saint-Etienne. Le cytomètre est un analyseur-trieur : FACS Digital Vantage (BD Biosciences) (Figure 49).



Figure 49 : Photographie d'un FACS Digital Vantage.

Il est équipé de deux lasers : un laser argon (Coherent – Enterprise) et un laser hélium/néon (Spectra Physics) émettant trois raies d'excitation, respectivement : 488 nm (bleu) plus 351 nm (UV), et 633 nm (rouge). De larges applications, sur cellules fixées ou sur cellules vivantes, sont possibles en fonction des fluorochromes utilisés. Pour supprimer tout chevauchement des spectres de longueurs d'onde réémises, il faut corriger les superpositions d'émission de fluorescence en réalisant des compensations électroniques.

La suspension cellulaire contenue dans le tube est mise sous pression (Figure 50). La veine liquide contenant les cellules à analyser est entraînée à l'intérieur de la gaine liquide circulant en permanence. Ainsi, on obtient une focalisation hydrodynamique qui permet un alignement des cellules dans le flux. Elles se présentent donc les unes à la suite des autres au niveau des focales des faisceaux d'excitation laser.

L'optique d'excitation est composée d'un ou de plusieurs lasers (ici deux), de lentilles et de prismes pour focaliser les faisceaux laser d'excitation. Quand la cellule passe devant le laser, les fluorochromes excitables absorbent l'énergie. Ils libèrent ensuite l'énergie absorbée par une émission de photons d'une longueur d'onde supérieure à la longueur d'onde absorbée au départ. La différence entre la longueur d'absorption et la longueur d'émission est appelée le déplacement de Stokes. De plus, la lumière du laser argon (488 nm) diffusée à petit angle et à 90°, nous permet par les phénomènes de réfraction et de diffraction de recueillir respectivement le signal proportionnel à la taille de la cellule (« FSC ou forward scatter ») et le signal correspondant à la complexité de la cellule (« SSC ou side scatter »).

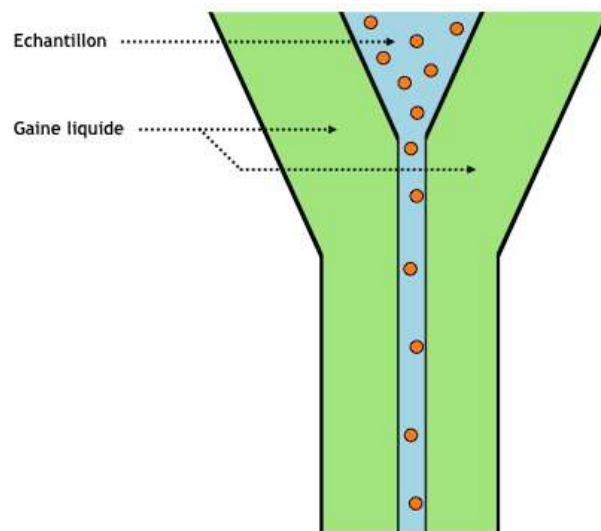


Figure 50 : Représentation du flux dynamique des cellules à analyser dans la fluidique.

Le liquide de gaine et la veine liquide, contenant les cellules, sont tous deux mis sous pression. En modulant la pression de l'échantillon, il est possible de faire varier la vitesse de défilement des cellules au niveau des lasers. La différence de vitesse entre les deux fluides permet aux cellules de se présenter devant la focale du ou des lasers les unes à la suite des autres. Par exemple, lors de l'acquisition d'un cycle cellulaire, les cellules à analyser doivent se présenter à une vitesse de défilement lent devant l'excitation laser.

L'optique de réception est composée de lentilles qui focalisent les photons recueillis et d'un ensemble de miroirs et de filtres qui acheminent les différentes longueurs d'onde vers leurs détecteurs spécifiques (diode et photomultiplicateurs) (Figure 51, ci-après). Il existe des filtres optiques « passe-haut » (pour laisser passer les longueurs d'onde supérieures à la longueur d'onde choisie), et des miroirs dichroïques « passe-bas » (pour laisser passer les longueurs d'onde inférieures à la longueur d'onde choisie) et « passe-

bande » (pour ne laisser passer qu'une longueur d'onde choisie).

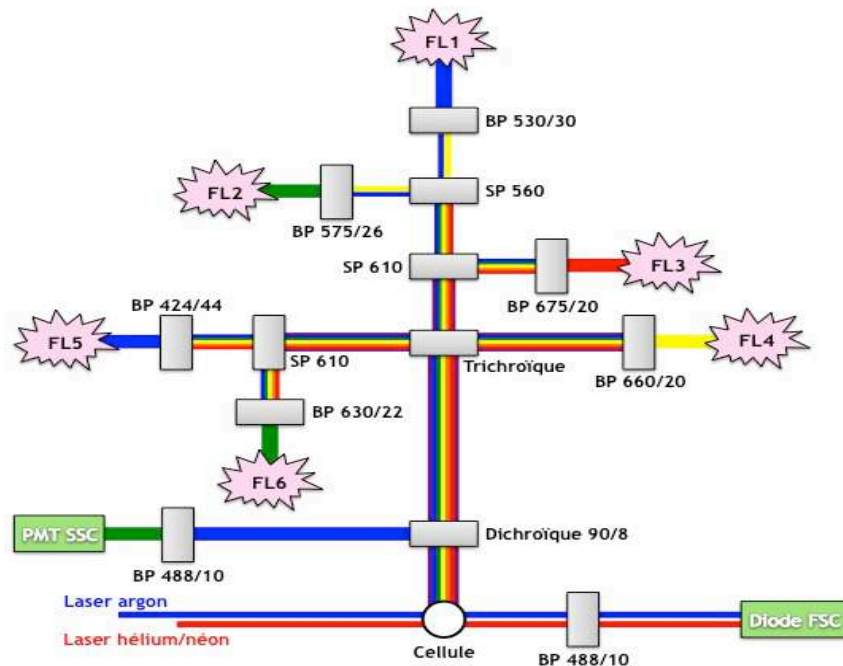


Figure 51 : Exemple de banc optique.

Banc optique utilisé pour les analyses en cytométrie en flux. Les deux lasers (argon et hélium/néon), les deux prismes, la diode FSC « forward scatter », le PMT SSC (« side scatter »), les six photomultiplicateurs des fluorescences 1 à 6 (FL1-6), ainsi que les filtres SP (« passe-bas ») et BP (« passe-bande ») sont représentés.

Les signaux lumineux sont convertis en signaux électriques puis numériques, analysables par ordinateur. Les logiciels utilisés pour l'acquisition, l'analyse et le tri sont : BD CellQuest Pro 4.0.2 et BD FACS DiVa 5.0.3. ; et pour l'analyse des cycles cellulaires : ModFit LT 3.1. L'intensité relative de chaque fluorescence mesurée dans son canal spécifique permet de recueillir une information quantitative. Les impulsions électriques générées par la réémission de la fluorescence vont être converties en valeur de canal et réparties en fonction de leur intensité de 0 à 1024 canaux (analogique) ou de 0 à 262 144 canaux (digitale).

Immunomarquage indirect de Ki-67 et marquage à l'Hoechst 33342 sur cellules LLC

Références

- Cellules LLC – Lewis lung carcinoma cells (ATCC® – CRL-1642™)
- DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ATCC® – 30-2002)
- FBS – Fetal Bovine Serum "Gold" (PAA – A15-151)
- P/S – Pénicilline/Streptomycine (PAA – P11-010)
- DPBS avec Ca²⁺/Mg²⁺ – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x with Ca & Mg (PAA – H15-001)
- Hoechst 33342 16.23 mM (Invitrogen – H3570)
- Anti-Ki-67 Polyclonal Antibody (Millipore – AB9260) ⇨ Anticorps I^{re}
- Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/FITC (Dako – F0054) ⇨ Anticorps II^{re}
- Ethanol absolu (Riedel-de Haën – 34935)

Principe

L'immunomarquage indirect permet de mettre en évidence des protéines membranaires intra ou extracellulaires, des protéines intracytoplasmiques ou encore nucléaires. L'antigène Ki-67 fait partie des marqueurs de prolifération. Il est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives, en phases G1, S, G2 et M, et absent chez les cellules quiescentes (G0). Il est utilisé ici comme un marqueur du cycle cellulaire. Le Hoechst 33342 est un colorant vital de l'ADN. Il est utilisé ici pour permettre de détecter le contenu en ADN des cellules vivantes.

Solutions

- › *A préparer :*

FBS 5%	5 ml dans 100 ml de DPBS avec Ca ²⁺ /Mg ²⁺
--------	--
- › *Dilution :*

Anticorps primaire (Ac I ^{re})	5 µl pur
Anticorps secondaire (Ac II ^{re})	10 µl pur

Paramètres enregistrés

Paramètres morphologiques : FSC, SSC

FITC ⇨ λ_{exc} : 488 nm ; λ_{ém} : BP 530/30 ; Photomultiplicateur : FL1-H

Hoechst 33342 ⇨ λ_{exc} : 351 nm ; λ_{ém} : BP 424/44 ; Photomultiplicateurs : FL5-A et FL5-W

Protocole

1. Trypsiner les cellules LLC.
2. Centrifuger les cellules LLC à 120 g (850 rpm) pendant 7 minutes.
3. Reprendre les cellules LLC dans du milieu de culture (DMEM + 10% FBS + 1% P/S).
4. Faire une numération cellulaire (2 x 2 comptages).
5. Répartir les cellules dans une première série de tubes de cytométrie : 0.5 ml de solution cellulaire à une concentration de 1 000 000 cellules/ml.
6. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 3 minutes.

7. Eliminer le surnageant.
8. Préparer une seconde série de tubes de cytométrie et y introduire 2 ml d'éthanol absolu très froid.
9. Ajouter 1 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dans les tubes contenant le culot cellulaire. Resuspendre les cellules et introduire ce volume (1 ml) dans les tubes contenant l'éthanol absolu en faisant glisser les cellules doucement contre la paroi du tube. (⇒ éthanol 70%)
10. Incuber 60 minutes dans la glace.
11. Ajouter 2 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
12. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 3 minutes.
13. Eliminer le surnageant.
14. Ajouter 2 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
15. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 3 minutes.
16. Eliminer le surnageant.
17. Ajouter 2 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - FBS 5%.
18. Incuber 30 minutes, à l'abri de la lumière, à température ambiante.
19. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 3 minutes.
20. Eliminer le surnageant.
21. Ajouter l'anticorps I^e.
22. Resuspendre les cellules et remuer doucement (3 flushes aller/retour (3 secondes pour l'aller et 3 secondes pour le retour)).
23. Incuber 120 minutes, à l'abri de la lumière, dans la glace.
24. Ajouter 2 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - FBS 5%.
25. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 3 minutes.
26. Eliminer le surnageant.
27. Ajouter l'anticorps II^e couplé au fluorochrome « isothiocyanate de fluorescéine » (FITC).
28. Resuspendre les cellules et remuer doucement (3 flushes aller/retour (3 secondes pour l'aller et 3 secondes pour le retour)).
29. Incuber 60 minutes, à l'abri de la lumière, dans la glace.
30. Ajouter 2 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - FBS 5%.
31. Centrifuger à 120 g (850 rpm) pendant 3 minutes.
32. Eliminer le surnageant.
33. Si l'analyse des échantillons est réalisée le jour même : ajouter 1ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
Si l'analyse des échantillons est réalisée un autre jour : ajouter 1 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ - FBS 5% et conserver les tubes dans le frigo à 4°C à l'abri de la lumière.
 Le jour de l'analyse, centrifuger à 120 g pendant 3 minutes, éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 1 ml de DPBS avec $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
34. Ajouter l'Hoechst 33342 à 0.25 µg/ml.
35. Flusher doucement les cellules (3 flushes aller/retour)
36. Laisser 30 minutes, à l'abri de la lumière, dans la glace.
37. Analyser en cytométrie en flux.

Résultats

« Je voudrais que tu comprennes ce qu'est le vrai courage ... C'est savoir que tu pars battu d'avance et, malgré ça, agir quand même et tenir jusqu'au bout. »

Harper Lee (introduction de *16 Lunes*)

Myostatin gene inactivation induces resistance to skeletal muscle loss, reduces tumor growth and increases survival in mouse models of cancer cachexia

Yann Simon Gallot¹, Josiane Castells¹, Anne-Cécile Durieux¹, Barbara Vernus², Stéphanie Chanon³, Léa Plantureux¹, Etienne Lefai³, Dominique Dardevet⁴, Laurent Schaeffer⁵, Georges Nemoz³, Anne Bonnieu² and Damien Gilles Freyssenet¹

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France

²INRA, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, 2 place Viala, F-34060, Montpellier, France

³Lyon 1 University, INSERM U1060, CarMeN Laboratory, Institut National de la Recherche Agronomique UMR 1235, F-69600, Oullins, France

⁴INRA, Unité de Nutrition Humaine (UNH, UMR 1019), CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, F-63000, France

⁵Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS, UMR 5239, IFR128, Université de Lyon, Equipe Différenciation Neuromusculaire, Lyon, F-69000, France

Corresponding author: Damien Freyssenet
Laboratoire de Physiologie de l'Exercice
Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré
42023 Saint-Etienne Cedex 2, France
Tel: 033 4 77 42 14 77
Fax: 033 4 77 42 14 78
E-mail: damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr

ABSTRACT

Cachexia is a wasting syndrome frequently encountered in cancer patients characterized by the uncontrolled loss of adipose tissue and skeletal muscle. Myostatin (Mstn) is a negative regulator of skeletal muscle mass and a critical determinant of skeletal muscle homeostasis. Although the regulation of the mechanisms involved in the control of skeletal muscle mass is a core issue concerning the pathogenesis of cancer cachexia, the relationship between Mstn and the pathophysiological mechanisms of cancer cachexia remains largely unknown. We show here that increasing skeletal muscle mass through the genetic ablation of *Mstn* improves a number of features of cancer-associated cachexia. *Mstn* gene invalidation in mouse prevents the loss of skeletal muscle induced by the subcutaneous implantation of Lewis lung carcinoma cells, together with a reduction in tumor growth. Prevention of cancer cachexia in *Mstn*-deficient mice prolongs animal survival. *Mstn* gene invalidation increased apoptosis of tumor cells, together with a decrease in the expression of genes involved in tumor cell proliferation and metabolism. The induction of NF- κ B, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways triggered by the implantation of Lewis lung carcinoma cells was markedly reduced or even abolished in response to *Mstn* gene invalidation. Skeletal muscle content of ceramides, a family of molecules synthesized in response to excessive lipolysis, was tightly correlated with the loss of skeletal muscle mass, suggesting that ceramides could be a cachectic mediator involved in the pathogenesis of cancer cachexia. Overall, these findings establish that Mstn plays a critical role in the pathogenesis of cancer-associated cachexia.

INTRODUCTION

Cachexia is a wasting syndrome that is frequently observed in patients suffering from chronic diseases such as HIV-acquired immunodeficiency syndrome, sepsis, chronic heart failure, chronic kidney disease, chronic obstructive pulmonary disease and cancer (Morley *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2008). In cancer patients, cachexia can affect up to 80% of patients with advanced cancer (DeWys *et al.*, 1980; Bruera, 1997; Prado *et al.*, 2008), particularly in pancreatic and gastric cancers (DeWys *et al.*, 1980; Bruera, 1997; Tisdale, 2002), and accounts for 30% of cancer related deaths (Warren, 1932; Tan & Fearon, 2008; Tisdale, 2010). Cancer cachexia is characterized by an uncontrolled loss of body weight that results from depletion of both adipose tissue and skeletal muscle, while the non-muscle protein compartment is relatively preserved (Fearon, 1992; Fouladiun *et al.*, 2005). Concurrent anorexia, also variably contributes to cachexia and aggravates weight loss (Fearon *et al.*, 2011), but does not appear to be solely responsible for the loss of adipose tissue and skeletal muscle (Tisdale, 2009). Cancer cachexia dramatically contributes to a reduced quality of life, an increased toxicity from chemotherapy and a decreased survival (DeWys *et al.*, 1980; Andreyev *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 2004). Unfortunately, there is no effective treatment for cancer cachexia.

Myostatin (Mstn), also known as growth and differentiation factor-8 (GDF-8), is a highly conserved member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily of secreted growth factor. Mstn plays a critical role in regulating skeletal muscle mass. *Mstn* gene mutation and/or inactivation induce skeletal muscle hypertrophy (Grobet *et al.*, 1997; McPherron *et al.*, 1997; McPherron & Lee, 1997; Grobet *et al.*, 2003), whereas forced overexpression of Mstn induces skeletal muscle atrophy (Zimmers *et al.*, 2002; Durieux *et*

al., 2007; Amirouche *et al.*, 2009). An increase in *Mstn* expression is the molecular signature of multiple conditions leading to skeletal muscle mass loss (Gonzalez-Cadavid *et al.*, 1998; Yarasheski *et al.*, 2002; Gilson *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2008; Allen *et al.*, 2010a; Allen *et al.*, 2010b; George *et al.*, 2010; Man *et al.*, 2010; Gruson *et al.*, 2011; Hayot *et al.*, 2011; Ryan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; McKay *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2013), including cancer cachexia (Costelli *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2008; Bonetto *et al.*, 2009; Benny Klimek *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010; Busquets *et al.*, 2012b). The concept that *Mstn* is critically involved in cancer-associated cachexia is further supported by two recent reports showing that pharmacological blockade of a high affinity activin type 2 receptor (ActRIIB) that mediates *Mstn* signaling (Lee & McPherron, 2001; Souza *et al.*, 2008), preserved skeletal muscle mass (Benny Klimek *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010), and restored muscle strength (Zhou *et al.*, 2010) in mouse models of cancer cachexia. However, the mechanisms triggered by *Mstn* gene invalidation in the pathogenesis of cancer cachexia remains still unknown.

In this study, we examined the potential therapeutic impact of *Mstn* inhibition on skeletal muscle loss, tumor growth and animal survival in two different animal models of cancer cachexia. Furthermore, the molecular mechanisms involved in cancer cachexia, as well as the mechanisms by which *Mstn* gene invalidation may alter the course of cancer cachexia, have been also investigated. Mice with a deletion of the third exon of *Mstn* gene were used in 2 different models of cancer cachexia, the Lewis lung carcinoma (LLC) tumor-bearing mice (van Royen *et al.*, 2000) and the *Apc*^{Min/+} mouse, a genetic model of colorectal cancer and cachexia (Moser *et al.*, 1990; Mehl *et al.*, 2005a). The present study demonstrates that *Mstn* gene invalidation confers resistance to skeletal muscle atrophy and reduces tumor growth, thereby markedly prolonging survival of the tumor-bearing animals and *Apc*^{Min/+} mice. Our data also reveal that *Mstn* gene invalidation increases apoptosis of

tumor cells and attenuates or blocks the expression of genes involved in muscle protein breakdown. Thus, these findings establish a crucial link between inhibition of the Mstn pathway and the prevention of cancer-associated cachexia.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Ethical approval of the procedure

Experiments were approved by Jean Monnet University Animal Care and Use Committee, and were carried out in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

Animals

Wild type C57BL/6 male mice and *Mstn*^{-/-} male mice on a C57BL/6 background were used. *Mstn*^{-/-} mice have been previously described as *Mstn*^{Δ/Δ} (Grobet *et al.*, 2003). Briefly, *Mstn*^{-/-} mice carry the floxed *Mstn* allele (where the third exon of the *Mstn* gene is flanked with a pair of *loxP* sites) that was deleted at the zygote stage by a Cre plasmid.

Apc^{Min/+} male mice on a C57BL/6 background were purchased from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA), and mated with *Mstn*^{-/-} female mice on a C57BL/6 background. Resulting male pups were genotyped to distinguish *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{+/+}, *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{+/-} and *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{-/-}. Primer sequences for *Apc* were 5'-GCC-ATC-CCT-TCA-CGT-TAG-3'; 5'-TTC-CAC-TTT-GGC-ATA-AGG C-3' and 5'-TTC-TGA-GAA-AGA-CAG-AAG-TTA-3'. Primer sequences for *Mstn* were 5'-CCA-TAT-AGT-GCT-CAG-AAA-GAG-CTA C-3'; 5'-TGG-GCT-AAT-TAT-GAA-TTA-TTC-ACT-C-3' and 5'-GTC-TGT-CAC-CTT-GAC-TTC-TAA-3'. All animals were housed and bred under a constant 12:12 hours light-dark cycle with food and water *ad libitum*.

Cell culture and inoculation of Lewis lung carcinoma cells

Lewis lung carcinoma (LLC) cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, ATCC - 30-2002)

supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin (P/S) at 37°C and 5% CO₂ in air. *Mstn*^{-/-} (14.54 ± 0.80 months; n=11) and wild type (14.60 ± 0.95 months; n=12) male mice were subcutaneously injected with 5 x 10⁶ LLC cells in 150 µl of sterile Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS). Control *Mstn*^{-/-} (14.67 ± 1.13 months; n=8) and wild type (14.66 ± 0.95 months; n=9) male mice were injected with sterile DPBS. Body weight, food intake and tumor size were measured daily during 35 days.

Survival rate

One group of *Mstn*^{-/-} (15.15 ± 0.16 months; n=17) and wild type (15.06 ± 0.62 months; n=20) tumor-bearing mice were used for determination of survival rates. Body weight, food intake and tumor size were measured daily until death.

Apc^{Min/+}/*Mstn*^{+/+} (n=30), *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{+/-} (n=14) and *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{-/-} (n=6) were also used for determination of survival rates. Body weight and food intake were measured weekly throughout lifespan.

Tissue removal

Animals were anesthetized 35 days after inoculation of LLC cells (i.p. injection of 90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine). Heparinized blood samples were collected. Tumor and visceral adipose tissue were removed, weighted and stored at -80°C. *Extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* muscles were carefully dissected, trimmed of tendons and any non-muscle tissue and weighed. A portion of *gastrocnemius* muscle was conditioned in RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France). *Gastrocnemius* and *tibialis anterior* muscles were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Mice were sacrificed as a consequence of heart excision, while deeply anesthetized.

Protein extraction

Gastrocnemius muscles and tumor were homogenized (1:20 dilution wt:vol) in an ice-cold buffer (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM β -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 120 nM okadaic acid, and 1% Triton X-100). Homogenates were centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4°C, and the resulting supernatants analyzed for soluble and non-myofibrillar protein content (DC Protein Assay; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using bovine serum albumin as standard.

Luminex analysis

Protein extracts were transferred into 96-well dishes and diluted (1:10 dilution vol:vol) with buffered solution. Fluorescent capturing beads coupled to antibodies directed against I κ B- α , I κ B- α ^{Ser32/Ser36} and p70S6K^{Thr421/Ser424} (Bio-Rad) were used. The antibody-conjugated beads were added into each well and incubated overnight. The plates were washed and incubated with biotinylated antibodies to fix each target protein. Streptavidin–phycoerythrin solution was then added. The analysis consisted of a double-laser fluorescence detection, which allowed simultaneous identification of the target protein through the red fluorescence emission signal of the bead and quantification of the target protein through the fluorescence intensity of phycoerythrin. A positive control, consisting of a standard protein extract from control cell line, was added to each series. Results were recorded as mean fluorescence intensities on a Bio-Plex™ 200 System instrument (Bio-Rad), using Bio-Plex Manager Software version 6.

Immunoblotting

Equal amount of protein (50 µg) were resolved on 12.5% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to 0.45 µm nitrocellulose membranes. After Ponceau S staining, membranes were blocked (1 h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat dried milk), and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Antibodies directed against 4E-BP1 (1:500 vol/vol), NF-κB p65 (1:600), NF-κB p65^{Ser536} (1:200), PTEN (1:800), ribosomal protein (rp) S6 (1:600) and rpS6^{Ser235/236} (1:800) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies directed against Bax (1:1000) and Bcl-2 (1:800) were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Antibodies directed against Atg5-Atg12 complex (1:800), LC3b (1:800) and α-tubulin (1:2000) were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Membranes were then washed 3 times in TBS and incubated for 1h at room temperature with a goat-anti-rabbit or a rabbit anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Trappes, France). After 3 x 5 min washes in TBS-Tween, immunocomplexes were visualized using an enhanced chemiluminescence detection method (ECL, GE Healthcare, Orsay, France). The films were scanned and band intensities were quantified using ImageJ analysis software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). α-tubulin immunoblots were used to check for equal protein loading.

RNA isolation, cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted from visceral adipose tissue using the RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), and from *gastrocnemius* muscle and tumor tissue (RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, Qiagen) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated from 400 ng of RNA using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). The selected forward and reverse primer

sequences are listed in Table 1. Real time PCR was performed in a 20 µl final volume and optimized concentrations for each primer using the SsoFast EvaGreen Super mix (Bio-Rad) and a CFX96 Real Time PCR Detection System, C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Reference genes, *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (Hprt)*, *peptidylprolyl isomerase A (Ppia)*, *ribosomal protein, large, PO (Rplp0)* and *tubulin, alpha 1A (Tuba1a)* were used to normalize the expression levels of genes of interest, as previously described (Pfaffl, 2001).

Gene	Primer sequence 5'-3'	GenBank® accession no.	Amplicon length (pb)
<i>Atgl (Pnpla2)</i>	Fwd : TGT GCA AAC AGG GCT ACA G Rev : AAG GGT TGG GTT GGT TCA G	NM_001163689.1	72
<i>Glut1 (Slc2a1)</i>	Fwd : TGC CTT GGA TGT CCT ATC TG Rev : ACC AGG GCC TAC TTC AAA GA	NM_011400.3	71
<i>Hprt (Hprt)</i>	Fwd : CAG GCC AGA CTT TGT TGG AT Rev : TTG CGC TCA TCT TAG GCT TT	NM_013556.2	147
<i>Hsl (Lipe)</i>	Fwd : AAT GAG ATG GCG AGG GTC AG Rev : GCC CTCA CAG CAG GAA TAG T	NM_010719.5	96
<i>MAFbx/atrogin-1 (Fbxo32)</i>	Fwd : GTT TTC AGC AGG CCA AGA AG Rev : TTG CCA GAG AAC ACG CTA TG	NM_026346.3	115
<i>MuRF1 (Trim63)</i>	Fwd : ACC TGC TGG TGG AAA ACA TC Rev : AGG AGC AAG TAG GCA CCT CA	NM_001039048.2	147
<i>PO (Rplp0)</i>	Fwd : CTC CAA GCA GAT GCA GCA GA Rev : ATA GCC TTG CGC ATC ATG GT	NM_007475.5	87
<i>Ppia (Ppia)</i>	Fwd : AGC ATA CAG GTC CTG GCA TC Rev : TTC ACC TTC CCA AAG ACC AC	NM_008907.1	127
<i>Sptlc1 (Sptlc1)</i>	Fwd : GCA GGA GCG TTC TGA TCT TAC Rev : ACG ATG TTG TGG GTT GGA G	NM_009269.2	144
<i>Traf6 (Traf6)</i>	Fwd : TGC TGA GCC ACA ATA CTC AC Rev : CCA TCC GTG TTA GCA GTT AG	NM_009424.2	73
<i>Tubulin (Tuba1a)</i>	Fwd : TGA GGA GGT TGG TGT GGA TTC Rev : AAA CAT CCC TGT GGA AGC AG	NM_011653.2	99
<i>Tweak (Tnfsf12)</i>	Fwd : GCT ACG ACC GCC AGA TTG GG Rev : GCC AGC ACA CCG TTC ACC AG	NM_011614.3	130
<i>Vegfa (Vegfa)</i>	Fwd : CAC CCA CGA CAG AAG GAG AG Rev : TCT CAA TCG GAC GGC AGT AG	NM_001025250.3	87

Table 1. Oligonucleotide primers used for PCR analysis.

Primers were designed using Primer 3 software from gene sequences obtained from GenBank[®]. Primer specificity was determined using a BLAST search.

Enzyme assay

Caspase-3 enzyme activity was fluorometrically determined ($\lambda_{\text{exc}} = 380 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$) by using Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (Bachem, Weil am Rhein, Germany) as fluorogenic substrate (Berthon *et al.*, 2007).

Measurement of ceramide levels

Sphingolipids were extracted by the Bligh and Dyer method (Bligh & Dyer, 1959). *Tibialis anterior* muscle tissue was homogenized (Precellys 24 Homogenizer; Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) in chloroform/methanol (1:2 v/v) using 1 ml of solvent per 10 mg of wet tissue. An aliquot of the mixture was kept for Bradford protein assay. Internal deuterium-labeled standard was added at this step: C16:0 D31 ceramide (N-palmitoyl(d31)-D-erythrosphingosine) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA). The samples were mixed by vortex for 30 seconds, sonicated, and let to stand for 30 minutes at room temperature. One volume of sterile DPBS and one volume of chloroform were added to perform phase separation. The samples were then vortexed again for 1 minute before centrifugation at 750 g for 5 minutes. The lower organic phase was transferred to a clean collection tube, and evaporated under a nitrogen stream. The dry extracts were kept at -20°C until analysis by electrospray tandem mass spectrometry (ESI MS/MS), carried out on a triple-quadrupole mass spectrometer (API 3200 MS/MS; Sciex Applied Biosystems, Toronto, Canada) equipped with an ion spray source (TurboIon; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) heated to 500°C . Two binary pumps, a vacuum degasser and a high-performance autosampler (Agilent

1200 Series; Agilent Technologies, Massy, France) with a control module (Instant Pilot; Agilent Technologies) were used for solvent delivery and automated sample introduction. All results were acquired with Analyst software (version 1.5; AB Sciex LLC, Foster City, CA, USA). For measurement of ceramide, the MS/MS was performed in positive ionization mode. Specific parameters used were as follows (in arbitrary units): ion spray voltage 5500 V; entrance potential -10 V; declustering potential 100 V; collision energy 40 eV. Sample analysis for quantification was performed in multiple reaction monitoring (MRM) mode by flow injection analysis. The dwell time was fixed to 30 ms for each species. Ceramides were measured with a flow rate of 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ 2:1 chloroform:methanol (analysis time of 3 minutes). The concentration of each molecular species was calculated from the ratio of its signal to that of the corresponding internal standard. Total ceramide concentration was the sum of the concentrations of the various species (De Larichaudy *et al.*, 2012).

Measurement of amino acids levels

Plasma amino acids were purified from blood samples by ion-exchange chromatography after protein precipitation: 250 ml of plasma was homogenized in 50 μl of sulfosalicylic acid solution (1 M in ethanol with thioglycolate 0.5 M) that had previously completely evaporated. Norleucine was added as an internal standard. Samples were incubated on ice for 15 min and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. An aliquot (200 μl) of the supernatant was combined with 100 μl of 0.1 M lithium acetate buffer, pH 2.2. Amino acid concentrations were determined by ion-exchange chromatography (Bio-Tek Instruments A.R.L., Saint Quentin en Yvelines, France) using post-column derivatization with Ninhydrin.

Statistics

Data are means \pm SE. Statistical comparisons were performed using a two-way analysis of variance (GraphPad Prism 5.03 software; GraphPad, San Diego, CA, USA). Specific differences between means were tested with Student's unpaired two-tailed t-test (GraphPad Prism 5.03 software). Survival curves were analyzed using a log-rank test (GraphPad Prism 5.03 software). Analysis of covariance (ANCOVA) was used to adjust the difference between WT+LLC group and Mstn^{-/-}+LLC group for survival time, including tumor mass at death as covariate (SuperANOVA; Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). The α -level of significance was set at 0.05 for all comparisons.

RESULTS

***Mstn* gene inactivation reduces tumor growth and prevents skeletal muscle loss in tumor-bearing mice**

Implantation of LLC cells in mice has been shown to decrease body weight and skeletal muscle mass (van Royen *et al.*, 2000). Weight loss in wild type tumor-bearing mice started 7 days after implantation, so that 4 weeks after implantation tumor-free body weight had declined by about 20% (Figure 1A). *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice also lost weight over the course of cancer cachexia, but this decrease was significantly attenuated by *Mstn* gene inactivation ($p < 0.05$) (Figure 1A-B). Importantly, food intake was similar in all groups of mice during the time course of the experiment (Supplemental Figure 1), indicating that anorexia cannot play a causal role in the development of cancer cachexia.

Tumor growth in response to the implantation of LLC cell was observed in 100% of treated animals. However, tumor volume was lower in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice during the course of cancer cachexia ($p < 0.01$) (Figure 1C). Accordingly, tumor weight was significantly lower in *Mstn*^{-/-} mice compared to wild type mice 5 weeks after implantation of LLC cells (Figure 1D).

Development of cancer cachexia induced a decrease in adipose tissue mass in tumor-bearing wild type and *Mstn*^{-/-} mice (Figure 2A). As *Mstn*^{-/-} mice had significantly less adipose tissue than their wild type counterparts (Figure 2A) (McPherron *et al.*, 1997), the decrease was more pronounced in wild type tumor-bearing mice (1.05 g) compared to *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (0.39 g) ($p < 0.05$) (Figure 2A).

As previously described (Grobet *et al.*, 2003), *Mstn*^{-/-} mice had a double muscling phenotype (Figure 2B). In wild type tumor-bearing mice, the weight of *extensor digitorum*

longus, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* decreased by more than 20% below control levels, whereas muscle mass loss was prevented in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 2B). As shown in Figure 2C for *gastrocnemius* muscle, total muscle protein content also remained unchanged in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 2C). Protection against muscle wasting in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice was also illustrated by the preservation of plasma amino acid concentration (Figure 2D-E and Supplemental Figure 2A-B). Importantly, plasma amino acid concentration was inversely correlated with muscle weight changes (Supplemental Figure 2C), suggesting that changes in plasma amino acid concentration largely reflect a leak of amino acids from the muscle compartment. Taken together, these data indicate *Mstn* gene inactivation fully protected hind limb skeletal muscles against atrophy, while reducing tumor growth.

***Mstn* gene inactivation dramatically prolongs survival of LLC tumor-bearing mice and *Apc*^{Min/+} mice**

The LLC tumor implanted mice manifested a lethal wasting syndrome characterized by progressive weight loss (Figure 1) and death (Figure 3A). *Mstn* gene inactivation in tumor-bearing mice was associated with a prolongation of animal survival ($p < 0.001$) (Figure 3A). Median survival was increased by almost 30% from 32 days to 41 days ($p < 0.001$).

We next examined the impact of *Mstn* gene inactivation in *Apc*^{Min/+} mouse, an established model of colorectal cancer and cachexia (Moser *et al.*, 1990; Mehl *et al.*, 2005a). Mutation in the *adenomatous polyposis coli* (*Apc*) gene leads to multiple intestinal tumors in human and mouse (Moser *et al.*, 1990; Groden *et al.*, 1991; Su *et al.*, 1992). *Apc*^{Min/+} develops intestinal polyps as early as 4 weeks of age, and become cachectic between 3 and 6 months of age (Mehl *et al.*, 2005a). On the heterozygous *Mstn*^{+/-} and homozygous *Mstn*^{-/-} backgrounds,

survival of $Apc^{Min/+}$ mouse was remarkably prolonged ($p < 0.001$) (Figure 3B). When 50% of $Apc^{Min/+}/Mstn^{+/+}$ mice were dead because of development of intestinal polyps, both $Apc^{Min/+}/Mstn^{+/-}$ and $Apc^{Min/+}/Mstn^{-/-}$ mice were still alive. Importantly, lifespan was similar in wild type and $Mstn^{-/-}$ mice under normal conditions (Supplemental Figure 3). Thus, regardless of mouse model of cancer cachexia, *Mstn* gene inactivation dramatically prolongs animal survival.

***Mstn* gene inactivation increases apoptosis of tumor cells**

Because of the marked effect of *Mstn* gene inactivation on tumor growth (Figure 1 C-D), we first examined the expression of genes involved in tumor metabolism, proliferation and apoptosis. Vascular endothelial growth factor (VEGF) A is a major driver of tumor angiogenesis and growth (Rapisarda & Melillo, 2012). Compared to wild type mice, VEGFA transcript was significantly reduced in the tumors of $Mstn^{-/-}$ mice (Figure 4A). Expression of glucose transporter (GLUT) 1, the predominant glucose transporter in many types of cancer cells (Younes *et al.*, 1997; Amann *et al.*, 2009), was significantly reduced in tumors from $Mstn^{-/-}$ mice (Figure 4B). *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)* gene encodes a protein with tumor-suppressive activity (Li *et al.*, 1997; Maehama & Dixon, 1998). Compared with wild type tumor-bearing mice, PTEN protein content was 30% higher in $Mstn^{-/-}$ mice with tumors (Figure 4C). We next determined whether *Mstn* may directly affect the *in vitro* proliferative characteristics of LCC cells. Cell number, as well as the relative distribution of LLC cells in G₀/G₁, S and G₂M phases determined by FACS analysis, were similar in control and LLC cells treated for 48 hours with human recombinant *Mstn* (Supplemental Figure 4A-B). Accordingly, expression of Ki-67, a marker of cell proliferation, remained unchanged (Supplemental Figure 4C). These results collectively indicate that *Mstn*

gene invalidation favorably regulates the expression of genes involved in LLC tumor growth and metabolism, while *Mstn per se* does not regulate *in vitro* the proliferation of LLC cells, as well as Ki-67 protein content. This apparent paradox suggests that *Mstn* gene invalidation could modulate the activity of other tissues to trigger adaptive responses that alter expression of critical markers of tumor growth and metabolism *in vivo*.

We next explored the possibility that *Mstn* gene invalidation reduces tumor growth by increasing apoptosis of tumor cells. Consistent with this hypothesis, protein content of Bcl-2-associated X protein (Bax), the proapoptotic member of the Bcl-2 protein family, was increased by about 50% in the tumors of *Mstn*^{-/-} mice, whereas it remained unchanged in the tumors of wild type mice (Figure 4D). Since Bcl-2 protein content was remained unchanged (Supplemental Figure 4D), the Bax-to-Bcl-2 protein ratio was consequently increased in the tumors of *Mstn*^{-/-} mice (Figure 4E). Caspase-3 activity, was also significantly increased in the tumors of *Mstn*^{-/-} mice (Figure 4F). The increase in Bax protein content, the increase in Bax-to-Bcl-2 protein ratio and caspase-3 activity demonstrates an increased apoptosis in the tumors of *Mstn*^{-/-} mice.

***Mstn* gene inactivation decreases ceramide production in response to cancer cachexia**

Lipolysis has recently been shown to be essential in the pathogenesis of cancer cachexia (Das *et al.*, 2011). Ceramides refer to a family of lipid molecules composed of a sphingosine and a fatty acid. Aberrant accumulation of ceramides in skeletal muscle has been implicated in many metabolic processes (Holland & Summers, 2008), and more recently in cancer cachexia (De Larichaudy *et al.*, 2012). In agreement with these observations, skeletal muscle ceramide content was negatively correlated with skeletal muscle weight changes ($r^2=0.6547$; $p < 0.001$) (Figure 5A), suggesting that ceramide accumulation in skeletal muscle could

contribute to the loss of skeletal muscle. Skeletal muscle ceramide content was higher in wild type mouse compared to *Mstn*^{-/-} mice ($p < 0.05$): cancer cachexia increased skeletal muscle ceramide content both in wild type and *Mstn*^{-/-} mice, but ceramide content was 65% higher in wild type mice compared to *Mstn*^{-/-} mice ($p < 0.05$) (Figure 5B). Skeletal muscle ceramide content was also negatively correlated with adipose tissue weight changes ($r^2=0.6975$; $p < 0.001$) (Figure 5C), suggesting that fatty acid production originating from triglyceride hydrolysis in adipose tissue is probably a major contributor of ceramide accumulation in skeletal muscle. However, this could not be explained by a differential regulation of genes encoding adipose triglyceride lipase (*Atgl*) and hormone sensitive lipase (*Hsl*), as *Atgl* and *Hsl* mRNA levels in adipose tissue were decreased in both groups in response to cancer cachexia ($P < 0.001$) (Supplemental Figure 5A-B). Similarly, mRNA level of serine palmitoyltransferase 1 (*Sptlc1*), a key limiting enzyme in ceramide biosynthesis (Hanada, 2003; Hojjati *et al.*, 2005; Hornemann *et al.*, 2009), was also similarly decreased in adipose tissue of wild type and *Mstn*^{-/-} mice ($P < 0.001$) (Supplemental Figure 5C).

***Mstn* gene inactivation does not attenuate the inhibition of Akt/mTOR pathway, but markedly reduces the activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in tumor-bearing mice**

Muscle atrophy may originate from a decrease in protein synthesis and/or an increase in protein degradation (Favier *et al.*, 2008; Glass, 2010a). We first explored the regulation of the Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy that can prevent muscle atrophy *in vivo* (Bodine *et al.*, 2001b; Rommel *et al.*, 2001). Phosphorylation levels of downstream effectors of the pathway, including p70S6K on Thr421 and Ser424, rpS6 on Ser235 and 236 and the translation repressor 4E-

Binding Protein (4E-BP)-1 on Thr37/46, were all significantly and similarly decreased in *gastrocnemius* muscle of wild type and *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 6). rpS6 protein content was also significantly decreased in both groups in response to cancer cachexia. Altogether, these data suggest that preservation of skeletal muscle mass in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice does not involve a differential regulation of Akt/mTOR pathway 5 weeks after tumor cell implantation.

Skeletal muscle atrophy induces the expression of multiple components of the ubiquitin-proteasome pathway, including the muscle-specific E3 ubiquitin ligases of the ubiquitin-proteasome pathway (Bodine *et al.*, 2001a; Gomes *et al.*, 2001; Lecker *et al.*, 2004). mRNA levels of *MAFbx/atrogin-1* and *MuRF1* were strongly increased in *gastrocnemius* muscle of wild type tumor-bearing mice, whereas expression of these atrophy-related genes was completely blunted (*MAFbx/atrogin-1*) or even decreased (*MuRF1*) in the *gastrocnemius* muscle of *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 7A). Thus, *Mstn* gene inactivation prevents the activation of key players of the ubiquitin-proteasome pathway in response to cancer cachexia.

NF-κB protein complex is a transcription factor involved in skeletal muscle wasting (Cai *et al.*, 2004; Wyke *et al.*, 2004; Wyke & Tisdale, 2005). NF-κB is activated by phosphorylation to regulate gene transcription (Sakurai *et al.*, 1999; Sakurai *et al.*, 2003). Whereas, protein content of NF-κB p65 was similar in all groups of mice (Figure 7B), protein content of active p65 phosphorylated on Ser536 was 3-fold higher ($p < 0.001$) in wild type tumor-bearing mice compared to *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 7B). Under normal conditions, NF-κB is sequestered by a family of inhibitory proteins called IκB. Phosphorylation of IκBα on Ser32 and Ser36 allows the release of NF-κB. IκBα protein content was significantly increased in wild type tumor-bearing mice ($p < 0.01$), whereas it remained unchanged in *Mstn*^{-/-} tumor-

bearing mice (Figure 7C). Most importantly, I κ B α phosphorylation on Ser32 and Ser36 was markedly increased by about 8-fold in *gastrocnemius* muscle of wild type mice in response to cancer cachexia ($p < 0.001$), whereas I κ B α phosphorylation remained unchanged in *Mstn*^{-/-} mice in response to tumor growth (Figure 7C). Altogether, these data showed that *Mstn* gene inactivation strongly reduced NF- κ B signaling in skeletal muscle of tumor-bearing mice. In agreement with this observation, expression of TWEAK, a powerful skeletal muscle-wasting cytokine (Dogra *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 2010), and TRAF6, an E3 ubiquitin ligase and adaptator protein required for the activation of NF- κ B in response to TWEAK (Paul *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2012), was markedly down-regulated in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 7D-E).

Another proteolytic system that contributes to skeletal muscle atrophy is the autophagy-lysosome pathway (Mammucari *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Light Chain 3 (LC3) b, a protein constituent of autophagosomes, is a prototypical marker of autophagy (Klionsky *et al.*, 2012). Protein content of LC3b-I, the cytoplasmic form of LC3b, and LC3b-II, the membrane-bound form conjugated to phosphatidylethanolamine, were significantly increased in *gastrocnemius* muscle of wild type tumor-bearing mice, whereas no significant variation was observed in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (Figure 7F). Accordingly, the Atg5-Atg12 protein complex was decreased in *Mstn*^{-/-} mice in response to cancer cachexia ($p < 0.05$), whereas it remained unchanged in wild type mice (Figure 7G). Thus, *Mstn* gene invalidation prevents the activation of key players of the autophagy-lysosome pathway in response to cancer cachexia. Collectively, all these findings indicate that *Mstn* gene invalidation preserves skeletal muscle mass during cancer cachexia in mice by attenuating the activation of proteolytic pathways.

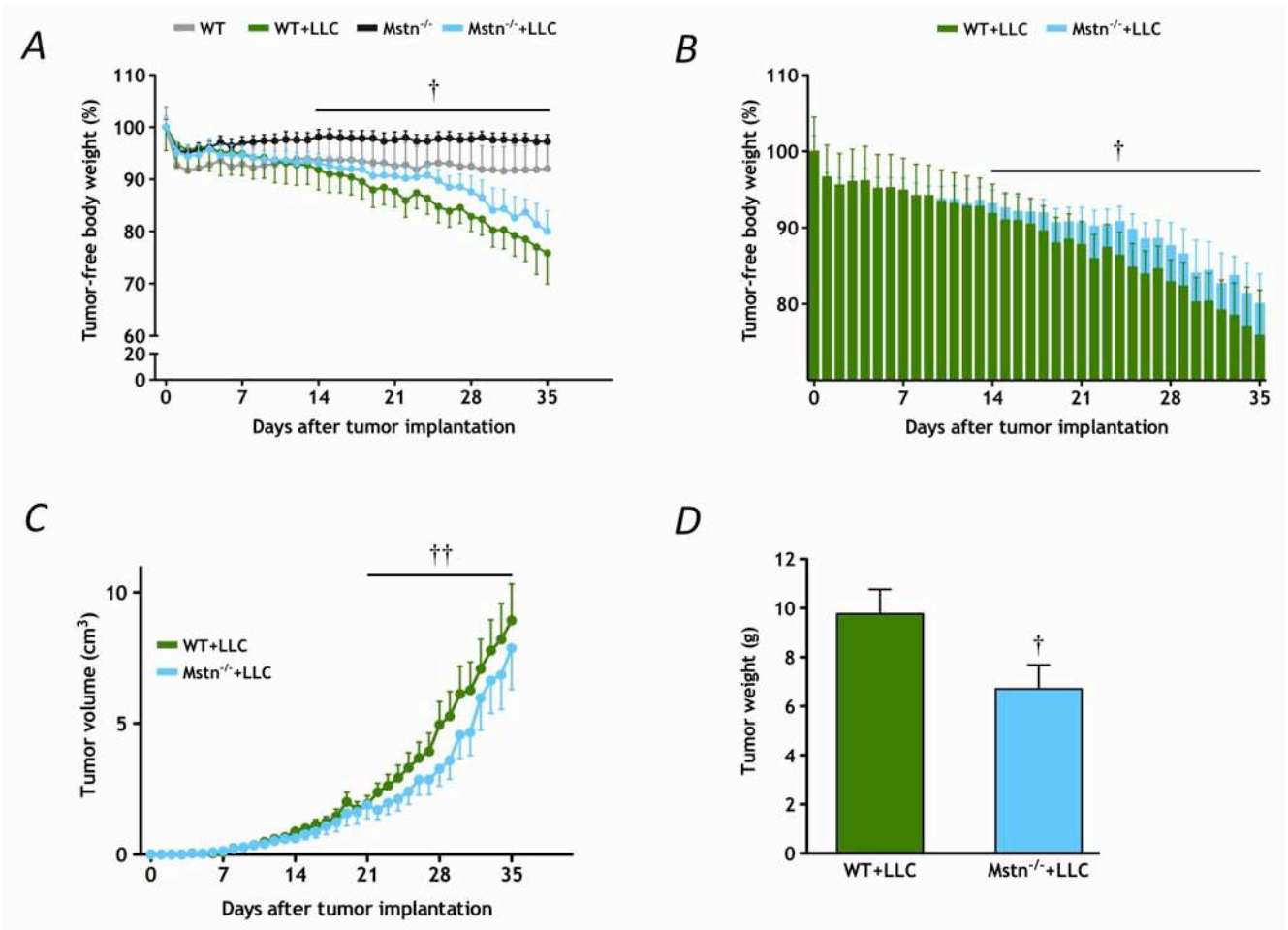


Figure 1. *Mstn* gene invalidation protects mice from cancer-associated weight loss and reduces tumor growth.

(A) and (B) *Mstn* gene invalidation reduces tumor-free body weight loss in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (*Mstn*^{-/-}+LLC).

(C) *Mstn* gene invalidation reduces tumor growth.

(D) *Mstn* gene invalidation reduces tumor weight 35 days after implantation of LLC cells.

Data are means ± SE (n=10-12/group). † p < 0.05 and †† p < 0.01 : significantly different from wild type tumor-bearing mice (WT+LLC).

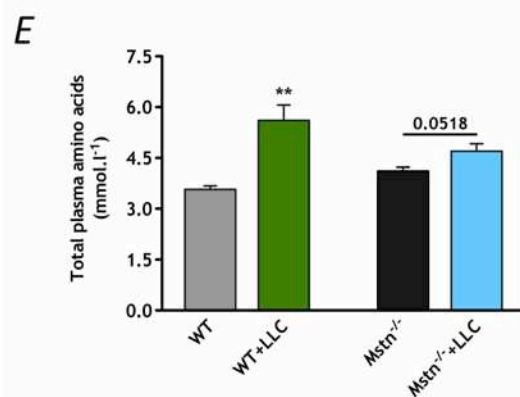
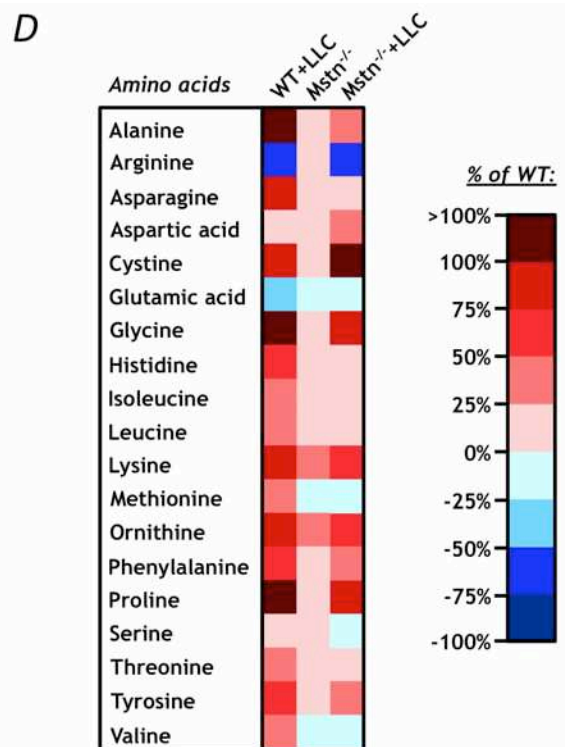
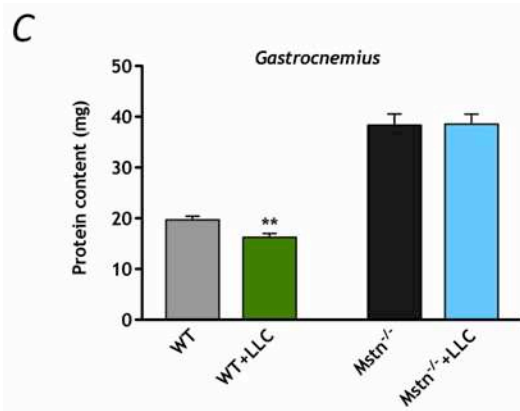
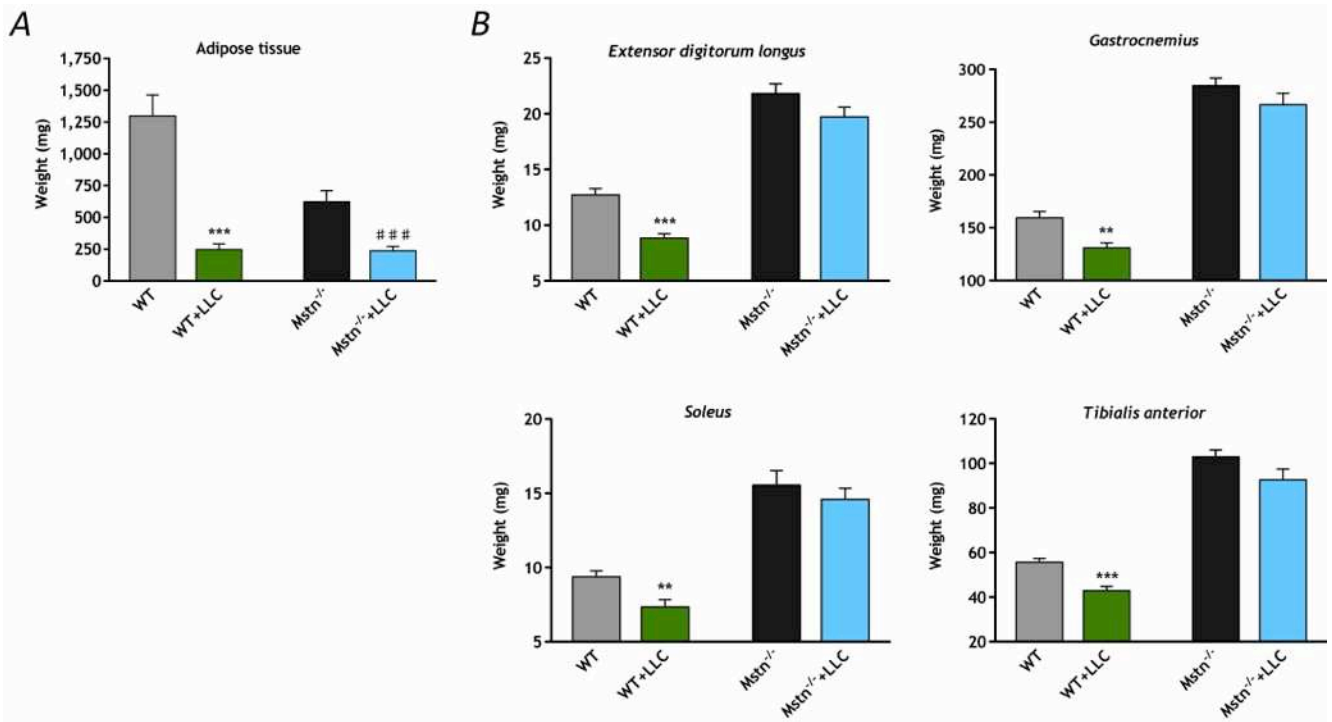


Figure 2. *Mstn* gene invalidation protects tumor-bearing mice from skeletal muscle weight loss.

(A) Visceral adipose tissue weight 35 days after implantation of LLC cells.

(B) Weight of *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* skeletal muscles 35 days after implantation of LLC cells.

(C) Total protein content of *gastrocnemius* skeletal muscle 35 days after implantation of LLC cells.

(D) Plasma amino acid concentration of *Mstn*^{-/-} mice, wild type tumor-bearing mice (WT+LLC) and *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (*Mstn*^{-/-}+LLC) relative to plasma amino acid content of wild type mice (WT) 35 days after implantation of LLC cells.

(E) Plasma amino acid concentration 35 days after implantation of LLC cells.

Data are means ± SE (n=10-12/group). ** p < 0.01 and *** p < 0.001: significantly different from wild type mice (WT). ### p < 0.001: significantly different from *Mstn*^{-/-} mice.

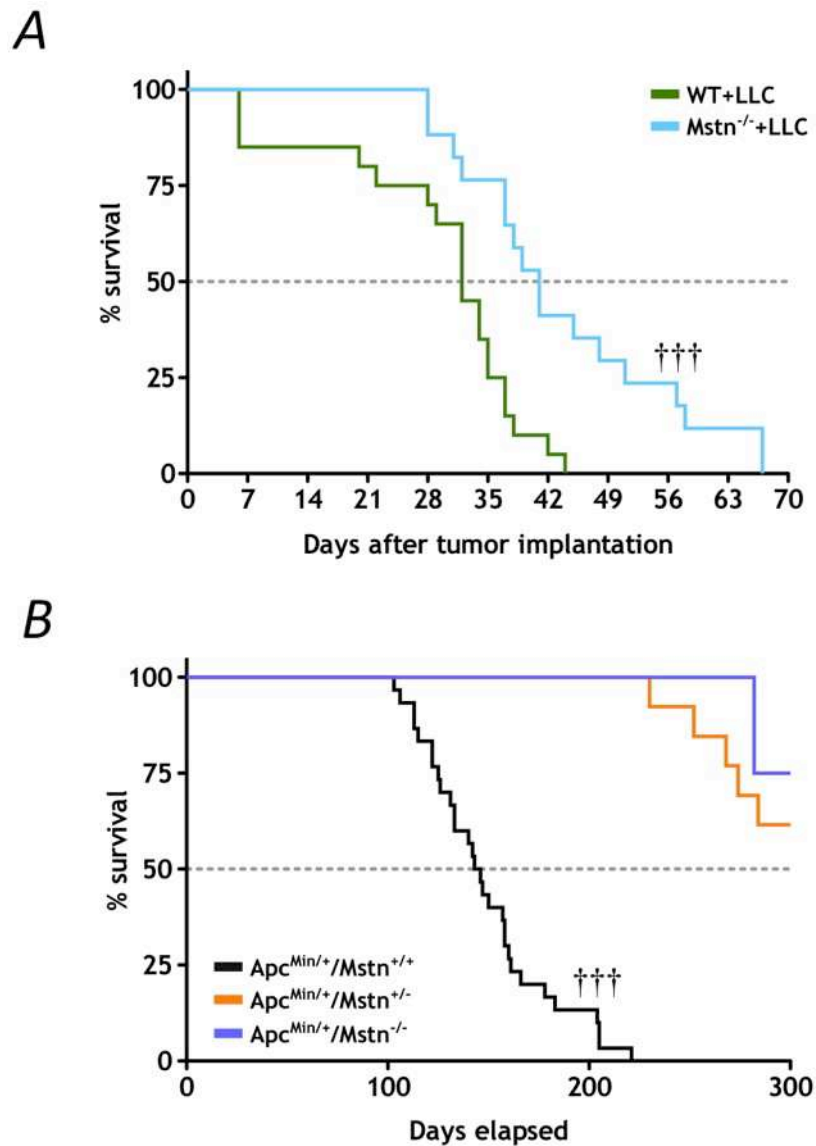


Figure 3. *Mstn* gene invalidation increases survival rates of tumor-bearing mice and *Apc*^{Min/+} mice.

(A) Survival rates of wild type tumor-bearing mice (WT+LLC; n=20) and *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice (*Mstn*^{-/-}+LLC; n=17) in response to LLC tumor growth.

(B) Survival rates of *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{+/+} (n=30), *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{+/-} (n=14) and *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{-/-} (n=6).

††† p < 0.001: significantly different from wild type tumor-bearing mice (WT+LLC) and *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{+/+} mice.

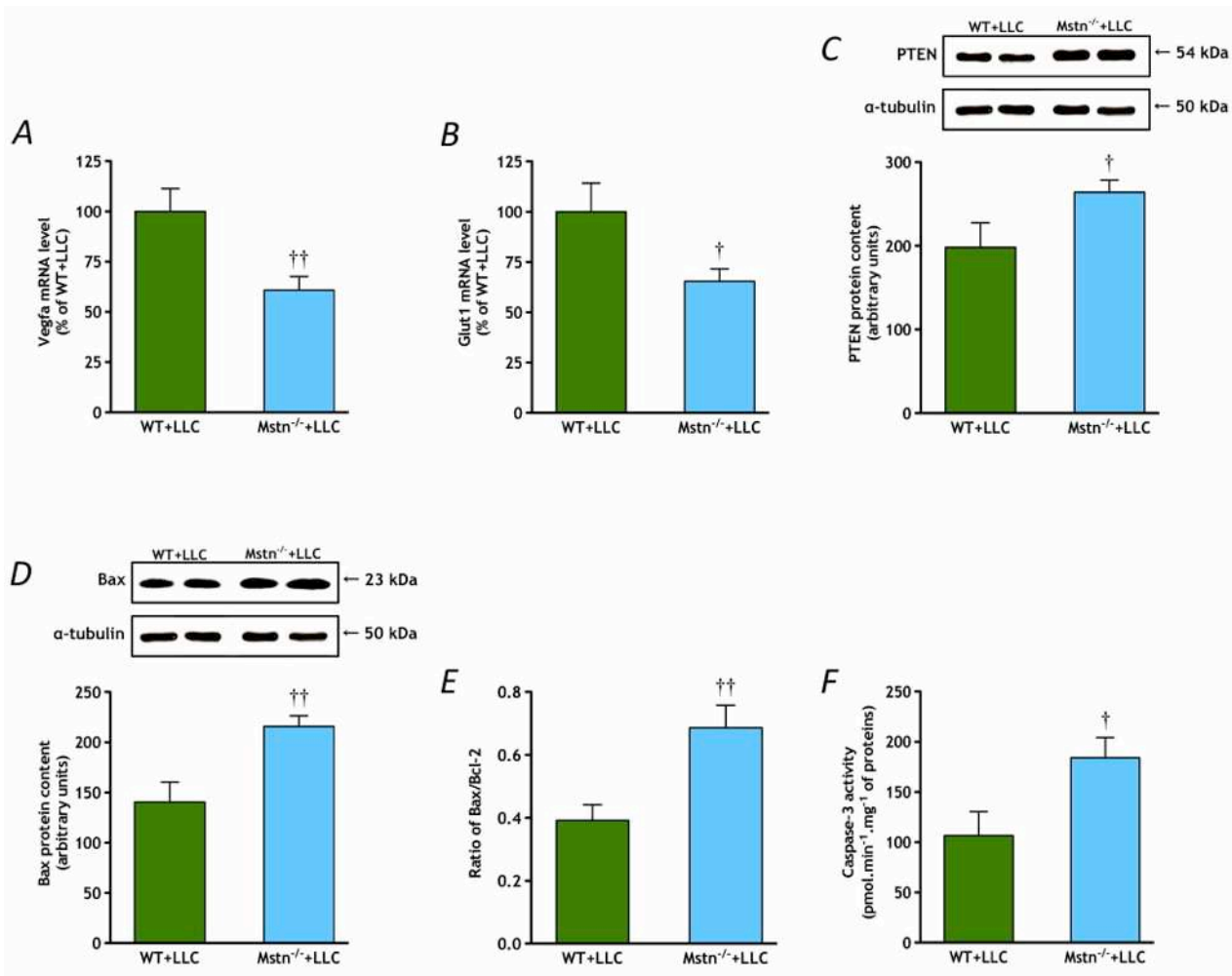


Figure 4. *Mstn* gene invalidation reduces expression of genes involved in tumor growth, while increasing apoptosis.

(A) Transcript level of VEGFA in the tumor of wild type (WT+LLC) and *Mstn*^{-/-} mice (*Mstn*^{-/-}+LLC) 35 days after implantation of LLC cells.

(B) Transcript level of GLUT1 in the tumor of wild type (WT+LLC) and *Mstn*^{-/-} mice (*Mstn*^{-/-}+LLC) 35 days after implantation of LLC cells.

(C) Protein content of the tumor suppressive gene PTEN is increased in the tumors of *Mstn*^{-/-} mice (*Mstn*^{-/-}+LLC) 35 days after implantation of LLC cells.

(D, E and F) Bax protein content, Bax-to-Bcl-2 protein content ratio and caspase-3 activity in the tumors of *Mstn*^{-/-} mice (*Mstn*^{-/-}+LLC) demonstrate an increase in apoptosis 35 days after implantation of LLC cells.

Data are means ± SE (n=8/group). † p < 0.05 and †† p < 0.01: significantly different from tumors of wild type mice (WT+LLC).

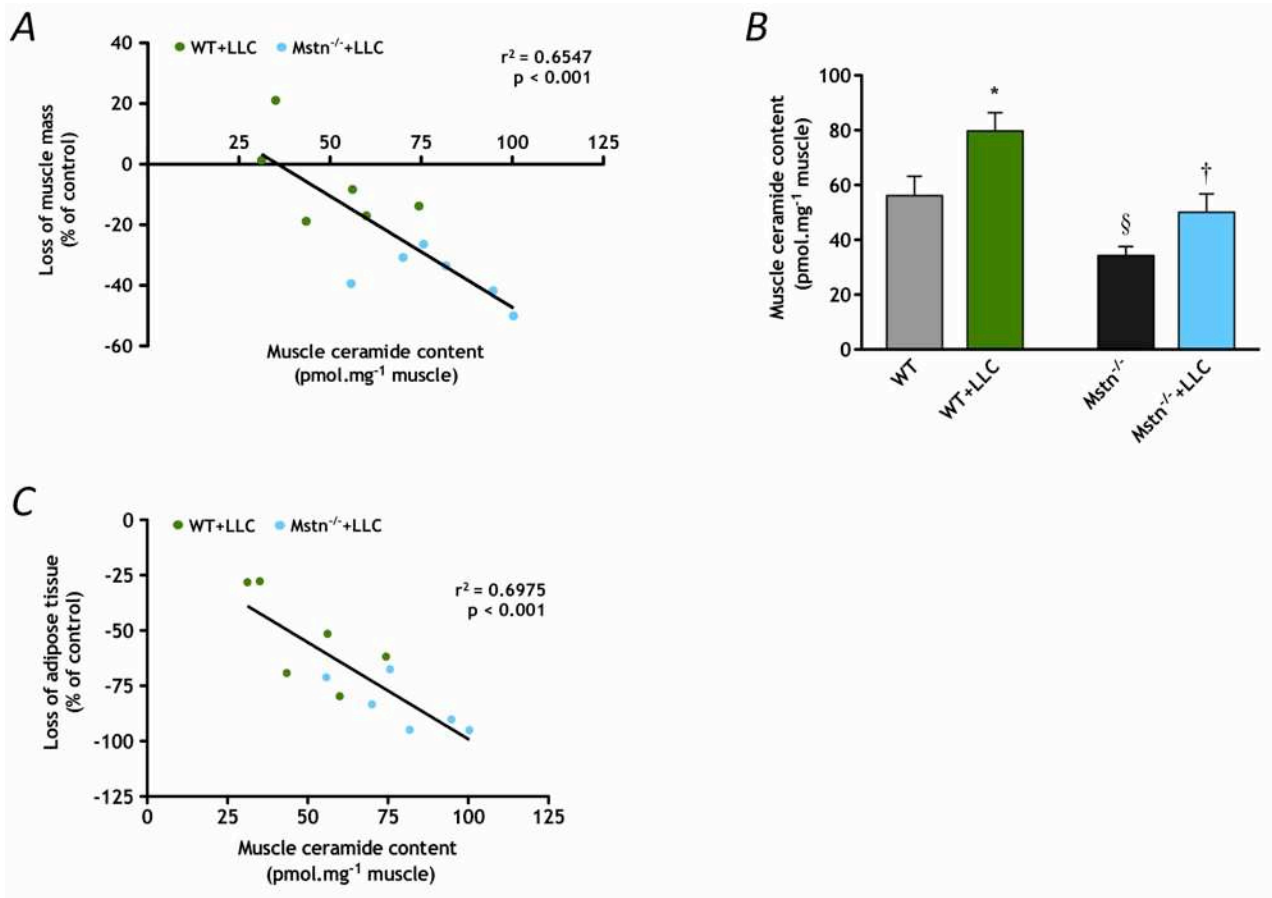


Figure 5. *Mstn* gene invalidation attenuates the accumulation of ceramide in *gastrocnemius* muscle.

(A) Linear regression between skeletal muscle ceramide content and skeletal muscle weight change 35 days after implantation of LLC cells.

(B) Ceramide content of *tibialis anterior* muscle 35 days after implantation of LLC cells.

(C) Linear regression between skeletal muscle ceramide content and adipose tissue weight change 35 days after implantation of LLC cells.

Data are means \pm SE (n=8/group). * $p < 0.05$: significantly different from wild type mice (WT). § $p < 0.05$: significantly different from wild type mice (WT). † $p < 0.05$: significantly different from wild type tumor-bearing mice (WT+LLC).

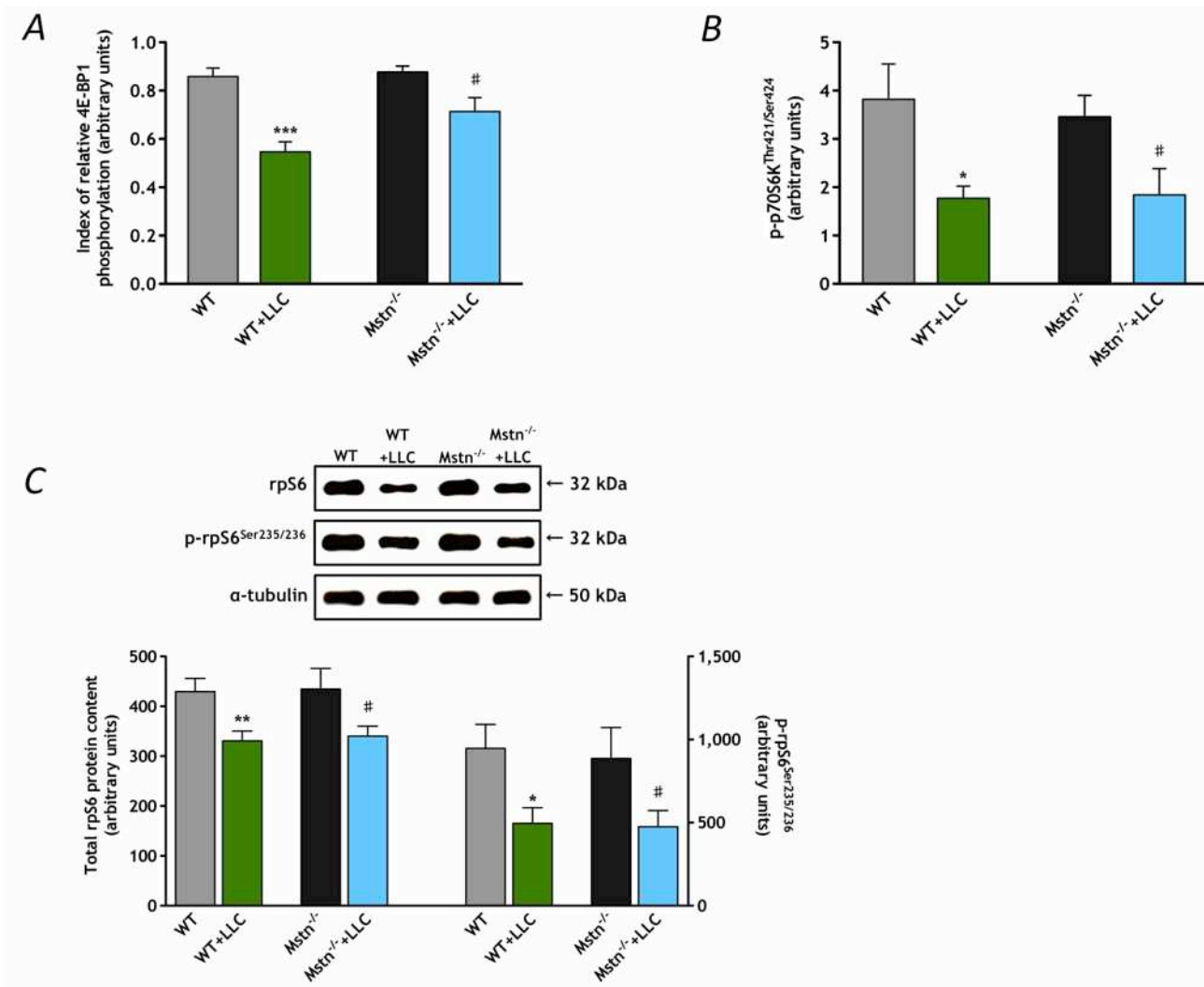


Figure 6. *Mstn* gene invalidation does not prevent the decrease in Akt/mTOR signaling pathway during cancer cachexia.

(A) 4E-BP1 phosphorylation on Thr37 and Thr46, 35 days after implantation of LLC cells, was determined by western blot.

(B) p70S6K phosphorylation on Thr421 and Ser424, 35 days after implantation of LLC cells, was determined by Luminex analysis.

(C) Protein content of rpS6 and rpS6 phosphorylation on Ser235 and Ser236, 35 days after implantation of LLC cells were determined by western blot analysis.

Data are means \pm SE (n=8/group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$: significantly different from wild type mice (WT). # $p < 0.05$: significantly different from *Mstn*^{-/-} mice.

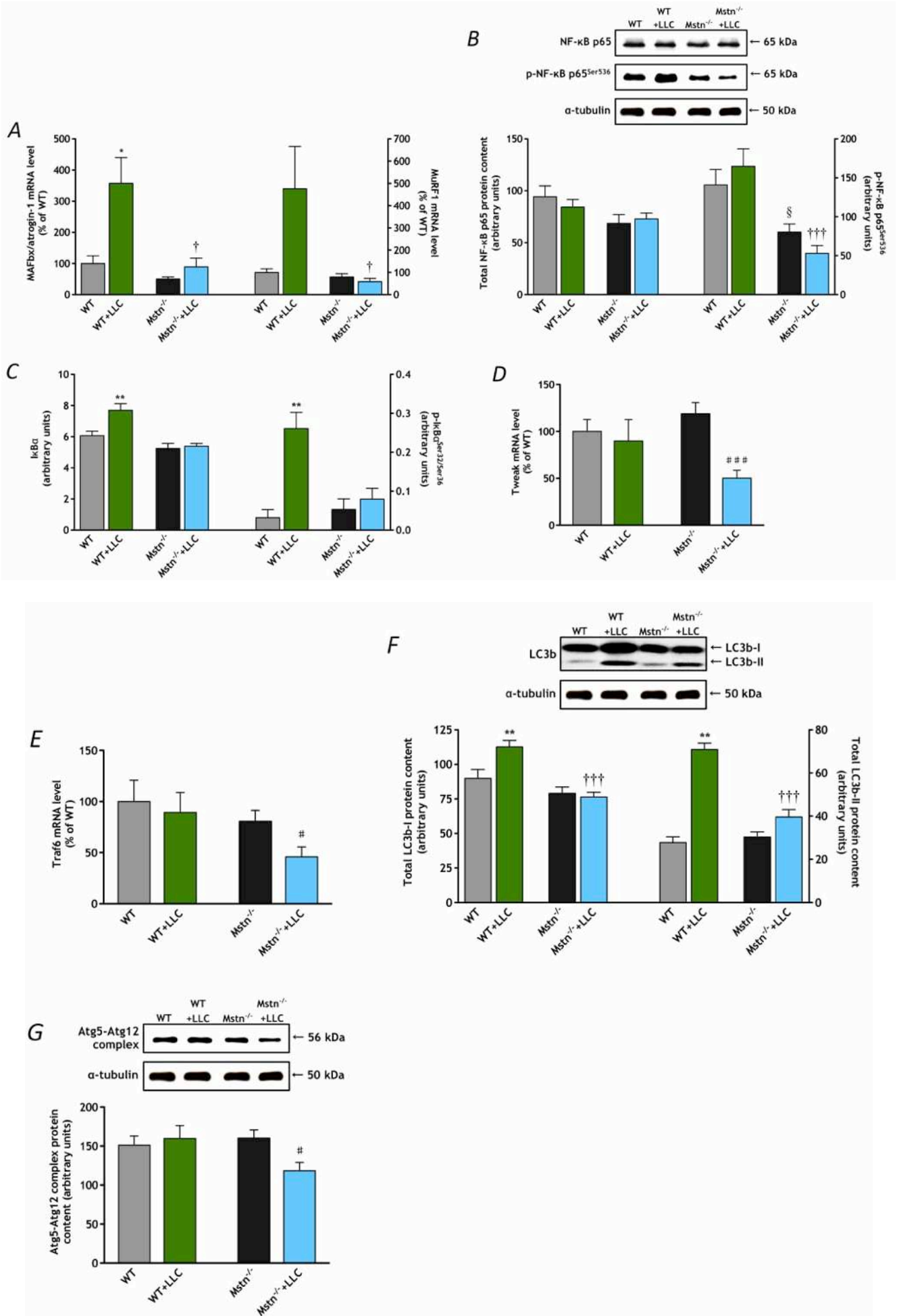


Figure 7. *Mstn* gene invalidation prevents the expression of critical markers of protein catabolism in *gastrocnemius* muscle during cancer cachexia.

(A) MuRF1 and MAFbx/atrogin-1 transcript levels, 35 days after implantation of LLC cells were quantified by qPCR.

(B) NF- κ B p65 protein content and NF- κ B p65 phosphorylation on Ser536, 35 days after implantation of LLC cells, was determined by western blot analysis.

(C) I κ B α protein content and I κ B α phosphorylation on Ser32 and Ser36, 35 days after implantation of LLC cells, was determined by Luminex analysis.

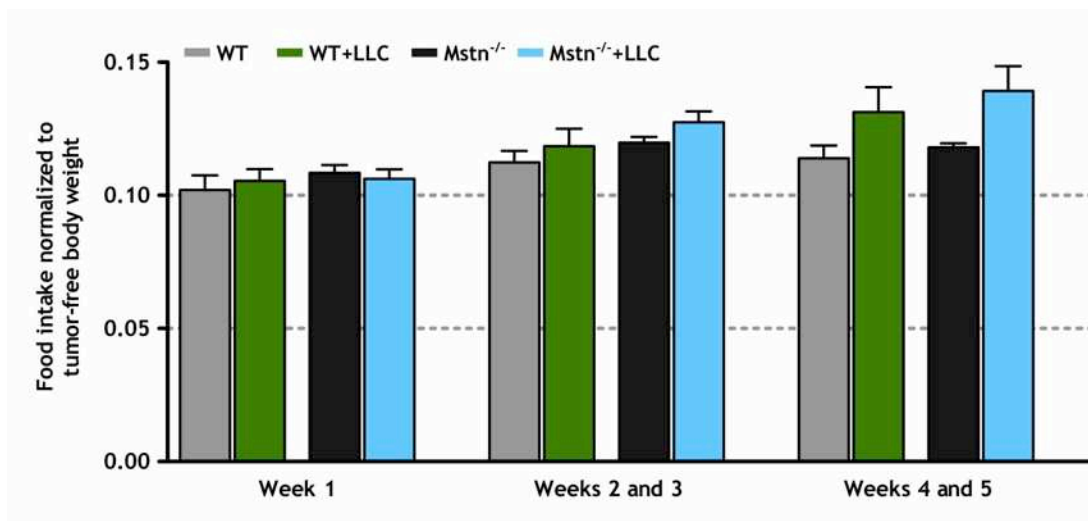
(D) TWEAK transcript level, 35 days after implantation of LLC cells were quantified by qPCR.

(E) TRAF6 transcript level, 35 days after implantation of LLC cells were quantified by qPCR.

(F) LC3b-I and LC3b-II protein content, 35 days after implantation of LLC cells, were determined by western blot analysis.

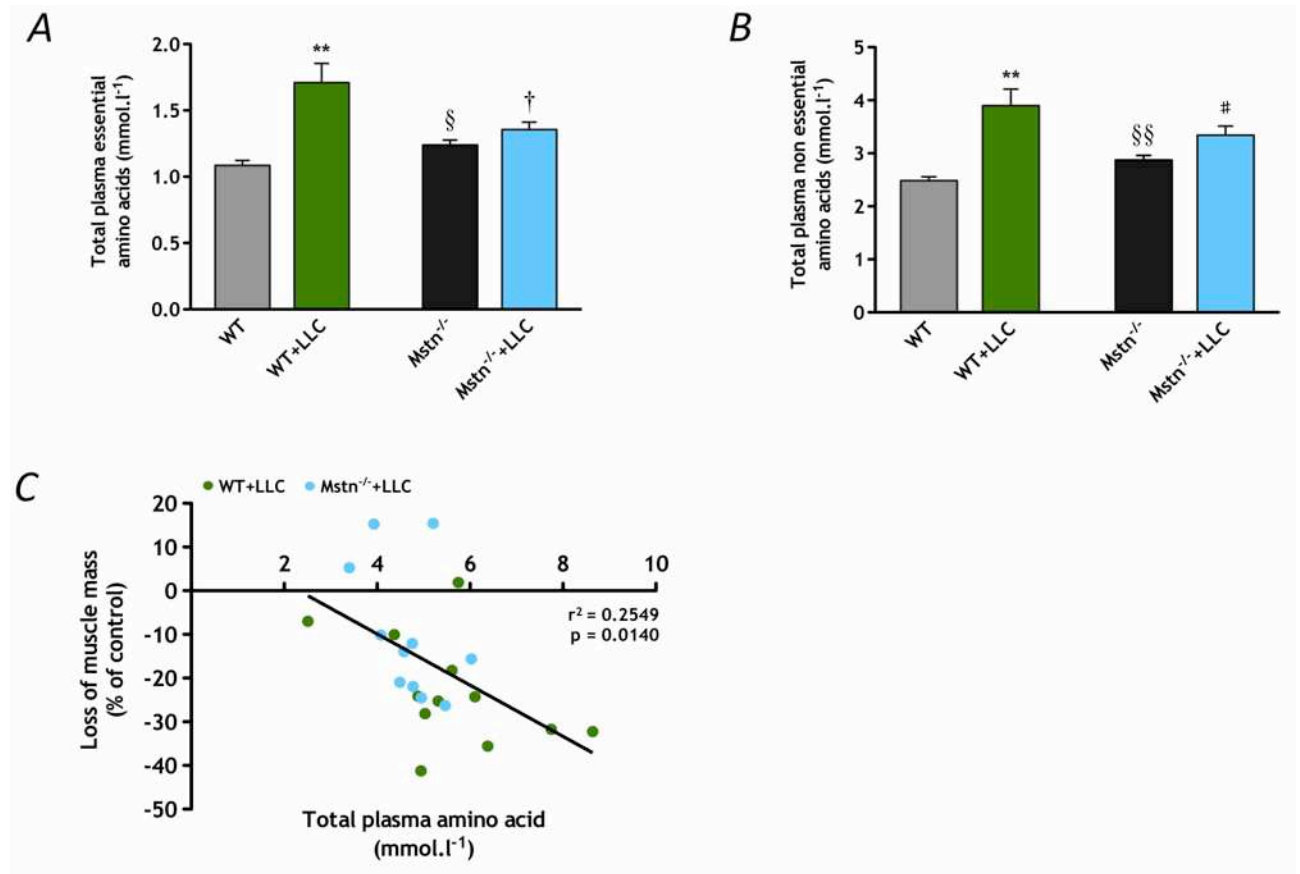
(G) Protein content of Atg5-Atg12 protein complex, 35 days after implantation of LLC cells, was determined by western blot analysis.

Data are means \pm SE (n=8/group). * p < 0.05 and ** p < 0.01: significantly different from wild type mice (WT). § p < 0.05: significantly different from wild type mice (WT). # p < 0.05 and ### p < 0.001: significantly different from *Mstn*^{-/-} mice. † p < 0.05 and ††† p < 0.001: significantly different from wild type tumor-bearing mice (WT+LLC).



Supplemental Figure 1. Food intake normalized to tumor-free body weight over the course of cancer cachexia.

Data are means \pm SE (n=10-12/group).



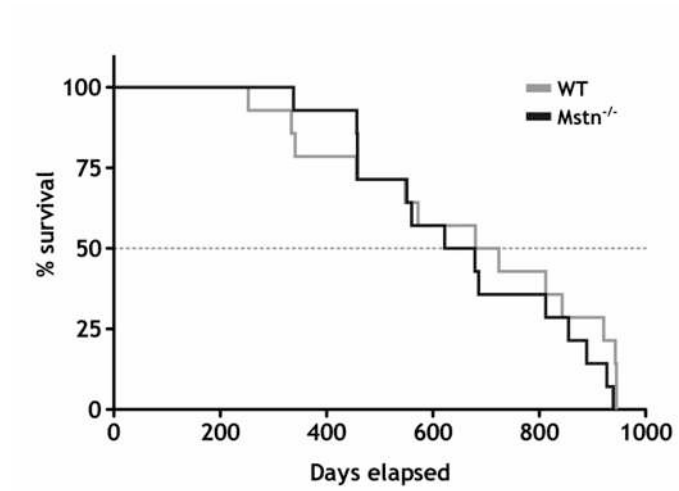
Supplemental Figure 2

(A) Plasma concentration of essential amino acids 35 days after implantation of LLC cells.

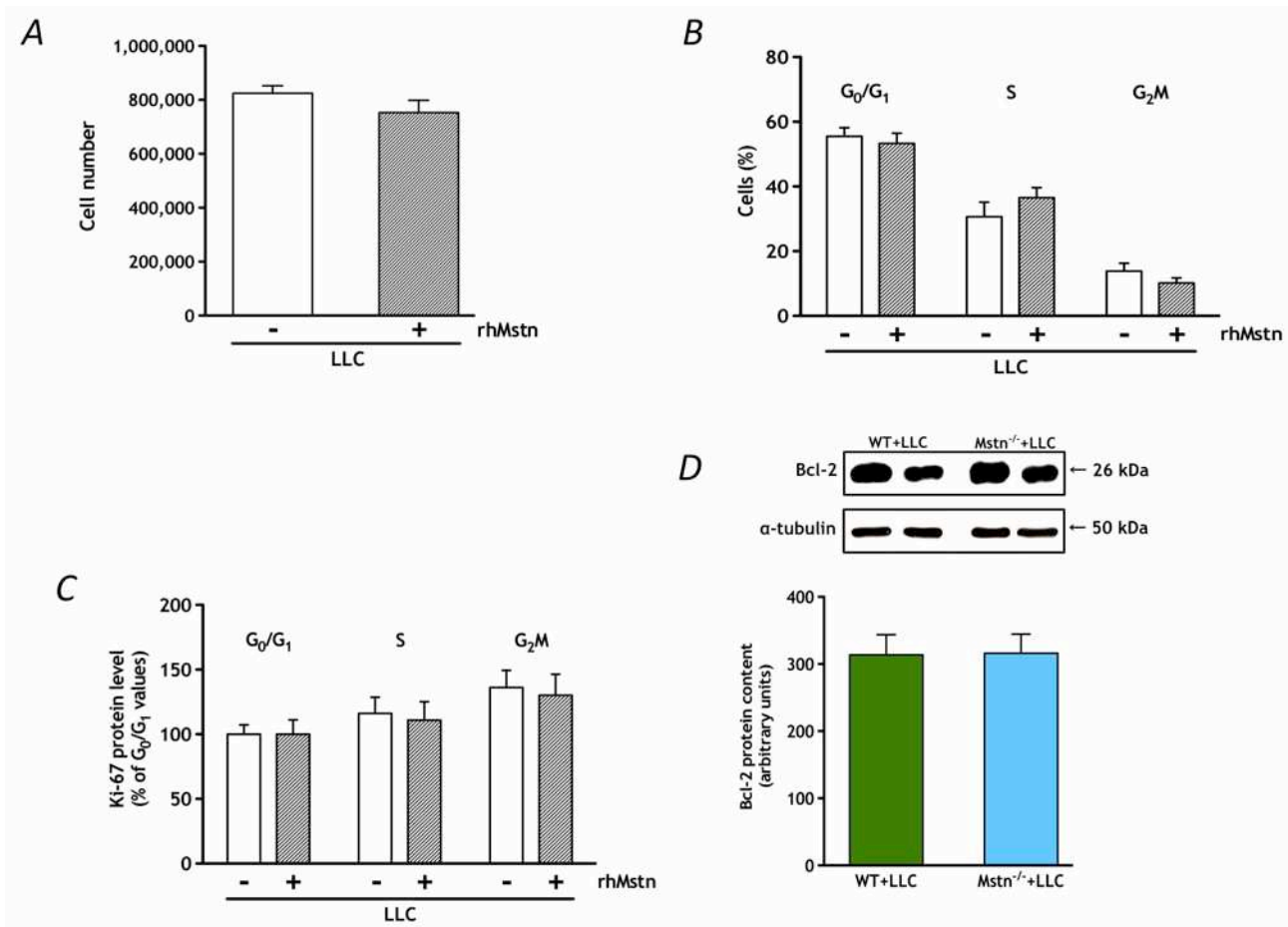
(B) Plasma concentration of non essential amino acids 35 days after implantation of LLC cells.

(C) Linear regression between plasma amino acid concentration and skeletal muscle weight change 35 days after implantation of LLC cells.

Data are means \pm SE (n=10-12/group). ** p < 0.01: significantly different from wild type mice (WT). # p < 0.05: significantly different from *Mstn*^{-/-} mice. § p < 0.05 and §§ p < 0.01: significantly different from wild type mice (WT). † p < 0.05: significantly different from wild type tumor-bearing mice (WT+LLC).



Supplemental Figure 3. Survival rates of wild type (WT; n=14) and *Mstn*^{-/-} mice (n=14).



Supplemental Figure 4. *In vitro* proliferative characteristics of LLC cells and Bcl-2 protein content in tumors.

(A) Number of LLC cells after 48 hours in absence or presence (2.5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) of recombinant human Mstn (rhMstn).

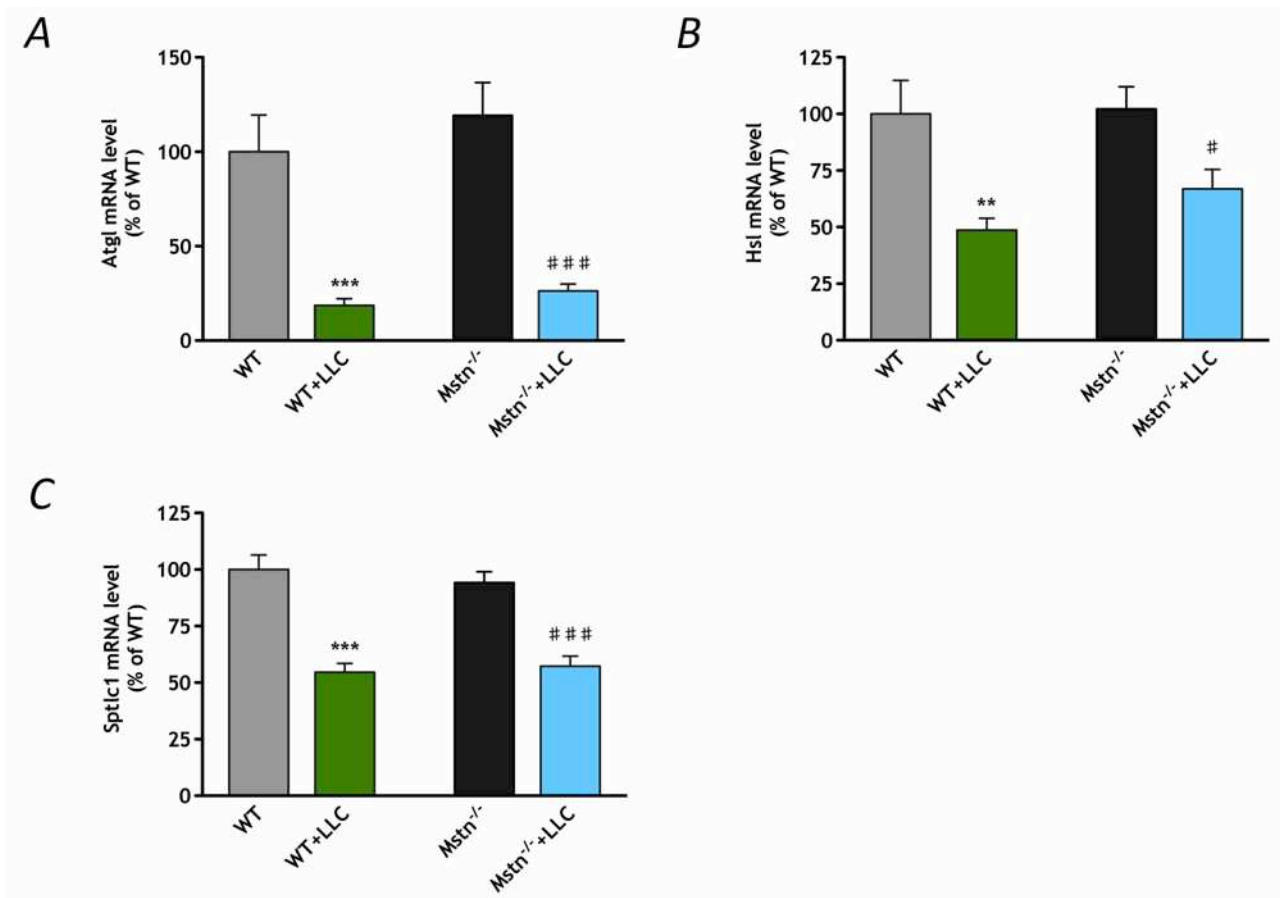
(B) Relative distribution of LLC cells in G₀/G₁, S and G₂M phases determined by FACS analysis after 48 hours in absence or presence of rhMstn.

(C) Expression of Ki-67 by LLC cells after 48 hours in absence or presence of rhMstn.

Data are means \pm SE (n=5-6 independent experiments).

(D) Bcl-2 protein content in the tumors of wild type (WT+LLC) and Mstn^{-/-} mice (Mstn^{-/-}+LLC) 35 days after implantation of LLC cells.

Data are means \pm SE (n=8/group).



Supplemental Figure 5. mRNA level of adipose triglyceride lipase (Atgl), hormone-sensitive lipase (Hsl) and serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1 (Sptlc1) in adipose tissue 35 days after implantation of LLC cells.

(A) Atgl transcript level, 35 days after implantation of LLC cells were quantified by qPCR.

(B) Hsl transcript level, 35 days after implantation of LLC cells were quantified by qPCR.

(C) Sptlc1 transcript level, 35 days after implantation of LLC cells were quantified by qPCR.

Data are means \pm SE (n=8/group). ** p < 0.01 and *** p < 0.001: significantly different from wild type mice (WT). # p < 0.05 and ### p < 0.001: significantly different from *Mstn*^{-/-} mice.

DISCUSSION

Cancer-associated cachexia is a devastating syndrome frequently encountered in cancer patients that results in a significant loss of adipose tissue and skeletal muscle, which cannot be reversed by classical nutritional interventions. In addition to markedly reduce patient life quality, cancer-associated cachexia is of poor prognosis being involved in an increased toxicity from chemotherapy and a decreased survival (DeWys *et al.*, 1980; Bruera, 1997; Ross *et al.*, 2004; Arrieta *et al.*, 2010). Despite the major clinical relevance of understanding the pathogenesis of cancer-associated cachexia, the molecular mechanisms involved in cancer-associated cachexia are only beginning to emerge (Zhou *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2011; De Larichaudy *et al.*, 2012; Penna *et al.*, 2013b). The findings of the present study in LLC tumor-bearing mouse and *Apc*^{Min/+} mouse provide experimental evidence that *Mstn* is a critical determinant of cancer-associated cachexia: *i)* *Mstn* gene invalidation reduced tumor growth, *ii)* *Mstn* gene invalidation prevented skeletal muscle loss during cancer cachexia, *iii)* *Mstn* gene invalidation markedly prolonged lifespan of tumor-bearing animals and *Apc*^{Min/+} mice, *iv)* *Mstn* gene invalidation attenuated the accumulation of ceramides in skeletal muscle, and *v)* *Mstn* gene invalidation attenuated the expression/activation of key regulators of protein degradation in tumor-bearing mice. These findings open interesting avenues for therapeutic strategies for treating cancer cachexia.

The present study shows that resistance to loss of skeletal muscle induced by *Mstn* gene invalidation is associated with increased survival in LLC tumor-bearing mice. Survival was also dramatically increased in *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{+/-} and *Apc*^{Min/+}/*Mstn*^{-/-} mice. A previous study by Zhou *et al.* reported that pharmacological blockade of *Mstn* signaling prevented muscle wasting (Zhou *et al.*, 2010). The same experimental strategy has also been shown to result in

an improvement in muscle weight, together with an increase in muscle force (Busquets *et al.*, 2012b). Taken together, these data raise the question about the mechanisms triggered by *Mstn* gene invalidation or Mstn signaling blockade to prolong survival. Although an association between preservation of skeletal muscle mass and survival does not prove causality, mechanistic links between these factors are biologically possible. Skeletal muscle constitutes an important reservoir of amino acids and a decrease in this amino acid reservoir may alter biological functions. An increase circulating pool of amino acids, due to excessive skeletal muscle protein degradation, may increase the availability of glucogenic precursors for liver neoglucogenesis, and ultimately provides energy in glucose form for tumor metabolism (Argiles & Lopez-Soriano, 1991). Acute respiratory failure (often associated with a respiratory infection) is frequently a fatal event in cancer patients (Nava & Cuomo, 2004). Preservation of muscle mass and function would be therefore of interest by maintaining respiratory muscle function and could thus contribute to prolong lifespan. Finally, preservation of skeletal muscle mass is also critical to limit the decrease in physical activity that occurs with the advancement of the disease, and ultimately to delay whole body deconditioning (Garcia-Aymerich *et al.*, 2006).

Our data clearly identify that *Mstn* gene invalidation preserves skeletal muscle mass during cancer cachexia in mice by attenuating the activation of proteolytic pathways, including ubiquitin-proteasome and autophagy lysosome pathways, without attenuating the decrease in Akt/mTOR pathway. However, we cannot also exclude the possibility that earlier during the time course of LLC tumor growth-induced cachexia, a differential regulation of Akt/mTOR pathway had occurred in wild type and tumor-bearing mice. These data are consistent with a mechanism whereby upstream events that regulate proteolytic pathways are also regulated in response to *Mstn* gene invalidation. A resistance of skeletal muscle to

the action of cachectic mediators could have been developed in *Mstn*^{-/-} mice, thus limiting the activation of downstream signaling events in response to cancer cachexia. We are currently investigating this hypothesis. Our data also suggest that the production of extracellular atrophic signals is attenuated in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice, thus leading to the preservation of skeletal muscle. Production of inflammatory cytokines in response to tumor growth could be therefore an upstream regulatory event that may determine the extent of the cachectic response. Interestingly, circulating levels of catabolic cytokines is considerably lowered in *Mstn*^{-/-} compared to wild type mice under normal conditions (Gallot *et al.*, unpublished observations). It remains therefore to determine whether *Mstn* gene invalidation favorably regulates the production of inflammatory cytokines by the immune system and whether this could contribute to slow down skeletal muscle mass loss. Interestingly, expression of TWEAK, a powerful skeletal muscle-wasting cytokine (Dogra *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 2010), was markedly reduced in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice. TWEAK has been shown to activate NF-κB signaling, which is in accordance with the regulation of NF-κB signaling observed in *Mstn*^{-/-} mice. Similarly, expression of TRAF6, an E3 ubiquitin ligase and adaptor protein required for the activation of NF-κB in response to TWEAK (Paul *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2012), was also down-regulated in *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice. Overall, these data indicate that *Mstn* contributes to the regulation of TWEAK expression in response to cancer cachexia. They also suggest that TWEAK could be an important target for preventing skeletal muscle mass loss in response to cancer cachexia.

The present study shows that *Mstn* gene invalidation reduces tumor growth. This has been previously reported in response to *Mstn* signaling blockade using a soluble ActRIIB (Busquets *et al.*, 2012b), even though other investigators did not report such an observation by using the same experimental strategy (Zhou *et al.*, 2010). Our data showing that *Mstn*

gene invalidation markedly alters the expression of genes involved in tumor cell metabolism and proliferation, and increases apoptosis, suggest that *Mstn* gene invalidation may directly regulate tumor growth and/or that *Mstn* gene invalidation has triggered adaptive response(s) in other tissues than skeletal muscle to regulate tumor growth and metabolism. The first possibility can be reasonably excluded, as *Mstn* *per se* did not directly regulate proliferation of LLC cells *in vitro*. Therefore, beyond specific effects on skeletal muscle tissue, we cannot exclude the possibility that the contribution of *Mstn* gene invalidation to the regulation of tumor growth is a developmental effect that is exerted on other tissue(s).

The anti-tumoral effect of *Mstn* gene invalidation could contribute to increase the survival of *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice. However, when a covariance analysis was used to account for differences in tumor weight, survival rate was still significantly increased, suggesting that the anti-tumorigenic effect triggered by *Mstn* gene invalidation is not the main determinant to prolong survival of *Mstn*^{-/-} tumor-bearing mice.

Recent evidence from murine adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase knockout mice suggesting that a fat-muscle crosstalk is a critical regulator in the development of muscle mass loss during cancer cachexia (Das *et al.*, 2011). Ceramides produced from fatty acids resulting from excessive triglyceride hydrolysis could constitute metabolic messengers involved in fat tissue-skeletal muscle communication. Indeed, circulating concentration of free fatty acids is increased in response to cancer cachexia in animal models (Busquets *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2013). Furthermore, ceramides have been also recently involved in tumor-induced skeletal muscle atrophy (De Larichaudy *et al.*, 2012), an effect that could be attributed to the regulation of Akt/mTOR pathway (De Larichaudy *et al.*, 2012; Jaafar *et al.*, 2013), apoptosis (Turpin *et al.*, 2006) and oxidative stress (Ferreira *et al.*, 2010). Our observation that *Mstn* gene invalidation reduced ceramide

muscle content and attenuated the ceramide accumulation in skeletal muscle induced by tumor growth is in agreement with this hypothesis. Furthermore, the strong relationship between muscle ceramide content and skeletal muscle mass loss further supports this hypothesis. This also suggests that triglyceride lipolysis of adipose tissue could constitute an important source of fatty acid for ceramide biosynthesis. *Mstn*^{-/-} mice have been reported to have a lower fat content tissue (Lin *et al.*, 2002; McPherron & Lee, 2002), an effect that has been attributed to a reduced adipogenesis (Kim *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2002). This phenotypical feature could be beneficial during the course of cancer-associated cachexia by limiting the whole amount of triglyceride that could be hydrolyzed, thereby contributing to a lower production of fatty acids and ultimately to a lower accumulation of ceramide species in skeletal muscle. The molecular mechanisms leading to a reduction in the ceramide accumulation in skeletal muscle will be important issues for future study.

In summary, our data are consistent with the view that *Mstn* plays a critical role in the pathogenesis of cancer-associated cachexia. The absence of *Mstn* reduces tumor growth and prevents skeletal muscle mass loss, while prolonging survival. Thus targeting *Mstn* could be of major clinical relevance in improving quality of life and increasing survival. Whether the resistance of skeletal muscle to cachexia is a consequence of molecular adaptations triggered by the absence of *Mstn* in skeletal muscle and/or due to altered endocrine signaling from the tumor, immune system and other organs remains to be elucidated. Wasting associated with cancer has long been recognized as a prognostic factor in patients with cancer. From a clinical point of view, our data suggest that skeletal muscle has a strong implication for prognosis in cancer patients and that assessment of body composition may be useful in the clinical evaluation of patients with cancer.

ACKNOWLEDGMENTS

Thierry Busso and Damien Lacroix are gratefully acknowledged. Fabienne Jospin and Olivier Delézay are acknowledged for their help in using the Luminex. Ghislaine Roux is acknowledged for their help in animal care. Guénaëlle Bouët is also gratefully acknowledged for her help and constant support. This study was supported by grants from the Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) and the Institut National du Cancer (INCa).

SUPPLEMENTAL MATERIEL

Flow cytometer analyses

LLC cells (ATCC) were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% P/S at 37°C and 5% CO₂ in air on 6-well microplate (growth area 9.5 cm²). LLC cells were incubated in presence (2.5 µg.ml⁻¹) or in absence of recombinant human Mstn (Shenandoah Biotechnology, Inc., Warwick, PA, USA). After 48 h of proliferation, cells were trypsinized for 3 min at 37°C, harvested and centrifuged at 120 g for 7 min. Then, cells were resuspended with growth medium, and counted. Finally, cells were stained with an antibody anti-Ki-67 (Millipore, Molsheim, France) and with Hoechst 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were analyzed on a FACSDiva (BD Biosciences, San José, CA, USA) equipped with an Enterprise II argon ion laser (Coherent, Palo Alto, CA, USA). All analyses were performed as a function of LLC cell position G₀/G₁, S, and G₂M phases of the cell cycle. Data were analyzed using BD Diva 4.1.2 or BD Cell Quest Pro 4.0.2. Cell cycle was analyzed with ModFitLT V3.1.

REFERENCES

- Allen DL, Cleary AS, Lindsay SF, Loh AS & Reed JM. (2010a). Myostatin expression is increased by food deprivation in a muscle-specific manner and contributes to muscle atrophy during prolonged food deprivation in mice. *J Appl Physiol* **109**, 692-701.
- Allen DL, McCall GE, Loh AS, Madden MC & Mehan RS. (2010b). Acute daily psychological stress causes increased atrophic gene expression and myostatin-dependent muscle atrophy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **299**, R889-898.
- Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, Agaimy A, Marienhagen J, Weiss TS, Stoeltzing O, Warnecke C, Scholmerich J, Oefner PJ, Kreutz M, Bosserhoff AK & Hellerbrand C. (2009). GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *The American journal of pathology* **174**, 1544-1552.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A & Freyssenet D. (2009). Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* **150**, 286-294.
- Andreyev HJ, Norman AR, Oates J & Cunningham D. (1998). Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *Eur J Cancer* **34**, 503-509.
- Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1991). The energy state of tumor-bearing rats. *J Biol Chem* **266**, 2978-2982.
- Arrieta O, Michel Ortega RM, Villanueva-Rodriguez G, Serna-Thome MG, Flores-Estrada D, Diaz-Romero C, Rodriguez CM, Martinez L & Sanchez-Lara K. (2010). Association of nutritional status and serum albumin levels with development of toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with paclitaxel-cisplatin chemotherapy: a prospective study. *BMC Cancer* **10**, 50.
- Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG & Zimmers TA. (2010). Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1548-1554.
- Berthon P, Duguez S, Favier FB, Amirouche A, Feasson L, Vico L, Denis C & Freyssenet D. (2007). Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflugers Arch* **454**, 625-633.
- Bligh EG & Dyer WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**, 911-917.

- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ & Yancopoulos GD. (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* **3**, 1014-1019.
- Bonetto A, Penna F, Minero VG, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM & Costelli P. (2009). Deacetylase inhibitors modulate the myostatin/follistatin axis without improving cachexia in tumor-bearing mice. *Curr Cancer Drug Targets* **9**, 608-616.
- Bruera E. (1997). ABC of palliative care. Anorexia, cachexia, and nutrition. *BMJ* **315**, 1219-1222.
- Busquets S, Carbo N, Almendro V, Figueras M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2001). Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia? *FEBS Lett* **505**, 255-258.
- Busquets S, Toledo M, Orpi M, Massa D, Porta M, Capdevila E, Padilla N, Frailis V, Lopez-Soriano FJ, Han HQ & Argiles JM. (2012). Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **3**, 37-43.
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ & Shoelson SE. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119**, 285-298.
- Cheung WW, Rosengren S, Boyle DL & Mak RH. (2008). Modulation of melanocortin signaling ameliorates uremic cachexia. *Kidney Int* **74**, 180-186.
- Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, Bonelli G, Doglietto GB, Baccino FM & Rossi Fanelli F. (2008). Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest* **38**, 531-538.
- Das SK, Eder S, Schauer S, Diwoky C, Temmel H, Guertl B, Gorkiewicz G, Tamilarasan KP, Kumari P, Trauner M, Zimmermann R, Vesely P, Haemmerle G, Zechner R & Hoefler G. (2011). Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science* **333**, 233-238.
- Davidson W, Ash S, Capra S & Bauer J. (2004). Weight stabilisation is associated with improved survival duration and quality of life in unresectable pancreatic cancer. *Clin Nutr* **23**, 239-247.

- De Larichaudy J, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, Dessalle K, Desgeorges M, Piraud M, Cheillan D, Vidal H, Lefai E & Nemoz G. (2012). TNF-alpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skeletal muscle* **2**, 2.
- DeWys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO, Jr., Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW & Tormey DC. (1980). Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *The American journal of medicine* **69**, 491-497.
- Dogra C, Changotra H, Mohan S & Kumar A. (2006). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis inhibits skeletal myogenesis through sustained activation of nuclear factor-kappaB and degradation of MyoD protein. *J Biol Chem* **281**, 10327-10336.
- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Padeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A & Freyssenet D. (2007). Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* **148**, 3140-3147.
- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R & Anker SD. (2008). Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* **27**, 793-799.
- Favier FB, Benoit H & Freyssenet D. (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch* **456**, 587-600.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S & Baracos VE. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The lancet oncology* **12**, 489-495.
- Fearon KC. (1992). The Sir David Cuthbertson Medal Lecture 1991. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society* **51**, 251-265.
- Ferreira LF, Moylan JS, Gilliam LA, Smith JD, Nikolova-Karakashian M & Reid MB. (2010). Sphingomyelinase stimulates oxidant signaling to weaken skeletal muscle and promote fatigue. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C552-560.
- Fouladiun M, Korner U, Bosaeus I, Daneryd P, Hyltander A & Lundholm KG. (2005). Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer* **103**, 2189-2198.

- Garcia-Aymerich J, Lange P, Benet M, Schnohr P & Anto JM. (2006). Regular physical activity reduces hospital admission and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a population based cohort study. *Thorax* **61**, 772-778.
- George I, Bish LT, Kamalakkannan G, Petrilli CM, Oz MC, Naka Y, Sweeney HL & Maybaum S. (2010). Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *European journal of heart failure* **12**, 444-453.
- Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM & Thissen JP. (2007). Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* **148**, 452-460.
- Glass DJ. (2010). PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Current topics in microbiology and immunology* **346**, 267-278.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A & Goldberg AL. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14440-14445.
- Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S & Bhasin S. (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14938-14943.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R & Georges M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nat Genet* **17**, 71-74.
- Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R & Georges M. (2003). Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis* **35**, 227-238.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M & et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589-600.
- Gruson D, Ahn SA, Ketelslegers JM & Rousseau MF. (2011). Increased plasma myostatin in heart failure. *European journal of heart failure* **13**, 734-736.
- Hanada K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1632**, 16-30.
- Hayot M, Rodriguez J, Vernus B, Carnac G, Jean E, Allen D, Goret L, Obert P, Candau R & Bonniou A. (2011). Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. *Mol Cell Endocrinol* **332**, 38-47.

- Hojjati MR, Li Z & Jiang XC. (2005). Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta* **1737**, 44-51.
- Holland WL & Summers SA. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocrine reviews* **29**, 381-402.
- Hornemann T, Penno A, Rutti MF, Ernst D, Kivrak-Pfiffner F, Rohrer L & von Eckardstein A. (2009). The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J Biol Chem* **284**, 26322-26330.
- Huang J, Das SK, Jha P, Al Zoughbi W, Schauer S, Claudel T, Sexl V, Vesely P, Birner-Gruenberger R, Kratky D, Trauner M & Hoefler G. (2013). The PPARalpha agonist fenofibrate suppresses B-cell lymphoma in mice by modulating lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1555-1565.
- Jaafar R, De Larichaudy J, Chanon S, Euthine V, Durand C, Naro F, Bertolino P, Vidal H, Lefai E & Nemoz G. (2013). Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling. *Cell Commun Signal* **11**, 55.
- Jeong J, Conboy MJ & Conboy IM. (2013). Pharmacological inhibition of myostatin/TGF-beta receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. *Acta pharmacologica Sinica* **34**, 1052-1060.
- Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL & Baile CA. (2001). Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 902-906.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M & Agostinis P. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544.
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE & Goldberg AL. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 39-51.
- Lee SJ & McPherron AC. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9306-9311.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH & Parsons R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947.

- Lin J, Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL & Baile CA. (2002). Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 701-706.
- Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R & Sun LQ. (2008). Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene Ther* **15**, 155-160.
- Maehama T & Dixon JE. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S & Sandri M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* **6**, 458-471.
- Man WD-C, Natanek SA, Riddoch-Contreras J, Lewis A, Marsh GS, Kemp PR & Polkey MI. (2010). Quadriceps myostatin expression in COPD. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* **36**, 686-688.
- McKay BR, Ogborn DI, Bellamy LM, Tarnopolsky MA & Parise G. (2012). Myostatin is associated with age-related human muscle stem cell dysfunction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 2509-2521.
- McPherron AC, Lawler AM & Lee SJ. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90.
- McPherron AC & Lee SJ. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12457-12461.
- McPherron AC & Lee SJ. (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* **109**, 595-601.
- Mehl KA, Davis JM, Berger FG & Carson JA. (2005). Myofiber degeneration/regeneration is induced in the cachectic ApcMin/+ mouse. *J Appl Physiol* **99**, 2379-2387.
- Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, Lach-Trifilieff E, Wauters S, Li H, Makonchuk DY, Glass DJ & Kumar A. (2010). The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Cell Biol* **188**, 833-849.
- Morley JE, Thomas DR & Wilson MM. (2006). Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *The American journal of clinical nutrition* **83**, 735-743.
- Moser AR, Pitot HC & Dove WF. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322-324.

- Nava S & Cuomo AM. (2004). Acute respiratory failure in the cancer patient: the role of non-invasive mechanical ventilation. *Critical reviews in oncology/hematology* **51**, 91-103.
- Paul PK, Bhatnagar S, Mishra V, Srivastava S, Darnay BG, Choi Y & Kumar A. (2012). The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Molecular and cellular biology* **32**, 1248-1259.
- Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y & Kumar A. (2010). Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J Cell Biol* **191**, 1395-1411.
- Penna F, Costamagna D, Pin F, Camperi A, Fanzani A, Chiarpotto EM, Cavallini G, Bonelli G, Baccino FM & Costelli P. (2013). Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *The American journal of pathology* **182**, 1367-1378.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Prado CM, Lieffers JR, McCargar LJ, Reiman T, Sawyer MB, Martin L & Baracos VE. (2008). Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *The lancet oncology* **9**, 629-635.
- Rapisarda A & Melillo G. (2012). Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Advances in cancer research* **114**, 237-267.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* **3**, 1009-1013.
- Ross PJ, Ashley S, Norton A, Priest K, Waters JS, Eisen T, Smith IE & O'Brien ME. (2004). Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? *Br J Cancer* **90**, 1905-1911.
- Ryan AS, Ivey FM, Prior S, Li G & Hafer-Macko C. (2011). Skeletal muscle hypertrophy and muscle myostatin reduction after resistive training in stroke survivors. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **42**, 416-420.
- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T & Toriumi W. (1999). I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* **274**, 30353-30356.
- Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, Nakano H, Okazaki T, Chino A, Doi T & Saiki I. (2003). Tumor necrosis factor- α -induced IKK phosphorylation of NF- κ B p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **278**, 36916-36923.

- Souza TA, Chen X, Guo Y, Sava P, Zhang J, Hill JJ, Yaworsky PJ & Qiu Y. (2008). Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators. *Mol Endocrinol* **22**, 2689-2702.
- Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA & Dove WF. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* **256**, 668-670.
- Tan BH & Fearon KC. (2008). Cachexia: prevalence and impact in medicine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**, 400-407.
- Tisdale MJ. (2002). Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **2**, 862-871.
- Tisdale MJ. (2009). Mechanisms of cancer cachexia. *Physiological reviews* **89**, 381-410.
- Tisdale MJ. (2010). Cancer cachexia. *Current opinion in gastroenterology* **26**, 146-151.
- Turpin SM, Lancaster GI, Darby I, Febbraio MA & Watt MJ. (2006). Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1341-1350.
- van Royen M, Carbo N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2000). DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 533-537.
- Warren S. (1932). The Immediate Causes of Death in Cancer. *Am J Med Sci* **184**, 610-615.
- Wyke SM, Russell ST & Tisdale MJ. (2004). Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* **91**, 1742-1750.
- Wyke SM & Tisdale MJ. (2005). NF-kappaB mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Br J Cancer* **92**, 711-721.
- Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J & Gonzalez-Cadavid NF. (2002). Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J Nutr Health Aging* **6**, 343-348.
- Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M & Cagle PT. (1997). Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* **80**, 1046-1051.

- Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, Song Y, Min H, Wang X, Du J & Mitch WE. (2011). Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 1653-1663.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* **6**, 472-483.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL & Han HQ. (2010). Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* **142**, 531-543.
- Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM & Lee SJ. (2002). Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296**, 1486-1488.

Discussion

Tumeur	Histopathologie	Hôte
Colôn-26 (C26)	Carcinome colique	Souris BALB/c
Lewis lung carcinoma (LLC)	Carcinome pulmonaire	Souris C57BL/6
MAC16	Adénocarcinome colique	Souris NMRI
MCG-101	Sarcome	Souris C57BL/6J
Yoshida AH-130 (YAH-130)	Hépatome ascitique	Rat Wistar
Walker-256	Carcinosarcome	Rat Sprague Dawley

Tableau 12 : Modèles de tumeurs transplantables les plus utilisés pour l'étude de la cachexie associée au cancer.

Les principaux résultats obtenus au cours de notre étude sont les suivants :

- 1- L'inactivation du gène de la Mstn réduit la croissance tumorale.
- 2- L'inactivation du gène de la Mstn prévient la perte de masse musculaire au cours de la cachexie associée au cancer.
- 3- L'inactivation du gène de la Mstn prolonge d'une manière marquée la durée de vie de deux modèles murins cachectiques.
- 4- L'inactivation du gène de la Mstn atténue l'accumulation de céramides dans le muscle squelettique au cours de la cachexie associée au cancer.
- 5- L'inactivation du gène de la Mstn atténue l'expression/activation de régulateurs clés de la dégradation des protéines chez les souris cachectiques.

I. Discussion des aspects méthodologiques de notre étude

Les modèles expérimentaux de cachexie associée au cancer sont majoritairement des modèles murins porteurs de tumeurs transplantables (Emery, 1999). Le tableau ci-avant présente les modèles de tumeurs transplantables les plus utilisés et leurs hôtes, pour l'étude de la cachexie associée au cancer ([Tableau 12](#)).

1. Le modèle LLC

Dans notre étude, nous avons utilisé des souris de souche C57BL/6J, inoculées avec des cellules LLC. C'est probablement le modèle le plus couramment utilisé en recherche, dans le cas de la cachexie associée au cancer chez la souris (Holecek, 2012). Les cellules LLC originelles sont issues du développement spontané de carcinome pulmonaire de souris C57BL, en 1951, dans le laboratoire du Docteur Margaret R. Lewis à l'Institut Wistar (Sugiura & Stock, 1955). Les cellules LLC utilisées dans notre modèle cachectique proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1642™). Elles présentent un temps de doublement *in vitro* d'environ 21 heures, et *in vivo* d'environ 23 heures quand la masse tumorale pèse 0.1 g (Bertram & Janik, 1980). Ces cellules utilisées *in vivo* chez la souris provoquent une cachexie marquée (Llovera *et al.*, 1998c; van Royen *et al.*, 2000).

Référence	Nombre de cellules LLC injectées	Mode d'inoculation	Âge / poids des souris	Durée du protocole	Muscle (perte de masse musculaire en %)
Ohe et al., <i>Br J Cancer</i> . 1993 May;67(5):939-44.	1 x 10 ⁶	Sous-cutané (flanc)		Jusqu'à la mort	
Llovera et al., <i>Cancer Lett</i> . 1998 Aug 14;130(1-2):19-27.	0.5 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)		15 jours	gastrocnemius (22%)
Llovera et al., <i>Mol Cell Endocrinol</i> . 1998 Jul 25;142(1-2):183-9.	0.5 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)		15 jours	gastrocnemius (26%)
Eli et al., <i>Biochem Pharmacol</i> . 2001 Mar 1;61(5):565-71.	0.2 x 10 ⁶	Sous-cutané (patte)	8 à 10 semaines		
van Royen et al., <i>Biochem Biophys Res Commun</i> . 2000 Apr 13;270(2):533-7.	0.375 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)	25 g	15 jours	gastrocnemius (23%) ; tibialis (25%) ; soleus (36%) ; extensor digitorum longus (38%)
Marks et al., <i>Cancer Res</i> . 2001 Feb 15;61(4):1432-8.	1 x 10 ⁶	Sous-cutané (flanc)	4 semaines		
Carbo et al., <i>Br J Cancer</i> . 2002 Mar 18;86(6):1012-6.	0.5 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)	25 g	15 jours	gastrocnemius (26%)
Busquets et al., <i>Cancer Res</i> . 2004 Sep 15;64(18):6725-31.	0.5 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)	12 semaines	15 jours	gastrocnemius (13%) ; tibialis (21%) ; soleus (18%)
Carbo et al., <i>Int J Mol Med</i> . 2004 Oct;14(4):719-23.	0.5 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)	25 g	15 jours	gastrocnemius (12%) ; tibialis (12%) ; extensor digitorum longus (13%)
Busquets et al., <i>FEBS Lett</i> . 2005 Jan 31;579(3):717-22.	100 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)	20 semaines	15 jours	gastrocnemius (24%) ; tibialis (32%) ; extensor digitorum longus (24%)
Markinson et al., <i>Endocrinology</i> . 2005 Jun;146(6):2766-73.	1 x 10 ⁶	Sous-cutané (flanc)		17 jours	
McCarthy et al., <i>Res Nurs Health</i> . 2006 Apr;29(2):98-104.	0.5 x 10 ⁶	Sous-cutané (entre les omoplates)	15 à 17 g	17 jours	
Graves et al., <i>Res Nurs Health</i> . 2006 Apr;29(2):87-97.	0.5 x 10 ⁶	Sous-cutané (entre les omoplates)		17 jours	
Nicholson et al., <i>J Pharmacol Exp Ther</i> . 2006 May;317(2):771-7.	1 x 10 ⁶	Sous-cutané (flanc)	20 g		
Busquets et al., <i>Clin Nutr</i> . 2007 Apr;26(2):239-44.	0.5 x 10 ⁶	Intramusculaire (cuisse gauche)	12 semaines	15 jours	gastrocnemius (26%) ; tibialis (25%) ; extensor digitorum longus (49%)
Argiles et al., <i>Muscle Nerve</i> . 2008 Feb;37(2):190-5.	0.4 x 10 ⁶	Intramusculaire (patte arrière)	25 g	7 jours	gastrocnemius (4%) ; tibialis posterior (6%) ; soleus (3%) ; extensor digitorum longus (23%)
Argiles et al., <i>Muscle Nerve</i> . 2008 Feb;37(2):190-5.	0.4 x 10 ⁶	Intramusculaire (patte arrière)	25 g	14 jours	gastrocnemius (24%) ; tibialis posterior (28%) ; soleus (23%) ; extensor digitorum longus (24%)
Argiles et al., <i>Muscle Nerve</i> . 2008 Feb;37(2):190-5.	0.4 x 10 ⁶	Intramusculaire (patte arrière)	25 g	19 jours	gastrocnemius (33%) ; tibialis posterior (43%) ; soleus (22%) ; extensor digitorum longus (35%)
Moore-Carrasco et al., <i>Oncol Rep</i> . 2008 Jan;19(1):253-6.	0.5 x 10 ⁶	Intramusculaire (patte)	5 semaines	13 jours	gastrocnemius (34%) ; tibialis (34%) ; soleus (17%) ; extensor digitorum longus (31%)
Benny Klimek et al., <i>Biochem Biophys Res Commun</i> . 2010 Jan 15;391(3):1548-54.	1 x 10 ⁶	Intramusculaire (quadriceps)	12 semaines	14 jours	gastrocnemius (14%) ; quadriceps (12%)

Tableau 13 : Différentes études utilisant le modèle cachectique LLC.

Après des expériences préliminaires faisant varier le nombre de cellules LLC inoculées chez la souris, ainsi qu'une revue de la littérature portant sur les différents modes d'inoculation des cellules LLC, le nombre de cellules LLC à inoculer, la durée du protocole à conduire et le pourcentage de perte de masse musculaire observée suite au protocole (Tableau 13), nous avons décidé de réaliser une injection sous-cutanée de cinq millions de cellules LLC, dans le flanc droit des souris sauvages (WT) et *Mstn*^{-/-}. Contrairement à l'inoculation intramusculaire souvent utilisée, l'injection sous-cutanée nous a semblé être plus judicieuse, puisque la tumeur va se développer aux dépens de l'organisme entier et pourra donc exercer un effet systémique. Nous avons d'ailleurs observé que le poids des muscles *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* et *tibialis anterior* était identique dans le membre inférieur droit et dans le membre inférieur gauche (données non présentées). De plus, ces données montrent que le site d'injection n'avait aucune influence sur la latéralité de la fonte musculaire.

Dans le but d'observer une cachexie associée au cancer marquée d'environ 20%, une étude préliminaire (mémoire de deuxième année de master de Yann Simon Gallot, 2009), nous indiquait que sur la base de l'analyse du volume de la tumeur, une perte de masse musculaire de l'ordre de 20% était observée pour un volume d'environ 10 cm³. Dans notre étude, ce volume correspondait à une durée de protocole d'environ trente-cinq jours.

2. Le modèle *Apc*^{Min/+}

Le modèle animal d'inoculation de cellules tumorales peut présenter des inconvénients. En effet, le comportement de la tumeur peut être différent de celui de la tumeur d'origine en raison de l'interruption des connexions des cellules stromales complexes entre la tumeur et son milieu primaire. De plus, l'angiogenèse et l'invasivité de la tumeur d'origine peuvent ne pas être reproduites, du fait que la tumeur est souvent bien délimitée. Par conséquent, nous avons cherché un second modèle mimant d'avantage le cancer observé chez l'homme. Notre choix s'est porté sur un modèle animal génétiquement modifié qui développe un cancer spontané, la souris *Apc*^{Min/+}. Des mutations dans le gène humain APC (adenomatous polyposis coli) sont impliquées dans l'initiation et le développement de la polypose recto-colique familiale, ainsi que dans des cancers sporadiques du côlon (Grodén *et al.*, 1991). Les individus portant ces mutations germinales, présentent une plus grande propension au développement de polypes adénomateux du

côlon, pouvant progresser en cancer (Grodén *et al.*, 1991). Le phénotype de la souris $Apc^{Min/+}$, possédant une mutation non sens au niveau du codon 850 de l'homologue murin du gène APC, est caractérisé par une anémie et le développement de multiples tumeurs intestinales (Moser *et al.*, 1990; Su *et al.*, 1992). Ces polypes intestinaux se développent dès quatre semaines chez les souris $Apc^{Min/+}$ (Baltgalvis *et al.*, 2008). Après six mois, ces souris deviennent cachectiques, avec une atrophie musculaire marquée (Mehl *et al.*, 2005a), et une importante fonte du tissu adipeux (Baltgalvis *et al.*, 2008). Toutefois, il est à noter que les souris $Apc^{Min/+}$ ont une croissance similaire aux souris sauvages, puisqu'aucune différence au niveau de la longueur du tibia n'a été observée après trois et six mois (Mehl *et al.*, 2005a). Afin d'étudier l'effet de l'inactivation du gène de la Mstn sur le développement de la cachexie associée au cancer, nous avons effectué des croisements entre les souris $Apc^{Min/+}$ et les souris $Mstn^{-/-}$.

II. Discussion des résultats de notre étude

Un certain nombre de résultats ayant été discutés dans le manuscrit de l'article, nous allons ici plus spécifiquement aborder *i)* le rôle de la Mstn dans l'épargne musculaire observée lors de la cachexie associée au cancer, *ii)* l'influence de la Mstn sur la durée de vie des animaux cachectiques, *iii)* l'implication de la Mstn sur la réduction de la croissance tumorale, *iv)* la place des céramides dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer, ainsi que leur mode d'action.

1. Mstn et épargne musculaire

Nous avons tout d'abord écarté l'hypothèse de l'impact du facteur nutritionnel. En effet, nous n'observons pas de modification de la prise alimentaire entre les quatre groupes d'animaux au cours des cinq semaines de protocole. Cette absence d'effet de la croissance tumorale sur la prise alimentaire avait également été rapportée chez le même modèle murin cachectique lors de protocoles d'une durée de deux semaines (Llovera *et al.*, 1998b; Busquets *et al.*, 2004).

Nous avons étudié l'impact de la voie des synthèses protéiques PI3K/Akt/mTOR, qui est généralement réprimée au cours de l'atrophie musculaire observée lors de la cachexie associée au cancer (cf. Chapitre II). Au terme de notre protocole, ceci était confirmé chez les souris WT+LLC et $Mstn^{-/-}$ +LLC. En effet, nous observons une diminution significative de l'état de phosphorylation de 4E-BP1, de $p70^{S6k}$ et de rpS6, ainsi qu'une diminution de la forme

totale de la protéine rpS6, indiquant une moindre activation de la voie des synthèses protéiques dans le muscle squelettique. Toutefois aucune régulation différentielle n'était observée entre les deux génotypes.

Même si la protéolyse n'a pas été directement appréciée, nos données montrent clairement une activation des systèmes protéolytiques ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome chez les souris sauvages. L'absence de variation de l'expression des transcrits MAFbx/atrogin-1 et MuRF1, l'absence de lipidation de LC3b-I, ainsi que la diminution de l'expression du complexe Atg5-Atg12 suggèrent une forte atténuation du catabolisme protéique, ce qui conduit à une épargne musculaire chez les souris *Mstn*^{-/-}+LLC.

2. *Mstn et durée de vie*

Un résultat important de cette étude est, qu'expérimentalement, pour la première fois, nous avons mis en évidence que l'inactivation du gène de la *Mstn* prolonge la durée de vie de deux modèles murins : les souris cachectique LLC et les souris génétiquement modifiées développant un cancer spontané (*Apc*^{Min/+}), indiquant que l'inhibition de la *Mstn* est une stratégie efficace pour ralentir le développement de la cachexie associée au cancer. Il est à noter qu'une étude majeure conduite par Xiaolan Zhou avait déjà montré, chez quatre modèles murins cachectiques, que le blocage de la *Mstn* et/ou de la signalisation de l'activine prévenait l'atrophie musculaire voire augmentait la masse musculaire, et allongeait la durée de vie (Zhou *et al.*, 2010). Néanmoins, ce blocage était réalisé à l'aide du sActRIIB, un récepteur soluble leurre du ActRIIB, fixant la *Mstn* et l'activine A (ActA) (Lee *et al.*, 2005). L'ActA est un régulateur négatif de la masse musculaire (Lee *et al.*, 2005; Gilson *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010). Par conséquent dans l'étude de Xiaolan Zhou (Zhou *et al.*, 2010), les effets de la *Mstn* et de l'ActA sont bloqués simultanément, et il est donc impossible de différencier les effets du blocage de la *Mstn* et de l'ActA, sur la cachexie associée au cancer, contrairement à notre étude.

Les facteurs mis en jeu dans l'augmentation de la durée de vie restent à déterminer, mais il est probable que la préservation de la masse musculaire puisse y contribuer. En cas de cancer, les protéines sont mobilisées pour la croissance tumorale ainsi que pour le maintien de l'intégrité de l'organisme. Le muscle squelettique étant un énorme réservoir de protéines (Hoppeler, 1986), il constitue un tissu de soutien important pour ces deux processus. Il est possible que la masse musculaire importante des souris *Mstn*^{-/-} permette à

l'organisme de maintenir son intégrité sur une période plus longue. De plus, il est aussi envisageable que les muscles des souris *Mstn*^{-/-} soient plus résistants à la perte de masse musculaire. Cette hypothèse est actuellement testée sur un modèle de cultures primaires de cellules musculaires issues de muscles de souris sauvages et de souris *Mstn*^{-/-}, exposés à des facteurs atrophiants (TNF- α et céramide). Enfin, il est également possible d'envisager que les souris *Mstn*^{-/-} préservent leur fonction respiratoire. En effet, l'atrophie musculaire associée au cancer touche tous les muscles de l'organisme, y compris les muscles respiratoires. Le diaphragme est atrophié au cours de la cachexie associée au cancer (Lima *et al.*, 2013), de plus, il a été observé que sa fonction est altérée dans cette condition (Murphy *et al.*, 2011a; Murphy *et al.*, 2012). Par conséquent, il peut en résulter une défaillance respiratoire et une mort prématurée, qui pourraient être retardées par la présence d'une masse musculaire plus importante et fonctionnelle. Néanmoins, aucune étude n'a rapporté à ce jour, le poids du diaphragme en condition basale chez des souris déficientes pour le gène de la *Mstn*, ni même la fonction respiratoire de ces souris.

3. *Mstn et croissance tumorale*

Un résultat important de cette étude est que l'inactivation du gène de la *Mstn* diminue la croissance tumorale. Contrairement à l'étude de Benny Klimek *et al.* qui n'ont pas montré d'effet de l'inactivation du gène de la *Mstn* sur la croissance tumorale des cellules LLC (Benny Klimek *et al.*, 2010), Silvia Busquets et son équipe ont montré une diminution significative de 15% du poids des tumeurs chez des souris traitées avec sActRIIB, quatorze jours après l'injection de cellules LLC (Busquets *et al.*, 2012b). Cette dernière étude et nos données suggèrent que l'inhibition de la *Mstn* et/ou de sa signalisation a un effet protecteur contre le développement tumoral.

Nos données montrent clairement que l'inactivation du gène de la *Mstn* est responsable d'une augmentation de l'expression/activité de marqueurs de l'apoptose, associée à une réduction du métabolisme tumoral. Ces données suggèrent un rôle crucial pour la *Mstn* dans le contrôle de l'activité tumorale. Par ailleurs, une autre hypothèse de travail est que la *Mstn* serait un activateur direct de la prolifération des cellules LLC, bien qu'elle ait été précédemment décrite comme un régulateur négatif de la croissance des myoblastes (Thomas *et al.*, 2000; Rios *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2001; Joulia *et al.*, 2003), ou de lignées cellulaires issues de rhabdomyosarcome (Ricaud *et al.*, 2003; Langley *et al.*, 2004).

Afin de déterminer les effets de la Mstn sur la croissance tumorale, nous avons analysé le cycle cellulaire et l'expression de Ki-67, un marqueur de la prolifération cellulaire (Gerdes *et al.*, 1983). Aucun effet de la Mstn sur la prolifération cellulaire, sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, ou sur l'expression de Ki-67 n'a été observé, indiquant que la Mstn ne régule pas directement la croissance tumorale des cellules LLC. Toutefois, ces premiers résultats n'invalident pas totalement notre hypothèse de départ puisque ces expériences ont été conduites *in vitro*, donc dans un microenvironnement tumoral différent de celui rencontré au sein de l'hôte. Le microenvironnement des cellules tumorales, plus connu sous le nom de stroma tumoral constitue le tissu nourricier et de soutien de ces cellules. Il diffère du microenvironnement normal par la composition biochimique de la matrice extracellulaire et surtout par le fait que les populations cellulaires du stroma (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunes, ...), bien que non transformées, soient subverties et contrôlées par les cellules tumorales pour répondre à leurs propres besoins. Les fibroblastes prennent dans ce cas-là, la dénomination de fibroblastes associés au cancer. Ils permettent la progression tumorale (Kalluri & Zeisberg, 2006; Billottet & Jouanneau, 2008). Il a récemment été montré, *in vitro* et *in vivo*, que la présence des fibroblastes facilitait la croissance des cellules LLC et leur invasion (Yamauchi *et al.*, 2013). Les fibroblastes peuvent être activés par des facteurs de croissance tels que le TGF- β (Kalluri & Zeisberg, 2006). Dans l'étude de Yamauchi *et al.*, il a également été montré que la progression des cellules LLC se faisait par l'intermédiaire de la voie des TGF- β (Yamauchi *et al.*, 2013). De plus, il a été mis en évidence, que la progression tumorale était accompagnée d'une augmentation de la phosphorylation de Smad3, et qu'en présence d'un inhibiteur du récepteur de type I des TGF- β , elle était diminuée (Yamauchi *et al.*, 2013). Ces informations suggèrent que la Mstn pourrait être impliquée dans l'activation des fibroblastes, et ainsi contribuer à la progression tumorale.

4. Les céramides

Au cours de ces dernières années, les chercheurs se sont questionnés sur l'existence d'une communication croisée entre le muscle et le tissu adipeux au cours de la cachexie associée au cancer. Ce questionnement prenait tout son sens avec l'étude menée par Suman K. Das et son équipe qui a mis en évidence la prévention de la perte de tissu adipeux et de tissu musculaire observée chez des souris *Atgl*^{-/-} et *Hsl*^{-/-} lors de la cachexie associée au

cancer (Das *et al.*, 2011), suggérant l'existence d'un médiateur cellulaire libéré par le tissu adipeux lors du catabolisme des triglycérides et capable de réguler la masse musculaire.

Dans le muscle de souris cachectiques C26, en plus d'une atrophie musculaire marquée, De Larichaudy *et al.* ont observé une augmentation de 53% du taux de céramides (De Larichaudy *et al.*, 2012). De plus, suite à l'ajout de la myriocine, un inhibiteur de la sérine palmitoyltransférase (enzyme clé de la synthèse des céramides), il a été rapporté une protection de l'atrophie musculaire (De Larichaudy *et al.*, 2012). Par conséquent, les céramides issus du métabolisme des TG du tissu adipeux, pourraient être le médiateur cellulaire entre le tissu musculaire et le tissu adipeux. Au cours de notre étude, contrairement aux souris *Mstn*^{-/-}+LLC, nous observons chez les souris WT+LLC une augmentation du taux de céramides dans le muscle *tibialis anterior*. De plus, nous avons mis en évidence que la perte de tissu adipeux observée au cours de notre étude était corrélée à l'augmentation du taux de céramides dans le muscle *tibialis anterior*. Les acides gras issus du catabolisme lipidique seraient acheminés par la circulation sanguine aux muscles où ils seraient convertis en céramides. Chez des rats cachectiques YAH-130, il a notamment été montré une augmentation de la concentration plasmatique d'acides gras libres (Busquets *et al.*, 2001), ainsi qu'une augmentation de l'expression des transcrits des transporteurs d'acides gras FAT (appelé aussi CD36) et FATP, dans le muscle (Fuster *et al.*, 2007). Chez des souris cachectiques, il a également été rapporté une augmentation du taux sérique d'acides gras libres (Huang *et al.*, 2013). Il est aussi possible que les céramides soient obtenus à partir du catabolisme des TG circulants. Chez des rats, il a été observé que l'infusion de TG dans la circulation sanguine, provoquait une accumulation de céramides dans le muscle (Holland *et al.*, 2007). Au cours de la cachexie associée au cancer, une hypertriglycémie peut être observée (Evans & Williamson, 1988; Lopez-Soriano *et al.*, 1996; Nomura *et al.*, 1996; Lopez-Soriano *et al.*, 1997a), et par conséquent pourrait contribuer à expliquer cette augmentation du contenu en céramides. Enfin, les céramides pourraient également être synthétisés à partir des acides gras libres résultant de la dégradation des TG intramyocellulaires. Les TG sont stockés dans le muscle au sein de gouttelettes lipidiques. Chez des patients cachectiques, il a été montré une augmentation de la quantité de gouttelettes lipidiques intramyocellulaires (Weber *et al.*, 2009; Stephens *et al.*, 2011). De plus, il a été mis en évidence qu'une quantité élevée de gouttelettes lipidiques intramyocellulaires était associée à une forte présence d'intermédiaires lipotoxiques, comme les céramides (Moro *et al.*,

2009). Ceci suggère qu'au cours de la cachexie associée au cancer, les TG intramyocellulaires pourraient être à l'origine de la production des céramides.

Nos données posent également la question du(es) mécanisme(s) par lequel(s) les céramides seraient susceptibles de contrôler la masse musculaire. Les céramides sont capables de générer des ROS et d'induire un stress oxydatif (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997; Quillet-Mary *et al.*, 1997; Corda *et al.*, 2001). L'exposition de cardiomyocytes à la N-acétylsphingosine (céramide en C2), un analogue synthétique, provoque *in vitro* une augmentation de la production de ROS dans des myocytes (Suematsu *et al.*, 2003). De plus, l'exposition directe de myotubes matures C2C12 à des céramides en C2 ou en C6, provoque une augmentation du stress oxydatif (Ferreira *et al.*, 2010). Une augmentation similaire a été observée dans des faisceaux de fibres musculaires de diaphragme murin (Ferreira *et al.*, 2010). De nombreuses études ont montré que les ROS et le stress oxydatif jouaient un rôle dans l'atrophie musculaire durant une inactivité prolongée (Kondo *et al.*, 1991; Servais *et al.*, 2007; Andrianjafiniony *et al.*, 2010; Min *et al.*, 2011; Powers *et al.*, 2011). Leur implication a également été mise en évidence chez l'humain (Kondo *et al.*, 1991), ou expérimentalement chez l'animal, dans la cachexie associée au cancer (Gomes-Marcondes & Tisdale, 2002; Barreiro *et al.*, 2005). D'après l'étude de Gomes-Marcondes *et al.*, les effets des ROS et du stress oxydatif sur l'atrophie musculaire, se feraient par l'intermédiaire d'une activation du système ubiquitine-protéasome (Gomes-Marcondes & Tisdale, 2002). Dans notre étude, il aurait été intéressant de déterminer l'activité et/ou la quantité d'enzymes antioxydantes (superoxydes dismutases, catalases, glutathion peroxydases), de doser certains antioxydants (glutathion), mais aussi de déterminer si l'exposition à des céramides conduit à une stimulation de ce stress oxydant et contribue à la perte de masse musculaire. Dans ce contexte, l'utilisation d'un modèle de cultures primaires de cellules musculaires issues de muscles de souris sauvages et de souris *Mstn*^{-/-} serait très utile.

A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée sur le rôle des céramides dans l'induction de l'autophagie au sein du muscle squelettique. Néanmoins, il a été montré chez des cellules du cancer du côlon humain (HT-29) et chez des cellules du cancer du sein humain (MCF-7), une augmentation de la protéolyse et de la formation de vacuoles autophagiques, en réponse aux céramides (Scarlati *et al.*, 2004). Il a également été mis en évidence une augmentation de l'expression de Beclin-1 (Scarlati *et al.*, 2004). Les céramides promouvaient la formation de vacuoles autophagiques, augmentaient l'expression protéique

de LC3 total et de LC3b-II, ainsi que l'expression de Bnip3 (Daido *et al.*, 2004). Toutes ces études démontrent que les céramides sont impliqués dans le contrôle de l'autophagie (Daido *et al.*, 2004; Scarlatti *et al.*, 2004). De plus, dans des myotubes L6, l'ajout d'inhibiteurs de la synthèse de céramides, diminuait de manière significative l'expression du transcrite de LC3b en présence de TNF- α (De Larichaudy *et al.*, 2012). Dans notre étude, contrairement aux souris Mstn^{-/-}+LLC, nous observons chez les souris WT+LLC une augmentation de l'expression protéique totale de LC3b-I et de LC3b-II. De plus, chez les souris Mstn^{-/-}+LLC, nous observons une diminution de l'expression du transcrite Ulk1 (données non présentées), et de l'expression protéique du complexe Atg5-Atg12. Nous avons également mis en évidence que l'augmentation de l'expression protéique de LC3b-I et de LC3b-II au cours de notre étude était corrélée à l'augmentation du taux de céramides dans le muscle *tibialis anterior* (données non présentées). Ces résultats suggèrent que la stimulation du processus autophagique au cours de la cachexie associée au cancer pourrait se faire par l'intermédiaire des céramides. Cette hypothèse doit bien évidemment être testée expérimentalement.

L'apoptose des cellules musculaires est une composante de l'atrophie musculaire observée au cours de la cachexie associée au cancer, comme nous l'avons décrit précédemment. Les céramides sont également des messagers importants impliqués dans l'apoptose (Mathias *et al.*, 1998; Woodcock, 2006). Il a notamment été observé que les céramides induisaient une apoptose des myotubes L6 en culture (Turpin *et al.*, 2006). Par conséquent, il est possible que les médiateurs de ce processus apoptotique dans le muscle squelettique soient les céramides. Néanmoins, dans l'étude de De Larichaudy *et al.*, la viabilité des myotubes L6 n'était pas modifiée lorsque la synthèse des céramides était bloquée, indiquant que l'apoptose n'intervenait pas dans le processus d'atrophie musculaire impliquant les céramides (De Larichaudy *et al.*, 2012). Ces divergences de résultats peuvent être imputées à la stratégie d'étude utilisée : d'un côté, l'injection d'un céramide en C2 (De Larichaudy *et al.*, 2012), de l'autre, l'injection d'un inhibiteur de la synthèse des céramides (Turpin *et al.*, 2006). Au-delà du rôle des céramides dans le contrôle de l'apoptose, l'existence d'une mort nucléaire contribuant à la perte de masse musculaire reste à déterminer dans notre modèle animal.

Conclusion

La Mstn constitue une cible d'action thérapeutique potentielle dans un certain nombre de conditions, y compris la cachexie associée au cancer. Néanmoins, au cours de ce processus, les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la masse musculaire squelettique restaient en grande partie à déterminer. En ce sens, mes travaux de thèse ont apporté une contribution significative à la compréhension de ces mécanismes et du rôle de la myostatine dans ce contexte physiopathologique.

Ces travaux nous ont permis d'émettre un certain nombre d'hypothèses : *i)* les fibres musculaires des souris $Mstn^{-/-}$ seraient résistantes à l'action de facteurs extracellulaires atrophiants ; *ii)* l'inactivation du gène de la Mstn pourrait exercer des effets sur d'autres tissus, en plus du tissu musculaire, limitant ainsi l'ampleur de la réponse cachectique. Cet effet pourrait notamment mettre en jeu une régulation de la production de cytokines cataboliques ; et *iii)* une accumulation de céramides intramusculaires contribuerait au catabolisme protéique musculaire. Ces hypothèses de travail attendent d'être validées expérimentalement.

Références bibliographiques

- Abernethy TJ & Avery OT. (1941). The Occurrence during Acute Infections of a Protein Not Normally Present in the Blood : I. Distribution of the Reactive Protein in Patients' Sera and the Effect of Calcium on the Flocculation Reaction with C Polysaccharide of Pneumococcus. *The Journal of experimental medicine* **73**, 173-182.
- Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, Wang H, Saji M, Carathers M, Ringel MD, Skipworth RJ, Fearon KC, Hollingsworth MA, Muscarella P, Burghes AH, Rafael-Fortney JA & Guttridge DC. (2005). Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer cell* **8**, 421-432.
- Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S & Guttridge DC. (2004). Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest* **114**, 370-378.
- Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV & Harkins RN. (1985). Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem* **260**, 2345-2354.
- Aggarwal BB, Moffat B & Harkins RN. (1984). Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J Biol Chem* **259**, 686-691.
- Agustsson T, Ryden M, Hoffstedt J, van Harmelen V, Dicker A, Laurencikiene J, Isaksson B, Permert J & Arner P. (2007). Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res* **67**, 5531-5537.
- Agustsson T, Wikrantz P, Ryden M, Brismar T & Isaksson B. (2012). Adipose tissue volume is decreased in recently diagnosed cancer patients with cachexia. *Nutrition* **28**, 851-855.
- Ahlquist RP. (1948). A study of the adrenotropic receptors. *The American journal of physiology* **153**, 586-600.
- Akbulut G. (2011). New perspective for nutritional support of cancer patients: Enteral/parenteral nutrition. *Experimental and therapeutic medicine* **2**, 675-684.
- Akerblom IE & Murry LE. (1998). Human cachexia associated protein. Incyte Pharmaceuticals, Inc. (Palo Alto, CA, USA), United States of America.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB & Cohen P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB* **7**, 261-269.
- Allen DL, Cleary AS, Lindsay SF, Loh AS & Reed JM. (2010a). Myostatin expression is increased by food deprivation in a muscle-specific manner and contributes to muscle atrophy during prolonged food deprivation in mice. *J Appl Physiol (1985)* **109**, 692-701.
- Allen DL, Linderman JK, Roy RR, Grindeland RE, Mukku V & Edgerton VR. (1997). Growth hormone/IGF-I and/or resistive exercise maintains myonuclear number in hindlimb unweighted muscles. *J Appl Physiol (1985)* **83**, 1857-1861.
- Allen DL, McCall GE, Loh AS, Madden MC & Mehan RS. (2010b). Acute daily psychological stress causes increased atrophic gene expression and myostatin-dependent muscle atrophy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **299**, R889-898.
- Allen DL, Roy RR & Edgerton VR. (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* **22**, 1350-1360.
- Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR & Edgerton VR. (1996). Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol (1985)* **81**, 145-151.

- Amann T, Maegdefrau U, Hartmann A, Agaimy A, Marienhagen J, Weiss TS, Stoeltzing O, Warnecke C, Scholmerich J, Oefner PJ, Kreutz M, Bosserhoff AK & Hellerbrand C. (2009). GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis. *The American journal of pathology* **174**, 1544-1552.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A & Freyssenet D. (2009). Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* **150**, 286-294.
- Amthor H, Huang R, McKinnell I, Christ B, Kambadur R, Sharma M & Patel K. (2002). The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Dev Biol* **251**, 241-257.
- Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R & Patel K. (2004). Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol* **270**, 19-30.
- Amthor H, Otto A, Macharia R, McKinnell I & Patel K. (2006). Myostatin imposes reversible quiescence on embryonic muscle precursors. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **235**, 672-680.
- Ando K, Takahashi F, Motojima S, Nakashima K, Kaneko N, Hoshi K & Takahashi K. (2013). Possible role for tocilizumab, an anti-interleukin-6 receptor antibody, in treating cancer cachexia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, e69-72.
- Andreyev HJ, Norman AR, Oates J & Cunningham D. (1998). Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *Eur J Cancer* **34**, 503-509.
- Andrianjafiniony T, Dupre-Aucouturier S, Letexier D, Couchoux H & Desplanches D. (2010). Oxidative stress, apoptosis, and proteolysis in skeletal muscle repair after unloading. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C307-315.
- Annas GJ & Elias S. (1999). Thalidomide and the Titanic: reconstructing the technology tragedies of the twentieth century. *American journal of public health* **89**, 98-101.
- Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E & Holm C. (1998). Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *J Biol Chem* **273**, 215-221.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R & Martinou JC. (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* **277**, 370-372.
- Arbeit JM, Lees DE, Corsey R & Brennan MF. (1984). Resting energy expenditure in controls and cancer patients with localized and diffuse disease. *Ann Surg* **199**, 292-298.
- Arends J, Bodoky G, Bozzetti F, Fearon K, Muscaritoli M, Selga G, van Bokhorst-de van der Schueren MA, von Meyenfeldt M, Zurcher G, Fietkau R, Aulbert E, Frick B, Holm M, Kneba M, Mestrom HJ & Zander A. (2006). ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Non-surgical oncology. *Clin Nutr* **25**, 245-259.
- Arends J, Zuercher G, Dossett A, Fietkau R, Hug M, Schmid I, Shang E & Zander A. (2009). Non-surgical oncology - Guidelines on Parenteral Nutrition, Chapter 19. *German medical science : GMS e-journal* **7**, Doc09.
- Argiles JM, Alvarez B & Lopez-Soriano FJ. (1997). The metabolic basis of cancer cachexia. *Medicinal research reviews* **17**, 477-498.
- Argiles JM, Anguera A & Stemmler B. (2013). A new look at an old drug for the treatment of cancer cachexia: megestrol acetate. *Clin Nutr* **32**, 319-324.

- Argiles JM, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Costelli P & Penna F. (2012). Are there any benefits of exercise training in cancer cachexia? *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **3**, 73-76.
- Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1990a). The effects of tumour necrosis factor-alpha (cachectin) and tumour growth on hepatic amino acid utilization in the rat. *The Biochemical journal* **266**, 123-126.
- Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1990b). The oxidation of leucine in tumour-bearing rats. *The Biochemical journal* **268**, 241-244.
- Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1991). The energy state of tumor-bearing rats. *J Biol Chem* **266**, 2978-2982.
- Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1992). The enzymatic activities of branched-chain amino acid catabolism in tumour-bearing rats. *Cancer Lett* **61**, 239-242.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Toledo M, Betancourt A, Serpe R & Busquets S. (2011). The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**, 87-93.
- Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Wiggins D & Williamson DH. (1989). Comparative effects of tumour necrosis factor-alpha (cachectin), interleukin-1-beta and tumour growth on amino acid metabolism in the rat in vivo. Absorption and tissue uptake of alpha-amino[1-14C]isobutyrate. *The Biochemical journal* **261**, 357-362.
- Argiles JM, Olivan M, Busquets S & Lopez-Soriano FJ. (2010). Optimal management of cancer anorexia-cachexia syndrome. *Cancer management and research* **2**, 27-38.
- Arnold J, Campbell IT, Samuels TA, Devlin JC, Green CJ, Hipkin LJ, MacDonald IA, Scrimgeour CM, Smith K & Rennie MJ. (1993). Increased whole body protein breakdown predominates over increased whole body protein synthesis in multiple organ failure. *Clin Sci (Lond)* **84**, 655-661.
- Arounleut P, Bialek P, Liang LF, Upadhyay S, Fulzele S, Johnson M, Elsalanty M, Isales CM & Hamrick MW. (2013). A myostatin inhibitor (propeptide-Fc) increases muscle mass and muscle fiber size in aged mice but does not increase bone density or bone strength. *Experimental gerontology* **48**, 898-904.
- Arrieta O, Michel Ortega RM, Villanueva-Rodriguez G, Serna-Thome MG, Flores-Estrada D, Diaz-Romero C, Rodriguez CM, Martinez L & Sanchez-Lara K. (2010). Association of nutritional status and serum albumin levels with development of toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with paclitaxel-cisplatin chemotherapy: a prospective study. *BMC Cancer* **10**, 50.
- Asp ML, Tian M, Wendel AA & Belury MA. (2010). Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer* **126**, 756-763.
- Attaix D & Baracos VE. (2010). MAFbx/Atrogin-1 expression is a poor index of muscle proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**, 223-224.
- Attie KM, Borgstein NG, Yang Y, Condon CH, Wilson DM, Pearsall AE, Kumar R, Willins DA, Seehra JS & Sherman ML. (2013). A single ascending-dose study of muscle regulator ACE-031 in healthy volunteers. *Muscle Nerve* **47**, 416-423.
- Aulino P, Berardi E, Cardillo VM, Rizzuto E, Perniconi B, Ramina C, Padula F, Spugnini EP, Baldi A, Faiola F, Adamo S & Coletti D. (2010). Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse. *BMC Cancer* **10**, 363.
- Babcock JC, Gutsell ES, Herr ME, Hogg JA, Stucki JC, Barnes LE & Dulin WE. (1958). 6 α -Methyl-17 α -hydroxyprogesterone 17-acylates; a new class of potent progestins. *Journal of the American Chemical Society* **80**, 2904-2905.

- Baboshina OV & Haas AL. (1996). Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S proteasome subunit 5. *J Biol Chem* **271**, 2823-2831.
- Bachmann J, Heiligensetzer M, Krakowski-Roosen H, Buchler MW, Friess H & Martignoni ME. (2008). Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract* **12**, 1193-1201.
- Badalamente MA & Stracher A. (2000). Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition. *Muscle Nerve* **23**, 106-111.
- Baehr LM, Furlow JD & Bodine SC. (2011). Muscle sparing in muscle RING finger 1 null mice: response to synthetic glucocorticoids. *The Journal of physiology* **589**, 4759-4776.
- Baeuerle PA & Baltimore D. (1988). I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science* **242**, 540-546.
- Baeuerle PA & Baltimore D. (1989). A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes & development* **3**, 1689-1698.
- Baldwin C, Spiro A, Ahern R & Emery PW. (2012). Oral nutritional interventions in malnourished patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* **104**, 371-385.
- Baldwin C, Spiro A, McGough C, Norman AR, Gillbanks A, Thomas K, Cunningham D, O'Brien M & Andreyev HJ. (2011). Simple nutritional intervention in patients with advanced cancers of the gastrointestinal tract, non-small cell lung cancers or mesothelioma and weight loss receiving chemotherapy: a randomised controlled trial. *Journal of human nutrition and dietetics : the official journal of the British Dietetic Association* **24**, 431-440.
- Balkwill F, Osborne R, Burke F, Naylor S, Talbot D, Durbin H, Tavernier J & Fiers W. (1987). Evidence for tumour necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* **2**, 1229-1232.
- Balow RM, Tomkinson B, Ragnarsson U & Zetterqvist O. (1986). Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *J Biol Chem* **261**, 2409-2417.
- Baltgalvis KA, Berger FG, Pena MM, Davis JM, Muga SJ & Carson JA. (2008). Interleukin-6 and cachexia in ApcMin/+ mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R393-401.
- Baltgalvis KA, Berger FG, Pena MM, Davis JM, White JP & Carson JA. (2009). Muscle wasting and interleukin-6-induced atrogin-1 expression in the cachectic Apc (Min/+) mouse. *Pflugers Arch* **457**, 989-1001.
- Baltgalvis KA, Berger FG, Pena MM, Mark Davis J, White JP & Carson JA. (2010). Activity level, apoptosis, and development of cachexia in Apc(Min/+) mice. *J Appl Physiol (1985)* **109**, 1155-1161.
- Baracos VE. (2008). Reply to Letter to the Editor: a Response to the Letter of M. Tisdale. *Clinical Cancer Research* **14**, 2245-2245.
- Baracos VE, DeVivo C, Hoyle DH & Goldberg AL. (1995). Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *The American journal of physiology* **268**, E996-1006.
- Baracos VE, Reiman T, Mourtzakis M, Gioulbasanis I & Antoun S. (2010). Body composition in patients with non-small cell lung cancer: a contemporary view of cancer cachexia with the use of computed tomography image analysis. *The American journal of clinical nutrition* **91**, 1133S-1137S.
- Barber MD & Fearon KC. (2001). Tolerance and incorporation of a high-dose eicosapentaenoic acid diester emulsion by patients with pancreatic cancer cachexia. *Lipids* **36**, 347-351.

- Barber MD, Ross JA, Voss AC, Tisdale MJ & Fearon KC. (1999). The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* **81**, 80-86.
- Barreiro E, de la Puente B, Busquets S, Lopez-Soriano FJ, Gea J & Argiles JM. (2005). Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett* **579**, 1646-1652.
- Barta J, Toth A, Edes I, Vaszily M, Papp JG, Varro A & Papp Z. (2005). Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Molecular and cellular biochemistry* **278**, 1-8.
- Bartoli M & Richard I. (2005). Calpains in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2115-2133.
- Batista ML, Jr., Olivan M, Alcantara PS, Sandoval R, Peres SB, Neves RX, Silverio R, Maximiano LF, Otoch JP & Seelaender M. (2013). Adipose tissue-derived factors as potential biomarkers in cachectic cancer patients. *Cytokine* **61**, 532-539.
- Bauer J, Capra S & Ferguson M. (2002). Use of the scored Patient-Generated Subjective Global Assessment (PG-SGA) as a nutrition assessment tool in patients with cancer. *European journal of clinical nutrition* **56**, 779-785.
- Bauer JD & Capra S. (2005). Nutrition intervention improves outcomes in patients with cancer cachexia receiving chemotherapy--a pilot study. *Support Care Cancer* **13**, 270-274.
- Bayliss TJ, Smith JT, Schuster M, Dragnev KH & Rigas JR. (2011). A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer. *Expert opinion on biological therapy* **11**, 1663-1668.
- Bayram I, Erbey F, Celik N, Nelson JL & Tanyeli A. (2009). The use of a protein and energy dense eicosapentaenoic acid containing supplement for malignancy-related weight loss in children. *Pediatric blood & cancer* **52**, 571-574.
- Beal JE, Olson R, Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF & Shepard KV. (1995). Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage* **10**, 89-97.
- Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L & Attaix D. (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2098-2114.
- Beck SA, Smith KL & Tisdale MJ. (1991). Anticachectic and antitumor effect of eicosapentaenoic acid and its effect on protein turnover. *Cancer Res* **51**, 6089-6093.
- Beck SA & Tisdale MJ. (1987). Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res* **47**, 5919-5923.
- Belfrage P, Jergil B, Stralfors P & Tornqvist H. (1977). Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue: identification and some properties of the enzyme protein. *FEBS Lett* **75**, 259-264.
- Belfrage P, Jergil B, Stralfors P & Tornqvist H. (1978). Identification and some characteristics of the enzyme protein of the hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *Advances in experimental medicine and biology* **101**, 113-126.
- Belizario JE, Lorite MJ & Tisdale MJ. (2001). Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. *Br J Cancer* **84**, 1135-1140.
- Beller E, Tattersall M, Lumley T, Levi J, Dalley D, Olver I, Page J, Abdi E, Wynne C, Friedlander M, Boadle D, Wheeler H, Margrie S & Simes RJ. (1997). Improved quality of life with megestrol acetate in patients with endocrine-insensitive advanced cancer: a randomised placebo-controlled trial. *Australasian*

- Megestrol Acetate Cooperative Study Group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **8**, 277-283.
- Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Jouglu E, Benhamou E, Delafosse P, Guizard AV, Molinie F, Danzon A, Bara S, Bouvier AM, Tretarre B, Binder-Foucard F, Colonna M, Daubisse L, Hedelin G, Launoy G, Le Stang N, Maynadie M, Monnereau A, Troussard X, Faivre J, Collignon A, Janoray I, Arveux P, Buemi A, Raverdy N, Schvartz C, Bovet M, Cherie-Challine L, Esteve J, Remontet L & Velten M. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Revue d'épidémiologie et de sante publique* **56**, 159-175.
- Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG & Zimmers TA. (2010). Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 1548-1554.
- Berk L, James J, Schwartz A, Hug E, Mahadevan A, Samuels M & Kachnic L. (2008). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a beta-hydroxyl beta-methyl butyrate, glutamine, and arginine mixture for the treatment of cancer cachexia (RTOG 0122). *Support Care Cancer* **16**, 1179-1188.
- Berthon P, Duguez S, Favier FB, Amirouche A, Feasson L, Vico L, Denis C & Freyssenet D. (2007). Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflugers Arch* **454**, 625-633.
- Bertram JS & Janik P. (1980). Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett* **11**, 63-73.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R & Cerami A. (1985a). Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552-554.
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P & Cerami A. (1985b). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *The Journal of experimental medicine* **161**, 984-995.
- Beutler BA & Cerami A. (1985). Recombinant interleukin 1 suppresses lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. *J Immunol* **135**, 3969-3971.
- Bhasin S, Calof OM, Storer TW, Lee ML, Mazer NA, Jasuja R, Montori VM, Gao W & Dalton JT. (2006). Drug insight: Testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging. *Nature clinical practice Endocrinology & metabolism* **2**, 146-159.
- Bhatnagar S, Mittal A, Gupta SK & Kumar A. (2012). TWEAK causes myotube atrophy through coordinated activation of ubiquitin-proteasome system, autophagy, and caspases. *J Cell Physiol* **227**, 1042-1051.
- Biggs WH, 3rd, Cavenee WK & Arden KC. (2001). Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome* **12**, 416-425.
- Biggs WH, 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK & Arden KC. (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7421-7426.
- Billottet C & Jouanneau J. (2008). [Tumor-stroma interactions]. *Bulletin du cancer* **95**, 51-56.
- Bing C, Bao Y, Jenkins J, Sanders P, Manieri M, Cinti S, Tisdale MJ & Trayhurn P. (2004). Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2500-2505.

- Bing C, Russell S, Becket E, Pope M, Tisdale MJ, Trayhurn P & Jenkins JR. (2006). Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br J Cancer* **95**, 1028-1037.
- Bing C, Russell ST, Beckett EE, Collins P, Taylor S, Barraclough R, Tisdale MJ & Williams G. (2002). Expression of uncoupling proteins-1, -2 and -3 mRNA is induced by an adenocarcinoma-derived lipid-mobilizing factor. *Br J Cancer* **86**, 612-618.
- Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R & Schmid JA. (2002). Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* **277**, 10842-10851.
- Bishop JS & Marks PA. (1959). Studies on carbohydrate metabolism in patients with neoplastic disease. II. Response to insulin administration. *J Clin Invest* **38**, 668-672.
- Black K, Garrett IR & Mundy GR. (1991). Chinese hamster ovarian cells transfected with the murine interleukin-6 gene cause hypercalcemia as well as cachexia, leukocytosis and thrombocytosis in tumor-bearing nude mice. *Endocrinology* **128**, 2657-2659.
- Bligh EG & Dyer WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* **37**, 911-917.
- Blum D, Omlin A, Fearon K, Baracos V, Radbruch L, Kaasa S & Strasser F. (2010). Evolving classification systems for cancer cachexia: ready for clinical practice? *Support Care Cancer* **18**, 273-279.
- Bodell PW, Kodesh E, Haddad F, Zaldivar FP, Cooper DM & Adams GR. (2009). Skeletal muscle growth in young rats is inhibited by chronic exposure to IL-6 but preserved by concurrent voluntary endurance exercise. *J Appl Physiol (1985)* **106**, 443-453.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2001a). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* **294**, 1704-1708.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ & Yancopoulos GD. (2001b). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* **3**, 1014-1019.
- Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, Morris LD, Whittemore LA, Ahima RS & Khurana TS. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* **420**, 418-421.
- Bogdanovich S, Perkins KJ, Krag TO, Whittemore LA & Khurana TS. (2005). Myostatin propeptide-mediated amelioration of dystrophic pathophysiology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 543-549.
- Bonetto A, Aydogdu T, Kunzevitzky N, Guttridge DC, Khuri S, Koniaris LG & Zimmers TA. (2011). STAT3 activation in skeletal muscle links muscle wasting and the acute phase response in cancer cachexia. *PLoS One* **6**, e22538.
- Bonetto A, Penna F, Aversa Z, Mercantini P, Baccino FM, Costelli P, Ziparo V, Lucia S, Rossi Fanelli F & Muscaritoli M. (2013). Early changes of muscle insulin-like growth factor-1 and myostatin gene expression in gastric cancer patients. *Muscle Nerve* **48**, 387-392.
- Bonetto A, Penna F, Minero VG, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM & Costelli P. (2009). Deacetylase inhibitors modulate the myostatin/follistatin axis without improving cachexia in tumor-bearing mice. *Curr Cancer Drug Targets* **9**, 608-616.
- Bosaeus I, Daneryd P & Lundholm K. (2002). Dietary intake, resting energy expenditure, weight loss and survival in cancer patients. *J Nutr* **132**, 3465S-3466S.

- Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E & Lundholm K. (2001). Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *Int J Cancer* **93**, 380-383.
- Bossola M, Mirabella M, Ricci E, Costelli P, Pacelli F, Tortorelli AP, Muscaritoli M, Rossi Fanelli F, Baccino FM, Tonali PA & Doglietto GB. (2006). Skeletal muscle apoptosis is not increased in gastric cancer patients with mild-moderate weight loss. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 1561-1570.
- Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Bellantone R, Pacelli F, Busquets S, Argiles J, Lopez-Soriano FJ, Civello IM, Baccino FM, Rossi Fanelli F & Doglietto GB. (2001). Increased muscle ubiquitin mRNA levels in gastric cancer patients. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **280**, R1518-1523.
- Bossola M, Muscaritoli M, Costelli P, Grieco G, Bonelli G, Pacelli F, Rossi Fanelli F, Doglietto GB & Baccino FM. (2003). Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Ann Surg* **237**, 384-389.
- Bozzetti F, Braga M, Gianotti L, Gavazzi C & Mariani L. (2001). Postoperative enteral versus parenteral nutrition in malnourished patients with gastrointestinal cancer: a randomised multicentre trial. *Lancet* **358**, 1487-1492.
- Bozzetti F, Cozzaglio L, Biganzoli E, Chiavenna G, De Cicco M, Donati D, Gilli G, Percolla S & Pironi L. (2002). Quality of life and length of survival in advanced cancer patients on home parenteral nutrition. *Clin Nutr* **21**, 281-288.
- Brasaemle DL, Levin DM, Adler-Wailes DC & Londos C. (2000). The lipolytic stimulation of 3T3-L1 adipocytes promotes the translocation of hormone-sensitive lipase to the surfaces of lipid storage droplets. *Biochim Biophys Acta* **1483**, 251-262.
- Braun TP, Grossberg AJ, Krasnow SM, Levasseur PR, Szumowski M, Zhu XX, Maxson JE, Knoll JG, Barnes AP & Marks DL. (2013). Cancer- and endotoxin-induced cachexia require intact glucocorticoid signaling in skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**, 3572-3582.
- Brennan MF. (1977). Uncomplicated starvation versus cancer cachexia. *Cancer Res* **37**, 2359-2364.
- Brown SA, Richards CM, Hanscom HN, Feng SL & Winkles JA. (2003). The Fn14 cytoplasmic tail binds tumour-necrosis-factor-receptor-associated factors 1, 2, 3 and 5 and mediates nuclear factor-kappaB activation. *The Biochemical journal* **371**, 395-403.
- Bruera E. (1997). ABC of palliative care. Anorexia, cachexia, and nutrition. *BMJ* **315**, 1219-1222.
- Bruera E, Ernst S, Hagen N, Spachynski K, Belzile M, Hanson J, Summers N, Brown B, Dulude H & Gallant G. (1998). Effectiveness of megestrol acetate in patients with advanced cancer: a randomized, double-blind, crossover study. *Cancer prevention & control : CPC = Prevention & controle en cancerologie : PCC* **2**, 74-78.
- Bruera E, Macmillan K, Kuehn N, Hanson J & MacDonald RN. (1990). A controlled trial of megestrol acetate on appetite, caloric intake, nutritional status, and other symptoms in patients with advanced cancer. *Cancer* **66**, 1279-1282.
- Bruera E, Neumann CM, Pituskin E, Calder K, Ball G & Hanson J. (1999). Thalidomide in patients with cachexia due to terminal cancer: preliminary report. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **10**, 857-859.
- Bruera E, Roca E, Cedaro L, Carraro S & Chacon R. (1985). Action of oral methylprednisolone in terminal cancer patients: a prospective randomized double-blind study. *Cancer treatment reports* **69**, 751-754.

- Bruera E, Strasser F, Palmer JL, Willey J, Calder K, Amyotte G & Baracos V. (2003). Effect of fish oil on appetite and other symptoms in patients with advanced cancer and anorexia/cachexia: a double-blind, placebo-controlled study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **21**, 129-134.
- Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J & Greenberg ME. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-868.
- Buijs N, van Bokhorst-de van der Schueren MA, Langius JA, Leemans CR, Kuik DJ, Vermeulen MA & van Leeuwen PA. (2010). Perioperative arginine-supplemented nutrition in malnourished patients with head and neck cancer improves long-term survival. *The American journal of clinical nutrition* **92**, 1151-1156.
- Bullowa JGM & Kaplan DM. (1903). On the hypodermatic use of adrenalin chloride in the treatment of asthmatic attacks. *Medical News* **83**, 787-790.
- Burgi W & Schmid K. (1961). Preparation and properties of Zn-alpha 2-glycoprotein of normal human plasma. *J Biol Chem* **236**, 1066-1074.
- Burns CP, Halabi S, Clamon GH, Hars V, Wagner BA, Hohl RJ, Lester E, Kirshner JJ, Vinciguerra V & Paskett E. (1999). Phase I clinical study of fish oil fatty acid capsules for patients with cancer cachexia: cancer and leukemia group B study 9473. *Clin Cancer Res* **5**, 3942-3947.
- Burt ME, Aoki TT, Gorschboth CM & Brennan MF. (1983). Peripheral tissue metabolism in cancer-bearing man. *Ann Surg* **198**, 685-691.
- Burt ME, Lowry SF, Gorschboth C & Brennan MF. (1981). Metabolic alterations in a noncachectic animal tumor system. *Cancer* **47**, 2138-2146.
- Burt ME, Stein TP, Schwade JG & Brennan MF. (1984). Whole-body protein metabolism in cancer-bearing patients. Effect of total parenteral nutrition and associated serum insulin response. *Cancer* **53**, 1246-1252.
- Busquets S, Carbo N, Almendro V, Figueras M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2001). Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia? *FEBS Lett* **505**, 255-258.
- Busquets S, Deans C, Figueras M, Moore-Carrasco R, Lopez-Soriano FJ, Fearon KC & Argiles JM. (2007). Apoptosis is present in skeletal muscle of cachectic gastro-intestinal cancer patients. *Clin Nutr* **26**, 614-618.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (2004). Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res* **64**, 6725-6731.
- Busquets S, Figueras MT, Meijnsing S, Carbo N, Quinn LS, Almendro V, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (2005). Interleukin-15 decreases proteolysis in skeletal muscle: a direct effect. *Int J Mol Med* **16**, 471-476.
- Busquets S, Garcia-Martinez C, Alvarez B, Carbo N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2000). Calpain-3 gene expression is decreased during experimental cancer cachexia. *Biochim Biophys Acta* **1475**, 5-9.
- Busquets S, Serpe R, Sirisi S, Toledo M, Coutinho J, Martinez R, Orpi M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2010). Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia. *Clin Nutr* **29**, 733-737.

- Busquets S, Toledo M, Marmonti E, Orpi M, Capdevila E, Betancourt A, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2012a). Formoterol treatment downregulates the myostatin system in skeletal muscle of cachectic tumour-bearing rats. *Oncology letters* **3**, 185-189.
- Busquets S, Toledo M, Orpi M, Massa D, Porta M, Capdevila E, Padilla N, Frailis V, Lopez-Soriano FJ, Han HQ & Argiles JM. (2012b). Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **3**, 37-43.
- Busquets S, Toledo M, Sirisi S, Orpi M, Serpe R, Coutinho J, Martinez R, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (2011). Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity. *Experimental and therapeutic medicine* **2**, 731-735.
- Cabal-Manzano R, Bhargava P, Torres-Duarte A, Marshall J, Bhargava P & Wainer IW. (2001). Proteolysis-inducing factor is expressed in tumours of patients with gastrointestinal cancers and correlates with weight loss. *Br J Cancer* **84**, 1599-1601.
- Cahlin C, Korner A, Axelsson H, Wang W, Lundholm K & Svanberg E. (2000). Experimental cancer cachexia: the role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, interferon-gamma, and tumor necrosis factor alpha evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 Bl background and eicosanoid-dependent cachexia. *Cancer Res* **60**, 5488-5493.
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Jr., Melendez PA, Oh BC, Lidov HG, Hasselgren PO, Frontera WR, Lee J, Glass DJ & Shoelson SE. (2004). IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* **119**, 285-298.
- Cangiano C, Cascino A, Ceci F, Laviano A, Mulieri M, Muscaritoli M & Rossi-Fanelli F. (1990). Plasma and CSF tryptophan in cancer anorexia. *Journal of neural transmission General section* **81**, 225-233.
- Cangiano C, Laviano A, Meguid MM, Mulieri M, Conversano L, Preziosa I & Rossi-Fanelli F. (1996). Effects of administration of oral branched-chain amino acids on anorexia and caloric intake in cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute* **88**, 550-552.
- Cao DX, Wu GH, Yang ZA, Zhang B, Jiang Y, Han YS, He GD, Zhuang QL, Wang YF, Huang ZL & Xi QL. (2010). Role of beta1-adrenoceptor in increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer science* **101**, 1639-1645.
- Carbo N, Busquets S, van Royen M, Alvarez B, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2002). TNF-alpha is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. *Br J Cancer* **86**, 1012-1016.
- Carbo N, Costelli P, Busquets S, Lopez-Soriano J, Lopez-Soriano FJ, Baccino FM & Argiles JM. (2004). Effect of c-ski overexpression on the development of cachexia in mice bearing the Lewis lung carcinoma. *Int J Mol Med* **14**, 719-723.
- Carbo N, Lopez-Soriano J, Costelli P, Busquets S, Alvarez B, Baccino FM, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2000). Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. *Br J Cancer* **83**, 526-531.
- Carbo N, Lopez-Soriano J, Tarrago T, Gonzalez O, Llovera M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1997). Comparative effects of beta2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumour growth. *Cancer Lett* **115**, 113-118.
- Cariuk P, Lorite MJ, Todorov PT, Field WN, Wigmore SJ & Tisdale MJ. (1997). Induction of cachexia in mice by a product isolated from the urine of cachectic cancer patients. *Br J Cancer* **76**, 606-613.
- Carlsson P & Mahlapuu M. (2002). Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. *Dev Biol* **250**, 1-23.

- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N & Williamson B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 3666-3670.
- Carter HE, Glick FJ, Norris WP & Phillips GE. (1947). BIOCHEMISTRY OF THE SPHINGOLIPIDES: III. STRUCTURE OF SPHINGOSINE. *Journal of Biological Chemistry* **170**, 285-294.
- Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R & Heinrich PC. (1989). Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* **242**, 237-239.
- Castets P, Lin S, Rion N, Di Fulvio S, Romanino K, Guridi M, Frank S, Tintignac LA, Sinnreich M & Ruegg MA. (2013). Sustained activation of mTORC1 in skeletal muscle inhibits constitutive and starvation-induced autophagy and causes a severe, late-onset myopathy. *Cell metabolism* **17**, 731-744.
- Cataldi-Betcher EL, Seltzer MH, Slocum BA & Jones KW. (1983). Complications occurring during enteral nutrition support: a prospective study. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* **7**, 546-552.
- Cerchietti LC, Navigante AH & Castro MA. (2007). Effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic n-3 fatty acids from fish oil and preferential Cox-2 inhibition on systemic syndromes in patients with advanced lung cancer. *Nutrition and cancer* **59**, 14-20.
- Cerchietti LC, Navigante AH, Peluffo GD, Diament MJ, Stillitani I, Klein SA & Cabalar ME. (2004). Effects of celecoxib, medroxyprogesterone, and dietary intervention on systemic syndromes in patients with advanced lung adenocarcinoma: a pilot study. *J Pain Symptom Manage* **27**, 85-95.
- Chance WT, Cao L, Zhang FS & Fischer JE. (1991a). Clenbuterol plus acivicin decrease tumor growth and increase muscle mass in rats maintained on total parenteral nutrition. *American journal of surgery* **161**, 51-56.
- Chance WT, Cao LQ, Zhang FS, Foley-Nelson T & Fischer JE. (1991b). Clenbuterol treatment increases muscle mass and protein content of tumor-bearing rats maintained on total parenteral nutrition. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* **15**, 530-535.
- Chance WT, Zhang X, Zuo L & Balasubramaniam A. (1998). Reduction of gut hypoplasia and cachexia in tumor-bearing rats maintained on total parenteral nutrition and treated with peptide YY and clenbuterol. *Nutrition* **14**, 502-507.
- Chand A, Wyke SM & Tisdale MJ. (2005). Effect of cancer cachexia on the activity of tripeptidyl-peptidase II in skeletal muscle. *Cancer Lett* **218**, 215-222.
- Chao FC, Efron B & Wolf P. (1975). The possible prognostic usefulness of assessing serum proteins and cholesterol in malignancy. *Cancer* **35**, 1223-1229.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK & Varshavsky A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**, 1576-1583.
- Chen SZ & Xiao JD. (2014). Rosiglitazone and imidapril alone or in combination alleviate muscle and adipose depletion in a murine cancer cachexia model. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **35**, 323-332.
- Chester MA. (1998). IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature of glycolipids--recommendations 1997. *European journal of biochemistry / FEBS* **257**, 293-298.
- Cheung WW, Rosengren S, Boyle DL & Mak RH. (2008). Modulation of melanocortin signaling ameliorates uremic cachexia. *Kidney Int* **74**, 180-186.

- Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Garcia I & Browning JL. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 32401-32410.
- Chiu CS, Peekhaus N, Weber H, Adamski S, Murray EM, Zhang HZ, Zhao JZ, Ernst R, Lineberger J, Huang L, Hampton R, Arnold BA, Vitelli S, Hamuro L, Wang WR, Wei N, Dillon GM, Miao J, Alves SE, Glantschnig H, Wang F & Wilkinson HA. (2013). Increased Muscle Force Production and Bone Mineral Density in ActRIIB-Fc-Treated Mature Rodents. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* **68**, 1181-1192.
- Chlebowski RT, Herrold J, Ali I, Oktay E, Chlebowski JS, Ponce AT, Heber D & Block JB. (1986). Influence of nandrolone decanoate on weight loss in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* **58**, 183-186.
- Christensen HN & Henderson ME. (1952). Comparative uptake of free amino acids by mouse-ascites carcinoma cells and normal tissues. *Cancer Res* **12**, 229-231.
- Chung SY, Huang WC, Su CW, Lee KW, Chi HC, Lin CT, Chen ST, Huang KM, Tsai MS, Yu HP & Chen SL. (2013). FoxO6 and PGC-1alpha form a regulatory loop in myogenic cells. *Bioscience reports* **33**.
- Chung TH, Yen-Ping Kuo M, Chen JK & Huang DM. (2011). YC-1 rescues cancer cachexia by affecting lipolysis and adipogenesis. *Int J Cancer* **129**, 2274-2283.
- Ciechanover A. (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**, 79-87.
- Ciechanover A, Hod Y & Hershko A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **81**, 1100-1105.
- Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E & Glass DJ. (2007). The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell metabolism* **6**, 376-385.
- Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG & Yeaman SJ. (2000). Translocation of hormone-sensitive lipase and perilipin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* **275**, 5011-5015.
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C & Georges M. (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* **38**, 813-818.
- Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E & Goldberg AL. (2009). During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol* **185**, 1083-1095.
- Cohen S, Zhai B, Gygi SP & Goldberg AL. (2012). Ubiquitylation by Trim32 causes coupled loss of desmin, Z-bands, and thin filaments in muscle atrophy. *J Cell Biol* **198**, 575-589.
- Cohn SH, Gartenhaus W, Sawitsky A, Rai K, Zanzi I, Vaswani A, Ellis KJ, Yasumura S, Cortes E & Vartsky D. (1981). Compartmental body composition of cancer patients by measurement of total body nitrogen, potassium, and water. *Metabolism: clinical and experimental* **30**, 222-229.
- Coleman ME, DeMayo F, Yin KC, Lee HM, Geske R, Montgomery C & Schwartz RJ. (1995). Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J Biol Chem* **270**, 12109-12116.

- Combaret L, Ralliere C, Taillandier D, Tanaka K & Attaix D. (1999). Manipulation of the ubiquitin-proteasome pathway in cachexia: pentoxifylline suppresses the activation of 20S and 26S proteasomes in muscles from tumor-bearing rats. *Molecular biology reports* **26**, 95-101.
- Combaret L, Tilignac T, Claustre A, Voisin L, Taillandier D, Obled C, Tanaka K & Attaix D. (2002). Torbafylline (HWA 448) inhibits enhanced skeletal muscle ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis in cancer and septic rats. *The Biochemical journal* **361**, 185-192.
- Cong H, Sun L, Liu C & Tien P. (2011). Inhibition of atrogin-1/MAFbx expression by adenovirus-delivered small hairpin RNAs attenuates muscle atrophy in fasting mice. *Human gene therapy* **22**, 313-324.
- Corbin JD, Reimann EM, Walsh DA & Krebs EG. (1970). Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'- monophosphate-stimulated protein kinase. *J Biol Chem* **245**, 4849-4851.
- Corda S, Laplace C, Vicaut E & Duranteau J. (2001). Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **24**, 762-768.
- Costa G & Holland JF. (1962). Effects of Krebs-2 carcinoma on the lipide metabolism of male Swiss mice. *Cancer Res* **22**, 1081-1083.
- Coste H, Martel MB & Got R. (1986). Topology of glucosylceramide synthesis in Golgi membranes from porcine submaxillary glands. *Biochim Biophys Acta* **858**, 6-12.
- Costelli P, Bossola M, Muscaritoli M, Grieco G, Bonelli G, Bellantone R, Doglietto GB, Baccino FM & Rossi Fanelli F. (2002). Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca(2+)-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats. *Cytokine* **19**, 1-5.
- Costelli P, Carbo N, Tessitore L, Bagby GJ, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM & Baccino FM. (1993). Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J Clin Invest* **92**, 2783-2789.
- Costelli P, De Tullio R, Baccino FM & Melloni E. (2001). Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br J Cancer* **84**, 946-950.
- Costelli P, Garcia-Martinez C, Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, Agell N, Tessitore L, Baccino FM & Argiles JM. (1995a). Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J Clin Invest* **95**, 2367-2372.
- Costelli P, Llovera M, Carbo N, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1995b). Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) is unable to reverse cachexia in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Cancer Lett* **95**, 33-38.
- Costelli P, Llovera M, Garcia-Martinez C, Carbo N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1995c). Enhanced leucine oxidation in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130) and its reversal by clenbuterol. *Cancer Lett* **91**, 73-78.
- Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, Bonelli G, Doglietto GB, Baccino FM & Rossi Fanelli F. (2008). Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest* **38**, 531-538.
- Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Moore-Carrasco R, Crepaldi S, Grieco G, Autelli R, Bonelli G, Pacelli F, Lopez-Soriano FJ, Argiles JM, Doglietto GB, Baccino FM & Rossi Fanelli F. (2005). Skeletal muscle wasting in tumor-bearing rats is associated with MyoD down-regulation. *International journal of oncology* **26**, 1663-1668.

- Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, Penna F, Reffo P, Bonetto A, Busquets S, Bonelli G, Lopez-Soriano FJ, Doglietto GB, Argiles JM, Baccino FM & Rossi Fanelli F. (2006). IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291**, R674-683.
- Couluris M, Mayer JL, Freyer DR, Sandler E, Xu P & Krischer JP. (2008). The effect of cyproheptadine hydrochloride (peractin) and megestrol acetate (megace) on weight in children with cancer/treatment-related cachexia. *Journal of pediatric hematology/oncology* **30**, 791-797.
- Courneya KS, Segal RJ, Mackey JR, Gelmon K, Reid RD, Friedenreich CM, Ladha AB, Proulx C, Vallance JK, Lane K, Yasui Y & McKenzie DC. (2007). Effects of aerobic and resistance exercise in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: a multicenter randomized controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 4396-4404.
- Cozzaglio L, Balzola F, Cosentino F, DeCicco M, Fellagara P, Gaggiotti G, Gallitelli L, Giacosa A, Orban A, Fadda M, Gavazzi C, Pirovano F & Bozzetti F. (1997). Outcome of cancer patients receiving home parenteral nutrition. Italian Society of Parenteral and Enteral Nutrition (S.I.N.P.E.). *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* **21**, 339-342.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M & Hemmings BA. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-789.
- Csibi A, Leibovitch MP, Cornille K, Tintignac LA & Leibovitch SA. (2009). MAFbx/Atrogin-1 controls the activity of the initiation factor eIF3-f in skeletal muscle atrophy by targeting multiple C-terminal lysines. *J Biol Chem* **284**, 4413-4421.
- Dahlman I, Mejhert N, Linder K, Agustsson T, Mutch DM, Kulyte A, Isaksson B, Permert J, Petrovic N, Nedergaard J, Sjolín E, Brodin D, Clement K, Dahlman-Wright K, Ryden M & Arner P. (2010). Adipose tissue pathways involved in weight loss of cancer cachexia. *Br J Cancer* **102**, 1541-1548.
- Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y & Kondo S. (2004). Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* **64**, 4286-4293.
- Dalton JT, Barnette KG, Bohl CE, Hancock ML, Rodriguez D, Dodson ST, Morton RA & Steiner MS. (2011). The selective androgen receptor modulator GTX-024 (enobosarm) improves lean body mass and physical function in healthy elderly men and postmenopausal women: results of a double-blind, placebo-controlled phase II trial. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**, 153-161.
- Dardevet D, Sornet C, Taillandier D, Savary I, Attaix D & Grizard J. (1995). Sensitivity and protein turnover response to glucocorticoids are different in skeletal muscle from adult and old rats. Lack of regulation of the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway in aging. *J Clin Invest* **96**, 2113-2119.
- Darnton SJ, Zgainski B, Grenier I, Allister K, Hiller L, McManus KG & Steyn RS. (1999). The use of an anabolic steroid (nandrolone decanoate) to improve nutritional status after esophageal resection for carcinoma. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / ISDE* **12**, 283-288.
- Das SK, Eder S, Schauer S, Diwoky C, Temmel H, Guertl B, Gorkiewicz G, Tamilarasan KP, Kumari P, Trauner M, Zimmermann R, Vesely P, Haemmerle G, Zechner R & Hoefler G. (2011). Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science* **333**, 233-238.
- David A, Edwards K, Fellowes KP & Plummer JM. (1963). Anti-ovulatory and other biological properties of megestrol acetate 17 α acetoxy-6 methyl pregna 4:6-diene-3:20-dione (B.D.H. 1298). *Journal of Reproduction and Fertility* **5**, 331-346.
- David AR & Zimmerman MR. (2010). Cancer: an old disease, a new disease or something in between? *Nat Rev Cancer* **10**, 728-733.

- Davidson W, Ash S, Capra S & Bauer J. (2004). Weight stabilisation is associated with improved survival duration and quality of life in unresectable pancreatic cancer. *Clin Nutr* **23**, 239-247.
- Davis M, Lasheen W, Walsh D, Mahmoud F, Bicanovsky L & Lagman R. (2012). A Phase II dose titration study of thalidomide for cancer-associated anorexia. *J Pain Symptom Manage* **43**, 78-86.
- Davis MP, Dreicer R, Walsh D, Lagman R & LeGrand SB. (2004a). Appetite and cancer-associated anorexia: a review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 1510-1517.
- Davis TW, Zweifel BS, O'Neal JM, Heuvelman DM, Abegg AL, Hendrich TO & Masferrer JL. (2004b). Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **308**, 929-934.
- Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson RM & Reville WJ. (1976a). A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* **15**, 2150-2158.
- Dayton WR, Reville WJ, Goll DE & Stromer MH. (1976b). A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry* **15**, 2159-2167.
- De Conno F, Martini C, Zecca E, Balzarini A, Venturino P, Groff L & Caraceni A. (1998). Megestrol acetate for anorexia in patients with far-advanced cancer: a double-blind controlled clinical trial. *Eur J Cancer* **34**, 1705-1709.
- de Duve C. (1983). Lysosomes revisited. *European journal of biochemistry / FEBS* **137**, 391-397.
- De Larichaudy J, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, Dessalle K, Desgeorges M, Piraud M, Cheillan D, Vidal H, Lefai E & Nemoz G. (2012). TNF-alpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skeletal muscle* **2**, 2.
- de Vries EG, Mulder NH, Houwen B & de Vries-Hospers HG. (1982). Enteral nutrition by nasogastric tube in adult patients treated with intensive chemotherapy for acute leukemia. *The American journal of clinical nutrition* **35**, 1490-1496.
- Deans DA, Tan BH, Wigmore SJ, Ross JA, de Beaux AC, Paterson-Brown S & Fearon KC. (2009). The influence of systemic inflammation, dietary intake and stage of disease on rate of weight loss in patients with gastro-oesophageal cancer. *Br J Cancer* **100**, 63-69.
- Deans DA, Wigmore SJ, Gilmour H, Paterson-Brown S, Ross JA & Fearon KC. (2006). Elevated tumour interleukin-1beta is associated with systemic inflammation: A marker of reduced survival in gastro-oesophageal cancer. *Br J Cancer* **95**, 1568-1575.
- Dehoux MJ, van Beneden RP, Fernandez-Celemin L, Lause PL & Thissen JP. (2003). Induction of MafBx and Murf ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection. *FEBS Lett* **544**, 214-217.
- DeJong CH, Busquets S, Moses AG, Schrauwen P, Ross JA, Argiles JM & Fearon KC. (2005). Systemic inflammation correlates with increased expression of skeletal muscle ubiquitin but not uncoupling proteins in cancer cachexia. *Oncol Rep* **14**, 257-263.
- Del Fabbro E, Dev R, Hui D, Palmer L & Bruera E. (2013). Effects of melatonin on appetite and other symptoms in patients with advanced cancer and cachexia: a double-blind placebo-controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 1271-1276.
- Della Cuna GR, Pellegrini A & Piazzini M. (1989). Effect of methylprednisolone sodium succinate on quality of life in preterminal cancer patients: a placebo-controlled, multicenter study. The Methylprednisolone Preterminal Cancer Study Group. *European journal of cancer & clinical oncology* **25**, 1817-1821.

- Demoor-Goldschmidt C & Raynard B. (2009). How can we integrate nutritional support in medical oncology? *Bulletin du cancer* **96**, 665-675.
- Dempsey DT, Feurer ID, Knox LS, Crosby LO, Buzby GP & Mullen JL. (1984). Energy expenditure in malnourished gastrointestinal cancer patients. *Cancer* **53**, 1265-1273.
- Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C & Chen ZJ. (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* **103**, 351-361.
- Deshaies Y, Willemot J & Leblanc J. (1981). Protein synthesis, amino acid uptake, and pools during isoproterenol-induced hypertrophy of the rat heart and tibialis muscle. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **59**, 113-121.
- Deval C, Mordier S, Obled C, Bechet D, Combaret L, Attaix D & Ferrara M. (2001). Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *The Biochemical journal* **360**, 143-150.
- Dewey A, Baughan C, Dean T, Higgins B & Johnson I. (2007). Eicosapentaenoic acid (EPA, an omega-3 fatty acid from fish oils) for the treatment of cancer cachexia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004597.
- DeWys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, Cohen MH, Douglass HO, Jr., Engstrom PF, Ezdinli EZ, Horton J, Johnson GJ, Moertel CG, Oken MM, Perlia C, Rosenbaum C, Silverstein MN, Skeel RT, Sponzo RW & Tormey DC. (1980). Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *The American journal of medicine* **69**, 491-497.
- Dezube BJ, Sherman ML, Fridovich-Keil JL, Allen-Ryan J & Pardee AB. (1993). Down-regulation of tumor necrosis factor expression by pentoxifylline in cancer patients: a pilot study. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **36**, 57-60.
- Di Sebastiano KM, Yang L, Zbuk K, Wong RK, Chow T, Koff D, Moran GR & Mourtzakis M. (2013). Accelerated muscle and adipose tissue loss may predict survival in pancreatic cancer patients: the relationship with diabetes and anaemia. *The British journal of nutrition* **109**, 302-312.
- Dimeo FC, Stieglitz RD, Novelli-Fischer U, Fetscher S & Keul J. (1999). Effects of physical activity on the fatigue and psychologic status of cancer patients during chemotherapy. *Cancer* **85**, 2273-2277.
- Dobrzyn A & Gorski J. (2002). Ceramides and sphingomyelins in skeletal muscles of the rat: content and composition. Effect of prolonged exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E277-285.
- Dobs AS, Boccia RV, Croot CC, Gabrail NY, Dalton JT, Hancock ML, Johnston MA & Steiner MS. (2013). Effects of enobosarm on muscle wasting and physical function in patients with cancer: a double-blind, randomised controlled phase 2 trial. *The lancet oncology* **14**, 335-345.
- Dogra C, Changotra H, Mohan S & Kumar A. (2006). Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis inhibits skeletal myogenesis through sustained activation of nuclear factor-kappaB and degradation of MyoD protein. *J Biol Chem* **281**, 10327-10336.
- Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin X, Wergedal JE & Kumar A. (2007). TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 1857-1869.
- Doucet M, Russell AP, Leger B, Debigare R, Joanisse DR, Caron MA, LeBlanc P & Maltais F. (2007). Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory and critical care medicine* **176**, 261-269.

- Douillard A, Galbes O, Begue G, Rossano B, Levin J, Vernus B, Bonnieu A, Candau R & Py G. (2012). Calpastatin overexpression in the skeletal muscle of mice prevents clenbuterol-induced muscle hypertrophy and phenotypic shift. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **39**, 364-372.
- Downer S, Joel S, Allbright A, Plant H, Stubbs L, Talbot D & Slevin M. (1993). A double blind placebo controlled trial of medroxyprogesterone acetate (MPA) in cancer cachexia. *Br J Cancer* **67**, 1102-1105.
- Dresler CM, Jeevanandam M & Brennan MF. (1987). Metabolic efficacy of enteral feeding in malnourished cancer and noncancer patients. *Metabolism: clinical and experimental* **36**, 82-88.
- Dressler KA, Mathias S & Kolesnick RN. (1992). Tumor necrosis factor-alpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system. *Science* **255**, 1715-1718.
- Du J, Wang X, Miereles C, Bailey JL, Debigare R, Zheng B, Price SR & Mitch WE. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* **113**, 115-123.
- Dudrick SJ, MacFadyen BV, Jr., Souchon EA, Englert DM & Copeland EM, 3rd. (1977). Parenteral nutrition techniques in cancer patients. *Cancer Res* **37**, 2440-2450.
- Dupont-Versteegden EE. (2005). Apoptosis in muscle atrophy: relevance to sarcopenia. *Experimental gerontology* **40**, 473-481.
- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Pasdeloup M, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A & Freyssen D. (2007). Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* **148**, 3140-3147.
- Dworzak F, Ferrari P, Gavazzi C, Maiorana C & Bozzetti F. (1998). Effects of cachexia due to cancer on whole body and skeletal muscle protein turnover. *Cancer* **82**, 42-48.
- Ebisui C, Tsujinaka T, Morimoto T, Kan K, Iijima S, Yano M, Kominami E, Tanaka K & Monden M. (1995). Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clin Sci (Lond)* **89**, 431-439.
- Eckel RH. (1989). Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* **320**, 1060-1068.
- Eden E, Edstrom S, Bennegard K, Schersten T & Lundholm K. (1984). Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding. *Cancer Res* **44**, 1718-1724.
- Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK & Londos C. (1990). Control of endogenous phosphorylation of the major cAMP-dependent protein kinase substrate in adipocytes by insulin and beta-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* **265**, 18769-18775.
- Egan JJ, Greenberg AS, Chang MK, Wek SA, Moos MC, Jr. & Londos C. (1992). Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8537-8541.
- Eley HL, Russell ST & Tisdale MJ. (2007a). Attenuation of muscle atrophy in a murine model of cachexia by inhibition of the dsRNA-dependent protein kinase. *Br J Cancer* **96**, 1216-1222.
- Eley HL, Russell ST & Tisdale MJ. (2007b). Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *The Biochemical journal* **407**, 113-120.

- Elia M, Van Bokhorst-de van der Schueren MA, Garvey J, Goedhart A, Lundholm K, Nitenberg G & Stratton RJ. (2006). Enteral (oral or tube administration) nutritional support and eicosapentaenoic acid in patients with cancer: a systematic review. *International journal of oncology* **28**, 5-23.
- Emery PW. (1999). Cachexia in experimental models. *Nutrition* **15**, 600-603.
- Emery PW, Edwards RH, Rennie MJ, Souhami RL & Halliday D. (1984a). Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)* **289**, 584-586.
- Emery PW, Lovell L & Rennie MJ. (1984b). Protein synthesis measured in vivo in muscle and liver of cachectic tumor-bearing mice. *Cancer Res* **44**, 2779-2784.
- Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ & Winter PD. (1984c). Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Bioscience reports* **4**, 83-91.
- Enomoto A, Rho MC, Fukami A, Hiraku O, Komiyama K & Hayashi M. (2004). Suppression of cancer cachexia by 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-acetate-a novel nonpeptide IL-6 receptor antagonist. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 1096-1102.
- Evans RD & Williamson DH. (1988). Tissue-specific effects of rapid tumour growth on lipid metabolism in the rat during lactation and on litter removal. *The Biochemical journal* **252**, 65-72.
- Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, Jatoi A, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, Mantovani G, Marks D, Mitch WE, Muscaritoli M, Najand A, Ponikowski P, Rossi Fanelli F, Schambelan M, Schols A, Schuster M, Thomas D, Wolfe R & Anker SD. (2008). Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* **27**, 793-799.
- Falconer JS, Fearon KC, Plester CE, Ross JA & Carter DC. (1994). Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer. *Ann Surg* **219**, 325-331.
- Falconer JS, Fearon KC, Ross JA, Elton R, Wigmore SJ, Garden OJ & Carter DC. (1995). Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer. *Cancer* **75**, 2077-2082.
- Fantin VR, St-Pierre J & Leder P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer cell* **9**, 425-434.
- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C & De Laurenzi V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging* **4**, 330-349.
- Favier FB, Benoit H & Freyssenet D. (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflugers Arch* **456**, 587-600.
- Favier FB, Costes F, Defour A, Bonnefoy R, Lefai E, Bauge S, Peinnequin A, Benoit H & Freyssenet D. (2010). Downregulation of Akt/mammalian target of rapamycin pathway in skeletal muscle is associated with increased REDD1 expression in response to chronic hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, R1659-1666.
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G, Davis M, Muscaritoli M, Ottery F, Radbruch L, Ravasco P, Walsh D, Wilcock A, Kaasa S & Baracos VE. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The lancet oncology* **12**, 489-495.
- Fearon KC. (1992). The Sir David Cuthbertson Medal Lecture 1991. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. *The Proceedings of the Nutrition Society* **51**, 251-265.
- Fearon KC, Barber MD, Falconer JS, McMillan DC, Ross JA & Preston T. (1999). Pancreatic cancer as a model: inflammatory mediators, acute-phase response, and cancer cachexia. *World journal of surgery* **23**, 584-588.

- Fearon KC, Barber MD, Moses AG, Ahmedzai SH, Taylor GS, Tisdale MJ & Murray GD. (2006). Double-blind, placebo-controlled, randomized study of eicosapentaenoic acid diester in patients with cancer cachexia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**, 3401-3407.
- Fearon KC, Falconer JS, Slater C, McMillan DC, Ross JA & Preston T. (1998). Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response. *Ann Surg* **227**, 249-254.
- Fearon KC, Glass DJ & Guttridge DC. (2012). Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell metabolism* **16**, 153-166.
- Fearon KC, Hansell DT, Preston T, Plumb JA, Davies J, Shapiro D, Shenkin A, Calman KC & Burns HJ. (1988). Influence of whole body protein turnover rate on resting energy expenditure in patients with cancer. *Cancer Res* **48**, 2590-2595.
- Fearon KC, McMillan DC, Preston T, Winstanley FP, Cruickshank AM & Shenkin A. (1991). Elevated circulating interleukin-6 is associated with an acute-phase response but reduced fixed hepatic protein synthesis in patients with cancer. *Ann Surg* **213**, 26-31.
- Fearon KC & Preston T. (1990). Body composition in cancer cachexia. *Infusionstherapie* **17 Suppl 3**, 63-66.
- Fearon KC, Von Meyenfeldt MF, Moses AG, Van Geenen R, Roy A, Gouma DJ, Giacosa A, Van Gossum A, Bauer J, Barber MD, Aaronson NK, Voss AC & Tisdale MJ. (2003). Effect of a protein and energy dense N-3 fatty acid enriched oral supplement on loss of weight and lean tissue in cancer cachexia: a randomised double blind trial. *Gut* **52**, 1479-1486.
- Feng SL, Guo Y, Factor VM, Thorgeirsson SS, Bell DW, Testa JR, Peifley KA & Winkles JA. (2000). The Fn14 immediate-early response gene is induced during liver regeneration and highly expressed in both human and murine hepatocellular carcinomas. *The American journal of pathology* **156**, 1253-1261.
- Ferguson WW, Fidler MR, Folkmann CK & Starling JR. (1979). Correlation of lysosomal enzymes and cachexia in the tumor-bearing rat. *The Journal of surgical research* **26**, 150-156.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C & Parkin DM. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* **127**, 2893-2917.
- Fernstrom JD. (1985). Dietary effects on brain serotonin synthesis: relationship to appetite regulation. *The American journal of clinical nutrition* **42**, 1072-1082.
- Ferreira LF, Moylan JS, Gilliam LA, Smith JD, Nikolova-Karakashian M & Reid MB. (2010). Sphingomyelinase stimulates oxidant signaling to weaken skeletal muscle and promote fatigue. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C552-560.
- Ferreira SH, Moncada S & Vane JR. (1971). Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature: New biology* **231**, 237-239.
- Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, Richardson JA, Bassel-Duby R & Olson EN. (2007). Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *J Clin Invest* **117**, 2486-2495.
- Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E & Blenis J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & development* **16**, 1472-1487.
- Fleck A, Raines G, Hawker F, Trotter J, Wallace PI, Ledingham IM & Calman KC. (1985). Increased vascular permeability: a major cause of hypoalbuminaemia in disease and injury. *Lancet* **1**, 781-784.

- Flores EA, Bistran BR, Pomposelli JJ, Dinarello CA, Blackburn GL & Istfan NW. (1989). Infusion of tumor necrosis factor/cachectin promotes muscle catabolism in the rat. A synergistic effect with interleukin 1. *J Clin Invest* **83**, 1614-1622.
- Foltin RW, Brady JV & Fischman MW. (1986). Behavioral analysis of marijuana effects on food intake in humans. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **25**, 577-582.
- Foltin RW, Fischman MW & Byrne MF. (1988). Effects of smoked marijuana on food intake and body weight of humans living in a residential laboratory. *Appetite* **11**, 1-14.
- Fontes-Oliveira CC, Busquets S, Toledo M, Penna F, Paz Aylwin M, Sirisi S, Silva AP, Orpi M, Garcia A, Sette A, Ines Genovese M, Oliván M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2013). Mitochondrial and sarcoplasmic reticulum abnormalities in cancer cachexia: altered energetic efficiency? *Biochim Biophys Acta* **1830**, 2770-2778.
- Fouladiun M, Korner U, Bosaeus I, Daneryd P, Hyltander A & Lundholm KG. (2005). Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer* **103**, 2189-2198.
- Fouladiun M, Korner U, Gunnebo L, Sixt-Ammilon P, Bosaeus I & Lundholm K. (2007). Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia. *Clin Cancer Res* **13**, 6379-6385.
- Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferre T, Nagaev I, Andersson CX, Agudo J, Ruberte J, Bosch F & Smith U. (2008). Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia* **51**, 1306-1316.
- Fredrikson G, Stralfors P, Nilsson NO & Belfrage P. (1981). Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J Biol Chem* **256**, 6311-6320.
- Fredrikson G, Tornqvist H & Belfrage P. (1986). Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* **876**, 288-293.
- Fredrix EW, Soeters PB, Wouters EF, Deerenberg IM, von Meyenfeldt MF & Saris WH. (1991). Effect of different tumor types on resting energy expenditure. *Cancer Res* **51**, 6138-6141.
- Freyssenet D. (2006). Mécanismes cellulaires et moléculaires du contrôle de la masse musculaire lors d'un entraînement en force. *Science & Sports* **21**, 74-79.
- Frost RA, Nystrom GJ, Jefferson LS & Lang CH. (2007). Hormone, cytokine, and nutritional regulation of sepsis-induced increases in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E501-512.
- Fujiki F, Mukaida N, Hirose K, Ishida H, Harada A, Ohno S, Bluethmann H, Kawakami M, Akiyama M, Sone S & Matsushima K. (1997). Prevention of adenocarcinoma colon 26-induced cachexia by interleukin 10 gene transfer. *Cancer Res* **57**, 94-99.
- Fujita J, Tsujinaka T, Yano M, Ebisui C, Saito H, Katsume A, Akamatsu K, Ohsugi Y, Shiozaki H & Monden M. (1996). Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents muscle atrophy in colon-26 adenocarcinoma-bearing mice with modulation of lysosomal and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways. *Int J Cancer* **68**, 637-643.
- Furuno K & Goldberg AL. (1986). The activation of protein degradation in muscle by Ca²⁺ or muscle injury does not involve a lysosomal mechanism. *The Biochemical journal* **237**, 859-864.

- Furuno K, Goodman MN & Goldberg AL. (1990). Role of different proteolytic systems in the degradation of muscle proteins during denervation atrophy. *J Biol Chem* **265**, 8550-8557.
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I & Mori N. (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical journal* **349**, 629-634.
- Fuster G, Busquets S, Ametller E, Oliván M, Almendro V, de Oliveira CC, Figueras M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2007). Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists. *Cancer Res* **67**, 6512-6519.
- Futerman AH & Hannun YA. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports* **5**, 777-782.
- Futerman AH, Stieger B, Hubbard AL & Pagano RE. (1990). Sphingomyelin synthesis in rat liver occurs predominantly at the cis and medial cisternae of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **265**, 8650-8657.
- Galvao DA, Nosaka K, Taaffe DR, Spry N, Kristjanson LJ, McGuigan MR, Suzuki K, Yamaya K & Newton RU. (2006). Resistance training and reduction of treatment side effects in prostate cancer patients. *Medicine and science in sports and exercise* **38**, 2045-2052.
- Garcia JM, Friend J & Allen S. (2013). Therapeutic potential of anamorelin, a novel, oral ghrelin mimetic, in patients with cancer-related cachexia: a multicenter, randomized, double-blind, crossover, pilot study. *Support Care Cancer* **21**, 129-137.
- Garcia JM & Polvino WJ. (2007). Effect on body weight and safety of RC-1291, a novel, orally available ghrelin mimetic and growth hormone secretagogue: results of a phase I, randomized, placebo-controlled, multiple-dose study in healthy volunteers. *The oncologist* **12**, 594-600.
- Garcia JM & Polvino WJ. (2009). Pharmacodynamic hormonal effects of anamorelin, a novel oral ghrelin mimetic and growth hormone secretagogue in healthy volunteers. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society* **19**, 267-273.
- Garcia-Aymerich J, Lange P, Benet M, Schnohr P & Anto JM. (2006). Regular physical activity reduces hospital admission and mortality in chronic obstructive pulmonary disease: a population based cohort study. *Thorax* **61**, 772-778.
- Garcia-Martinez C, Agell N, Llovera M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1993a). Tumour necrosis factor-alpha increases the ubiquitination of rat skeletal muscle proteins. *FEBS Lett* **323**, 211-214.
- Garcia-Martinez C, Llovera M, Agell N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1994). Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased by tumour necrosis factor-alpha. *Biochem Biophys Res Commun* **201**, 682-686.
- Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1993b). Acute treatment with tumour necrosis factor-alpha induces changes in protein metabolism in rat skeletal muscle. *Molecular and cellular biochemistry* **125**, 11-18.
- Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1995). Amino acid uptake in skeletal muscle of rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Molecular and cellular biochemistry* **148**, 17-23.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A & Fernandez-Checa JC. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* **272**, 11369-11377.
- Gault CR, Obeid LM & Hannun YA. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Advances in experimental medicine and biology* **688**, 1-23.

- Gelin J, Moldawer LL, Lonroth C, Sherry B, Chizzonite R & Lundholm K. (1991). Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. *Cancer Res* **51**, 415-421.
- George I, Bish LT, Kamalakkannan G, Petrilli CM, Oz MC, Naka Y, Sweeney HL & Maybaum S. (2010). Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *European journal of heart failure* **12**, 444-453.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H & Stein H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* **31**, 13-20.
- Ghosh S, May MJ & Kopp EB. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual review of immunology* **16**, 225-260.
- Giacosa A, Frascio F, Sukkar SG & Roncella S. (1996). Food intake and body composition in cancer cachexia. *Nutrition* **12**, S20-23.
- Gillard BK, Clement RG & Marcus DM. (1998). Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* **8**, 885-890.
- Gilson H, Schakman O, Combaret L, Lause P, Grobet L, Attaix D, Ketelslegers JM & Thissen JP. (2007). Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. *Endocrinology* **148**, 452-460.
- Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K & Thissen JP. (2009). Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E157-164.
- Glass DJ. (2010a). PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Current topics in microbiology and immunology* **346**, 267-278.
- Glass DJ. (2010b). Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**, 225-229.
- Glass RE, Fern EB & Garlick PJ. (1983). Whole-body protein turnover before and after resection of colorectal tumours. *Clin Sci (Lond)* **64**, 101-108.
- Glickman MH & Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological reviews* **82**, 373-428.
- Glicksman AS & Rawson RW. (1956). Diabetes and altered carbohydrate metabolism in patients with cancer. *Cancer* **9**, 1127-1134.
- Goldberg RM, Loprinzi CL, Mailliard JA, O'Fallon JR, Krook JE, Ghosh C, Hestorff RD, Chong SF, Reuter NF & Shanahan TG. (1995). Pentoxifylline for treatment of cancer anorexia and cachexia? A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **13**, 2856-2859.
- Goldberg SC, Halmi KA, Eckert ED, Casper RC & Davis JM. (1979). Cyproheptadine in anorexia nervosa. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* **134**, 67-70.
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A & Goldberg AL. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14440-14445.
- Gomes-Marcondes MC & Tisdale MJ. (2002). Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett* **180**, 69-74.

- Gomez J, Page K & McAlindon M. (2008). Incidence of complications of home parenteral nutrition in patients with cancer versus other disease groups. *Proceedings of the Nutrition Society* **67**.
- Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S & Bhasin S. (1998). Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 14938-14943.
- Goodman MN. (1991). Tumor necrosis factor induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *The American journal of physiology* **260**, E727-730.
- Goodman MN. (1994). Interleukin-6 induces skeletal muscle protein breakdown in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **205**, 182-185.
- Gordon JN, Trebble TM, Ellis RD, Duncan HD, Johns T & Goggin PM. (2005). Thalidomide in the treatment of cancer cachexia: a randomised placebo controlled trial. *Gut* **54**, 540-545.
- Granneman JG, Moore HP, Granneman RL, Greenberg AS, Obin MS & Zhu Z. (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J Biol Chem* **282**, 5726-5735.
- Granneman JG, Moore HP, Krishnamoorthy R & Rathod M. (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J Biol Chem* **284**, 34538-34544.
- Greenbaum LM & Sutherland JH. (1983). Host cathepsin D response to tumor in the normal and pepstatin-treated mouse. *Cancer Res* **43**, 2584-2587.
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ & Londos C. (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem* **266**, 11341-11346.
- Greenberg AS, Nordan RP, McIntosh J, Calvo JC, Scow RO & Jablons D. (1992). Interleukin 6 reduces lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Res* **52**, 4113-4116.
- Greig CA, Gray C, Johns N, MacDonald A, Stephens NA, Skipworth RJ, Wall L, Fallon M, Fox GM & Fearon K. (2012). Pilot phase II trial of formoterol fumarate combined with megestrol acetate in patients with advanced malignancy. *International Symposium on Supportive Care in Cancer (New York City, USA) Poster session*, Abstract No: 1165.
- Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R & Georges M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* **17**, 71-74.
- Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, Christians E, Desmecht D, Coignoul F, Kahn R & Georges M. (2003). Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis* **35**, 227-238.
- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M & et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589-600.
- Grosvenor M, Bulcavage L & Chlebowski RT. (1989). Symptoms potentially influencing weight loss in a cancer population. Correlations with primary site, nutritional status, and chemotherapy administration. *Cancer* **63**, 330-334.
- Grotenhermen F. (2003). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical pharmacokinetics* **42**, 327-360.

- Groundwater P, Beck SA, Barton C, Adamson C, Ferrier IN & Tisdale MJ. (1990). Alteration of serum and urinary lipolytic activity with weight loss in cachectic cancer patients. *Br J Cancer* **62**, 816-821.
- Gruson D, Ahn SA, Ketelslegers JM & Rousseau MF. (2011). Increased plasma myostatin in heart failure. *European journal of heart failure* **13**, 734-736.
- Guroff G. (1964). A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *J Biol Chem* **239**, 149-155.
- Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG & Baldwin AS, Jr. (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and cellular biology* **19**, 5785-5799.
- Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang CY & Baldwin AS, Jr. (2000). NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science* **289**, 2363-2366.
- Hack V, Breitzkreutz R, Kinscherf R, Rohrer H, Bartsch P, Taut F, Benner A & Droge W. (1998). The redox state as a correlate of senescence and wasting and as a target for therapeutic intervention. *Blood* **92**, 59-67.
- Hackenberg R, Hofmann J, Wolff G, Holzel F & Schulz KD. (1990). Down-regulation of androgen receptor by progestins and interference with estrogenic or androgenic stimulation of mammary carcinoma cell growth. *Journal of cancer research and clinical oncology* **116**, 492-498.
- Haddad F, Roy RR, Zhong H, Edgerton VR & Baldwin KM. (2003). Atrophy responses to muscle inactivity. II. Molecular markers of protein deficits. *J Appl Physiol (1985)* **95**, 791-802.
- Haddad F, Zaldivar F, Cooper DM & Adams GR. (2005). IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* **98**, 911-917.
- Haemmerle G, Lass A, Zimmermann R, Gorkiewicz G, Meyer C, Rozman J, Heldmaier G, Maier R, Theussl C, Eder S, Kratky D, Wagner EF, Klingenspor M, Hoefler G & Zechner R. (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* **312**, 734-737.
- Haemmerle G, Zimmermann R, Hayn M, Theussl C, Waeg G, Wagner E, Sattler W, Magin TM, Wagner EF & Zechner R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* **277**, 4806-4815.
- Halabi S, Small EJ & Vogelzang NJ. (2005). Elevated body mass index predicts for longer overall survival duration in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 2434-2435; author reply 2435.
- Hale LP, Price DT, Sanchez LM, Demark-Wahnefried W & Madden JF. (2001). Zinc alpha-2-glycoprotein is expressed by malignant prostatic epithelium and may serve as a potential serum marker for prostate cancer. *Clin Cancer Res* **7**, 846-853.
- Ham DJ, Murphy KT, Chee A, Lynch GS & Koopman R. (2014). Glycine administration attenuates skeletal muscle wasting in a mouse model of cancer cachexia. *Clin Nutr* **33**, 448-458.
- Han HQ, Zhou X, Mitch WE & Goldberg AL. (2013). Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2333-2347.
- Han S, Yoon K, Lee K, Kim K, Jang H, Lee NK, Hwang K & Young Lee S. (2003). TNF-related weak inducer of apoptosis receptor, a TNF receptor superfamily member, activates NF-kappa B through TNF receptor-associated factors. *Biochem Biophys Res Commun* **305**, 789-796.

- Hanada K. (2003). Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1632**, 16-30.
- Hanada T, Toshinai K, Kajimura N, Nara-Ashizawa N, Tsukada T, Hayashi Y, Osuye K, Kangawa K, Matsukura S & Nakazato M. (2003). Anti-cachectic effect of ghrelin in nude mice bearing human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 275-279.
- Hannun YA & Obeid LM. (2002). The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* **277**, 25847-25850.
- Hara K, Yonezawa K, Kozlowski MT, Sugimoto T, Andrabi K, Weng QP, Kasuga M, Nishimoto I & Avruch J. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem* **272**, 26457-26463.
- Harada N, Nakayama M, Nakano H, Fukuchi Y, Yagita H & Okumura K. (2002). Pro-inflammatory effect of TWEAK/Fn14 interaction on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **299**, 488-493.
- Hart FD & Boardman PL. (1963). Indomethacin: A New Non-Steroid Anti-Inflammatory Agent. *British medical journal* **2**, 965-970.
- Haugen F, Labori KJ, Noreng HJ, Buanes T, Iversen PO & Drevon CA. (2011). Altered expression of genes in adipose tissues associated with reduced fat mass in patients with pancreatic cancer. *Archives of physiology and biochemistry* **117**, 78-87.
- Hayden MS & Ghosh S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & development* **26**, 203-234.
- Hayot M, Rodriguez J, Vernus B, Carnac G, Jean E, Allen D, Goret L, Obert P, Candau R & Bonniou A. (2011). Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. *Mol Cell Endocrinol* **332**, 38-47.
- Henderson JT, Mullen BJ & Roder JC. (1996). Physiological effects of CNTF-induced wasting. *Cytokine* **8**, 784-793.
- Henderson JT, Seniuk NA, Richardson PM, Gauldie J & Roder JC. (1994). Systemic administration of ciliary neurotrophic factor induces cachexia in rodents. *J Clin Invest* **93**, 2632-2638.
- Heymsfield SB & McManus CB. (1985). Tissue components of weight loss in cancer patients. A new method of study and preliminary observations. *Cancer* **55**, 238-249.
- Hill JJ, Davies MV, Pearson AA, Wang JH, Hewick RM, Wolfman NM & Qiu Y. (2002). The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum. *J Biol Chem* **277**, 40735-40741.
- Hill JJ, Qiu Y, Hewick RM & Wolfman NM. (2003). Regulation of myostatin in vivo by growth and differentiation factor-associated serum protein-1: a novel protein with protease inhibitor and follistatin domains. *Mol Endocrinol* **17**, 1144-1154.
- Hinkle RT, Hodge KM, Cody DB, Sheldon RJ, Kobilka BK & Isfort RJ. (2002). Skeletal muscle hypertrophy and anti-atrophy effects of clenbuterol are mediated by the beta2-adrenergic receptor. *Muscle Nerve* **25**, 729-734.
- Hirai K, Hussey HJ, Barber MD, Price SA & Tisdale MJ. (1998). Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients. *Cancer Res* **58**, 2359-2365.
- Hirata H, Tetsumoto S, Kijima T, Kida H, Kumagai T, Takahashi R, Otani Y, Inoue K, Kuhara H, Shimada K, Nagatomo I, Takeda Y, Goya S, Yoshizaki K, Kawase I, Tachibana I, Kishimoto T & Kumanogoh A. (2013).

- Favorable Responses to Tocilizumab in Two Patients With Cancer-Related Cachexia. *J Pain Symptom Manage*.
- Hojjati MR, Li Z & Jiang XC. (2005). Serine palmitoyl-CoA transferase (SPT) deficiency and sphingolipid levels in mice. *Biochim Biophys Acta* **1737**, 44-51.
- Holecek M. (2012). Muscle wasting in animal models of severe illness. *International journal of experimental pathology* **93**, 157-171.
- Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ & Summers SA. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell metabolism* **5**, 167-179.
- Holland WL & Summers SA. (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocrine reviews* **29**, 381-402.
- Hollenberg CH, Raben MS & Astwood EB. (1961). The lipolytic response to corticotropin. *Endocrinology* **68**, 589-598.
- Holm E, Hagmuller E, Staedt U, Schlickeiser G, Gunther HJ, Leweling H, Tokus M & Kollmar HB. (1995). Substrate balances across colonic carcinomas in humans. *Cancer Res* **55**, 1373-1378.
- Holroyde CP, Gabuzda TG, Putnam RC, Paul P & Reichard GA. (1975). Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma. *Cancer Res* **35**, 3710-3714.
- Holroyde CP, Skutches CL, Boden G & Reichard GA. (1984). Glucose metabolism in cachectic patients with colorectal cancer. *Cancer Res* **44**, 5910-5913.
- Holzbaur EL, Howland DS, Weber N, Wallace K, She Y, Kwak S, Tchistiakova LA, Murphy E, Hinson J, Karim R, Tan XY, Kelley P, McGill KC, Williams G, Hobbs C, Doherty P, Zaleska MM, Pangalos MN & Walsh FS. (2006). Myostatin inhibition slows muscle atrophy in rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* **23**, 697-707.
- Homnick DN, Homnick BD, Reeves AJ, Marks JH, Pimentel RS & Bonnema SK. (2004). Cyproheptadine is an effective appetite stimulant in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* **38**, 129-134.
- Homnick DN, Marks JH, Hare KL & Bonnema SK. (2005). Long-term trial of cyproheptadine as an appetite stimulant in cystic fibrosis. *Pediatric pulmonology* **40**, 251-256.
- Honors MA & Kinzig KP. (2014). Chronic exendin-4 treatment prevents the development of cancer cachexia symptoms in male rats bearing the yoshida sarcoma. *Hormones & cancer* **5**, 33-41.
- Hopkinson J, Wright D & Corner J. (2006). Exploring the experience of weight loss in people with advanced cancer. *Journal of advanced nursing* **54**, 304-312.
- Hoppeler H. (1986). Exercise-induced ultrastructural changes in skeletal muscle. *Int J Sports Med* **7**, 187-204.
- Hornberger TA, Hunter RB, Kandarian SC & Esser KA. (2001). Regulation of translation factors during hindlimb unloading and denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**, C179-187.
- Hornemann T, Penno A, Rutti MF, Ernst D, Kivrak-Pfiffner F, Rohrer L & von Eckardstein A. (2009). The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J Biol Chem* **284**, 26322-26330.

- Huang J, Das SK, Jha P, Al Zoughbi W, Schauer S, Claudel T, Sexl V, Vesely P, Birner-Gruenberger R, Kratky D, Trauner M & Hoefler G. (2013). The PPARalpha agonist fenofibrate suppresses B-cell lymphoma in mice by modulating lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1831**, 1555-1565.
- Huang J & Forsberg NE. (1998). Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12100-12105.
- Hunter DC, Weintraub M, Blackburn GL & Bistrian BR. (1989). Branched chain amino acids as the protein component of parenteral nutrition in cancer cachexia. *The British journal of surgery* **76**, 149-153.
- Hunter RB & Kandarian SC. (2004). Disruption of either the Nfkb1 or the Bcl3 gene inhibits skeletal muscle atrophy. *J Clin Invest* **114**, 1504-1511.
- Hunter RB, Stevenson E, Koncarevic A, Mitchell-Felton H, Essig DA & Kandarian SC. (2002). Activation of an alternative NF-kappaB pathway in skeletal muscle during disuse atrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **16**, 529-538.
- Hussey HJ & Tisdale MJ. (1994). Effect of polyunsaturated fatty acids on the growth of murine colon adenocarcinomas in vitro and in vivo. *Br J Cancer* **70**, 6-10.
- Hussey HJ, Todorov PT, Field WN, Inagaki N, Tanaka Y, Ishitsuka H & Tisdale MJ. (2000). Effect of a fluorinated pyrimidine on cachexia and tumour growth in murine cachexia models: relationship with a proteolysis inducing factor. *Br J Cancer* **83**, 56-62.
- Huston RB & Krebs EG. (1968). Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca²⁺. II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochemistry* **7**, 2116-2122.
- Hyde R, Hajduch E, Powell DJ, Taylor PM & Hundal HS. (2005). Ceramide down-regulates System A amino acid transport and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 461-463.
- Hyltander A, Svaninger G & Lundholm K. (1993). The effect of clenbuterol on body composition in spontaneously eating tumour-bearing mice. *Bioscience reports* **13**, 325-331.
- Hyltander A, Warnold I, Eden E & Lundholm K. (1991). Effect on whole-body protein synthesis after institution of intravenous nutrition in cancer and non-cancer patients who lose weight. *Eur J Cancer* **27**, 16-21.
- Inagaki J, Rodriguez V & Bodey GP. (1974). Proceedings: Causes of death in cancer patients. *Cancer* **33**, 568-573.
- INCa. (2013). La situation du cancer en France en 2012. In *Etat des lieux et des connaissances*, pp. 1-352. Institut National du Cancer.
- Inoki K, Li Y, Xu T & Guan KL. (2003). Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development* **17**, 1829-1834.
- Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J & Guan KL. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology* **4**, 648-657.
- Inui A. (2002). Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA: a cancer journal for clinicians* **52**, 72-91.
- Isenring EA, Capra S & Bauer JD. (2004). Nutrition intervention is beneficial in oncology outpatients receiving radiotherapy to the gastrointestinal or head and neck area. *Br J Cancer* **91**, 447-452.

- Ishiko O, Sumi T, Hirai K, Honda KI, Nakata S, Yoshida H & Ogita S. (2001). Apoptosis of muscle cells causes weight loss prior to impairment of DNA synthesis in tumor-bearing rabbits. *Japanese journal of cancer research : Gann* **92**, 30-35.
- Islam-Ali B, Khan S, Price SA & Tisdale MJ. (2001). Modulation of adipocyte G-protein expression in cancer cachexia by a lipid-mobilizing factor (LMF). *Br J Cancer* **85**, 758-763.
- Jaafar R, De Larichaudy J, Chanon S, Euthine V, Durand C, Naro F, Bertolino P, Vidal H, Lefai E & Nemoz G. (2013). Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling. *Cell Commun Signal* **11**, 55.
- Jaafar R, Zeiller C, Pirola L, Di Grazia A, Naro F, Vidal H, Lefai E & Nemoz G. (2011). Phospholipase D regulates myogenic differentiation through the activation of both mTORC1 and mTORC2 complexes. *J Biol Chem* **286**, 22609-22621.
- Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J & Su B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125-137.
- Jacobs FM, van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF & Smidt MP. (2003). FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem* **278**, 35959-35967.
- Jagoe RT, Redfern CP, Roberts RG, Gibson GJ & Goodship TH. (2002). Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy. *Clin Sci (Lond)* **102**, 353-361.
- Jahnke VE, Sabido O, Defour A, Castells J, Lefai E, Roussel D & Freyssenet D. (2010). Evidence for mitochondrial respiratory deficiency in rat rhabdomyosarcoma cells. *PLoS One* **5**, e8637.
- Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM & Ross R. (2000). Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* **89**, 81-88.
- Jatoi A, Dakhil SR, Nguyen PL, Sloan JA, Kugler JW, Rowland KM, Jr., Soori GS, Wender DB, Fitch TR, Novotny PJ & Loprinzi CL. (2007). A placebo-controlled double blind trial of etanercept for the cancer anorexia/weight loss syndrome: results from N00C1 from the North Central Cancer Treatment Group. *Cancer* **110**, 1396-1403.
- Jatoi A, Daly BD, Hughes VA, Dallal GE, Kehayias J & Roubenoff R. (2001). Do patients with nonmetastatic non-small cell lung cancer demonstrate altered resting energy expenditure? *The Annals of thoracic surgery* **72**, 348-351.
- Jatoi A, Rowland K, Loprinzi CL, Sloan JA, Dakhil SR, MacDonald N, Gagnon B, Novotny PJ, Mailliard JA, Bushey TI, Nair S & Christensen B. (2004). An eicosapentaenoic acid supplement versus megestrol acetate versus both for patients with cancer-associated wasting: a North Central Cancer Treatment Group and National Cancer Institute of Canada collaborative effort. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **22**, 2469-2476.
- Jatoi A, Windschitl HE, Loprinzi CL, Sloan JA, Dakhil SR, Mailliard JA, Pundaleeka S, Kardinal CG, Fitch TR, Krook JE, Novotny PJ & Christensen B. (2002). Dronabinol versus megestrol acetate versus combination therapy for cancer-associated anorexia: a North Central Cancer Treatment Group study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 567-573.
- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B & Gross RW. (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* **279**, 48968-48975.

- Jeong J, Conboy MJ & Conboy IM. (2013). Pharmacological inhibition of myostatin/TGF-beta receptor/pSmad3 signaling rescues muscle regenerative responses in mouse model of type 1 diabetes. *Acta pharmacologica Sinica* **34**, 1052-1060.
- Ji S, Losinski RL, Cornelius SG, Frank GR, Willis GM, Gerrard DE, Depreux FF & Spurlock ME. (1998). Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *The American journal of physiology* **275**, R1265-1273.
- Jiao J, Yuan T, Zhou Y, Xie W, Zhao Y, Zhao J, Ouyang H & Pang D. (2011). Analysis of myostatin and its related factors in various porcine tissues. *Journal of animal science* **89**, 3099-3106.
- Joachim H, Bryan CP & Smith GE. (1900). *The Papyrus Ebers*. Geoffrey Bles, London, England.
- Joassard OR, Amirouche A, Gallot YS, Desgeorges MM, Castells J, Durieux AC, Berthon P & Freyssenet DG. (2013a). Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2444-2455.
- Joassard OR, Durieux AC & Freyssenet DG. (2013b). beta2-Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2309-2321.
- Jocken JW & Blaak EE. (2008). Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiology & behavior* **94**, 219-230.
- Jogo M, Shiraishi S & Tamura TA. (2009). Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS Lett* **583**, 2715-2719.
- Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C & Obeid LM. (2003). Role of human sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 in the regulation of intra- and extracellular sphingosine-1-phosphate levels and cell viability. *J Biol Chem* **278**, 34541-34547.
- Jones SW, Parr T, Sensky PL, Scothern GP, Bardsley RG & Buttery PJ. (1999). Fibre type-specific expression of p94, a skeletal muscle-specific calpain. *Journal of muscle research and cell motility* **20**, 417-424.
- Joshi SK, Kim HT, Feeley BT & Liu X. (2014). Differential ubiquitin-proteasome and autophagy signaling following rotator cuff tears and suprascapular nerve injury. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **32**, 138-144.
- Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B & Cabello G. (2003). Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Exp Cell Res* **286**, 263-275.
- Judge AR, Koncarevic A, Hunter RB, Liou HC, Jackman RW & Kandarian SC. (2007). Role for I κ B α , but not c-Rel, in skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C372-382.
- Kadowaki M & Kanazawa T. (2003). Amino acids as regulators of proteolysis. *J Nutr* **133**, 2052S-2056S.
- Kaestner KH, Knochel W & Martinez DE. (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & development* **14**, 142-146.
- Kahn RH. (1907). Zur Physiologie der Trachea. In *Archiv für Anatomie und Physiologie, Archiv für Physiologie*, ed. Waldeyer W & Engelmann TW, pp. 398-426. Verlag Von Veit & Comp., Leipzig, Germany.
- Kalluri R & Zeisberg M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 392-401.
- Kambadur R, Sharma M, Smith TP & Bass JJ. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res* **7**, 910-916.

- Kamei Y, Miura S, Suzuki M, Kai Y, Mizukami J, Taniguchi T, Mochida K, Hata T, Matsuda J, Aburatani H, Nishino I & Ezaki O. (2004). Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem* **279**, 41114-41123.
- Kannan R, Lyon I & Baker N. (1980). Dietary control of lipogenesis in vivo in host tissues and tumors of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res* **40**, 4606-4611.
- Kardinal CG, Loprinzi CL, Schaid DJ, Hass AC, Dose AM, Athmann LM, Mailliard JA, McCormack GW, Gerstner JB & Schray MF. (1990). A controlled trial of cyproheptadine in cancer patients with anorexia and/or cachexia. *Cancer* **65**, 2657-2662.
- Karlsson KA. (1970). Sphingolipid long chain bases. *Lipids* **5**, 878-891.
- Kawakami M, Murase T, Ogawa H, Ishibashi S, Mori N, Takaku F & Shibata S. (1987). Human recombinant TNF suppresses lipoprotein lipase activity and stimulates lipolysis in 3T3-L1 cells. *Journal of biochemistry* **101**, 331-338.
- Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA & Patterson C. (2004). Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 18135-18140.
- Keifer JA, Guttridge DC, Ashburner BP & Baldwin AS, Jr. (2001). Inhibition of NF-kappa B activity by thalidomide through suppression of IkappaB kinase activity. *J Biol Chem* **276**, 22382-22387.
- Kelly FJ & Goldspink DF. (1982). The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *The Biochemical journal* **208**, 147-151.
- Kenley RA, Denissenko MF, Mullin RJ, Story J & Ekblom J. (2008). Formoterol fumarate and roxithromycin effects on muscle mass in an animal model of cancer cachexia. *Oncol Rep* **19**, 1113-1121.
- Kerr JF, Wyllie AH & Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Khal J, Hine AV, Fearon KC, Dejong CH & Tisdale MJ. (2005a). Increased expression of proteasome subunits in skeletal muscle of cancer patients with weight loss. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2196-2206.
- Khal J, Wyke SM, Russell ST, Hine AV & Tisdale MJ. (2005b). Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia. *Br J Cancer* **93**, 774-780.
- Khan S & Tisdale MJ. (1999). Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipid-mobilising factor. *Int J Cancer* **80**, 444-447.
- Khan ZH, Simpson EJ, Cole AT, Holt M, MacDonald I, Pye D, Austin A & Freeman JG. (2003). Oesophageal cancer and cachexia: the effect of short-term treatment with thalidomide on weight loss and lean body mass. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **17**, 677-682.
- Kien CL & Camitta BM. (1987). Close association of accelerated rates of whole body protein turnover (synthesis and breakdown) and energy expenditure in children with newly diagnosed acute lymphocytic leukemia. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* **11**, 129-134.
- Kien CL, Young VR, Rohrbaugh DK & Burke JF. (1978). Increased rates of whole body protein synthesis and breakdown in children recovering from burns. *Ann Surg* **187**, 383-391.
- Kim HJ, Lee S & Jung JU. (2010). When autophagy meets viruses: a double-edged sword with functions in defense and offense. *Seminars in immunopathology* **32**, 323-341.

- Kim HS, Liang L, Dean RG, Hausman DB, Hartzell DL & Baile CA. (2001). Inhibition of preadipocyte differentiation by myostatin treatment in 3T3-L1 cultures. *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 902-906.
- Kim MY, Linardic C, Obeid L & Hannun Y. (1991). Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation. *J Biol Chem* **266**, 484-489.
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM & Goldberg AL. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* **274**, 3363-3371.
- Kitada S, Hays EF & Mead JF. (1980). A lipid mobilizing factor in serum of tumor-bearing mice. *Lipids* **15**, 168-174.
- Kitada S, Hays EF & Mead JF. (1981). Characterization of a lipid mobilizing factor from tumors. *Progress in lipid research* **20**, 823-826.
- Kitada S, Hays EF, Mead JF & Zabin I. (1982). Lipolysis induction in adipocytes by a protein from tumor cells. *Journal of cellular biochemistry* **20**, 409-416.
- Klein S & Wolfe RR. (1990). Whole-body lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling in cachectic patients with esophageal cancer. *J Clin Invest* **86**, 1403-1408.
- Kline WO, Panaro FJ, Yang H & Bodine SC. (2007). Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *J Appl Physiol* **102**, 740-747.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M & Agostinis P. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544.
- Knox LS, Crosby LO, Feurer ID, Buzby GP, Miller CL & Mullen JL. (1983). Energy expenditure in malnourished cancer patients. *Ann Surg* **197**, 152-162.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H & Kangawa K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660.
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K & Chiba T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* **169**, 425-434.
- Kondas K, Szlama G, Trexler M & Patthy L. (2008). Both WFIKKN1 and WFIKKN2 have high affinity for growth and differentiation factors 8 and 11. *J Biol Chem* **283**, 23677-23684.
- Kondo H, Miura M & Itokawa Y. (1991). Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta physiologica Scandinavica* **142**, 527-528.
- Koohmaraie M. (1992). Ovine skeletal muscle multicatalytic proteinase complex (proteasome): purification, characterization, and comparison of its effects on myofibrils with mu-calpains. *Journal of animal science* **70**, 3697-3708.
- Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT & Lynch GS. (2010). Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic {beta}-adrenoceptor stimulation in mice. *The Journal of physiology* **588**, 4811-4823.
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL & Burgering BM. (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* **398**, 630-634.

- Kralovic RC, Zepp FA & Cenedella RJ. (1977). Studies of the mechanism of carcass fat depletion in experimental cancer. *Eur J Cancer* **13**, 1071-1079.
- Krause R, James JH, Ziparo V & Fischer JE. (1979). Brain tryptophan and the neoplastic anorexia-cachexia syndrome. *Cancer* **44**, 1003-1008.
- Krintel C, Osmark P, Larsen MR, Resjo S, Logan DT & Holm C. (2008). Ser649 and Ser650 are the major determinants of protein kinase A-mediated activation of human hormone-sensitive lipase against lipid substrates. *PLoS One* **3**, e3756.
- Krzystek-Korpacka M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Kustrzeba-Wojcicka I & Banas T. (2007). Impact of weight loss on circulating IL-1, IL-6, IL-8, TNF-alpha, VEGF-A, VEGF-C and midkine in gastroesophageal cancer patients. *Clinical biochemistry* **40**, 1353-1360.
- Kubota A, Meguid MM & Hitch DC. (1992). Amino acid profiles correlate diagnostically with organ site in three kinds of malignant tumors. *Cancer* **69**, 2343-2348.
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T & Mizushima N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036.
- Kuroda K, Nakashima J, Kanao K, Kikuchi E, Miyajima A, Horiguchi Y, Nakagawa K, Oya M, Ohigashi T & Murai M. (2007). Interleukin 6 is associated with cachexia in patients with prostate cancer. *Urology* **69**, 113-117.
- Kurzer M, Janiszewski J & Meguid MM. (1988). Amino acid profiles in tumor-bearing and pair-fed nontumor-bearing malnourished rats. *Cancer* **62**, 1492-1496.
- Lagirand-Cantaloube J, Cornille K, Csibi A, Batonnet-Pichon S, Leibovitch MP & Leibovitch SA. (2009). Inhibition of atrogen-1/MAFbx mediated MyoD proteolysis prevents skeletal muscle atrophy in vivo. *PLoS One* **4**, e4973.
- Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT & Leibovitch SA. (2008). The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogen1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *The EMBO journal* **27**, 1266-1276.
- Lai CH, Chou CY, Ch'ang LY, Liu CS & Lin W. (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res* **10**, 703-713.
- Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, Stitt TN, Economides AN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2004). Conditional activation of akt in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Molecular and cellular biology* **24**, 9295-9304.
- Lai V, George J, Richey L, Kim HJ, Cannon T, Shores C & Couch M. (2008). Results of a pilot study of the effects of celecoxib on cancer cachexia in patients with cancer of the head, neck, and gastrointestinal tract. *Head & neck* **30**, 67-74.
- Lainscak M, Filippatos GS, Gheorghiade M, Fonarow GC & Anker SD. (2008). Cachexia: common, deadly, with an urgent need for precise definition and new therapies. *The American journal of cardiology* **101**, 8E-10E.
- Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP & Brown TG, Jr. (1967). Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* **214**, 597-598.
- Lands AM, Luduena FP, Hoppe JO & Oyen IH. (1958). The pharmacologic actions of the bronchodilator drug, isoetharine. *Journal of the American Pharmaceutical Association American Pharmaceutical Association* **47**, 744-748.

- Lang CH, Frost RA, Nairn AC, MacLean DA & Vary TC. (2002). TNF-alpha impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E336-347.
- Langen RC, Schols AM, Kelders MC, Wouters EF & Janssen-Heininger YM. (2001). Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**, 1169-1180.
- Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S & Kambadur R. (2002). Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* **277**, 49831-49840.
- Langley B, Thomas M, McFarlane C, Gilmour S, Sharma M & Kambadur R. (2004). Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway. *Oncogene* **23**, 524-534.
- Langstein HN, Doherty GM, Fraker DL, Buresh CM & Norton JA. (1991). The roles of gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha in an experimental rat model of cancer cachexia. *Cancer Res* **51**, 2302-2306.
- Lanza-Jacoby S, Lansey SC, Miller EE & Cleary MP. (1984). Sequential changes in the activities of lipoprotein lipase and lipogenic enzymes during tumor growth in rats. *Cancer Res* **44**, 5062-5067.
- Lanza-Jacoby S, Miller EE & Rosato FE. (1982). Changes in the activities of lipoprotein lipase and the lipogenic enzymes in tumor-bearing rats. *Lipids* **17**, 944-949.
- Lass A, Zimmermann R, Haemmerle G, Riederer M, Schoiswohl G, Schweiger M, Kienesberger P, Strauss JG, Gorkiewicz G & Zechner R. (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell metabolism* **3**, 309-319.
- Lavenstein AF, Dacaney EP, Lasagna L & Vanmetre TE. (1962). Effect of cyproheptadine on asthmatic children. Study of appetite, weight gain, and linear growth. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **180**, 912-916.
- Laviano A & Meguid MM. (1996). Nutritional issues in cancer management. *Nutrition* **12**, 358-371.
- Laviano A, Meguid MM, Inui A, Muscaritoli M & Rossi-Fanelli F. (2005). Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself. *Nature clinical practice Oncology* **2**, 158-165.
- Laviano A, Meguid MM & Rossi-Fanelli F. (2003). Cancer anorexia: clinical implications, pathogenesis, and therapeutic strategies. *The lancet oncology* **4**, 686-694.
- Lazarus DD, Destree AT, Mazzola LM, McCormack TA, Dick LR, Xu B, Huang JQ, Pierce JW, Read MA, Coggins MB, Solomon V, Goldberg AL, Brand SJ & Elliott PJ. (1999). A new model of cancer cachexia: contribution of the ubiquitin-proteasome pathway. *The American journal of physiology* **277**, E332-341.
- Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE & Goldberg AL. (2004). Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **18**, 39-51.
- Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, Pistoia V, Wei M, Hwang S, Merlino A, Emionite L, de Cabo R & Longo VD. (2012). Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Science translational medicine* **4**, 124ra127.
- Lee JY, Hopkinson NS & Kemp PR. (2011). Myostatin induces autophagy in skeletal muscle in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **415**, 632-636.
- Lee SJ. (2007). Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PLoS One* **2**, e789.

- Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, Soleimani A, Matzuk MM, Tsuchida K, Cohn RD & Barton ER. (2010). Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol* **24**, 1998-2008.
- Lee SJ & McPherron AC. (2001). Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9306-9311.
- Lee SJ, Reed LA, Davies MV, Girgenrath S, Goad ME, Tomkinson KN, Wright JF, Barker C, Ehrmantraut G, Holmstrom J, Trowell B, Gertz B, Jiang MS, Sebald SM, Matzuk M, Li E, Liang LF, Quattlebaum E, Stotish RL & Wolfman NM. (2005). Regulation of muscle growth by multiple ligands signaling through activin type II receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18117-18122.
- Lee SW, Dai G, Hu Z, Wang X, Du J & Mitch WE. (2004). Regulation of muscle protein degradation: coordinated control of apoptotic and ubiquitin-proteasome systems by phosphatidylinositol 3 kinase. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **15**, 1537-1545.
- Lee YS & Lee SJ. (2013). Regulation of GDF-11 and myostatin activity by GASP-1 and GASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3713-3722.
- Lefevre C, Jobard F, Caux F, Bouadjar B, Karaduman A, Heilig R, Lakhdar H, Wollenberg A, Verret JL, Weissenbach J, Ozguc M, Lathrop M, Prud'homme JF & Fischer J. (2001). Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome. *American journal of human genetics* **69**, 1002-1012.
- Legaspi A, Jeevanandam M, Starnes HF, Jr. & Brennan MF. (1987). Whole body lipid and energy metabolism in the cancer patient. *Metabolism: clinical and experimental* **36**, 958-963.
- Leger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Deriaz O, Crettenand A, Gobelet C, Rohmer P, Konzelmann M, Luthi F & Russell AP. (2006). Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *The Journal of physiology* **576**, 923-933.
- Lelbach A, Muzes G & Feher J. (2007). Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia. *Med Sci Monit* **13**, RA168-173.
- Lenk K, Schuler G & Adams V. (2010). Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **1**, 9-21.
- Lerner AB, Case JD & Takahashi Y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *J Biol Chem* **235**, 1992-1997.
- Lesniak W, Bala M, Jaeschke R & Krzakowski M. (2008). Effects of megestrol acetate in patients with cancer anorexia-cachexia syndrome--a systematic review and meta-analysis. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej* **118**, 636-644.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH & Parsons R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**, 1943-1947.
- Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL & Reid MB. (2005). TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**, 362-370.
- Li YP, Lecker SH, Chen Y, Waddell ID, Goldberg AL & Reid MB. (2003). TNF-alpha increases ubiquitin-conjugating activity in skeletal muscle by up-regulating UbcH2/E220k. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17**, 1048-1057.

- Li YP & Reid MB. (2000). NF-kappaB mediates the protein loss induced by TNF-alpha in differentiated skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**, R1165-1170.
- Li YP, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR & Reid MB. (1998). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF-kappaB activation in response to tumor necrosis factor alpha. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12**, 871-880.
- Lieffers JR, Mourtzakis M, Hall KD, McCargar LJ, Prado CM & Baracos VE. (2009). A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands. *The American journal of clinical nutrition* **89**, 1173-1179.
- Lima M, Sato S, Enos RT, Baynes JW & Carson JA. (2013). Development of an UPLC mass spectrometry method for measurement of myofibrillar protein synthesis: application to analysis of murine muscles during cancer cachexia. *J Appl Physiol (1985)* **114**, 824-828.
- Lin J, Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL & Baile CA. (2002). Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **291**, 701-706.
- Lindmark L, Bennegard K, Eden E, Svaninger G, Ternell M & Lundholm K. (1986). Thermic effect and substrate oxidation in response to intravenous nutrition in cancer patients who lose weight. *Ann Surg* **204**, 628-636.
- Lipina C, Kendall H, McPherron AC, Taylor PM & Hundal HS. (2010). Mechanisms involved in the enhancement of mammalian target of rapamycin signalling and hypertrophy in skeletal muscle of myostatin-deficient mice. *FEBS Lett* **584**, 2403-2408.
- Lissoni P. (2007). Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathologie-biologie* **55**, 201-204.
- Lissoni P, Barni S, Tancini G, Brivio F, Tisi E, Zubelewicz B & Braczkowski R. (1994). Role of the pineal gland in the control of macrophage functions and its possible implication in cancer: a study of interactions between tumor necrosis factor-alpha and the pineal hormone melatonin. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* **8**, 126-129.
- Lissoni P, Paolorossi F, Ardizzioia A, Barni S, Chilelli M, Mancuso M, Tancini G, Conti A & Maestroni GJ. (1997). A randomized study of chemotherapy with cisplatin plus etoposide versus chemoendocrine therapy with cisplatin, etoposide and the pineal hormone melatonin as a first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer patients in a poor clinical state. *Journal of pineal research* **23**, 15-19.
- Lissoni P, Paolorossi F, Tancini G, Barni S, Ardizzioia A, Brivio F, Zubelewicz B & Chatikhine V. (1996). Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? *Eur J Cancer* **32A**, 1340-1343.
- Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R & Sun LQ. (2007). Effect of RNA oligonucleotide targeting Foxo-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Cancer gene therapy* **14**, 945-952.
- Liu CM, Yang Z, Liu CW, Wang R, Tien P, Dale R & Sun LQ. (2008). Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene Ther* **15**, 155-160.
- Liu X, Joshi SK, Samagh SP, Dang YX, Laron D, Lovett DH, Bodine SC, Kim HT & Feeley BT. (2012). Evaluation of Akt/mTOR activity in muscle atrophy after rotator cuff tears in a rat model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **30**, 1440-1446.
- Ljungberg B, Grankvist K & Rasmuson T. (1995). Serum acute phase reactants and prognosis in renal cell carcinoma. *Cancer* **76**, 1435-1439.

- Llovera M, Carbo N, Lopez-Soriano J, Garcia-Martinez C, Busquets S, Alvarez B, Agell N, Costelli P, Lopez-Soriano FJ, Celada A & Argiles JM. (1998a). Different cytokines modulate ubiquitin gene expression in rat skeletal muscle. *Cancer Lett* **133**, 83-87.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1995). Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer* **61**, 138-141.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1997). TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochem Biophys Res Commun* **230**, 238-241.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, Marzabal M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1994). Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett* **338**, 311-318.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Agell N, Lopez-Soriano FJ, Garcia I & Argiles JM. (1998b). Protein turnover in skeletal muscle of tumour-bearing transgenic mice overexpressing the soluble TNF receptor-1. *Cancer Lett* **130**, 19-27.
- Llovera M, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano J, Carbo N, Agell N, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1998c). Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* **142**, 183-189.
- Llovera M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1993). Effects of tumor necrosis factor-alpha on muscle-protein turnover in female Wistar rats. *Journal of the National Cancer Institute* **85**, 1334-1339.
- Lokireddy S, McFarlane C, Ge X, Zhang H, Sze SK, Sharma M & Kambadur R. (2011a). Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Mol Endocrinol* **25**, 1936-1949.
- Lokireddy S, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R & McFarlane C. (2011b). Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**, C1316-1324.
- Lokireddy S, Wijesoma IW, Bonala S, Wei M, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R & Sharma M. (2012a). Myostatin is a novel tumoral factor that induces cancer cachexia. *The Biochemical journal* **446**, 23-36.
- Lokireddy S, Wijesoma IW, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R & Sharma M. (2012b). Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol* **303**, C512-529.
- Long CL, Jeevanandam M, Kim BM & Kinney JM. (1977). Whole body protein synthesis and catabolism in septic man. *The American journal of clinical nutrition* **30**, 1340-1344.
- Lopez-Soriano J, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1995). Marked hyperlipidaemia in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Biochemical Society transactions* **23**, 492S.
- Lopez-Soriano J, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1996). Lipid metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Molecular and cellular biochemistry* **165**, 17-23.
- Lopez-Soriano J, Argiles JM & Lopez-Soriano FJ. (1997a). Sequential changes in lipoprotein lipase activity and lipaemia induced by the Yoshida AH-130 ascites hepatoma in rats. *Cancer Lett* **116**, 159-165.
- Lopez-Soriano J, Llovera M, Carbo N, Garcia-Martinez C, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (1997b). Lipid metabolism in tumour-bearing mice: studies with knockout mice for tumour necrosis factor receptor 1 protein. *Mol Cell Endocrinol* **132**, 93-99.

- Loprinzi CL, Ellison NM, Schaid DJ, Krook JE, Athmann LM, Dose AM, Mailliard JA, Johnson PS, Ebbert LP & Geeraerts LH. (1990). Controlled trial of megestrol acetate for the treatment of cancer anorexia and cachexia. *Journal of the National Cancer Institute* **82**, 1127-1132.
- Loprinzi CL, Kugler JW, Sloan JA, Mailliard JA, Krook JE, Wilwerding MB, Rowland KM, Jr., Camoriano JK, Novotny PJ & Christensen BJ. (1999). Randomized comparison of megestrol acetate versus dexamethasone versus fluoxymesterone for the treatment of cancer anorexia/cachexia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **17**, 3299-3306.
- Loprinzi CL, Michalak JC, Schaid DJ, Mailliard JA, Athmann LM, Goldberg RM, Tschetter LK, Hatfield AK & Morton RF. (1993a). Phase III evaluation of four doses of megestrol acetate as therapy for patients with cancer anorexia and/or cachexia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 762-767.
- Loprinzi CL, Schaid DJ, Dose AM, Burnham NL & Jensen MD. (1993b). Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 152-154.
- Lorite MJ, Cariuk P & Tisdale MJ. (1997). Induction of muscle protein degradation by a tumour factor. *Br J Cancer* **76**, 1035-1040.
- Lorite MJ, Smith HJ, Arnold JA, Morris A, Thompson MG & Tisdale MJ. (2001). Activation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscle in vivo and murine myoblasts in vitro by a proteolysis-inducing factor (PIF). *Br J Cancer* **85**, 297-302.
- Lorite MJ, Thompson MG, Drake JL, Carling G & Tisdale MJ. (1998). Mechanism of muscle protein degradation induced by a cancer cachectic factor. *Br J Cancer* **78**, 850-856.
- Lozano J, Berra E, Municio MM, Diaz-Meco MT, Dominguez I, Sanz L & Moscat J. (1994). Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* **269**, 19200-19202.
- Luketich JD, Mullen JL, Feurer ID, Sternlieb J & Fried RC. (1990). Ablation of abnormal energy expenditure by curative tumor resection. *Arch Surg* **125**, 337-341.
- Lundholm K, Bennegard K, Eden E, Svaninger G, Emery PW & Rennie MJ. (1982a). Efflux of 3-methylhistidine from the leg in cancer patients who experience weight loss. *Cancer Res* **42**, 4807-4811.
- Lundholm K, Bylund AC, Holm J & Schersten T. (1976). Skeletal muscle metabolism in patients with malignant tumor. *Eur J Cancer* **12**, 465-473.
- Lundholm K, Daneryd P, Bosaeus I, Korner U & Lindholm E. (2004a). Palliative nutritional intervention in addition to cyclooxygenase and erythropoietin treatment for patients with malignant disease: Effects on survival, metabolism, and function. *Cancer* **100**, 1967-1977.
- Lundholm K, Daneryd P, Korner U, Hyltander A & Bosaeus I. (2004b). Evidence that long-term COX-treatment improves energy homeostasis and body composition in cancer patients with progressive cachexia. *International journal of oncology* **24**, 505-512.
- Lundholm K, Edstrom S, Ekman L, Karlberg I, Bylund AC & Schersten T. (1978). A comparative study of the influence of malignant tumor on host metabolism in mice and man: evaluation of an experimental model. *Cancer* **42**, 453-461.
- Lundholm K, Edstrom S, Karlberg I, Ekman L & Schersten T. (1982b). Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients. *Cancer* **50**, 1142-1150.

- Lundholm K, Gelin J, Hyltander A, Lonnroth C, Sandstrom R, Svaninger G, Korner U, Gulich M, Karrefors I, Norli B & et al. (1994). Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors. *Cancer Res* **54**, 5602-5606.
- Lundholm K, Gunnebo L, Korner U, Iresjo BM, Engstrom C, Hyltander A, Smedh U & Bosaeus I. (2010). Effects by daily long term provision of ghrelin to unselected weight-losing cancer patients: a randomized double-blind study. *Cancer* **116**, 2044-2052.
- Lundholm K, Karlberg I, Ekman L, Edstrom S & Schersten T. (1981). Evaluation of anorexia as the cause of altered protein synthesis in skeletal muscles from nongrowing mice with sarcoma. *Cancer Res* **41**, 1989-1996.
- Lyons JA, Haring JS & Biga PR. (2010). Myostatin expression, lymphocyte population, and potential cytokine production correlate with predisposition to high-fat diet induced obesity in mice. *PLoS One* **5**, e12928.
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J & Salehian B. (2003). Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E363-371.
- Maccio A, Madeddu C, Gramignano G, Mulas C, Floris C, Sanna E, Cau MC, Panzone F & Mantovani G. (2012). A randomized phase III clinical trial of a combined treatment for cachexia in patients with gynecological cancers: evaluating the impact on metabolic and inflammatory profiles and quality of life. *Gynecologic oncology* **124**, 417-425.
- Machleidt T, Wiegmann K, Henkel T, Schutze S, Baeuerle P & Kronke M. (1994). Sphingomyelinase activates proteolytic I kappa B-alpha degradation in a cell-free system. *J Biol Chem* **269**, 13760-13765.
- Mackenzie ML, Bedard N, Wing SS & Baracos VE. (2005). A proinflammatory tumor that activates protein degradation sensitizes rats to catabolic effects of endotoxin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**, E527-533.
- Maehama T & Dixon JE. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378.
- Mahony SM & Tisdale MJ. (1988). Induction of weight loss and metabolic alterations by human recombinant tumour necrosis factor. *Br J Cancer* **58**, 345-349.
- Maltoni M, Nanni O, Pirovano M, Scarpi E, Indelli M, Martini C, Monti M, Arnoldi E, Piva L, Ravaioli A, Cruciani G, Labianca R & Amadori D. (1999). Successful validation of the palliative prognostic score in terminally ill cancer patients. Italian Multicenter Study Group on Palliative Care. *J Pain Symptom Manage* **17**, 240-247.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S & Sandri M. (2007). FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism* **6**, 458-471.
- Man WD-C, Natanek SA, Riddoch-Contreras J, Lewis A, Marsh GS, Kemp PR & Polkey MI. (2010). Quadriceps myostatin expression in COPD. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* **36**, 686-688.
- Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G & Sandhoff K. (1992). Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem* **267**, 11144-11148.
- Manickam R, Pena RN & Whitelaw CB. (2008). Mammary gland differentiation inversely correlates with GDF-8 expression. *Mol Reprod Dev* **75**, 1783-1788.

- Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J & Cantley LC. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Molecular cell* **10**, 151-162.
- Mansoor O, Beaufriere B, Boirie Y, Ralliere C, Taillandier D, Aurousseau E, Schoeffler P, Arnal M & Attaix D. (1996). Increased mRNA levels for components of the lysosomal, Ca²⁺-activated, and ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathways in skeletal muscle from head trauma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2714-2718.
- Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Gramignano G, Lusso MR, Serpe R, Massa E, Astaro G & Deiana L. (2006). A phase II study with antioxidants, both in the diet and supplemented, pharmaconutritional support, progestagen, and anti-cyclooxygenase-2 showing efficacy and safety in patients with cancer-related anorexia/cachexia and oxidative stress. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **15**, 1030-1034.
- Mantovani G, Maccio A, Madeddu C, Serpe R, Antoni G, Massa E, Dessi M & Panzone F. (2010). Phase II nonrandomized study of the efficacy and safety of COX-2 inhibitor celecoxib on patients with cancer cachexia. *J Mol Med (Berl)* **88**, 85-92.
- Mantovani G, Madeddu C & Maccio A. (2013). Drugs in development for treatment of patients with cancer-related anorexia and cachexia syndrome. *Drug design, development and therapy* **7**, 645-656.
- Marsters SA, Sheridan JP, Pitti RM, Brush J, Goddard A & Ashkenazi A. (1998). Identification of a ligand for the death-domain-containing receptor Apo3. *Current biology : CB* **8**, 525-528.
- Martignoni ME, Kunze P, Hildebrandt W, Kunzli B, Berberat P, Giese T, Kloters O, Hammer J, Buchler MW, Giese NA & Friess H. (2005). Role of mononuclear cells and inflammatory cytokines in pancreatic cancer-related cachexia. *Clin Cancer Res* **11**, 5802-5808.
- Martin L, Birdsell L, Macdonald N, Reiman T, Clandinin MT, McCargar LJ, Murphy R, Ghosh S, Sawyer MB & Baracos VE. (2013). Cancer cachexia in the age of obesity: skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, 1539-1547.
- Mastrocola R, Reffo P, Penna F, Tomasinelli CE, Boccuzzi G, Baccino FM, Aragno M & Costelli P. (2008). Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free radical biology & medicine* **44**, 584-593.
- Masukawa Y, Narita H, Shimizu E, Kondo N, Sugai Y, Oba T, Homma R, Ishikawa J, Takagi Y, Kitahara T, Takema Y & Kita K. (2008). Characterization of overall ceramide species in human stratum corneum. *Journal of lipid research* **49**, 1466-1476.
- Masuno H, Yamasaki N & Okuda H. (1981). Purification and characterization of a lipolytic factor (toxohormone-L) from cell-free fluid of ascites sarcoma 180. *Cancer Res* **41**, 284-288.
- Masuno H, Yoshimura H, Ogawa N & Okuda H. (1984). Isolation of a lipolytic factor (toxohormone-L) from ascites fluid of patients with hepatoma and its effect on feeding behavior. *European journal of cancer & clinical oncology* **20**, 1177-1185.
- Mathias S, Pena LA & Kolesnick RN. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *The Biochemical journal* **335 (Pt 3)**, 465-480.
- Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlow I, Joseph C & Kolesnick RN. (1993). Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science* **259**, 519-522.

- Matthys P, Dijkmans R, Proost P, Van Damme J, Heremans H, Sobis H & Billiau A. (1991a). Severe cachexia in mice inoculated with interferon-gamma-producing tumor cells. *Int J Cancer* **49**, 77-82.
- Matthys P, Heremans H, Opdenakker G & Billiau A. (1991b). Anti-interferon-gamma antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia. *Eur J Cancer* **27**, 182-187.
- Maturo G, Vespasiani G, Mohamed EI, Maiolo C, Finazzi Agro E, Forte F & De Lorenzo A. (2003). Evaluating body composition of Italian prostate cancer patients without metastases. *Acta diabetologica* **40 Suppl 1**, S168-170.
- Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H & Bradley A. (1994). Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8817-8821.
- May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A & Abumrad NN. (2002). Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *American journal of surgery* **183**, 471-479.
- McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M & Kambadur R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* **162**, 1135-1147.
- McFarlane C, Hennebry A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M & Kambadur R. (2008). Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res* **314**, 317-329.
- McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M & Kambadur R. (2006). Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* **209**, 501-514.
- McIntosh JK, Jablons DM, Mule JJ, Nordan RP, Rudikoff S, Lotze MT & Rosenberg SA. (1989). In vivo induction of IL-6 by administration of exogenous cytokines and detection of de novo serum levels of IL-6 in tumor-bearing mice. *J Immunol* **143**, 162-167.
- McKay BR, Ogborn DI, Bellamy LM, Tarnopolsky MA & Parise G. (2012). Myostatin is associated with age-related human muscle stem cell dysfunction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 2509-2521.
- McMillan DC, O'Gorman P, Fearon KC & McArdle CS. (1997). A pilot study of megestrol acetate and ibuprofen in the treatment of cachexia in gastrointestinal cancer patients. *Br J Cancer* **76**, 788-790.
- McMillan DC, Preston T, Watson WS, Simpson JM, Fearon KC, Shenkin A, Burns HJ & McArdle CS. (1994). Relationship between weight loss, reduction of body cell mass and inflammatory response in patients with cancer. *The British journal of surgery* **81**, 1011-1014.
- McMillan DC, Scott HR, Watson WS, Preston T, Milroy R & McArdle CS. (1998). Longitudinal study of body cell mass depletion and the inflammatory response in cancer patients. *Nutrition and cancer* **31**, 101-105.
- McMillan DC, Wigmore SJ, Fearon KC, O'Gorman P, Wright CE & McArdle CS. (1999). A prospective randomized study of megestrol acetate and ibuprofen in gastrointestinal cancer patients with weight loss. *Br J Cancer* **79**, 495-500.
- McPherron AC, Lawler AM & Lee SJ. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* **387**, 83-90.
- McPherron AC & Lee SJ. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12457-12461.
- McPherron AC & Lee SJ. (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* **109**, 595-601.

- McQuellon RP, Moose DB, Russell GB, Case LD, Greven K, Stevens M & Shaw EG. (2002). Supportive use of megestrol acetate (Megace) with head/neck and lung cancer patients receiving radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **52**, 1180-1185.
- McTiernan A. (2008). Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 205-211.
- Meadows KA, Holly JM & Stewart CE. (2000). Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis is associated with suppression of insulin-like growth factor binding protein-5 secretion in differentiating murine skeletal myoblasts. *J Cell Physiol* **183**, 330-337.
- Mebarek S, Komati H, Naro F, Zeiller C, Alvisi M, Lagarde M, Prigent AF & Nemoz G. (2007). Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation. *Journal of cell science* **120**, 407-416.
- Mehl KA, Davis JM, Berger FG & Carson JA. (2005a). Myofiber degeneration/regeneration is induced in the cachectic ApcMin/+ mouse. *J Appl Physiol* **99**, 2379-2387.
- Mehl KA, Davis JM, Clements JM, Berger FG, Pena MM & Carson JA. (2005b). Decreased intestinal polyp multiplicity is related to exercise mode and gender in ApcMin/+ mice. *J Appl Physiol* **98**, 2219-2225.
- Mehrpour M, Esclatine A, Beau I & Codogno P. (2010). Autophagy in health and disease. 1. Regulation and significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C776-785.
- Meighan-Mantha RL, Hsu DK, Guo Y, Brown SA, Feng SL, Peifley KA, Alberts GF, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Richards CM & Winkles JA. (1999). The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *J Biol Chem* **274**, 33166-33176.
- Merrill AH, Jr. & Wang E. (1986). Biosynthesis of long-chain (sphingoid) bases from serine by LM cells. Evidence for introduction of the 4-trans-double bond after de novo biosynthesis of N-acylsphinganine(s). *J Biol Chem* **261**, 3764-3769.
- Merritt EK, Thalacker-Mercer A, Cross JM, Windham ST, Thomas SJ & Bamman MM. (2013). Increased Expression of Atrogenes and TWEAK Family Members after Severe Burn Injury in Nonburned Human Skeletal Muscle. *Journal of burn care & research : official publication of the American Burn Association* **34**, e297-304.
- Metcalfe D & Gearing DP. (1989). Fatal syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of the leukemia inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5948-5952.
- Mider GB. (1951). Some aspects of nitrogen and energy metabolism in cancerous subjects: a review. *Cancer Res* **11**, 821-829.
- Mider GB, Sherman CD, Jr. & Morton JJ. (1949). The effect of Walker carcinoma 256 on the total lipid content of rats. *Cancer Res* **9**, 222-224.
- Miller LL, Bly CG, Watson ML & Bale WF. (1951). The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *The Journal of experimental medicine* **94**, 431-453.
- Min K, Smuder AJ, Kwon OS, Kavazis AN, Szeto HH & Powers SK. (2011). Mitochondrial-targeted antioxidants protect skeletal muscle against immobilization-induced muscle atrophy. *J Appl Physiol (1985)* **111**, 1459-1466.
- Mitchell MD, Osepchok CC, Leung KC, McMahan CD & Bass JJ. (2006). Myostatin is a human placental product that regulates glucose uptake. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **91**, 1434-1437.

- Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, Lach-Trifilieff E, Wauters S, Li H, Makonchuk DY, Glass DJ & Kumar A. (2010). The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J Cell Biol* **188**, 833-849.
- Miura T, Kishioka Y, Wakamatsu J, Hattori A, Hennebry A, Berry CJ, Sharma M, Kambadur R & Nishimura T. (2006). Decorin binds myostatin and modulates its activity to muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 675-680.
- Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, Souza SC, Shen WJ, Zhang HH, Stancheva ZS, Kraemer FB, Obin MS & Greenberg AS. (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* **282**, 996-1002.
- Mizushima N, Levine B, Cuervo AM & Klionsky DJ. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069-1075.
- Mizutani Y, Kihara A & Igarashi Y. (2005). Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides. *The Biochemical journal* **390**, 263-271.
- Moertel CG, Schutt AJ, Reitemeier RJ & Hahn RG. (1974). Corticosteroid therapy of preterminal gastrointestinal cancer. *Cancer* **33**, 1607-1609.
- Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremler KE, Fung VP, Madani H & Widmer MB. (1993). Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* **151**, 1548-1561.
- Mohler ML, Bohl CE, Jones A, Coss CC, Narayanan R, He Y, Hwang DJ, Dalton JT & Miller DD. (2009). Nonsteroidal selective androgen receptor modulators (SARMs): dissociating the anabolic and androgenic activities of the androgen receptor for therapeutic benefit. *Journal of medicinal chemistry* **52**, 3597-3617.
- Moldawer LL, Drott C & Lundholm K. (1988). Monocytic production and plasma bioactivities of interleukin-1 and tumour necrosis factor in human cancer. *Eur J Clin Invest* **18**, 486-492.
- Monestier O, Brun C, Heu K, Passet B, Malhouroux M, Magnol L, Vilotte JL & Blanquet V. (2012). Ubiquitous Gasp1 overexpression in mice leads mainly to a hypermuscular phenotype. *BMC genomics* **13**, 541.
- Monitto CL, Dong SM, Jen J & Sidransky D. (2004). Characterization of a human homologue of proteolysis-inducing factor and its role in cancer cachexia. *Clin Cancer Res* **10**, 5862-5869.
- Monk JP, Phillips G, Waite R, Kuhn J, Schaaf LJ, Otterson GA, Guttridge D, Rhoades C, Shah M, Criswell T, Caligiuri MA & Villalona-Calero MA. (2006). Assessment of tumor necrosis factor alpha blockade as an intervention to improve tolerability of dose-intensive chemotherapy in cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**, 1852-1859.
- Moore-Carrasco R, Busquets S, Almendro V, Palanki M, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2007). The AP-1/NF-kappaB double inhibitor SP100030 can revert muscle wasting during experimental cancer cachexia. *International journal of oncology* **30**, 1239-1245.
- Mordes JP & Rossini AA. (1981). Tumor-induced anorexia in the Wistar rat. *Science* **213**, 565-567.
- Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA & Kaplan G. (1993). Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *The Journal of experimental medicine* **177**, 1675-1680.
- Mori K, Fujimoto-Ouchi K, Ishikawa T, Sekiguchi F, Ishitsuka H & Tanaka Y. (1996). Murine interleukin-12 prevents the development of cancer cachexia in a murine model. *Int J Cancer* **67**, 849-855.

- Mori M, Yamaguchi K, Honda S, Nagasaki K, Ueda M, Abe O & Abe K. (1991). Cancer cachexia syndrome developed in nude mice bearing melanoma cells producing leukemia-inhibitory factor. *Cancer Res* **51**, 6656-6659.
- Morine KJ, Bish LT, Selsby JT, Gazzara JA, Pendrak K, Sleeper MM, Barton ER, Lee SJ & Sweeney HL. (2010). Activin IIB receptor blockade attenuates dystrophic pathology in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **42**, 722-730.
- Morissette MR, Cook SA, Buranasombati C, Rosenberg MA & Rosenzweig A. (2009). Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**, C1124-1132.
- Morley JE, Thomas DR & Wilson MM. (2006). Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *The American journal of clinical nutrition* **83**, 735-743.
- Moro C, Galgani JE, Luu L, Pasarica M, Mairal A, Bajpeyi S, Schmitz G, Langin D, Liebisch G & Smith SR. (2009). Influence of gender, obesity, and muscle lipase activity on intramyocellular lipids in sedentary individuals. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **94**, 3440-3447.
- Moser AR, Pitot HC & Dove WF. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322-324.
- Moses AG, Maingay J, Sangster K, Fearon KC & Ross JA. (2009). Pro-inflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with advanced pancreatic cancer: relationship to acute phase response and survival. *Oncol Rep* **21**, 1091-1095.
- Moses AW, Slater C, Preston T, Barber MD & Fearon KC. (2004). Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids. *Br J Cancer* **90**, 996-1002.
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG & Ostrander EA. (2007). A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS genetics* **3**, e79.
- Mourkioti F, Kratsios P, Luedde T, Song YH, Delafontaine P, Adami R, Parente V, Bottinelli R, Pasparakis M & Rosenthal N. (2006). Targeted ablation of IKK2 improves skeletal muscle strength, maintains mass, and promotes regeneration. *J Clin Invest* **116**, 2945-2954.
- Moylan JS, Smith JD, Chambers MA, McLoughlin TJ & Reid MB. (2008). TNF induction of atrogen-1/MAFbx mRNA depends on Foxo4 expression but not AKT-Foxo1/3 signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C986-993.
- Mracek T, Stephens NA, Gao D, Bao Y, Ross JA, Ryden M, Arner P, Trayhurn P, Fearon KC & Bing C. (2011). Enhanced ZAG production by subcutaneous adipose tissue is linked to weight loss in gastrointestinal cancer patients. *Br J Cancer* **104**, 441-447.
- Muggia FM, Cassieth PA, Ochoa M, Jr., Flatow FA, Gellhorn A & Hyman GA. (1968). Treatment of breast cancer with medroxyprogesterone acetate. *Annals of internal medicine* **68**, 328-337.
- Mulligan HD & Tisdale MJ. (1991a). Lipogenesis in tumour and host tissues in mice bearing colonic adenocarcinomas. *Br J Cancer* **63**, 719-722.
- Mulligan HD & Tisdale MJ. (1991b). Metabolic substrate utilization by tumour and host tissues in cancer cachexia. *The Biochemical journal* **277 (Pt 2)**, 321-326.

- Murachi T, Tanaka K, Hatanaka M & Murakami T. (1980). Intracellular Ca²⁺-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Advances in enzyme regulation* **19**, 407-424.
- Murphy KT, Chee A, Gleeson BG, Naim T, Swiderski K, Koopman R & Lynch GS. (2011a). Antibody-directed myostatin inhibition enhances muscle mass and function in tumor-bearing mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **301**, R716-726.
- Murphy KT, Chee A, Trieu J, Naim T & Lynch GS. (2012). Importance of functional and metabolic impairments in the characterization of the C-26 murine model of cancer cachexia. *Disease models & mechanisms* **5**, 533-545.
- Murphy KT, Chee A, Trieu J, Naim T & Lynch GS. (2013a). Inhibition of the renin-angiotensin system improves physiological outcomes in mice with mild or severe cancer cachexia. *Int J Cancer* **133**, 1234-1246.
- Murphy KT, Koopman R, Naim T, Leger B, Trieu J, Ibebunjo C & Lynch GS. (2010a). Antibody-directed myostatin inhibition in 21-mo-old mice reveals novel roles for myostatin signaling in skeletal muscle structure and function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**, 4433-4442.
- Murphy KT, Struk A, Malcontenti-Wilson C, Christophi C & Lynch GS. (2013b). Physiological characterization of a mouse model of cachexia in colorectal liver metastases. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**, R854-864.
- Murphy RA, Mourtzakis M, Chu QS, Baracos VE, Reiman T & Mazurak VC. (2011b). 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**, 1775-1782.
- Murphy RA, Wilke MS, Perrine M, Pawlowicz M, Mourtzakis M, Lieffers JR, Maneshgar M, Bruera E, Clandinin MT, Baracos VE & Mazurak VC. (2010b). Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients. *Clin Nutr* **29**, 482-487.
- Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, Barton ER, Sweeney HL & Rosenthal N. (2001). Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* **27**, 195-200.
- Muscaritoli M, Anker SD, Argiles J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, Boirie Y, Bosaeus I, Cederholm T, Costelli P, Fearon KC, Laviano A, Maggio M, Rossi Fanelli F, Schneider SM, Schols A & Sieber CC. (2010). Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". *Clin Nutr* **29**, 154-159.
- Naumann M & Scheidereit C. (1994). Activation of NF-kappa B in vivo is regulated by multiple phosphorylations. *The EMBO journal* **13**, 4597-4607.
- Nava S & Cuomo AM. (2004). Acute respiratory failure in the cancer patient: the role of non-invasive mechanical ventilation. *Critical reviews in oncology/hematology* **51**, 91-103.
- Neary NM, Small CJ, Wren AM, Lee JL, Druce MR, Palmieri C, Frost GS, Ghatei MA, Coombes RC & Bloom SR. (2004). Ghrelin increases energy intake in cancer patients with impaired appetite: acute, randomized, placebo-controlled trial. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **89**, 2832-2836.
- Negri DR, Mezzanzanica D, Sacco S, Gadina M, Benigni F, Cajola L, Finocchiaro G, Ghezzi P & Canevari S. (2001). Role of cytokines in cancer cachexia in a murine model of intracerebral injection of human tumours. *Cytokine* **15**, 27-38.

- Negro-Vilar A. (1999). Selective androgen receptor modulators (SARMs): a novel approach to androgen therapy for the new millennium. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **84**, 3459-3462.
- Neri B, Garosi VL & Intini C. (1997). Effect of medroxyprogesterone acetate on the quality of life of the oncologic patient: a multicentric cooperative study. *Anti-cancer drugs* **8**, 459-465.
- Ng EH, Rock CS, Lazarus DD, Stiaino-Coico L, Moldawer LL & Lowry SF. (1992). Insulin-like growth factor I preserves host lean tissue mass in cancer cachexia. *The American journal of physiology* **262**, R426-431.
- Nicholas G, Thomas M, Langley B, Somers W, Patel K, Kemp CF, Sharma M & Kambadur R. (2002). Titin-cap associates with, and regulates secretion of, Myostatin. *J Cell Physiol* **193**, 120-131.
- Nieman DC, Cook VD, Henson DA, Suttles J, Rejeski WJ, Ribisl PM, Fagoaga OR & Nehlsen-Cannarella SL. (1995). Moderate exercise training and natural killer cell cytotoxic activity in breast cancer patients. *Int J Sports Med* **16**, 334-337.
- Nixon DW, Lawson DH, Kutner M, Ansley J, Schwarz M, Heymsfield S, Chawla R, Cartwright TH & Rudman D. (1981). Hyperalimentation of the cancer patient with protein-calorie undernutrition. *Cancer Res* **41**, 2038-2045.
- Noguchi Y, Vydelingum NA, Younes RN, Fried SK & Brennan MF. (1991). Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein lipase activity and mRNA levels. *Cancer Res* **51**, 863-869.
- Nomura K, Noguchi Y & Matsumoto A. (1996). Stimulation of decreased lipoprotein lipase activity in the tumor-bearing state by the antihyperlipidemic drug bezafibrate. *Surgery today* **26**, 89-94.
- Norton JA, Burt ME & Brennan MF. (1980). In vivo utilization of substrate by human sarcoma-bearing limbs. *Cancer* **45**, 2934-2939.
- Norton JA, Moley JF, Green MV, Carson RE & Morrison SD. (1985). Parabolic transfer of cancer anorexia/cachexia in male rats. *Cancer Res* **45**, 5547-5552.
- Norton JA, Stein TP & Brennan MF. (1981). Whole body protein synthesis and turnover in normal man and malnourished patients with and without known cancer. *Ann Surg* **194**, 123-128.
- Nozoe T, Matsumata T, Kitamura M & Sugimachi K. (1998). Significance of preoperative elevation of serum C-reactive protein as an indicator for prognosis in colorectal cancer. *American journal of surgery* **176**, 335-338.
- O'Keefe SJ, Ogden J, Ramjee G & Rund J. (1990). Contribution of elevated protein turnover and anorexia to cachexia in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **50**, 1226-1230.
- O'Riordain MG, Falconer JS, Maingay J, Fearon KC & Ross JA. (1999). Peripheral blood cells from weight-losing cancer patients control the hepatic acute phase response by a primarily interleukin-6 dependent mechanism. *International journal of oncology* **15**, 823-827.
- Ohkuma S & Poole B. (1978). Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 3327-3331.
- Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M & Suzuki K. (1984). Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* **312**, 566-570.
- Oliff A, Defeo-Jones D, Boyer M, Martinez D, Kiefer D, Vuocolo G, Wolfe A & Socher SH. (1987). Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. *Cell* **50**, 555-563.

- Olivan M, Springer J, Busquets S, Tschirner A, Figueras M, Toledo M, Fontes-Oliveira C, Genovese MI, Ventura da Silva P, Sette A, Lopez-Soriano FJ, Anker S & Argiles JM. (2012). Theophylline is able to partially revert cachexia in tumour-bearing rats. *Nutrition & metabolism* **9**, 76.
- Oltvai ZN, Milliman CL & Korsmeyer SJ. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Op den Kamp CM, Langen RC, Snepvangers FJ, de Theije CC, Schellekens JM, Laugs F, Dingemans AM & Schols AM. (2013a). Nuclear transcription factor kappa B activation and protein turnover adaptations in skeletal muscle of patients with progressive stages of lung cancer cachexia. *The American journal of clinical nutrition* **98**, 738-748.
- Op den Kamp CM, Langen RC, Snepvangers FJ, de Theije CC, Schellekens JM, Laugs F, Dingemans AM & Schols AM. (2013b). Nuclear transcription factor kappaB activation and protein turnover adaptations in skeletal muscle of patients with progressive stages of lung cancer cachexia. *The American journal of clinical nutrition*.
- Ottery FD. (1996). Definition of standardized nutritional assessment and interventional pathways in oncology. *Nutrition* **12**, S15-19.
- Ovesen L, Allingstrup L, Hannibal J, Mortensen EL & Hansen OP. (1993). Effect of dietary counseling on food intake, body weight, response rate, survival, and quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy: a prospective, randomized study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **11**, 2043-2049.
- Padrao AI, Oliveira P, Vitorino R, Colaco B, Pires MJ, Marquez M, Castellanos E, Neuparth MJ, Teixeira C, Costa C, Moreira-Goncalves D, Cabral S, Duarte JA, Santos LL, Amado F & Ferreira R. (2013). Bladder cancer-induced skeletal muscle wasting: disclosing the role of mitochondria plasticity. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 1399-1409.
- Pain VM, Randall DP & Garlick PJ. (1984). Protein synthesis in liver and skeletal muscle of mice bearing an ascites tumor. *Cancer Res* **44**, 1054-1057.
- Pallafacchina G, Calabria E, Serrano AL, Kalhovde JM & Schiaffino S. (2002). A protein kinase B-dependent and rapamycin-sensitive pathway controls skeletal muscle growth but not fiber type specification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9213-9218.
- Palomares MR, Sayre JW, Shekar KC, Lillington LM & Chlebowski RT. (1996). Gender influence on weight-loss pattern and survival of nonsmall cell lung carcinoma patients. *Cancer* **78**, 2119-2126.
- Pascual Lopez A, Roque i Figuls M, Urrutia Cuchi G, Berenstein EG, Almenar Pasies B, Balcells Alegre M & Herdman M. (2004). Systematic review of megestrol acetate in the treatment of anorexia-cachexia syndrome. *J Pain Symptom Manage* **27**, 360-369.
- Pasini E, Aquilani R, Dioguardi FS, D'Antona G, Gheorghide M & Taegtmeier H. (2008). Hypercatabolic syndrome: molecular basis and effects of nutritional supplements with amino acids. *The American journal of cardiology* **101**, 11E-15E.
- Passmore R & Draper MH. (1964). The Chemical Anatomy of the Human Body. In *Biochemical Disorders in Human Disease*, ed. Thompson RHS & King EJ, pp. 1-19. Academic Press, London, England.
- Patton JS, Shepard HM, Wilking H, Lewis G, Aggarwal BB, Eessalu TE, Gavin LA & Grunfeld C. (1986). Interferons and tumor necrosis factors have similar catabolic effects on 3T3 L1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8313-8317.

- Paul PK, Bhatnagar S, Mishra V, Srivastava S, Darnay BG, Choi Y & Kumar A. (2012). The E3 ubiquitin ligase TRAF6 intercedes in starvation-induced skeletal muscle atrophy through multiple mechanisms. *Molecular and cellular biology* **32**, 1248-1259.
- Paul PK, Gupta SK, Bhatnagar S, Panguluri SK, Darnay BG, Choi Y & Kumar A. (2010). Targeted ablation of TRAF6 inhibits skeletal muscle wasting in mice. *J Cell Biol* **191**, 1395-1411.
- Pavey SJ, Hawson GA & Marsh NA. (2001). Impact of the fibrinolytic enzyme system on prognosis and survival associated with non-small cell lung carcinoma. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* **12**, 51-58.
- Penna F, Bonetto A, Muscaritoli M, Costamagna D, Minero VG, Bonelli G, Rossi Fanelli F, Baccino FM & Costelli P. (2010a). Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? *Int J Cancer* **127**, 1706-1717.
- Penna F, Busquets S, Toledo M, Pin F, Massa D, Lopez-Soriano FJ, Costelli P & Argiles JM. (2013a). Erythropoietin administration partially prevents adipose tissue loss in experimental cancer cachexia models. *Journal of lipid research* **54**, 3045-3051.
- Penna F, Costamagna D, Fanzani A, Bonelli G, Baccino FM & Costelli P. (2010b). Muscle wasting and impaired myogenesis in tumor bearing mice are prevented by ERK inhibition. *PLoS One* **5**, e13604.
- Penna F, Costamagna D, Pin F, Camperi A, Fanzani A, Chiarpotto EM, Cavallini G, Bonelli G, Baccino FM & Costelli P. (2013b). Autophagic degradation contributes to muscle wasting in cancer cachexia. *The American journal of pathology* **182**, 1367-1378.
- Penning TD, Talley JJ, Bertenshaw SR, Carter JS, Collins PW, Docter S, Graneto MJ, Lee LF, Malecha JW, Miyashiro JM, Rogers RS, Rogier DJ, Yu SS, Anderson Gd, Burton EG, Cogburn JN, Gregory SA, Koboldt CM, Perkins WE, Seibert K, Veenhuizen AW, Zhang YY & Isakson PC. (1997). Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzene nesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *Journal of medicinal chemistry* **40**, 1347-1365.
- Persson C, Glimelius B, Ronnelid J & Nygren P. (2005). Impact of fish oil and melatonin on cachexia in patients with advanced gastrointestinal cancer: a randomized pilot study. *Nutrition* **21**, 170-178.
- Persson CR, Johansson BB, Sjoden PO & Glimelius BL. (2002). A randomized study of nutritional support in patients with colorectal and gastric cancer. *Nutrition and cancer* **42**, 48-58.
- Pfaffl MW. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**, e45.
- Piffar PM, Fernandez R, Tchaikovski O, Hirabara SM, Folador A, Pinto GJ, Jakobi S, Gobbo-Bordon D, Rohn TV, Fabricio VE, Moretto KD, Tosta E, Curi R & Fernandes LC. (2003). Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. *Cancer Lett* **201**, 139-148.
- Pirottin D, Grobet L, Adamantidis A, Farnir F, Herens C, Daa Schroder H & Georges M. (2005). Transgenic engineering of male-specific muscular hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6413-6418.
- Pirovano M, Maltoni M, Nanni O, Marinari M, Indelli M, Zaninetta G, Petrella V, Barni S, Zecca E, Scarpi E, Labianca R, Amadori D & Luporini G. (1999). A new palliative prognostic score: a first step for the staging of terminally ill cancer patients. Italian Multicenter and Study Group on Palliative Care. *J Pain Symptom Manage* **17**, 231-239.

- Pistilli EE, Bogdanovich S, Goncalves MD, Ahima RS, Lachey J, Seehra J & Khurana T. (2011). Targeting the activin type IIB receptor to improve muscle mass and function in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *The American journal of pathology* **178**, 1287-1297.
- Plant PJ, Bain JR, Correa JE, Woo M & Batt J. (2009). Absence of caspase-3 protects against denervation-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* **107**, 224-234.
- Plant PJ, Brooks D, Faughnan M, Bayley T, Bain J, Singer L, Correa J, Pearce D, Binnie M & Batt J. (2010). Cellular markers of muscle atrophy in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **42**, 461-471.
- Polge C, Heng AE, Jarzaguat M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, Bechet D, Matondo M, Uttenweiler-Joseph S, Monsarrat B, Attaix D & Taillandier D. (2011). Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 3790-3802.
- Popiela T, Lucchi R & Giongo F. (1989). Methylprednisolone as palliative therapy for female terminal cancer patients. The Methylprednisolone Female Preterminal Cancer Study Group. *European journal of cancer & clinical oncology* **25**, 1823-1829.
- Powers SK, Hudson MB, Nelson WB, Talbert EE, Min K, Szeto HH, Kavazis AN & Smuder AJ. (2011). Mitochondria-targeted antioxidants protect against mechanical ventilation-induced diaphragm weakness. *Critical care medicine* **39**, 1749-1759.
- Prado CM, Baracos VE, McCargar LJ, Reiman T, Mourtzakis M, Tonkin K, Mackey JR, Koski S, Pituskin E & Sawyer MB. (2009). Sarcopenia as a determinant of chemotherapy toxicity and time to tumor progression in metastatic breast cancer patients receiving capecitabine treatment. *Clin Cancer Res* **15**, 2920-2926.
- Prado CM, Lieffers JR, McCargar LJ, Reiman T, Sawyer MB, Martin L & Baracos VE. (2008). Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *The lancet oncology* **9**, 629-635.
- Pressoir M, Desne S, Berchery D, Rossignol G, Poiree B, Meslier M, Traversier S, Vittot M, Simon M, Gekiere JP, Meuric J, Serot F, Falewee MN, Rodrigues I, Senesse P, Vasson MP, Chelle F, Maget B, Antoun S & Bachmann P. (2010). Prevalence, risk factors and clinical implications of malnutrition in French Comprehensive Cancer Centres. *Br J Cancer* **102**, 966-971.
- Preston T, Fearon KC, McMillan DC, Winstanley FP, Slater C, Shenkin A & Carter DC. (1995). Effect of ibuprofen on the acute-phase response and protein metabolism in patients with cancer and weight loss. *The British journal of surgery* **82**, 229-234.
- Preston T, Fearon KCH, Robertson I, East BW & Calman KC. (1987). Tissue loss during severe wasting in lung cancer patients. In *In vivo Body Composition Studies*, ed. Ellis KJ, Yasumura S & Morgan WP, pp. 60-69. Institute of Physical Sciences in Medicine, London, England.
- Preston T, Slater C, McMillan DC, Falconer JS, Shenkin A & Fearon KC. (1998). Fibrinogen synthesis is elevated in fasting cancer patients with an acute phase response. *J Nutr* **128**, 1355-1360.
- Price SR, Olivecrona T & Pekala PH. (1986). Regulation of lipoprotein lipase synthesis in 3T3-L1 adipocytes by cachectin. Further proof for identity with tumour necrosis factor. *The Biochemical journal* **240**, 601-604.
- Puppa MJ, Gao S, Narsale AA & Carson JA. (2014). Skeletal muscle glycoprotein 130's role in Lewis lung carcinoma-induced cachexia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **28**, 998-1009.

- Purintrapiban J, Wang MC & Forsberg NE. (2003). Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* **136**, 393-401.
- Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J & Laurent G. (1997). Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 21388-21395.
- Quinn LS, Anderson BG, Drivdahl RH, Alvarez B & Argiles JM. (2002). Overexpression of interleukin-15 induces skeletal muscle hypertrophy in vitro: implications for treatment of muscle wasting disorders. *Exp Cell Res* **280**, 55-63.
- Quinn LS, Haugk KL & Grabstein KH. (1995). Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* **136**, 3669-3672.
- Quist M, Rorth M, Zacho M, Andersen C, Moeller T, Midtgaard J & Adamsen L. (2006). High-intensity resistance and cardiovascular training improve physical capacity in cancer patients undergoing chemotherapy. *Scandinavian journal of medicine & science in sports* **16**, 349-357.
- Rapisarda A & Melillo G. (2012). Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Advances in cancer research* **114**, 237-267.
- Ravasco P, Monteiro-Grillo I & Camilo M. (2012). Individualized nutrition intervention is of major benefit to colorectal cancer patients: long-term follow-up of a randomized controlled trial of nutritional therapy. *The American journal of clinical nutrition* **96**, 1346-1353.
- Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Marques Vidal P & Camilo ME. (2005a). Impact of nutrition on outcome: a prospective randomized controlled trial in patients with head and neck cancer undergoing radiotherapy. *Head & neck* **27**, 659-668.
- Ravasco P, Monteiro-Grillo I, Vidal PM & Camilo ME. (2005b). Dietary counseling improves patient outcomes: a prospective, randomized, controlled trial in colorectal cancer patients undergoing radiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 1431-1438.
- Ravussin E & Bogardus C. (1992). A brief overview of human energy metabolism and its relationship to essential obesity. *The American journal of clinical nutrition* **55**, 242S-245S.
- Raynes JG & Cooper EH. (1983). Comparison of serum amyloid A protein and C-reactive protein concentrations in cancer and non-malignant disease. *Journal of clinical pathology* **36**, 798-803.
- Read JA, Beale PJ, Volker DH, Smith N, Childs A & Clarke SJ. (2007). Nutrition intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. *Support Care Cancer* **15**, 301-307.
- Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P & Byrne E. (2001). Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* **24**, 893-899.
- Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana JL, Celeste AJ & Attisano L. (2003). Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular and cellular biology* **23**, 7230-7242.
- Reed SA, Sandesara PB, Senf SM & Judge AR. (2012). Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 987-1000.

- Reichard GA, Moury NF, Hochella NJ, Patterson AL & Weinhouse S. (1963). Quantitative Estimation of the Cori Cycle in the Human. *Journal of Biological Chemistry* **238**, 495-501.
- Reid J, McKenna H, Fitzsimons D & McCance T. (2009). The experience of cancer cachexia: a qualitative study of advanced cancer patients and their family members. *International journal of nursing studies* **46**, 606-616.
- Reid J, Mills M, Cantwell M, Cardwell CR, Murray LJ & Donnelly M. (2012). Thalidomide for managing cancer cachexia. *Cochrane Database Syst Rev* **4**, CD008664.
- Reisz-Porszasz S, Bhasin S, Artaza JN, Shen R, Sinha-Hikim I, Hogue A, Fielder TJ & Gonzalez-Cadavid NF. (2003). Lower skeletal muscle mass in male transgenic mice with muscle-specific overexpression of myostatin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E876-888.
- Rena G, Guo S, Cichy SC, Unterman TG & Cohen P. (1999). Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J Biol Chem* **274**, 17179-17183.
- Reynolds THT, Bodine SC & Lawrence JC, Jr. (2002). Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem* **277**, 17657-17662.
- Rhoads MG, Kandarian SC, Pacelli F, Doglietto GB & Bossola M. (2010). Expression of NF-kappaB and IkappaB proteins in skeletal muscle of gastric cancer patients. *Eur J Cancer* **46**, 191-197.
- Ricaud S, Vernus B, Duclos M, Bernardi H, Ritvos O, Carnac G & Bonnieu A. (2003). Inhibition of autocrine secretion of myostatin enhances terminal differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene* **22**, 8221-8232.
- Richter E, Denecke A, Klapdor S & Klapdor R. (2012). Parenteral nutrition support for patients with pancreatic cancer—improvement of the nutritional status and the therapeutic outcome. *Anticancer research* **32**, 2111-2118.
- Ries A, Trottenberg P, Elsner F, Stiel S, Haugen D, Kaasa S & Radbruch L. (2012). A systematic review on the role of fish oil for the treatment of cachexia in advanced cancer: an EPCRC cachexia guidelines project. *Palliative medicine* **26**, 294-304.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM & Devesa J. (2001). Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 561-566.
- Rios R, Carneiro I, Arce VM & Devesa J. (2002). Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C993-999.
- Rivera S, Azcon-Bieto J, Lopez-Soriano FJ, Miralpeix M & Argiles JM. (1988). Amino acid metabolism in tumour-bearing mice. *The Biochemical journal* **249**, 443-449.
- Roberts BM, Ahn B, Smuder AJ, Al-Rajhi M, Gill LC, Beharry AW, Powers SK, Fuller DD, Ferreira LF & Judge AR. (2013). Diaphragm and ventilatory dysfunction during cancer cachexia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **27**, 2600-2610.
- Rodrigues Ade C & Schmalbruch H. (1995). Satellite cells and myonuclei in long-term denervated rat muscles. *The Anatomical record* **243**, 430-437.
- Rodriguez J, Vernus B, Toubiana M, Jublanc E, Tintignac L, Leibovitch S & Bonnieu A. (2011). Myostatin inactivation increases myotube size through regulation of translational initiation machinery. *Journal of cellular biochemistry* **112**, 3531-3542.

- Rolli V, Radosavljevic M, Astier V, Macquin C, Castan-Laurell I, Visentin V, Guigne C, Carpenne C, Valet P, Gilfillan S & Bahram S. (2007). Lipolysis is altered in MHC class I zinc-alpha(2)-glycoprotein deficient mice. *FEBS Lett* **581**, 394-400.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology* **3**, 1009-1013.
- Rosenberg IH. (2002). Fish -- food to calm the heart. *N Engl J Med* **346**, 1102-1103.
- Ross PJ, Ashley S, Norton A, Priest K, Waters JS, Eisen T, Smith IE & O'Brien ME. (2004). Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? *Br J Cancer* **90**, 1905-1911.
- Rossi Fanelli F, Cangiano C, Ceci F, Cellerino R, Franchi F, Menichetti ET, Muscaritoli M & Cascino A. (1986). Plasma tryptophan and anorexia in human cancer. *European journal of cancer & clinical oncology* **22**, 89-95.
- Rother J, van Echten G, Schwarzmann G & Sandhoff K. (1992). Biosynthesis of sphingolipids: dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 14-20.
- Ruiz Garcia V, Lopez-Briz E, Carbonell Sanchis R, Gonzalez Perales JL & Bort-Marti S. (2013). Megestrol acetate for treatment of anorexia-cachexia syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* **3**, CD004310.
- Russell L & Forsdyke DR. (1991). A human putative lymphocyte G0/G1 switch gene containing a CpG-rich island encodes a small basic protein with the potential to be phosphorylated. *DNA and cell biology* **10**, 581-591.
- Russell ST, Hirai K & Tisdale MJ. (2002). Role of beta3-adrenergic receptors in the action of a tumour lipid mobilizing factor. *Br J Cancer* **86**, 424-428.
- Russell ST, Siren PM, Siren MJ & Tisdale MJ. (2009). Attenuation of skeletal muscle atrophy in cancer cachexia by D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate. *Cancer chemotherapy and pharmacology* **64**, 517-527.
- Russell ST & Tisdale MJ. (2010). Antidiabetic properties of zinc-alpha2-glycoprotein in ob/ob mice. *Endocrinology* **151**, 948-957.
- Russell ST & Tisdale MJ. (2011a). Studies on the anti-obesity activity of zinc-alpha2-glycoprotein in the rat. *Int J Obes (Lond)* **35**, 658-665.
- Russell ST & Tisdale MJ. (2011b). Studies on the antiobesity effect of zinc-alpha2-glycoprotein in the ob/ob mouse. *Int J Obes (Lond)* **35**, 345-354.
- Russell ST & Tisdale MJ. (2012). Role of beta-adrenergic receptors in the anti-obesity and anti-diabetic effects of zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG). *Biochim Biophys Acta* **1821**, 590-599.
- Ryan AM, Reynolds JV, Healy L, Byrne M, Moore J, Brannelly N, McHugh A, McCormack D & Flood P. (2009). Enteral nutrition enriched with eicosapentaenoic acid (EPA) preserves lean body mass following esophageal cancer surgery: results of a double-blinded randomized controlled trial. *Ann Surg* **249**, 355-363.
- Ryan AS, Ivey FM, Prior S, Li G & Hafer-Macko C. (2011). Skeletal muscle hypertrophy and muscle myostatin reduction after resistive training in stroke survivors. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **42**, 416-420.

- Ryden M, Agustsson T, Laurencikiene J, Britton T, Sjolín E, Isaksson B, Permert J & Arner P. (2008). Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. *Cancer* **113**, 1695-1704.
- Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **21**, 140-155.
- Sacheck JM, Ohtsuka A, McLary SC & Goldberg AL. (2004). IGF-I stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E591-601.
- Saitoh T, Nakayama M, Nakano H, Yagita H, Yamamoto N & Yamaoka S. (2003). TWEAK induces NF-kappaB2 p100 processing and long lasting NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **278**, 36005-36012.
- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T & Toriumi W. (1999). IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem* **274**, 30353-30356.
- Sakurai H, Suzuki S, Kawasaki N, Nakano H, Okazaki T, Chino A, Doi T & Saiki I. (2003). Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway. *J Biol Chem* **278**, 36916-36923.
- Salorinne Y, Stenius B, Tukiainen P & Poppius H. (1975). Double-blind cross-over comparison of clenbuterol and salbutamol tablets in asthmatic out-patients. *European journal of clinical pharmacology* **8**, 189-195.
- Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA & Kaplan G. (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *The Journal of experimental medicine* **173**, 699-703.
- Samuels SE, Knowles AL, Tilignac T, Debiton E, Madelmont JC & Attaix D. (2001). Higher skeletal muscle protein synthesis and lower breakdown after chemotherapy in cachectic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **281**, R133-139.
- Sandri M, Barberi L, Bijlsma AY, Blaauw B, Dyar KA, Milan G, Mammucari C, Meskers CG, Pallafacchina G, Paoli A, Pion D, Roceri M, Romanello V, Serrano AL, Toniolo L, Larsson L, Maier AB, Munoz-Canoves P, Musaro A, Pende M, Reggiani C, Rizzuto R & Schiaffino S. (2013). Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle. The role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology* **14**, 303-323.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, Goldberg AL & Spiegelman BM. (2006). PGC-1alpha protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16260-16265.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* **117**, 399-412.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM & Sabatini DM. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101.
- Sarcev T, Secen N, Sabo A & Povazan D. (2008). Influence of dexamethasone on appetite and body weight in lung cancer patients. *Medicinski pregljed* **61**, 571-575.
- Sassa T, Ohno Y, Suzuki S, Nomura T, Nishioka C, Kashiwagi T, Hirayama T, Akiyama M, Taguchi R, Shimizu H, Itohara S & Kihara A. (2013). Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking elovl1, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Molecular and cellular biology* **33**, 2787-2796.

- Sauer LA, Stayman JW, 3rd & Dauchy RT. (1982). Amino acid, glucose, and lactic acid utilization in vivo by rat tumors. *Cancer Res* **42**, 4090-4097.
- Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R & Codogno P. (2004). Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* **279**, 18384-18391.
- Schakman O, Dehoux M, Bouchuari S, Delaere S, Lause P, Decroly N, Shoelson SE & Thissen JP. (2012). Role of IGF-I and the TNFalpha/NF-kappaB pathway in the induction of muscle atrogenes by acute inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E729-739.
- Schattner MA, Willis HJ, Raykher A, Brown P, Quesada O, Scott B & Shike M. (2005). Long-term enteral nutrition facilitates optimization of body weight. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* **29**, 198-203.
- Schein PS, Kisner D, Haller D, Blecher M & Hamosh M. (1979). Cachexia of malignancy: potential role of insulin in nutritional management. *Cancer* **43**, 2070-2076.
- Schersten T & Lundholm K. (1972). Lysosomal enzyme activity in muscle tissue from patients with malignant tumor. *Cancer* **30**, 1246-1251.
- Schiaffino S & Hanzlikova V. (1972). Studies on the effect of denervation in developing muscle. II. The lysosomal system. *Journal of ultrastructure research* **39**, 1-14.
- Schmidt K, von Haehling S, Doehner W, Palus S, Anker SD & Springer J. (2011). IGF-1 treatment reduces weight loss and improves outcome in a rat model of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**, 105-109.
- Schmitt TL, Martignoni ME, Bachmann J, Fechtner K, Friess H, Kinscherf R & Hildebrandt W. (2007). Activity of the Akt-dependent anabolic and catabolic pathways in muscle and liver samples in cancer-related cachexia. *J Mol Med* **85**, 647-654.
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF & Lee SJ. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med* **350**, 2682-2688.
- Schweiger M, Paar M, Eder C, Brandis J, Moser E, Gorkiewicz G, Grond S, Radner FP, Cerk I, Cornaciu I, Oberer M, Kersten S, Zechner R, Zimmermann R & Lass A. (2012). G0/G1 switch gene-2 regulates human adipocyte lipolysis by affecting activity and localization of adipose triglyceride lipase. *Journal of lipid research* **53**, 2307-2317.
- Schweiger M, Schreiber R, Haemmerle G, Lass A, Fledelius C, Jacobsen P, Tornqvist H, Zechner R & Zimmermann R. (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J Biol Chem* **281**, 40236-40241.
- Scott HR, McMillan DC, Crilly A, McArdle CS & Milroy R. (1996). The relationship between weight loss and interleukin 6 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **73**, 1560-1562.
- Scott HR, McMillan DC, Forrest LM, Brown DJ, McArdle CS & Milroy R. (2002). The systemic inflammatory response, weight loss, performance status and survival in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* **87**, 264-267.
- Segal RJ, Reid RD, Courneya KS, Malone SC, Parliament MB, Scott CG, Venner PM, Quinney HA, Jones LW, D'Angelo ME & Wells GA. (2003). Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **21**, 1653-1659.

- Segal RJ, Reid RD, Courneya KS, Sigal RJ, Kenny GP, Prud'Homme DG, Malone SC, Wells GA, Scott CG & Slovinec D'Angelo ME. (2009). Randomized controlled trial of resistance or aerobic exercise in men receiving radiation therapy for prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 344-351.
- Segaloff A, Cuningham M, Rice BF & Weeth JB. (1967). Hormonal therapy in cancer of the breast. XXIV. Effect of corticosterone or medroxyprogesterone acetate on clinical course and hormonal excretion. *Cancer* **20**, 1673-1678.
- Segaud F, Combaret L, Neveux N, Attaix D, Cynober L & Moinard C. (2007). Effects of ornithine alpha-ketoglutarate on protein metabolism in Yoshida sarcoma-bearing rats. *Clin Nutr* **26**, 624-630.
- Sen R & Baltimore D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**, 705-716.
- Servais S, Letexier D, Favier R, Duchamp C & Desplanches D. (2007). Prevention of unloading-induced atrophy by vitamin E supplementation: links between oxidative stress and soleus muscle proteolysis? *Free radical biology & medicine* **42**, 627-635.
- Shadfar S, Couch ME, McKinney KA, Weinstein LJ, Yin X, Rodriguez JE, Guttridge DC & Willis M. (2011). Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo. *Nutrition and cancer* **63**, 749-762.
- Shamberger RC, Brennan MF, Goodgame JT, Jr., Lowry SF, Maher MM, Wesley RA & Pizzo PA. (1984). A prospective, randomized study of adjuvant parenteral nutrition in the treatment of sarcomas: results of metabolic and survival studies. *Surgery* **96**, 1-13.
- Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV, Fowke PJ & Bass JJ. (1999). Myostatin, a transforming growth factor-beta superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol* **180**, 1-9.
- Shaw JH & Wolfe RR. (1987). Fatty acid and glycerol kinetics in septic patients and in patients with gastrointestinal cancer. The response to glucose infusion and parenteral feeding. *Ann Surg* **205**, 368-376.
- Shen WJ, Patel S, Miyoshi H, Greenberg AS & Kraemer FB. (2009). Functional interaction of hormone-sensitive lipase and perilipin in lipolysis. *Journal of lipid research* **50**, 2306-2313.
- Sherry BA, Gelin J, Fong Y, Marano M, Wei H, Cerami A, Lowry SF, Lundholm KG & Moldawer LL. (1989). Anticachectin/tumor necrosis factor-alpha antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **3**, 1956-1962.
- Simons JP, Aaronson NK, Vansteenkiste JF, ten Velde GP, Muller MJ, Drenth BM, Erdkamp FL, Cobben EG, Schoon EJ, Smeets JB, Schouten HC, Demedts M, Hillen HF, Blijham GH & Wouters EF. (1996). Effects of medroxyprogesterone acetate on appetite, weight, and quality of life in advanced-stage non-hormone-sensitive cancer: a placebo-controlled multicenter study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **14**, 1077-1084.
- Simons JP, Schols AM, Hoefnagels JM, Westerterp KR, ten Velde GP & Wouters EF. (1998). Effects of medroxyprogesterone acetate on food intake, body composition, and resting energy expenditure in patients with advanced, nonhormone-sensitive cancer: a randomized, placebo-controlled trial. *Cancer* **82**, 553-560.
- Siu PM & Alway SE. (2005). Mitochondria-associated apoptotic signalling in denervated rat skeletal muscle. *The Journal of physiology* **565**, 309-323.

- Siu PM, Pistilli EE & Alway SE. (2005). Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**, R1015-1026.
- Skipworth RJ, Stewart GD, Dejong CH, Preston T & Fearon KC. (2007). Pathophysiology of cancer cachexia: much more than host-tumour interaction? *Clin Nutr* **26**, 667-676.
- Smith IJ, Aversa Z, Hasselgren PO, Pacelli F, Rosa F, Doglietto GB & Bossola M. (2011). Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss. *Muscle Nerve* **43**, 410-414.
- Smith KL & Tisdale MJ. (1993a). Increased protein degradation and decreased protein synthesis in skeletal muscle during cancer cachexia. *Br J Cancer* **67**, 680-685.
- Smith KL & Tisdale MJ. (1993b). Mechanism of muscle protein degradation in cancer cachexia. *Br J Cancer* **68**, 314-318.
- Socher SH, Martinez D, Craig JB, Kuhn JG & Oliff A. (1988). Tumor necrosis factor not detectable in patients with clinical cancer cachexia. *Journal of the National Cancer Institute* **80**, 595-598.
- Solheim TS, Blum D, Fayers PM, Hjerfnstad MJ, Stene GB, Strasser F & Kaasa S. (2014). Weight loss, appetite loss and food intake in cancer patients with cancer cachexia: Three peas in a pod? - analysis from a multicenter cross sectional study. *Acta Oncol* **53**, 539-546.
- Solheim TS, Fearon KC, Blum D & Kaasa S. (2013). Non-steroidal anti-inflammatory treatment in cancer cachexia: a systematic literature review. *Acta Oncol* **52**, 6-17.
- Solis-Cohen S. (1900). The use of adrenal substance in the treatment of asthma. *Journal of the American Medical Association* **XXXIV**, 1164-1166.
- Solomon V & Goldberg AL. (1996). Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem* **271**, 26690-26697.
- Somers GF. (1960). Pharmacological properties of thalidomide (alpha-phthalimido glutarimide), a new sedative hypnotic drug. *British journal of pharmacology and chemotherapy* **15**, 111-116.
- Song YH, Li Y, Du J, Mitch WE, Rosenthal N & Delafontaine P. (2005). Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J Clin Invest* **115**, 451-458.
- Sorimachi H, Imajoh-Ohmi S, Emori Y, Kawasaki H, Ohno S, Minami Y & Suzuki K. (1989). Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in skeletal muscle. *J Biol Chem* **264**, 20106-20111.
- Souza TA, Chen X, Guo Y, Sava P, Zhang J, Hill JJ, Yaworsky PJ & Qiu Y. (2008). Proteomic identification and functional validation of activins and bone morphogenetic protein 11 as candidate novel muscle mass regulators. *Mol Endocrinol* **22**, 2689-2702.
- Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT & Fischer JE. (1993). Effects of increased beta 2-agonist dose in tumor-bearing animals. *Nutrition and cancer* **20**, 251-260.
- Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT, James JH & Fischer JE. (1995). Anticatabolic effect of the beta 2-agonist cimaterol in vivo in tumor-bearing animals. *The Journal of surgical research* **59**, 387-392.
- Stallion A, Zhang FS, Chance WT, Foley-Nelson T & Fischer JE. (1991). Reversal of cancer cachexia in rats by cimaterol and supplemental nutrition. *Surgery* **110**, 678-684.
- Starnes HF, Jr., Warren RS & Brennan MF. (1987). Protein synthesis in hepatocytes isolated from patients with gastrointestinal malignancy. *J Clin Invest* **80**, 1384-1390.

- Stein TP, Oram-Smith JC, Leskiw MJ, Wallace HW & Miller EE. (1976). Tumor-caused changes in host protein synthesis under different dietary situations. *Cancer Res* **36**, 3936-3940.
- Stene GB, Helbostad JL, Balstad TR, Riphagen, II, Kaasa S & Oldervoll LM. (2013). Effect of physical exercise on muscle mass and strength in cancer patients during treatment-A systematic review. *Critical reviews in oncology/hematology* **88**, 573-593.
- Stephens NA, Gray C, MacDonald AJ, Tan BH, Gallagher IJ, Skipworth RJ, Ross JA, Fearon KC & Greig CA. (2012). Sexual dimorphism modulates the impact of cancer cachexia on lower limb muscle mass and function. *Clin Nutr* **31**, 499-505.
- Stephens NA, Skipworth RJ & Fearon KC. (2008). Cachexia, survival and the acute phase response. *Current opinion in supportive and palliative care* **2**, 267-274.
- Stephens NA, Skipworth RJ, Macdonald AJ, Greig CA, Ross JA & Fearon KC. (2011). Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**, 111-117.
- Stewart Coats AJ, Srinivasan V, Surendran J, Chiramana H, Vangipuram SR, Bhatt NN, Jain M, Shah S, Ali IA, Fuang HG, Hassan MZ, Beadle J, Tilson J, Kirwan BA & Anker SD. (2011). The ACT-ONE trial, a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding study of the anabolic/catabolic transforming agent, MT-102 in subjects with cachexia related to stage III and IV non-small cell lung cancer and colorectal cancer: study design. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **2**, 201-207.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD & Glass DJ. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell* **14**, 395-403.
- Stoll BA. (1967). Progesterin therapy of breast cancer: comparison of agents. *British medical journal* **3**, 338-341.
- Stovroff MC, Fraker DL, Swedenborg JA & Norton JA. (1988). Cachectin/tumor necrosis factor: a possible mediator of cancer anorexia in the rat. *Cancer Res* **48**, 4567-4572.
- Stralfors P, Bjorgell P & Belfrage P. (1984). Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 3317-3321.
- Strasser F, Luftner D, Possinger K, Ernst G, Ruhstaller T, Meissner W, Ko YD, Schnelle M, Reif M & Cerny T. (2006). Comparison of orally administered cannabis extract and delta-9-tetrahydrocannabinol in treating patients with cancer-related anorexia-cachexia syndrome: a multicenter, phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial from the Cannabis-In-Cachexia-Study-Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**, 3394-3400.
- Strasser F, Lutz TA, Maeder MT, Thuerlimann B, Bueche D, Tschop M, Kaufmann K, Holst B, Brandle M, von Moos R, Demmer R & Cerny T. (2008). Safety, tolerability and pharmacokinetics of intravenous ghrelin for cancer-related anorexia/cachexia: a randomised, placebo-controlled, double-blind, double-crossover study. *Br J Cancer* **98**, 300-308.
- Strassmann G, Fong M, Kenney JS & Jacob CO. (1992). Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* **89**, 1681-1684.
- Strassmann G, Masui Y, Chizzonite R & Fong M. (1993). Mechanisms of experimental cancer cachexia. Local involvement of IL-1 in colon-26 tumor. *J Immunol* **150**, 2341-2345.

- Stratton RJ & Elia M. (2000). Are oral nutritional supplements of benefit to patients in the community? Findings from a systematic review. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **3**, 311-315.
- Strieter RM, Remick DG, Ward PA, Spengler RN, Lynch JP, 3rd, Larrick J & Kunkel SL. (1988). Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. *Biochem Biophys Res Commun* **155**, 1230-1236.
- Sturlan S, Beinbauer BG, Oberhuber G, Huang L, Aasen AO & Rogy MA. (2002). In vivo gene transfer of murine interleukin-4 inhibits colon-26-mediated cancer cachexia in mice. *Anticancer research* **22**, 2547-2554.
- Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA & Dove WF. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* **256**, 668-670.
- Subramanian V, Rothenberg A, Gomez C, Cohen AW, Garcia A, Bhattacharyya S, Shapiro L, Dolios G, Wang R, Lisanti MP & Brasaemle DL. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **279**, 42062-42071.
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N & Takeshita A. (2003). Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* **107**, 1418-1423.
- Sugiura K & Stock CC. (1955). Studies in a tumor spectrum. III. The effect of phosphoramides on the growth of a variety of mouse and rat tumors. *Cancer Res* **15**, 38-51.
- Suh SY, Choi YS, Yeom CH, Kwak SM, Yoon HM, Kim DG, Koh SJ, Park J, Lee MA, Lee YJ, Seo AR, Ahn HY & Yim E. (2013). Interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts survival in patients with advanced cancer. *Support Care Cancer* **21**, 3071-3077.
- Sumi T, Ishiko O, Honda K, Hirai K, Yasui T & Ogita S. (1999). Muscle cell apoptosis is responsible for the body weight loss in tumor-bearing rabbits. *Osaka city medical journal* **45**, 25-35.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ & White MF. (1991). Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* **352**, 73-77.
- Sun YS, Ye ZY, Qian ZY, Xu XD & Hu JF. (2012). Expression of TRAF6 and ubiquitin mRNA in skeletal muscle of gastric cancer patients. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* **31**, 81.
- Szabo G, Dallmann G, Muller G, Patthy L, Soller M & Varga L. (1998). A deletion in the myostatin gene causes the compact (Cmpt) hypermuscular mutation in mice. *Mamm Genome* **9**, 671-672.
- Szlama G, Kondas K, Trexler M & Patthy L. (2010). WFIKKN1 and WFIKKN2 bind growth factors TGFbeta1, BMP2 and BMP4 but do not inhibit their signalling activity. *The FEBS journal* **277**, 5040-5050.
- Tada T, Ohkubo I, Niwa M, Sasaki M, Tateyama H & Eimoto T. (1991). Immunohistochemical localization of Zn-alpha 2-glycoprotein in normal human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **39**, 1221-1226.
- Takaishi H, Konishi H, Matsuzaki H, Ono Y, Shirai Y, Saito N, Kitamura T, Ogawa W, Kasuga M, Kikkawa U & Nishizuka Y. (1999). Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11836-11841.
- Taketa Y, Nagai Y, Ogasawara H, Hayashi S, Miyake M, Tanaka S, Watanabe K, Ohwada S, Aso H & Yamaguchi T. (2008). Differential expression of myostatin and its receptor in the porcine anterior pituitary gland. *Animal Science Journal* **79**, 382-390.

- Tan BH, Birdsell LA, Martin L, Baracos VE & Fearon KC. (2009). Sarcopenia in an overweight or obese patient is an adverse prognostic factor in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 6973-6979.
- Tan BH & Fearon KC. (2008). Cachexia: prevalence and impact in medicine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **11**, 400-407.
- Tanaka K. (1998). Molecular biology of the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 537-541.
- Tanaka Y, Tanaka T & Ishitsuka H. (1989). Antitumor activity of indomethacin in mice bearing advanced colon 26 carcinoma compared with those with early transplants. *Cancer Res* **49**, 5935-5939.
- Tardif N, Klaude M, Lundell L, Thorell A & Rooyackers O. (2013). Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients. *The American journal of clinical nutrition* **98**, 1485-1492.
- Taschler U, Radner FP, Heier C, Schreiber R, Schweiger M, Schoiswohl G, Preiss-Landl K, Jaeger D, Reiter B, Koefeler HC, Wojciechowski J, Theussl C, Penninger JM, Lass A, Haemmerle G, Zechner R & Zimmermann R. (2011). Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem* **286**, 17467-17477.
- Tayek JA. (1992). A review of cancer cachexia and abnormal glucose metabolism in humans with cancer. *Journal of the American College of Nutrition* **11**, 445-456.
- Tayek JA, Bistrrian BR, Hehir DJ, Martin R, Moldawer LL & Blackburn GL. (1986). Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia. A prospective randomized crossover trial. *Cancer* **58**, 147-157.
- Taylor DD, Gercel-Taylor C, Jenis LG & Devereux DF. (1992). Identification of a human tumor-derived lipolysis-promoting factor. *Cancer Res* **52**, 829-834.
- Taylor WE, Bhasin S, Artaza J, Byhower F, Azam M, Willard DH, Jr., Kull FC, Jr. & Gonzalez-Cadavid N. (2001). Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E221-228.
- Tchekmedyian NS, Hickman M, Siau J, Greco FA, Keller J, Browder H & Aisner J. (1992a). Megestrol acetate in cancer anorexia and weight loss. *Cancer* **69**, 1268-1274.
- Tchekmedyian NS, Tait N, Moody M & Aisner J. (1987). High-dose megestrol acetate. A possible treatment for cachexia. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **257**, 1195-1198.
- Tchekmedyian NS, Zahyna D, Halpert C & Heber D. (1992b). Clinical aspects of nutrition in advanced cancer. *Oncology* **49 Suppl 2**, 3-7.
- Tee AR, Fingar DC, Manning BD, Kwiatkowski DJ, Cantley LC & Blenis J. (2002). Tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products function together to inhibit mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated downstream signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13571-13576.
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC & Blenis J. (2003). Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Current biology : CB* **13**, 1259-1268.
- Temparis S, Asensi M, Taillandier D, Aurousseau E, Larbaud D, Obled A, Bechet D, Ferrara M, Estrela JM & Attaix D. (1994). Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res* **54**, 5568-5573.

- Tessitore L, Bonelli G & Baccino FM. (1987). Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia. *The Biochemical journal* **241**, 153-159.
- Tessitore L, Costelli P & Baccino FM. (1994). Pharmacological interference with tissue hypercatabolism in tumour-bearing rats. *The Biochemical journal* **299 (Pt 1)**, 71-78.
- Tessitore L, Costelli P, Bonetti G & Baccino FM. (1993). Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Archives of biochemistry and biophysics* **306**, 52-58.
- Teulings FA, van Gilse HA, Henkelman MS, Portengen H & Alexieva-Figusch J. (1980). Estrogen, androgen, glucocorticoid, and progesterone receptors in progestin-induced regression of human breast cancer. *Cancer Res* **40**, 2557-2561.
- Tews DS, Behrhof W & Schindler S. (2005). Expression patterns of initiator and effector caspases in denervated human skeletal muscle. *Muscle Nerve* **31**, 175-181.
- Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA & Wolfman NM. (2001). GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth Factors* **18**, 251-259.
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J & Kambadur R. (2000). Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* **275**, 40235-40243.
- Thompson MP, Cooper ST, Parry BR & Tuckey JA. (1993). Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. *Biochim Biophys Acta* **1180**, 236-242.
- Thompson MP, Koons JE, Tan ET & Grigor MR. (1981). Modified lipoprotein lipase activities, rates of lipogenesis, and lipolysis as factors leading to lipid depletion in C57BL mice bearing the preputial gland tumor, ESR-586. *Cancer Res* **41**, 3228-3232.
- Thudichum JLW. (1882). Ueber das Phrenosin, einen neuen stickstoffhaltiger phosphorfreen spezifischen Gehirnstoff. *Journal für Praktische Chemie* **25**, 19-28.
- Thudichum JLW. (1884). *A treatise on the chemical constitution of the brain; based throughout upon original researches*. Baillière, Tindall, and Cox, London, England.
- Tidball JG & Spencer MJ. (2002). Expression of a calpastatin transgene slows muscle wasting and obviates changes in myosin isoform expression during murine muscle disuse. *The Journal of physiology* **545**, 819-828.
- Tillett WS & Francis T. (1930). Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus. *The Journal of experimental medicine* **52**, 561-571.
- Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP & Leibovitch SA. (2005). Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem* **280**, 2847-2856.
- Tisdale MJ. (2002). Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer* **2**, 862-871.
- Tisdale MJ. (2003). The 'cancer cachectic factor'. *Support Care Cancer* **11**, 73-78.
- Tisdale MJ. (2009). Mechanisms of cancer cachexia. *Physiological reviews* **89**, 381-410.
- Tisdale MJ. (2010). Cancer cachexia. *Current opinion in gastroenterology* **26**, 146-151.
- Tisdale MJ & Beck SA. (1991). Inhibition of tumour-induced lipolysis in vitro and cachexia and tumour growth in vivo by eicosapentaenoic acid. *Biochemical pharmacology* **41**, 103-107.

- Todorov P, Cariuk P, McDevitt T, Coles B, Fearon K & Tisdale M. (1996a). Characterization of a cancer cachectic factor. *Nature* **379**, 739-742.
- Todorov PT, Deacon M & Tisdale MJ. (1997). Structural analysis of a tumor-produced sulfated glycoprotein capable of initiating muscle protein degradation. *J Biol Chem* **272**, 12279-12288.
- Todorov PT, Field WN & Tisdale MJ. (1999). Role of a proteolysis-inducing factor (PIF) in cachexia induced by a human melanoma (G361). *Br J Cancer* **80**, 1734-1737.
- Todorov PT, McDevitt TM, Cariuk P, Coles B, Deacon M & Tisdale MJ. (1996b). Induction of muscle protein degradation and weight loss by a tumor product. *Cancer Res* **56**, 1256-1261.
- Todorov PT, McDevitt TM, Meyer DJ, Ueyama H, Ohkubo I & Tisdale MJ. (1998). Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor. *Cancer Res* **58**, 2353-2358.
- Todorov PT, Wyke SM & Tisdale MJ. (2007). Identification and characterization of a membrane receptor for proteolysis-inducing factor on skeletal muscle. *Cancer Res* **67**, 11419-11427.
- Tozer RG, Tai P, Falconer W, Ducruet T, Karabadjian A, Bounous G, Molson JH & Droge W. (2008). Cysteine-rich protein reverses weight loss in lung cancer patients receiving chemotherapy or radiotherapy. *Antioxidants & redox signaling* **10**, 395-402.
- Tracey KJ, Morgello S, Koplin B, Fahey TJ, 3rd, Fox J, Aledo A, Manogue KR & Cerami A. (1990). Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. Cachectin/tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominantly acute anorexia. *J Clin Invest* **86**, 2014-2024.
- Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A & et al. (1988). Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *The Journal of experimental medicine* **167**, 1211-1227.
- Tran M, Raynard B, Bataillard A, Duguet A, Garabige V, Lallemand Y, Meuric J, Rossignol G, Schneider S, Simon M, Bachmann P, Nitenberg G, Combret D, Piquet MA, Arnaud-Battandier F, Bredeau O, Petit F, Triqueneau O, Dolbeault S & Bonnet-Pommatau L. (2006). Standards, Options and Recommendations 2005 for a good practice in enteral nutrition in oncology (summary report.). *Bulletin du cancer* **93**, 715-722.
- Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S & Glass DJ. (2009). Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C1258-1270.
- Trew JA & Begg RW. (1959). In vitro incorporation of acetate-1-C14 into adipose tissue from normal and tumor-bearing rats. *Cancer Res* **19**, 1014-1019.
- Tsujinaka T, Ebisui C, Fujita J, Kishibuchi M, Morimoto T, Ogawa A, Katsume A, Ohsugi Y, Kominami E & Monden M. (1995). Muscle undergoes atrophy in association with increase of lysosomal cathepsin activity in interleukin-6 transgenic mouse. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 168-174.
- Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, Tanaka K, Katsume A, Ohsugi Y, Shiozaki H & Monden M. (1996). Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest* **97**, 244-249.
- Tuca A, Jimenez-Fonseca P & Gascon P. (2013). Clinical evaluation and optimal management of cancer cachexia. *Critical reviews in oncology/hematology* **88**, 625-636.

- Turinsky J, Bayly BP & O'Sullivan DM. (1991). 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in rat liver and skeletal muscle in vivo. *The American journal of physiology* **261**, E620-627.
- Turinsky J, O'Sullivan DM & Bayly BP. (1990). 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* **265**, 16880-16885.
- Turk V, Turk B & Turk D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO journal* **20**, 4629-4633.
- Turpin SM, Lancaster GI, Darby I, Febbraio MA & Watt MJ. (2006). Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1341-1350.
- Utech AE, Tadros EM, Hayes TG & Garcia JM. (2012). Predicting survival in cancer patients: the role of cachexia and hormonal, nutritional and inflammatory markers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **3**, 245-251.
- Utsumi K, Takai Y, Tada T, Ohzeki S, Fujiwara H & Hamaoka T. (1990). Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. *J Immunol* **145**, 397-403.
- van der Meij BS, Langius JA, Smit EF, Spreeuwenberg MD, von Blomberg BM, Heijboer AC, Paul MA & van Leeuwen PA. (2010). Oral nutritional supplements containing (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the nutritional status of patients with stage III non-small cell lung cancer during multimodality treatment. *J Nutr* **140**, 1774-1780.
- van Eys J. (1982). Effect of nutritional status on responses to therapy. *Cancer Res* **42**, 747s-753s.
- van Royen M, Carbo N, Busquets S, Alvarez B, Quinn LS, Lopez-Soriano FJ & Argiles JM. (2000). DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 533-537.
- Vandenburgh HH, Karlisch P, Shansky J & Feldstein R. (1991). Insulin and IGF-I induce pronounced hypertrophy of skeletal myofibers in tissue culture. *The American journal of physiology* **260**, C475-484.
- Vander Heiden MG, Cantley LC & Thompson CB. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033.
- Vane JR. (1971). Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature: New biology* **231**, 232-235.
- Vescovo G & Dalla Libera L. (2006). Skeletal muscle apoptosis in experimental heart failure: the only link between inflammation and skeletal muscle wastage? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**, 416-422.
- Viallet A, Benhamou JP & Fauvert R. (1962). Primary carcinoma of the liver and hyperlipemia. *Canadian Medical Association journal* **86**, 1118-1121.
- Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH & Sul HS. (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* **279**, 47066-47075.
- Vince JE, Chau D, Callus B, Wong WW, Hawkins CJ, Schneider P, McKinlay M, Benetatos CA, Condon SM, Chunduru SK, Yeoh G, Brink R, Vaux DL & Silke J. (2008). TWEAK-FN14 signaling induces lysosomal degradation of a cIAP1-TRAF2 complex to sensitize tumor cells to TNFalpha. *J Cell Biol* **182**, 171-184.
- Voisin L, Breuille D, Combaret L, Pouyet C, Taillandier D, Aourousseau E, Obléd C & Attaix D. (1996). Muscle wasting in a rat model of long-lasting sepsis results from the activation of lysosomal, Ca²⁺-activated, and ubiquitin-proteasome proteolytic pathways. *J Clin Invest* **97**, 1610-1617.

- von Haehling S, Stepney R & Anker SD. (2010). Advances in understanding and treating cardiac cachexia: highlights from the 5th Cachexia Conference. *International journal of cardiology* **144**, 347-349.
- von Klein CH. (1905). *The medical features of the Papyrus Ebers*. American Medical Association, Chicago, USA.
- von Manteuffel SR, Gingras AC, Ming XF, Sonenberg N & Thomas G. (1996). 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4076-4080.
- Wagner KR, Liu X, Chang X & Allen RE. (2005). Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2519-2524.
- Walsh D, Mahmoud F & Barna B. (2003). Assessment of nutritional status and prognosis in advanced cancer: interleukin-6, C-reactive protein, and the prognostic and inflammatory nutritional index. *Support Care Cancer* **11**, 60-62.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J & Chen ZJ. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* **412**, 346-351.
- Wang H, Hertlein E, Bakkar N, Sun H, Acharyya S, Wang J, Carathers M, Davuluri R & Guttridge DC. (2007). NF-kappaB regulation of YY1 inhibits skeletal myogenesis through transcriptional silencing of myofibrillar genes. *Molecular and cellular biology* **27**, 4374-4387.
- Wang H, Hu L, Dalen K, Dorward H, Marcinkiewicz A, Russell D, Gong D, Londos C, Yamaguchi T, Holm C, Rizzo MA, Brasaemle D & Sztalryd C. (2009). Activation of hormone-sensitive lipase requires two steps, protein phosphorylation and binding to the PAT-1 domain of lipid droplet coat proteins. *J Biol Chem* **284**, 32116-32125.
- Wang H, Lai YJ, Chan YL, Li TL & Wu CJ. (2011). Epigallocatechin-3-gallate effectively attenuates skeletal muscle atrophy caused by cancer cachexia. *Cancer Lett* **305**, 40-49.
- Wang H, Zhang Q & Zhu D. (2003a). hSGT interacts with the N-terminal region of myostatin. *Biochem Biophys Res Commun* **311**, 877-883.
- Wang Q, Lu JB, Wu B & Hao LY. (2010). Expression and clinicopathologic significance of proteolysis-inducing factor in non-small-cell lung cancer: an immunohistochemical analysis. *Clinical lung cancer* **11**, 346-351.
- Wang Z, Corey E, Hass GM, Higano CS, True LD, Wallace D, Jr., Tisdale MJ & Vessella RL. (2003b). Expression of the human cachexia-associated protein (HCAP) in prostate cancer and in a prostate cancer animal model of cachexia. *Int J Cancer* **105**, 123-129.
- Warburg O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314.
- Warburg O, Wind F & Negelein E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *The Journal of general physiology* **8**, 519-530.
- Warnold I, Lundholm K & Schersten T. (1978). Energy balance and body composition in cancer patients. *Cancer Res* **38**, 1801-1807.
- Warren S. (1932). The Immediate Causes of Death in Cancer. *Am J Med Sci* **184**, 610-615.
- Watchorn TM, Waddell I, Dowidar N & Ross JA. (2001). Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF-(kappa)B and STAT3. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**, 562-564.

- Watchorn TM, Waddell I & Ross JA. (2002). Proteolysis-inducing factor differentially influences transcriptional regulation in endothelial subtypes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E763-769.
- Waterhouse C. (1974). Lactate metabolism in patients with cancer. *Cancer* **33**, 66-71.
- Waterhouse C, Jeanpretre N & Keilson J. (1979). Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. *Cancer Res* **39**, 1968-1972.
- Waterhouse C & Kemperman JH. (1971). Carbohydrate metabolism in subjects with cancer. *Cancer Res* **31**, 1273-1278.
- Watson WS & Sammon AM. (1980). Body composition in cachexia resulting from malignant and non-malignant diseases. *Cancer* **46**, 2041-2046.
- WCRF. (2007). Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective, pp. 1-537. World Cancer Research Fund, Washington, DC, USA.
- Weber MA, Krakowski-Roosen H, Schroder L, Kinscherf R, Krix M, Kopp-Schneider A, Essig M, Bachert P, Kauczor HU & Hildebrandt W. (2009). Morphology, metabolism, microcirculation, and strength of skeletal muscles in cancer-related cachexia. *Acta Oncol* **48**, 116-124.
- Weed HG, Ferguson ML, Gaff RL, Hustead DS, Nelson JL & Voss AC. (2011). 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**, 1027-1033.
- Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E & Jackle H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the Drosophila embryo. *Cell* **57**, 645-658.
- Weinhouse S. (1976). The Warburg hypothesis fifty years later. *Zeitschrift fur Krebsforschung und klinische Onkologie Cancer research and clinical oncology* **87**, 115-126.
- Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT & Proud CG. (1998). Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett* **421**, 125-130.
- Wentz WB. (1974). Progestin therapy in endometrial hyperplasia. *Gynecologic oncology* **2**, 362-367.
- White JP, Baynes JW, Welle SL, Kostek MC, Matesic LE, Sato S & Carson JA. (2011). The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in the Apc(Min/+) mouse. *PLoS One* **6**, e24650.
- White JP, Puppa MJ, Gao S, Sato S, Welle SL & Carson JA. (2013). Muscle mTORC1 suppression by IL-6 during cancer cachexia: a role for AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **304**, E1042-1052.
- Whitehouse AS, Smith HJ, Drake JL & Tisdale MJ. (2001). Mechanism of attenuation of skeletal muscle protein catabolism in cancer cachexia by eicosapentaenoic acid. *Cancer Res* **61**, 3604-3609.
- Whitehouse AS & Tisdale MJ. (2003). Increased expression of the ubiquitin-proteasome pathway in murine myotubes by proteolysis-inducing factor (PIF) is associated with activation of the transcription factor NF-kappaB. *Br J Cancer* **89**, 1116-1122.
- Whittemore LA, Song K, Li X, Aghajanian J, Davies M, Girgenrath S, Hill JJ, Jalenak M, Kelley P, Knight A, Maylor R, O'Hara D, Pearson A, Quazi A, Ryerson S, Tan XY, Tomkinson KN, Veldman GM, Widom A, Wright JF, Wudyka S, Zhao L & Wolfman NM. (2003). Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 965-971.

- WHO. (2008). The Global Burden of Disease: 2004 Update, pp. 1-160. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wieland BM, Stewart GD, Skipworth RJ, Sangster K, Fearon KC, Ross JA, Reiman TJ, Easaw J, Mourtzakis M, Kumar V, Pak BJ, Calder K, Filippatos G, Kremastinos DT, Palcic M & Baracos VE. (2007). Is there a human homologue to the murine proteolysis-inducing factor? *Clin Cancer Res* **13**, 4984-4992.
- Wigmore SJ, Falconer JS, Plester CE, Ross JA, Maingay JP, Carter DC & Fearon KC. (1995). Ibuprofen reduces energy expenditure and acute-phase protein production compared with placebo in pancreatic cancer patients. *Br J Cancer* **72**, 185-188.
- Wigmore SJ, Fearon KC, Sangster K, Maingay JP, Garden OJ & Ross JA. (2002). Cytokine regulation of constitutive production of interleukin-8 and -6 by human pancreatic cancer cell lines and serum cytokine concentrations in patients with pancreatic cancer. *International journal of oncology* **21**, 881-886.
- Wigmore SJ, Plester CE, Richardson RA & Fearon KC. (1997). Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer. *Br J Cancer* **75**, 106-109.
- Wigmore SJ, Ross JA, Falconer JS, Plester CE, Tisdale MJ, Carter DC & Fearon KC. (1996). The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. *Nutrition* **12**, S27-30.
- Wigmore SJ, Todorov PT, Barber MD, Ross JA, Tisdale MJ & Fearon KC. (2000). Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor. *The British journal of surgery* **87**, 53-58.
- Wiley SR, Cassiano L, Lofton T, Davis-Smith T, Winkles JA, Lindner V, Liu H, Daniel TO, Smith CA & Fanslow WC. (2001). A novel TNF receptor family member binds TWEAK and is implicated in angiogenesis. *Immunity* **15**, 837-846.
- Williams A, Sun X, Fischer JE & Hasselgren PO. (1999a). The expression of genes in the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway is increased in skeletal muscle from patients with cancer. *Surgery* **126**, 744-749; discussion 749-750.
- Williams AB, Decourten-Myers GM, Fischer JE, Luo G, Sun X & Hasselgren PO. (1999b). Sepsis stimulates release of myofilaments in skeletal muscle by a calcium-dependent mechanism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 1435-1443.
- Wilcox JC, Corr J, Shaw J, Richardson M, Calman KC & Drennan M. (1984). Prednisolone as an appetite stimulant in patients with cancer. *Br Med J (Clin Res Ed)* **288**, 27.
- Windsor JA & Hill GL. (1988). Risk factors for postoperative pneumonia. The importance of protein depletion. *Ann Surg* **208**, 209-214.
- Winkles JA. (2008). The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nature reviews Drug discovery* **7**, 411-425.
- Wolfman NM, McPherron AC, Pappano WN, Davies MV, Song K, Tomkinson KN, Wright JF, Zhao L, Sebald SM, Greenspan DS & Lee SJ. (2003). Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15842-15846.
- Woodcock J. (2006). Sphingosine and ceramide signalling in apoptosis. *IUBMB life* **58**, 462-466.
- Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA & Bloom SR. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **86**, 5992.

- Wyke SM, Russell ST & Tisdale MJ. (2004). Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation. *Br J Cancer* **91**, 1742-1750.
- Wyke SM & Tisdale MJ. (2005). NF-kappaB mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *Br J Cancer* **92**, 711-721.
- Xu R, Jin J, Hu W, Sun W, Bielawski J, Szulc Z, Taha T, Obeid LM & Mao C. (2006). Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 1813-1825.
- Yamaguchi T, Omatsu N, Matsushita S & Osumi T. (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J Biol Chem* **279**, 30490-30497.
- Yamaguchi T, Omatsu N, Morimoto E, Nakashima H, Ueno K, Tanaka T, Satouchi K, Hirose F & Osumi T. (2007). CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation. *Journal of lipid research* **48**, 1078-1089.
- Yamauchi Y, Izumi Y, Asakura K, Kawai K, Wakui M, Ohmura M, Suematsu M & Nomori H. (2013). Lewis Lung Carcinoma Progression Is Facilitated by TIG-3 Fibroblast Cells. *Anticancer research* **33**, 3791-3798.
- Yang X, Lu X, Lombes M, Rha GB, Chi YI, Guerin TM, Smart EJ & Liu J. (2010). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell metabolism* **11**, 194-205.
- Yang Z, Costanzo M, Golde DW & Kolesnick RN. (1993). Tumor necrosis factor activation of the sphingomyelin pathway signals nuclear factor kappa B translocation in intact HL-60 cells. *J Biol Chem* **268**, 20520-20523.
- Yarasheski KE, Bhasin S, Sinha-Hikim I, Pak-Loduca J & Gonzalez-Cadavid NF. (2002). Serum myostatin-immunoreactive protein is increased in 60-92 year old women and men with muscle wasting. *J Nutr Health Aging* **6**, 343-348.
- Yaron A, Gonen H, Alkalay I, Hatzubai A, Jung S, Beyth S, Mercurio F, Manning AM, Ciechanover A & Ben-Neriah Y. (1997). Inhibition of NF-kappa-B cellular function via specific targeting of the I-kappa-B-ubiquitin ligase. *The EMBO journal* **16**, 6486-6494.
- Yasaka N, Suzuki K, Kishioka Y, Wakamatsu J & Nishimura T. (2013). Laminin binds to myostatin and attenuates its signaling. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* **84**, 663-668.
- Yasumoto K, Mukaida N, Harada A, Kuno K, Akiyama M, Nakashima E, Fujioka N, Mai M, Kasahara T, Fujimoto-Ouchi K & et al. (1995). Molecular analysis of the cytokine network involved in cachexia in colon 26 adenocarcinoma-bearing mice. *Cancer Res* **55**, 921-927.
- Yoshida H, Ishiko O, Sumi T, Honda KI, Hirai K & Ogita S. (2001). Expression of apoptosis regulatory proteins in the skeletal muscle of tumor-bearing rabbits. *Japanese journal of cancer research : Gann* **92**, 631-637.
- Yoshizawa F. (2004). Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 417-422.
- Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M & Cagle PT. (1997). Overexpression of Glut1 and Glut3 in stage I nonsmall cell lung carcinoma is associated with poor survival. *Cancer* **80**, 1046-1051.
- Young VR. (1977). Energy metabolism and requirements in the cancer patient. *Cancer Res* **37**, 2336-2347.
- Zaki MH, Nemeth JA & Trikha M. (2004). CNTO 328, a monoclonal antibody to IL-6, inhibits human tumor-induced cachexia in nude mice. *Int J Cancer* **111**, 592-595.

- Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A & Madeo F. (2012). FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell metabolism* **15**, 279-291.
- Zeman RJ, Kameyama T, Matsumoto K, Bernstein P & Etlinger JD. (1985). Regulation of protein degradation in muscle by calcium. Evidence for enhanced nonlysosomal proteolysis associated with elevated cytosolic calcium. *J Biol Chem* **260**, 13619-13624.
- Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, Song Y, Min H, Wang X, Du J & Mitch WE. (2011). Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 1653-1663.
- Zhang L, Tang H, Kou Y, Li R, Zheng Y, Wang Q, Zhou X & Jin L. (2013). MG132-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway ameliorates cancer cachexia. *Journal of cancer research and clinical oncology* **139**, 1105-1115.
- Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA & Pan D. (2003). Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nature cell biology* **5**, 578-581.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, Lecker SH & Goldberg AL. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell metabolism* **6**, 472-483.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL & Han HQ. (2010). Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* **142**, 531-543.
- Zhu X, Topouzis S, Liang LF & Stotish RL. (2004). Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine* **26**, 262-272.
- Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G & Zechner R. (2009). Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 494-500.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A & Zechner R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386.
- Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM & Lee SJ. (2002). Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* **296**, 1486-1488.
- Zuijdgheest-van Leeuwen SD, van den Berg JW, Wattimena JL, van der Gaast A, Swart GR, Wilson JH & Dagnelie PC. (2000). Lipolysis and lipid oxidation in weight-losing cancer patients and healthy subjects. *Metabolism: clinical and experimental* **49**, 931-936.

Annexes

Articles parus dans des revues internationales à comité de lecture

Sirtuin 1 regulates SREBP-1c expression in a LXR-dependent manner in skeletal muscle.

Aurélia Defour, Kevin Dessalle, Andréa Castro Perez, Thomas Poyot, Josiane Castells, **Yann Simon Gallot**, Christine Durand, Vanessa Euthine, Yansong Gu, Daniel Béchet, André Peinnequin, Etienne Lefai and Damien Freyssenet

Publié dans PLoS One. 2012;7(9):e43490.

Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle

Olivier Roger Joassard, Adel Amirouche, **Yann Simon Gallot**, Marine Maud Desgeorges, Josiane Castells, Anne-Cécile Durieux, Phanélie Berthon and Damien Gilles Freyssenet

Publié dans Int J Biochem Cell Biol. 2013 Aug 2;45(11):2444-2455.

Sirtuin 1 Regulates SREBP-1c Expression in a LXR-Dependent Manner in Skeletal Muscle

Aurélia Defour¹, Kevin Dessalle², Andréa Castro Perez¹, Thomas Poyot³, Josiane Castells¹, Yann Simon Gallot¹, Christine Durand², Vanessa Euthine², Yansong Gu⁴, Daniel Béchet⁵, André Peinnequin³, Etienne Lefai², Damien Freyssenet^{1*}

1 Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon, Saint Etienne, France, **2** Laboratoire CarMeN, INSERM U1060, INRA 1235, Université de Lyon, Oullins, France, **3** Pôle de Génétique, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Centre de Recherche du Service de Santé des Armées, La Tronche, France, **4** Obenomics, Inc., Bellevue, Washington, United States of America, **5** INRA UMR 1019, Unité Nutrition Humaine, St Genès Champanelle, France

Abstract

Sirtuin 1 (SIRT1), a NAD⁺-dependent protein deacetylase, has emerged as a main determinant of whole body homeostasis in mammals by regulating a large spectrum of transcriptional regulators in metabolically relevant tissue such as liver, adipose tissue and skeletal muscle. Sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c is a transcription factor that controls the expression of genes related to fatty acid and triglyceride synthesis in tissues with high lipid synthesis rates such as adipose tissue and liver. Previous studies indicate that SIRT1 can regulate the expression and function of SREBP-1c in liver. In the present study, we determined whether SIRT1 regulates SREBP-1c expression in skeletal muscle. SREBP-1c mRNA and protein levels were decreased in the *gastrocnemius* muscle of mice harboring deletion of the catalytic domain of SIRT1 (SIRT1^{Δex4/Δex4} mice). By contrast, adenoviral expression of SIRT1 in human myotubes increased SREBP-1c mRNA and protein levels. Importantly, SREBP-1c promoter transactivation, which was significantly increased in response to SIRT1 overexpression by gene electrotransfer in skeletal muscle, was completely abolished when liver X receptor (LXR) response elements were deleted. Finally, our *in vivo* data from SIRT1^{Δex4/Δex4} mice and *in vitro* data from human myotubes overexpressing SIRT1 show that SIRT1 regulates LXR acetylation in skeletal muscle cells. This suggests a possible mechanism by which the regulation of SREBP-1c gene expression by SIRT1 may require the deacetylation of LXR transcription factors.

Citation: Defour A, Dessalle K, Castro Perez A, Poyot T, Castells J, et al. (2012) Sirtuin 1 Regulates SREBP-1c Expression in a LXR-Dependent Manner in Skeletal Muscle. PLoS ONE 7(9): e43490. doi:10.1371/journal.pone.0043490

Editor: Valdur Saks, Université Joseph Fourier, France

Received: April 22, 2012; **Accepted:** July 23, 2012; **Published:** September 11, 2012

Copyright: © 2012 Defour et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: AD was financially supported by a grant from the Caisse d'Épargne Rhône-Alpes. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: One author (YG) is employed by a commercial company (Obenomics). This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr

Introduction

Protein acetylation is a tightly controlled process reciprocally regulated by histone acetyltransferases and histone deacetylases. The class III histone deacetylases also known as sirtuins (SIRT) consists of seven members (SIRT1-7) [1,2]. This is a highly conserved gene family encoding nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-dependent protein deacetylases and mono-ADP-ribosyl transferases [2]. SIRT1 is a member of the sirtuin family that deacetylates a variety of substrates and thus contributes to multiple cellular functions including stress responses, aging and cellular metabolism [3,4]. The identification of a number of SIRT1 substrates in the last decade has clearly identified SIRT1 as a main determinant of whole-body metabolic homeostasis in several metabolically relevant tissues such as liver, adipose tissue and skeletal muscle [4–6]. SIRT1 deacetylates and regulates a large spectrum of transcriptional regulators, including p53 [7,8], peroxisome-proliferated activated receptor γ coactivator (PGC)-1 α [9,10], forkhead-O-box transcription factors (FOXOs) [11,12], liver X receptor (LXR) [13], and sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c [14–16].

SREBP proteins belong to the basic helix-loop-helix leucine zipper family of DNA binding transcription factors. SREBP-1a and -1c are produced from the same gene by alternative promoter usage, whereas a separate gene encodes SREBP-2 [17]. SREBP-1a and -1c control the expression of genes related to lipid metabolism, especially those involved in fatty acid and triglyceride synthesis, and SREBP-2 is related to the regulation of cholesterol synthesis [17]. Accordingly, SREBP transcription factors are markedly expressed in adipose tissue and liver, tissues with high rates of lipid synthesis [17]. However, SREBP-1a and -1c are also expressed to a significant level in skeletal muscle [18,19], and more than 1,000 genes are regulated in response to SREBP-1a and SREBP-1c overexpression in primary human myotubes [20], suggesting additional functions of these transcription factors in skeletal muscle. Recent *in vivo* studies have suggested a crucial role for SIRT1 in regulating SREBP-1c expression and activity in liver. *In vivo*, SIRT1 activation decreased expression of SREBP-1c and SREBP-1c target genes [14]. Conversely, SIRT1 knockdown in liver induced the expression of SREBP-1c and its target genes encoding lipid-synthesizing enzymes [15]. Furthermore, SREBP-1c deacetylation by SIRT1 on Lys-289 and Lys-309 inhibits SREBP-1c activity by decreasing its stability and its association

with lipogenic target genes [16], rendering SREBP-1c prone to ubiquitin-mediated degradation [21].

SREBP-1c expression is transcriptionally regulated by the nuclear receptors, liver X receptor (LXR) α and β , a family of transcription factors involved in the control of glucose, lipid and cholesterol metabolism [22]. LXRs can directly promote SREBP-1c transcription through two LXR response elements in the mouse SREBP-1c promoter [23]. Furthermore, synthetic LXR agonists up-regulate SREBP-1c gene expression both *in vivo* in rodents [24], and *in vitro* in cell models including human muscle cells [18,25]. Interestingly, it has been reported that SIRT1 also deacetylates and activates the nuclear receptor LXR. In HEK293T cells, deacetylation at a single lysine residue of both LXR- α and LXR- β induces LXR activation, whereas SIRT1 deficiency in mice results in a decreased expression of LXR target genes in liver [13].

The above studies clearly show that SIRT1 can control SREBP-1c gene expression, at least in the liver, through a mechanism that may involve LXR transcription factors. However, it is currently unknown whether SIRT1 regulates SREBP-1c gene expression in skeletal muscle, a tissue with a low rate of lipid synthesis. We therefore addressed the question of whether SIRT1 regulates SREBP-1c gene expression in skeletal muscle by using a combination of animal studies, as well as molecular and cellular studies.

Results

SIRT1 regulates SREBP-1c expression in skeletal muscle cells

We first determined whether SIRT1 could control SREBP-1c expression in skeletal muscle. Both mRNA level and protein level of SREBP-1c were decreased in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1 ^{Δ ex4/ Δ ex4} mice compared to SIRT1^{+/+} mice (Fig. 1A–B). Furthermore, adenoviral expression of SIRT1 in human myotubes significantly increased SREBP-1c mRNA and protein level (Fig. 1C–D). Taken together, these data indicate that SIRT1 can regulate SREBP-1c expression in skeletal muscle cells. Because LXR- α and LXR- β transcription factors are powerful inducers of SREBP-1c gene expression in skeletal muscle [18], we determined whether the reported decrease in SREBP-1c gene expression in SIRT1 ^{Δ ex4/ Δ ex4} mice was associated by a concomitant decrease in LXR- α and LXR- β expression. Although the mRNA level of LXR- β was significantly decreased in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1 ^{Δ ex4/ Δ ex4} mice, LXR- α mRNA level, LXR- α protein level and LXR- β protein level remained unchanged in response to SIRT1 gene invalidation (Fig. 2 A–B). In agreement with these results, LXR- α and LXR- β mRNA level remained unchanged in response to adenoviral expression of SIRT1 in human myotubes (Fig. 2C). Therefore, SIRT1 does not appear to be a major regulator of LXR expression in skeletal muscle cells.

SIRT1 regulates LXR- α and LXR- β acetylation in skeletal muscle cells

SIRT1 has been shown to deacetylate and increase LXR transcriptional activity in HEK293T cells [13]. We therefore reasoned that SIRT1 could control SREBP-1c gene expression by regulating LXR acetylation in skeletal muscle. We therefore determined the acetylation profile of the *gastrocnemius* muscle of SIRT1^{+/+} and SIRT1 ^{Δ ex4/ Δ ex4} mice. An hyperacetylated band at 50 kDa, which corresponds to the molecular weight of LXR isoforms, was particularly pronounced (Fig. 3A). We thus immunoprecipitated either LXR- α or LXR- β , and probed the resulting immunoprecipitate with an acetyl-lysine antibody. While the amount of LXR- α and LXR- β in the immunoprecipitates was

fairly constant, acetylation of both LXR- α and LXR- β was significantly increased in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1 ^{Δ ex4/ Δ ex4} mice (Fig. 3B–C). Furthermore, adenoviral expression of SIRT1 significantly decreased LXR- β acetylation in human myotubes (Fig. 3D). LXR- α was modestly acetylated in control myotubes, and LXR- α acetylation was further decreased and below the detection limit in human myotubes overexpressing SIRT1 (data not shown). Altogether, these data show that SIRT1 regulates LXR- α and LXR- β acetylation level in skeletal muscle cells.

SIRT1 overexpression regulates SREBP-1c promoter transactivation in a LXR-dependent manner *in vivo*

To determine whether SIRT1 regulates SREBP-1c gene expression in a LXR-dependent manner, we next performed a gene electrotransfer experiment with SREBP-1c reporter gene constructs exhibiting or not mutations of two LXR-response elements [18] (Fig. 4A). We first checked that *in vivo* electrotransfer of a SIRT1 expression vector significantly increased SIRT1 protein content (Fig. 4B). As expected [18], the two SREBP-1c promoter constructs distinctly responded to LXR- α overexpression (Fig. 4C), indicating that the two LXR-binding sites are functional in our experimental setting and play an important role in the basal activity of the SREBP-1c promoter. As shown in Fig. 4D, SIRT1 overexpression significantly increased the transactivation of SREBP-1c promoter by about 2-fold, whereas SIRT1-induced transactivation of the SREBP-1c promoter was dramatically reduced when LXR motifs were mutated. These data demonstrate that the two LXR-response elements present in SREBP-1c promoter are involved in the stimulatory effect of SIRT1 on SREBP-1c promoter transactivation in mouse skeletal muscle.

Discussion

Stable expression of the transcription factor SREBP-1c is essential for the regulation of lipid anabolism in tissues with high lipid synthesis rates such as liver and adipose tissue [17]. However, recent data indicate that SREBP-1c may also play important transcriptional regulatory functions in skeletal muscle [20,26]. Here, we demonstrate that SIRT1 can regulate SREBP-1c expression in a LXR-dependent manner, that may involve LXR deacetylation. Taken together, these data provide novel insights into the regulatory mechanisms modulating SREBP-1c expression in skeletal muscle.

We showed that knocking out the catalytic domain of SIRT1 decreased SREBP-1c mRNA and protein levels, whereas adenoviral expression of SIRT1 increased SREBP-1c protein level. Furthermore, SREBP-1c promoter transactivation was significantly increased in response to SIRT1 overexpression by *in vivo* gene electrotransfer in skeletal muscle. Altogether, these data indicate that SIRT1 regulates SREBP-1c gene expression in skeletal muscle. Interestingly, recent data also indicate that SIRT1 mRNA and protein levels are increased in response to SREBP-1c adenoviral expression in human myotubes [20]. Together with our observations, this suggests the existence of a positive regulatory feedback loop: SIRT1 increases SREBP-1c expression, which then increases SIRT1 expression, thus ultimately further increasing SREBP-1c expression.

Previous studies indicate that LXR are powerful stimulators of SREBP-1c transcription both in liver [24] and skeletal muscle [18]. Here, our *in vivo* gene electrotransfer experiment showed that the transactivation of SREBP-1c promoter by SIRT1 was completely abolished when two functional LXR response elements were deleted in the SREBP-1c promoter. This indicates that SIRT1 regulates SREBP-1c gene expression in a LXR-dependent

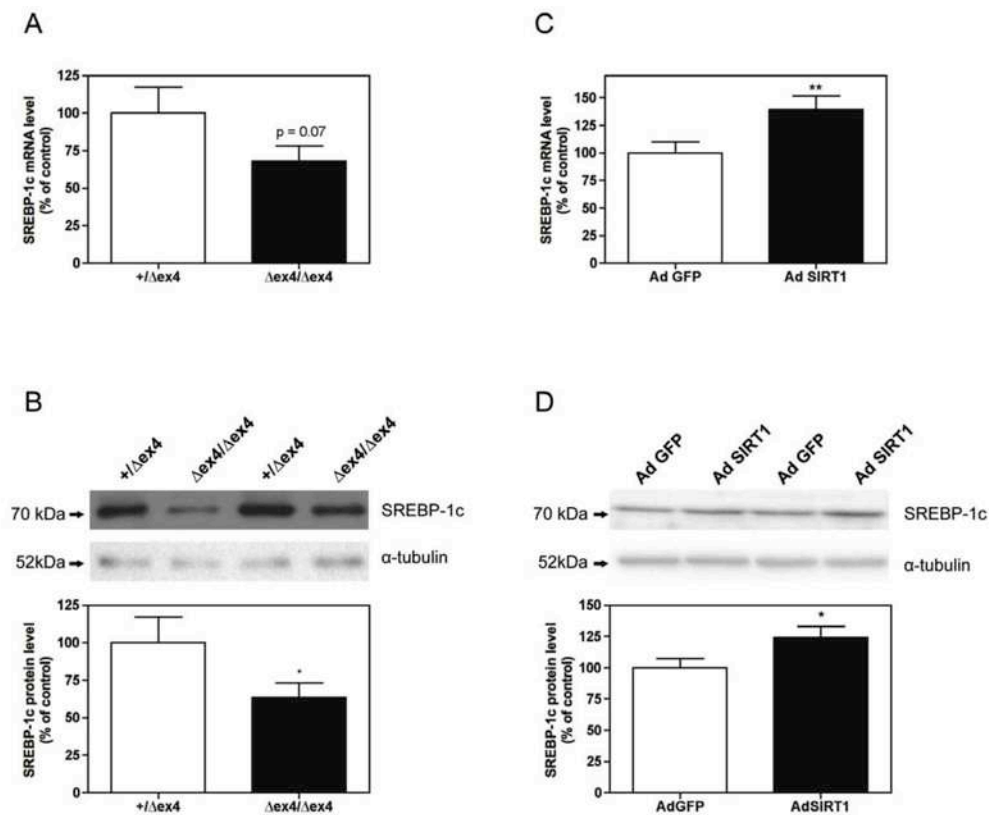


Figure 1. Sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c expression. (A) SREBP-1c mRNA level in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1^{+/Δex4} and SIRT1^{Δex4/Δex4} mice. (B) SREBP-1c protein level in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1^{+/Δex4} and SIRT1^{Δex4/Δex4} mice. (C) SREBP-1c mRNA level in human myotubes (7 days of differentiation) infected for 48 hours with recombinant adenovirus expressing either green fluorescent protein (AdGFP) or sirtuin 1 (AdSIRT1). (D) SREBP-1c protein level in human myotubes (7 days of differentiation) infected for 48 hours with AdGFP or AdSIRT1. For western blot analyses, equal protein loading was controlled by measuring total protein content and α -tubulin expression by western blot. Data are expressed as means \pm SE (n = 4/group for animal study; n = 5/group for *in vitro* study). ** P < 0.01 and * P < 0.05: significantly different from the corresponding control condition.
doi:10.1371/journal.pone.0043490.g001

manner. Although the way by which SIRT1 regulates LXR transcriptional activity has not been directly explored in this study, this may involve a decrease in LXR acetylation. In support of this hypothesis, we show that LXR- α and LXR- β acetylation was significantly increased in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1^{Δex4/Δex4} mice, and that adenoviral expression of SIRT1 decreased LXR- β acetylation in human myotubes. Furthermore, a previous report by Li *et al.* [13] showed that loss of SIRT1 reduced the expression of a variety of LXR target genes *in vivo*. They also showed that LXR- α and LXR- β are acetylated at Lys⁴³² and Lys⁴³³ in HEK293T cells, and that SIRT1 promoted LXR deacetylation and subsequent ubiquitination and degradation [13]. Degradation of LXR paradoxically increases the recruitment of new LXR molecules at transcriptional active sites of target genes, ultimately leading to an increase in transcriptional activity [13]. Whether such a mechanism is functional in skeletal muscle remains to be determined.

Our data contrast with the negative regulatory role of SIRT1 on SREBP-1c expression and activity previously described in liver [14–16]. It has thus been reported that SIRT1 activation

decreased SREBP-1c expression in the liver of genetically obese mice fed with a high-fat diet [14], and that knocking down SIRT1 induced SREBP-1c expression in the liver of fasted mice [15]. Importantly, these effects were all observed in response to metabolic challenges, and contrasts with the observation that SREBP-1c expression is increased in the liver of transgenic mice overexpressing SIRT1 in normal nutritional conditions [27]. Taken together, these data suggest that SIRT1 may have either negative or positive effects on SREBP-1c expression depending on metabolic context, tissue type and even promoter context.

One important question concerns the transcriptional targets of SREBP-1c regulated by SIRT1 in skeletal muscle. More than 500 genes have been shown to be either up- or down-regulated in response to SREBP-1c overexpression in human myotubes [20]. SIRT1 may thus exert multiple transcriptional regulatory functions in skeletal muscle via the control of SREBP-1c gene expression. As expected, SREBP-1c has been described to regulate the expression of genes involved in the control of lipid synthesis in skeletal muscle [19,20,28]. These data are in agreement with the reported increase in intramyocellular lipid content in skeletal

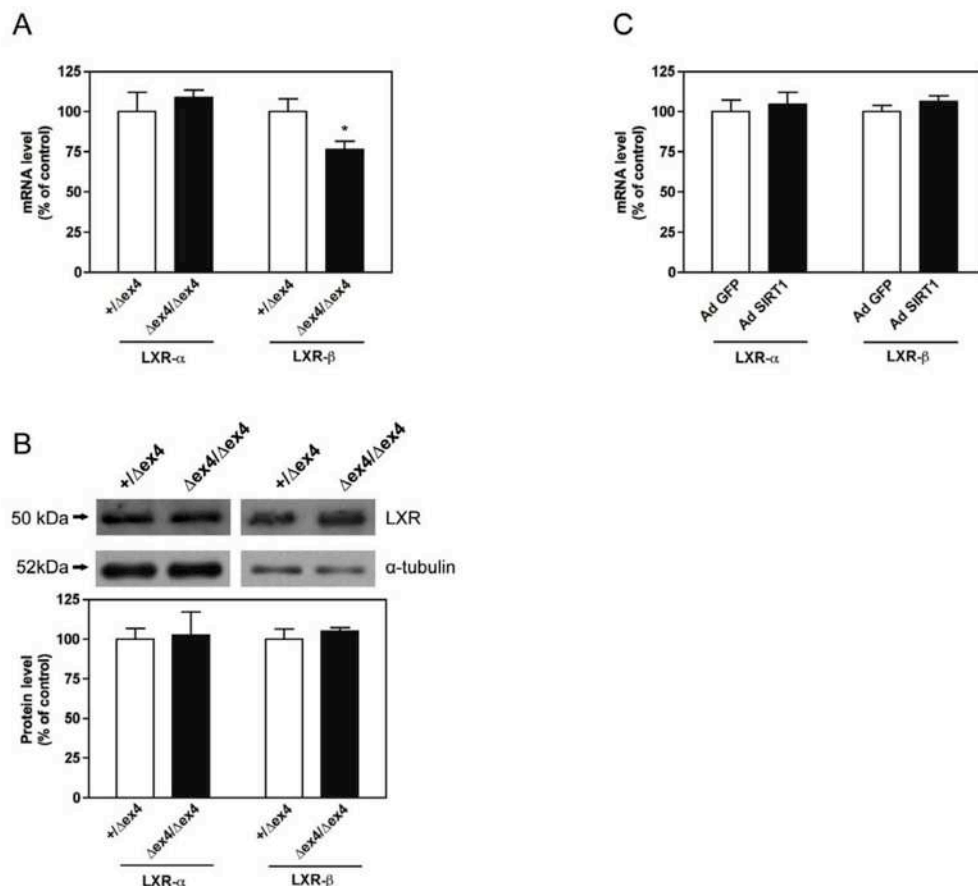


Figure 2. Liver X receptor (LXR)-α and LXR-β expression. (A) LXR-α and LXR-β mRNA level in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1^{+/Δex4} and SIRT1^{Δex4/Δex4} mice. (B) LXR-α and LXR-β protein level in the *gastrocnemius* muscle of SIRT1^{+/Δex4} and SIRT1^{Δex4/Δex4} mice. (C) LXR-α and LXR-β mRNA level in human myotubes (7 days of differentiation) infected for 48 hours with recombinant adenovirus expressing either green fluorescent protein (AdGFP) or sirtuin 1 (AdSIRT1). For western blot analysis, equal protein loading was controlled by measuring total protein content and α-tubulin expression by western blot. Data are expressed as means ± SE (n = 4/group for animal study; n = 8/group for *in vitro* study). * P < 0.05; significantly different from SIRT1^{+/Δex4} mice. doi:10.1371/journal.pone.0043490.g002

muscle induced by resveratrol [29], a natural polyphenolic compound that indirectly activates SIRT1 through the activation of AMPK [30–32]. SREBP-1c has also been shown to regulate the expression of genes involved in the efflux of intracellular cholesterol to extracellular acceptors in C2C12 myotubes [28]. However, and although the action of SIRT1 on cholesterol metabolism has been well described in liver [13,15,33,34], no effect of SIRT1 on cholesterol metabolism has been reported in skeletal muscle. Finally, SREBP-1c is also involved in the control of glucose metabolism in skeletal muscle. Previous studies thus indicate that one important transcriptional target of SREBP-1c in skeletal muscle is hexokinase II gene [19,35,36]. Furthermore, the expression of SIRT1 and hexokinase II both decreased in skeletal muscle of type II diabetic patients [37,38]. One may therefore suggest that a defect in a SIRT1/LXR/SREBP-1c axis may contribute to alter the expression of hexokinase II. In agreement with this hypothesis, we observed that hexokinase II mRNA level and activity were both significantly decreased in the *gastrocnemius*

muscle of SIRT1^{Δex4/Δex4} mice (Figure S1). However, further studies are necessary to evaluate the functional relevance of this observation in skeletal muscle.

In summary, we show that SIRT1 participates to the regulation of SREBP-1c expression in a LXR-dependent manner. We propose that this mechanism may involve the regulation of LXR acetylation.

Materials and Methods

Animals

Homozygous mice lacking exon 4 of the SIRT1 gene (SIRT1^{Δex4/Δex4} mice; 16.43 ± 1.80 months; n = 4) and heterozygous mice lacking exon 4 of the SIRT1 gene (SIRT1^{+/Δex4} mice; 14.80 ± 2.00 months; n = 4) were used [39]. Exon 4 encodes 51 amino acids of the conserved SIRT1 catalytic domain [39]. SIRT1^{Δex4/Δex4} mice thus expressed a SIRT1 mutant inactive protein, and are phenotypically identical to SIRT1 null mice [39].

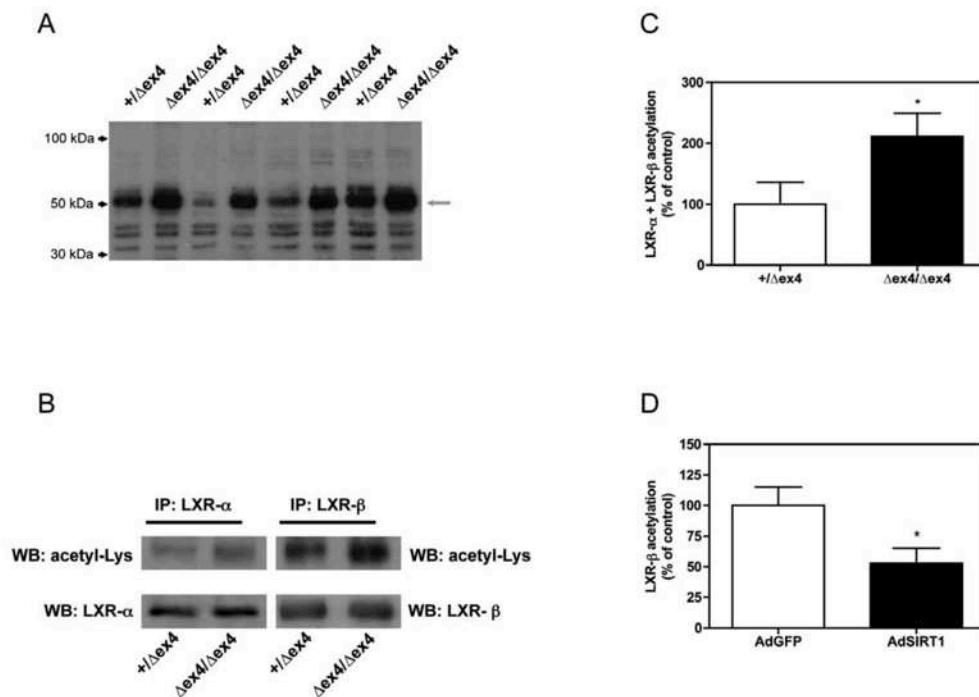


Figure 3. Sirtuin 1 (SIRT1) regulates liver X receptor (LXR)- α and LXR- β acetylation. (A) Immunoblot representing the acetylation profile of *gastrocnemius* muscle lysates of SIRT1^{+/Δex4} and SIRT1^{Δex4/Δex4} mice. Expected LXR band is indicated by a grey arrow. (B) Immunoblots showing LXR- α immunoprecipitates probed either with an acetyl-Lysine antibody (upper left) or a LXR- α antibody (lower left) and LXR- β immunoprecipitates probed either with an acetyl-Lysine antibody (upper right) or a LXR- β antibody (lower right). (C) Acetylation level of LXR- α and LXR- β normalized to the amount of LXR- α and LXR- β in the immunoprecipitate. (D) Acetylation level of LXR- β in human myotubes (7 days of differentiation) infected for 48 hours with recombinant adenovirus expressing either green fluorescent protein (AdGFP) or SIRT1 (AdSIRT1). Proteins were immunoprecipitated with a LXR- β antibody and then probed with an acetyl-Lysine antibody. Data were normalized to the amount of LXR- β in the immunoprecipitate. Data are expressed as means \pm SE (n=4/group for animal study; n=8/group for *in vitro* study). * $P < 0.05$; significantly different from the corresponding control condition.
doi:10.1371/journal.pone.0043490.g003

SIRT1 heterozygous mice are phenotypically normal [39,40] and were therefore used as controls. Morphological characteristics of SIRT1^{Δex4/Δex4} and SIRT1^{+/Δex4} mice are reported in Table S1. Mice were housed in a special pathogen-free facility. All procedures were approved by the University of Washington Animal Care and Use Committee.

Eight week-old male OF1 mice (32.9 \pm 1.2 g; n=24) were used for gene electrotransfer experiments. The mice were maintained under a constant 12:12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. All procedures were approved by Jean Monnet University Animal Care and Use Committee.

Primary cell culture

Human muscle biopsies (~200 mg wet weight) were taken under local anesthesia from the *vastus lateralis* muscle [25]. The experimental protocol was approved by the Ethical Committees of the Hospices Civils de Lyon and performed according to the French legislation. Written consent in accordance with the policy statement regarding the use of human subjects was obtained from all the subjects. Myoblasts were cultured in Ham's F10 supplemented with 2% Ultrosor (BioSepra, Cergy-Saint-Christophe, France), 2% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S) in 37°C and 5% CO₂ in air. Human myoblasts

were differentiated in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2% FBS. Recombinant adenoviral genome carrying the human SIRT1 gene was generated by homologous recombination [38]. Five days differentiated human myotubes were infected for 2 days with adenovirus encoding SIRT1. Control myoblasts were infected with an adenovirus encoding the green fluorescent protein (GFP).

Total RNA isolation and qRT-PCR

Gastrocnemius muscle samples were homogenized with a Mixer Mill MM300 (Retsch) in 300 μ L Trizol (Invitrogen). Total RNA extraction was carried out on the Qjacube automate (Rneasy protocol). Total RNA from human myotubes was isolated by using the Trizol reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen). RT was immediately performed using the Reverse Transcription Core Kit (Eurogentec). The selected forward (FW) and reverse (RW) primer sequences are listed in Table S2. Real time PCR assay was performed in a 20 μ L final volume and optimized concentration for each primer using a LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science) and a LightCycler (Roche Applied Science). Relative quantification of samples was performed using the comparative threshold method

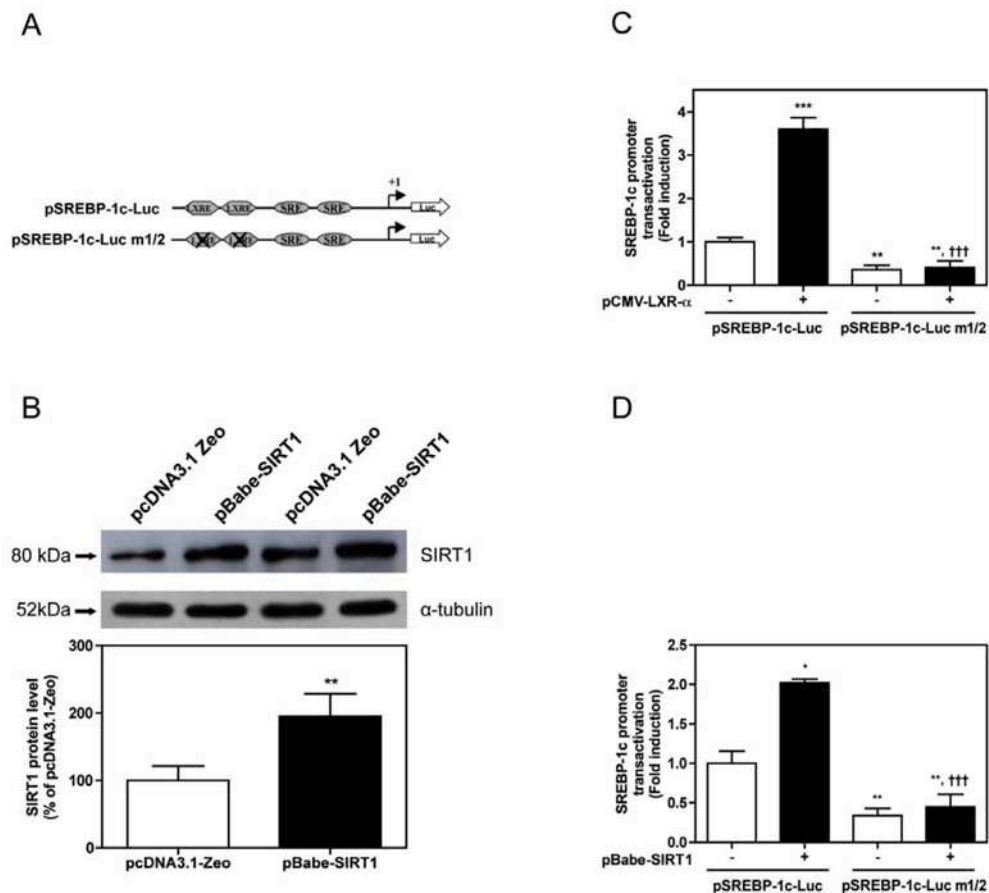


Figure 4. Sirtuin 1 (SIRT1) regulates sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1c promoter transactivation. (A) Human SREBP-1c promoter (-571/+90 bp) reporter construct (pSREBP-1c-Luc) and human SREBP-1c promoter reporter construct with two deleted mutations in LXR-response elements located at -311/-296 bp and -260/-245 bp (pSREBP-1c-Luc m1/2) [18]. (B) SIRT1 protein level in mouse *tibialis anterior* muscle 7 days after electrotransfer of a control vector (pcDNA3.1-Zeo) or a SIRT1 expression vector (pBabe-SIRT1). Equal protein loading was controlled by measuring total protein content and α -tubulin expression by western blot. Data are means \pm SE (n=8/group). ** $P < 0.01$; significantly different from pcDNA3.1-Zeo. (C) pSREBP-1c-Luc and pSREBP-1c-Luc m1/2 transactivation in absence and presence of a LXR- α expression vector (pCMV-LXR- α). *Tibialis anterior* muscles were removed 7 days after gene electrotransfer. Luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity to correct for variations in transfection efficiency. Data are means \pm SE (n=8/group). ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$; significantly different from pSREBP-1c-Luc alone. ††† $P < 0.001$; significantly different from pSREBP-1c-Luc with pCMV-LXR- α . (D) pSREBP-1c-Luc and pSREBP-1c-Luc m1/2 transactivation in absence and presence of pBabe-SIRT1. *Tibialis anterior* muscles were removed 7 days after gene electrotransfer. Luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity to correct for variations in transfection efficiency. Data are means \pm SE (n=8/group). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$; significantly different from pSREBP-1c-Luc alone. ††† $P < 0.001$; significantly different from pSREBP-1c-Luc with pBabeSIRT1. doi:10.1371/journal.pone.0043490.g004

[41], corrected for amplification efficiency variability between genes [42], and improved for use of multiple reference genes [43].

Immunoblot analysis. Muscle samples were homogenized (1:20 dilution, wt/vol) at 4°C [50 mM Tris-HCl (pH=7.4), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM β -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1 mM Na_3VO_4 , 120 nM okadaic acid, 1% Triton X-100]. Homogenates were centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4°C. Human myotube lysates were prepared as previously described [18]. Protein concentration was spectrophotometrically measured at 750 nm using the Bio-Rad DC protein assay. Depending on the antibody used, either 20 or 50 μ g of proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred to

nitrocellulose membranes. The blots were incubated overnight at 4°C with antibodies against LXR- α (1:400, sc-1202, Santa Cruz Biotechnology), LXR- β (1:400, sc-1001, Santa Cruz Biotechnology), SIRT1 (1:1,000, Upstate 05707) and nuclear SREBP-1c (1:40, Santa Cruz Biotechnology sc-8984). Corresponding horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse (1:3,000, Dako) and goat anti-rabbit (1:3,000, Dako) antibodies were used for chemiluminescent protein detection (ECL, GE Health Care). Equal protein loading was controlled by measuring α -tubulin content by western blot. Membranes were stripped (Re-Blot Plus Strong Solution, Millipore), checked for the absence of immunoreactivity, incubated with α -tubulin (1:500, Sigma T5168), and

then processed as described above. The films were scanned and quantified using ImageJ analysis.

Immunoprecipitation

Protein extracts (200 µg) from *gastrocnemius* skeletal muscle or human myotubes were incubated for one hour at 4°C with 2 µg of LXR antibodies (LXR-α sc-1202, LXR-β sc-1001, Santa Cruz Biotechnology) in 1 ml of RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH = 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1% NP40]. Protein magnetic B sepharose beads (Millipore) were then added and incubated at 4°C for an additional 15 minutes. The beads were washed 3 times with RIPA buffer and finally suspended in Laemmli's sample buffer. Proteins were resolved on 10% SDS-PAGE gel and immunoblotted using an acetyl-lysine antibody (1:500, Ac-K-103, #9681, Cell Signaling). The membranes were stripped (Re-Blot Plus Strong Solution, Millipore), checked for the absence of immunoreactivity, and then reprobed with the corresponding LXR antibody.

Plasmids

pBabe-SIRT1, the full-length murine SIRT1 cDNA in a pBabepuro expression vector, was a gift from Dr. J Luo (Columbia University, New York, USA) [7]. pCMV-LXR-α (Source BioScience/Geneservice, Cambridge, UK) is the full length murine LXR-α cDNA in a pCMV-Sport vector. Human SREBP-1c promoter (-571/+90 bp) reporter gene (pSREBP-1c-Luc) and human SREBP-1c promoter (-571/+90 bp) reporter gene with two deleted mutations in LXR-response elements located at -311/-296 bp and -260/-245 bp (pSREBP-1c-Luc m1/2) were previously described [18] (Fig. 4A). pCMV-β-galactosidase was obtained from Clontech. pcDNA3.1-Zeo (Clontech) is a null empty vector used to maintain constant the amount of DNA injected.

In vivo gene electrotransfer

Mice were anesthetized (*i.p.* injection of 90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine) and *tibialis anterior* muscles were injected with 125 µl of DNA mixtures in 0.9% NaCl endotoxin-free containing: *i*) 30 µg of pSREBP-1c-Luc, 30 µg of pCMV-β-galactosidase, and 20 µg of pcDNA3.1-Zeo (n = 8), *ii*) 30 µg of pSREBP-1c-Luc, 30 µg of pCMV-β-galactosidase and 20 µg of pBabe-SIRT1 (n = 8), and *iii*) 30 µg of pSREBP-1c-Luc, 30 µg of pCMV-β-galactosidase and 20 µg of pCMV-LXR-α (n = 8). Corresponding contralateral muscles were injected with the same DNA mixture except that pSREBP-1c-Luc was omitted and replaced by 30 µg of pSREBP-1c-Luc m1/2. Thirty seconds after injection, 6 pulses (20 ms, 50 mA) were delivered using a GET42 electroporator as previously described [44–46].

References

1. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16: 4623–4635.
2. Michan S, Sinclair D (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404: 1–13.
3. Brooks CL, Gu W (2009) How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer* 9: 123–128.
4. Yu J, Auwerx J (2010) Protein deacetylation by SIRT1: an emerging key post-translational modification in metabolic regulation. *Pharmacol Res* 62: 35–41.
5. Yu J, Auwerx J (2009) The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* 1173 Suppl 1: E10–19.
6. Canto C, Auwerx J (2012) Targeting sirtuin 1 to improve metabolism: all you need is NAD+? *Pharmacol Rev* 64: 166–187.

Firefly luciferase and β-galactosidase assays

Seven days after gene electrotransfer, the animals were anesthetized and the *tibialis anterior* muscles were removed. Protein isolation and measurement of firefly luciferase activity were performed as described previously [45]. To correct for interindividual variations in transfection efficiency, luciferase activity was normalized to β-galactosidase activity [45].

Statistics

Data are means ± SE. Statistical comparisons between SIRT1^{Δex4/Δex4} and SIRT1^{+/Δex4} mice, as well as statistical comparisons between AdGFP and AdSIRT1 myotubes were performed using unpaired t-test. The effect of SIRT1 gene electrotransfer on SIRT1 protein level was determined by using a paired t-test. A two-way analysis of variance was used to determine the effects of LXR-α and SIRT1 expression on the transactivation of pSREBP-1c-Luc and pSREBP-1c-Luc m1/2 promoters. Fisher's post hoc test was then used to determine specific mean differences. All statistical analyses were performed using StatView (StatView™SE+Graphics, Abacus Concept, Inc). The 0.05 level of confidence was accepted as the threshold for statistical significance.

Supporting Information

Figure S1 Hexokinase (HK) activity in the *tibialis anterior* muscle of Sirt1^{+/Δex4} and Sirt1^{Δex4/Δex4} mice. HK activity was determined by fluorimetric analysis. Data are expressed as means ± SE (n = 4/group). ** P < 0.01; significantly different from SIRT1^{+/Δex4} mice. (TIF)

Table S1 Morphometric characteristics of Sirt1^{+/Δex4} and Sirt1^{Δex4/Δex4} mice. (DOCX)

Table S2 Primers sequences and annealing temperatures of genes used for qPCR analysis. (DOCX)

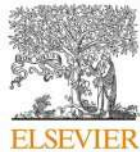
Acknowledgments

Philippe Courpron is acknowledged for his constant support. Li Hongzhe (University of Washington, Seattle, USA) is acknowledged for tissue collection. The authors also thank Hubert Vidal for his valuable advice (Laboratoire CarMeN, INSERM U1060, INRA 1235, Université de Lyon, Oullins, France).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AD EL DF. Performed the experiments: AD KD ACP TP JC YSG CD VE AP EL DF. Analyzed the data: AD AP EL DF. Contributed reagents/materials/analysis tools: YG DB AP EL DF. Wrote the paper: AD EL DF.

12. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, et al. (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116: 551–563.
13. Li X, Zhang S, Blander G, Tse JG, Krieger M, et al. (2007) SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol Cell* 28: 91–106.
14. Walker AK, Yang F, Jiang K, Ji JY, Watts JL, et al. (2010) Conserved role of SIRT1 orthologs in fasting-dependent inhibition of the lipid/cholesterol regulator SREBP. *Genes Dev* 24: 1403–1417.
15. Rodgers JT, Puigserver P (2007) Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12861–12866.
16. Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, Smith Z, Miao J, et al. (2010) SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem* 285: 33959–33970.
17. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F (2004) SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86: 839–848.
18. Dif N, Euthine V, Gonnet E, Laville M, Vidal H, et al. (2006) Insulin activates human sterol-regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) promoter through SRE motifs. *Biochem J* 400: 179–188.
19. Guillet-Deniau I, Mieulet V, Le Lay S, Achouri Y, Carre D, et al. (2002) Sterol regulatory element binding protein-1c expression and action in rat muscles: insulin-like effects on the control of glycolytic and lipogenic enzymes and UCP3 gene expression. *Diabetes* 51: 1722–1728.
20. Rome S, Lecomte V, Meugnier E, Rieusset J, Debard C, et al. (2008) Microarray analyses of SREBP-1a and SREBP-1c target genes identify new regulatory pathways in muscle. *Physiol Genomics* 34: 327–337.
21. Giandomenico V, Simonsson M, Gronroos E, Ericsson J (2003) Coactivator-dependent acetylation stabilizes members of the SREBP family of transcription factors. *Mol Cell Biol* 23: 2587–2599.
22. Calkin AC, Tontonoz P (2012) Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 213–224.
23. Yoshikawa T, Shimano H, Amemiya-Kudo M, Yahagi N, Hasty AH, et al. (2001) Identification of liver X receptor-retinoid X receptor as an activator of the sterol regulatory element-binding protein 1c gene promoter. *Mol Cell Biol* 21: 2991–3000.
24. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, et al. (2000) Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 14: 2819–2830.
25. Cozzone D, Debard C, Dif N, Ricard N, Diase E, et al. (2006) Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells. *Diabetologia* 49: 990–999.
26. Lecomte V, Meugnier E, Euthine V, Durand C, Freyssenet D, et al. (2010) A new role for sterol regulatory element binding protein 1 transcription factors in the regulation of muscle mass and muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol* 30: 1182–1198.
27. Qiang L, Lin HV, Kim-Muller JY, Welch CL, Gu W, et al. (2011) Proatherogenic abnormalities of lipid metabolism in SirT1 transgenic mice are mediated through Creb deacetylation. *Cell Metab* 14: 758–767.
28. Muscat GE, Wagner BL, Hou J, Tangirala RK, Bischoff ED, et al. (2002) Regulation of cholesterol homeostasis and lipid metabolism in skeletal muscle by liver X receptors. *J Biol Chem* 277: 40722–40728.
29. Timmers S, Koning E, Bilet L, Houtkooper RH, van de Weijer T, et al. (2011) Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. *Cell Metab* 14: 612–622.
30. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, et al. (2010) AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59: 554–563.
31. Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakis C, Coste A, et al. (2010) Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metab* 11: 213–219.
32. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, et al. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056–1060.
33. Erion DM, Yonemitsu S, Nie Y, Nagai Y, Gillum MP, et al. (2009) SirT1 knockdown in liver decreases basal hepatic glucose production and increases hepatic insulin responsiveness in diabetic rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 11288–11293.
34. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, et al. (2009) Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 9: 327–338.
35. Gosmain Y, Dif N, Berbe V, Loizon E, Rieusset J, et al. (2005) Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J Lipid Res* 46: 697–705.
36. Gosmain Y, Lefai E, Ryser S, Roques M, Vidal H (2004) Sterol regulatory element-binding protein-1 mediates the effect of insulin on hexokinase II gene expression in human muscle cells. *Diabetes* 53: 321–329.
37. Duchateau PH, Perretti N, Laville M, Andreelli F, Vega N, et al. (2001) Regulation by insulin of gene expression in human skeletal muscle and adipose tissue. Evidence for specific defects in type 2 diabetes. *Diabetes* 50: 1134–1142.
38. Frojdo S, Durand C, Molin L, Carey AL, El-Osta A, et al. (2011) Phosphoinositide 3-kinase as a novel functional target for the regulation of the insulin signaling pathway by SIRT1. *Mol Cell Endocrinol* 335: 166–176.
39. Cheng HL, Mostoslavsky R, Saito S, Manis JP, Gu Y, et al. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10794–10799.
40. Abdelmohsen K, Pullmann R, Lal A, Kim HH, Galban S, et al. (2007) Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell* 25: 543–557.
41. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods* 25: 402–408.
42. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
43. Hellemans J, Mortier G, De Paep A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* 8: R19.
44. Durieux AC, Bonnefoy R, Freyssenet D (2005) Kinetic of transgene expression after electrotransfer into skeletal muscle: Importance of promoter origin/strength. *Biochim Biophys Acta* 1725: 403–409.
45. Durieux AC, Bonnefoy R, Manissolle C, Freyssenet D (2002) High-efficiency gene electrotransfer into skeletal muscle: description and physiological applicability of a new pulse generator. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 443–450.
46. Durieux AC, Bonnefoy R, Busso T, Freyssenet D (2004) In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J Gene Med* 6: 809–816.



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biociel

Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle



Olivier Roger Joassard^a, Adel Amirouche^a, Yann Simon Gallot^a,
Marine Maud Desgeorges^a, Josiane Castells^a, Anne-Cécile Durieux^a,
Phanélie Berthon^b, Damien Gilles Freyssenet^{a,*}

^a Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France

^b Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Université de Savoie, F-73376 Le Bourget du Lac, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2013
Received in revised form 10 July 2013
Accepted 24 July 2013
Available online xxx

Keywords:

Akt-mTOR pathway
Autophagy
 β_2 -agonist
Hypertrophy
MAFbx/atrogen-1
Ubiquitin-proteasome

ABSTRACT

Administration of β_2 -agonists triggers skeletal muscle anabolism and hypertrophy. We investigated the time course of the molecular events responsible for rat skeletal muscle hypertrophy in response to 1, 3 and 10 days of formoterol administration (i.p. 2000 μ g/kg/day). A marked hypertrophy of rat *tibialis anterior* muscle culminated at day 10. Phosphorylation of Akt, ribosomal protein S6, 4E-BP1 and ERK1/2 was increased at day 3, but returned to control level at day 10. This could lead to a transient increase in protein translation and could explain previous studies that reported increase in protein synthesis following β_2 -agonist administration. Formoterol administration was also associated with a significant reduction in *MAFbx/atrogen-1* mRNA level (day 3), suggesting that formoterol can also affect protein degradation of *MAFbx/atrogen-1* targeted substrates, including MyoD and eukaryotic initiation factor-3f (eIF3-f). Surprisingly, mRNA level of autophagy-related genes, *light chain 3 beta (LC3b)* and *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1 (Gabarap1)*, as well as lysosomal hydrolases, *cathepsin B* and *cathepsin L*, was significantly and transiently increased after 1 and/or 3 days, suggesting that autophagosome formation would be increased in response to formoterol administration. However, this has to be relativized since the mRNA level of *Unc-51-like kinase 1 (Ulk1)*, *BCL2/adenovirus E1B interacting protein3 (Bnip3)*, and *transcription factor EB (TFEB)*, as well as the protein content of Ulk1, Atg13, Atg5-Atg12 complex and p62/Sqstm1 remained unchanged or was even decreased in response to formoterol administration. These results demonstrate that the effects of formoterol are mediated, in part, through the activation of Akt-mTOR pathway and that other signaling pathways become more important in the regulation of skeletal muscle mass with chronic administration of β_2 -agonists.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: Actb, actin beta; Atg, autophagy-related; Bnip3, BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3; BSA, bovine serum albumin; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CREB, cAMP response element binding protein; EDL, *extensor digitorum longus*; eIF3-f, eukaryotic initiation factor 3 subunit f; Epac, exchange protein activated directly by cAMP; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FoxO3, forkhead box O3; Gabarap1, gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein; GAS, *gastrocnemius*; G α i, α -subunit of the inhibitory G protein; G α q, α -subunit of the Gq protein; G α s, α -subunit of the stimulatory G protein; Hprt, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase; IGF-1, insulin growth factor-1; IRS-1, insulin receptor substrate-1; LC3b, light chain 3 beta; MEF2, myocyte enhancer factor 2; mTOR, mammalian target of rapamycin; MuRF1, muscle RING finger-1; p62/Sqstm1, sequestosome 1; PE, phosphatidylethanolamine; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PGC-1 α , peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) coactivator 1 α ; PKA, protein kinase A; Rap, ras-related protein; rpS6, ribosomal protein S6; SOL, *soleus*; TA, *tibialis anterior*; TBS, tris-buffered saline; TFEB, transcription factor EB; TSC2, tuberous sclerosis complex 2; 4E-BP1, eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1; Ulk1, unc-51-like kinase 1.

* Corresponding author at: Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Faculté de Médecine, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint Etienne Cedex 2, France.

Tel.: +33 4 77 42 14 77; fax: +33 4 77 42 14 78.

E-mail address: damien.freyssenet@univ-st-etienne.fr (D.G. Freyssenet).

1357-2725/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biociel.2013.07.019>

1. Introduction

β_2 -adrenoceptor-selective agonists (β_2 -agonists) are derived from the chemical structure of adrenaline. They are traditionally used for the treatment of bronchospasm associated with asthma and the treatment of symptomatic patient with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to induce a bronchodilatation by relaxing airway smooth muscle (Cazzola et al., 1997). However, when experimentally used in animals, chronic administration of β_2 -agonists is also known to trigger a gain in skeletal muscle mass. For instance, administration of formoterol (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$), clenbuterol (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) or fenoterol (2800 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) for 28 days increases skeletal muscle mass by about 20–30% (Gehrig et al., 2010; Koopman et al., 2010; Ryall et al., 2002). Even lower doses, such as 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of formoterol for 28 days (Ryall et al., 2006), as well as shorter duration treatment (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of formoterol for 7 days), also triggers skeletal muscle hypertrophy (Busquets et al., 2004). β_2 -agonist chronic administration can also attenuate skeletal muscle mass loss induced by different experimental settings including denervation (Zeman et al., 1987), hindlimb unloading (Yimlamai et al., 2005), and dexamethasone treatment (Agbenyega and Wareham, 1992), as well as in several muscle wasting conditions such as neuromuscular diseases and chronic diseases (see Joassard et al., 2013).

The hypertrophy and anti-atrophy effects of β_2 -agonists can be explained by their actions on the balance between protein synthesis and protein degradation. Previous studies indicate that chronic administration of β_2 -agonists not only increases muscle protein synthesis (Busquets et al., 2004; Emery et al., 1984; Koopman et al., 2010; MacLennan and Edwards, 1989; Navegantes et al., 2004), but also decreases muscle protein degradation (Busquets et al., 2004; Navegantes et al., 2000, 2001), thus leading to a net positive nitrogen balance. Activation of the Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway stimulates protein translation in skeletal muscle (Bodine et al., 2001b; Rommel et al., 2001) and inhibits protein degradation via the inhibition of both ubiquitin-proteasome (Bodine et al., 2001a; Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004) and autophagy-lysosome pathways (Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007). The activation of Akt-mTOR pathway and the subsequent inhibition of ubiquitin-proteasome pathway have been documented in response to β_2 -agonist administration (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010; Sneddon et al., 2001), but the kinetic of this response in relation to the regulation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways is currently unknown. This is of particular importance since prolonged β_2 -adrenoceptor stimulation can lead to receptor desensitization and decrease β_2 -adrenoceptor density (Beitzel et al., 2004; Rothwell et al., 1987; Ryall et al., 2002, 2004, 2006), thus leading to rapid dampening of receptor function and down-regulation of Akt-mTOR pathway. This also raises the question of the existence of other mechanisms that would be activated to sustain the hypertrophy. Finally, it is currently unknown whether β_2 -adrenoceptor stimulation regulates autophagy-lysosome pathway in skeletal muscle.

The aim of this study was therefore to provide a detailed analysis of the molecular events and signaling pathways involved in the hypertrophy triggered by 1, 3 and 10 days of β_2 -adrenoceptor stimulation by formoterol. Formoterol was used because unlike to the first generation of β_2 -agonists like clenbuterol, the addition of a long carbon chain containing a second benzene ring confers a rapid onset and long duration of action (van Noord et al., 1996). In this study, we also examined the hypothesis that activation of Akt-mTOR signaling pathway in response to formoterol administration is temporally associated with the regulation of both ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval of the procedure

Experiments were approved by Jean Monnet University Animal Care and Use Committee, and were carried out in accordance with the European Community guidelines for the use of laboratory animals.

2.2. Animals

Thirty-four male Wistar rats (224 ± 19 g) were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). The animals were maintained under a constant 12 h light-dark cycle with food and water *ad libitum*. Rats were allocated into a control group ($n = 10$) or a formoterol-treated group (3 groups, $n = 6-10/\text{group}$). Formoterol-treated animals received daily intraperitoneal (i.p.) injections of 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of formoterol (Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau, France) in 0.9% endotoxin free NaCl for 1, 3 and 10 days. Control rats were injected with the saline solution for 10 days. Body weight and food intake were measured daily.

2.3. Tissue removal

Tissue removal was realized 24 h after the last formoterol injection. At the indicated time points, animals were anesthetized (i.p. injection of 90 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine). *Tibialis anterior* (TA) muscle was carefully dissected and trimmed of tendons and any non-muscle tissue and weighed. Central portions of right TA muscle were mounted in embedding medium and frozen in thawing isopentane and stored at -80°C for subsequent analysis. The remaining right TA muscle and the entire left TA muscle were rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for later analyses. *Soleus*, *extensor digitorum longus* (EDL), and *gastrocnemius* muscles were carefully removed and weighed. Rats were sacrificed as a consequence of heart excision, while deeply anesthetized.

2.4. Histomorphometric analysis

TA muscle transverse sections (12 μm) of rats treated with 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of formoterol for 10 days were cut in a refrigerated (-20°C) cryostat (Microm HM 560, Thermo Fisher Scientific, Brebières, France), and stained with hemalun-eosin-safran. Eight to 11 photographs covering the entire muscle section were used to determine the whole muscle cross-sectional area. Five fields consistently positioned across muscle sections were chosen. The cross-sectional area of 1062 ± 309 fibers per muscle was determined. Digital images of stained sections were captured using an upright light microscope (Eclipse E400, Nikon, Badhoevedorp, The Netherlands) connected to a digital camera (Coolpix 990, Nikon). Images were quantified using ImageJ analysis software.

2.5. RNA isolation, cDNA synthesis and real-time PCR

Total RNA was extracted from 20–30 mg of TA muscle using the RNeasy Fibrous tissue mini kit (Qiagen, Courtabouef, France) following the manufacturer's instructions. cDNA was generated from 400 ng of RNA using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The selected forward and reverse primer sequences are listed in Table 1. Real time PCR was performed in a 20 μl final volume and optimized concentrations for each primer using the SsoFast EvaGreen Super mix (Bio-Rad) and a CFX96 Real Time PCR Detection System, C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Two reference genes, *actin beta* (*Actb*) and *hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (*Hprt*), were used to normalize the

Table 1
Oligonucleotide primers used for PCR analysis.

Gene	GeneBank accession no.	Primer sequences 5'–3'	Tm (°C)
<i>Actb</i> (<i>Actb</i>)	NM.031144.2	Fwd: GTCCACCCGCGAGTACAACCTT Rev: TTGCACATGCCGGAGCCGTT	56
<i>Bnip3</i> (<i>Bnip3</i>)	NM.053420.3	Fwd: AGATTGGATATGGGATTGGTCAAG Rev: CCCTTCTTCATAACGCTTGTG	60
<i>Cathepsin B</i>	NM.022597.2	Fwd: CCATCGCACAGATCAGAGAC Rev: CCACATTGACTCGGCCATTG	60
<i>Cathepsin L</i>	NM.013156.2	Fwd: CACAATGGGGAGTACAGCAAC Rev: TGTGCTTCTGGTGGGATAG	59
<i>Gabarapl1</i>	NM.172036.3	Fwd: AGGACCATCCGTTCCGAGAAG Rev: AGGTCCCTATCCGAGCTTGTG	59
<i>Gai1</i> (<i>Gnai1</i>)	NM.013145.1	Fwd: TCCTGGACCTGACCAGAGTTC Rev: AGGACCATCTTTCGCCCTTCTC	60
<i>Gaq</i> (<i>Gnaq</i>)	NM.031036.1	Fwd: TCCAGGAATGCTACGATAGACGGCG Rev: AAGGGTCAGCCACACGGTCCA	62
<i>Gas1</i> (<i>Gnas</i>)	NM.001024823.4	Fwd: TCAACGACTGCCGTGACATC Rev: CCTATGGTGGGTGATCAACTG	60
<i>Hprt1</i> (<i>Hprt1</i>)	NM.012583.2	Fwd: CCTCAGTCCCGCTCGTGATT Rev: TCAGCACACAGAGGCCACAA	58
<i>LC3b</i> (<i>Map1lc3b</i>)	NM.022867.2	Fwd: ACGGCTTCTGTACATGGTC Rev: GTGGGTGCCTACGTTCTGAT	60
<i>MAFbx/atrogen-1</i> (<i>Fbxo32</i>)	NM.133521.1	Fwd: TCCGTGTGGTGGGCAACAT Rev: AAGCACACAGGCGAGTCCGGT	60
<i>MuRF1</i> (<i>Trim63</i>)	NM.080903.1	Fwd: TGCAGCGGATCACTCAGGAGCA Rev: TGAGGGCTTGGCACTCAGA	58
<i>Myostatin</i> (<i>Mstn</i>)	NM.019151.1	Fwd: TGACGGCTCTTGGGAAGATGACGA Rev: ATATCCACAGCTGGGCCCTTACCA	60
<i>Tfeb</i> (<i>Tfeb</i>)	NM.001025707.1	Fwd: ACTTCCAGTCGCCACCACCACT Rev: GCTGACGTGGGCGAGCAAAC	60
<i>Ulk1</i> (<i>Ulk1</i>)	NM.001108341.1	Fwd: CATGACCTCCCTTGATGTAAC Rev: ACCAGGTGGTGGTAAGGAAC	60

Primers were designed using Primer 3 software from gene sequences obtained from GeneBank. Primer specificity was determined using a BLAST search.

expression levels of genes of interest, as previously described (Pfaffl, 2001).

2.6. Protein isolation

TA muscles were homogenized (1:20 dilution wt:vol) in ice-cold buffer (pH 7.4, 50 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 50 mM β -glycerophosphate, 50 mM sodium fluoride, 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, and 120 nM okadaic acid, all reagents from Sigma–Aldrich). Homogenates were centrifuged at 12,000 g for 20 min at 4 °C, and the resulting supernatants analyzed for total protein content (Bio-Rad DC Protein Assay) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.7. Immunoblotting

Equal amount of protein (50 μ g) were resolved on 12.5% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred to 0.45 μ m nitrocellulose membranes. After Ponceau S staining, membranes were blocked (1 h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS) containing 5% non-fat dried milk), and then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies. Antibodies directed against Akt, Akt^{Thr308}, Akt^{Ser473}, CREB, CREB^{Ser133}, ERK1/2, ERK1/2^{Thr202/Tyr204}, 4E-BP1, 4E-BP1^{Thr37/46}, IRS-1, IRS-1^{Ser636/639}, rpS6 and rpS6^{Ser235/236} were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Antibodies directed against Atg5–Atg12 complex, Atg13, LC3b, sequestosome1 (p62/Sqstm1) and α -tubulin were from Sigma–Aldrich (Saint Louis, USA). Antibodies directed

against β_2 -adrenoceptor (sc-569), β_2 -adrenoceptor^{Ser355/356} (sc-33182) and Ulk1 (sc-22191) were from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). Antibodies directed against FoxO3a and FoxO3a^{Thr32} were from Millipore (St. Quentin-en-Yvelines, France). Membranes were then washed 3 times in TBS and incubated for 1 h at room temperature with a goat anti-rabbit or a rabbit anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Dako, Trappes, France). After 3 \times 5 min washes in TBS-Tween, immunocomplexes were visualized using an enhanced chemiluminescence detection method (GE Healthcare, Orsay, France). The films were scanned and quantified using ImageJ analysis software. α -tubulin immunoblots were used to check for equal protein loading between samples.

2.8. Enzyme assays

Chymotrypsin-like and trypsin-like proteasome enzyme activities were fluorometrically determined (λ_{exc} = 380 nm; λ_{em} = 460 nm) by using Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (Bachem, Weil am Rhein, Germany) and Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-7-amido-4-methylcoumarin (Sigma–Aldrich), respectively, as fluorogenic substrates (Berthon et al., 2007).

2.9. Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. Control and formoterol-treated groups were compared using a one-way analysis of variance. Scheffe's post hoc test was used to determine

Table 2
Effect of formoterol administration on extensor digitorum longus, gastrocnemius, soleus and tibialis anterior muscle mass.

	EDL	GAS	SOL	TA
Control	128.0 ± 2.4	1.601 ± 27.0	108.2 ± 1.9	525.6 ± 5.9
D1	131.9 ± 1.6	1.679 ± 38.0	105.8 ± 2.5	553.9 ± 9.4
D3	136.6 ± 3.0	1.748 ± 47.0 ^a	125.8 ± 2.6 ^a	573.5 ± 10.0 ^a
D10	155.1 ± 5.5 ^b	2.097 ± 57.6 ^b	128.9 ± 4.4 ^b	655.7 ± 20.9 ^b

EDL, extensor digitorum longus; GAS, gastrocnemius; SOL, soleus; TA, tibialis anterior.

D1, D3 and D10: 1, 3 and 10 days of formoterol administration (2000 µg/kg). Data are means ± SEM (n = 6–10/group) and are expressed in milligrams.

^a P < 0.01.

^b P < 0.001: significantly different from control group.

significant differences between groups. Statistic analyses were performed using StatView version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The α-level of significance was set at 0.05.

3. Results

3.1. Formoterol administration induces hypertrophy of rat skeletal muscle

Daily injections of formoterol (2000 µg/kg) for 10 days induced a marked hypertrophy (20–30%) of *extensor digitorum longus*, *gastrocnemius*, *soleus* and *tibialis anterior* (TA) muscles (Table 2). With the exception of *extensor digitorum longus* muscle, this effect could be observed as soon as 3 days of formoterol administration. Interestingly, lower doses of formoterol (20 µg/kg/day and 200 µg/kg/day)

also induced muscle hypertrophy (Supplemental Table S1). Accordingly, whole TA muscle cross-sectional area (Fig. 1A) and TA muscle fiber cross-sectional area (Fig. 1B and C) were also significantly increased by 22% and 26%, respectively, in animals that received formoterol for 10 days. Muscle hypertrophy was associated with an increase in both total RNA content and muscle protein content (Supplemental Fig. S1). Altogether, these data indicate that muscle protein accretion is rapidly and strongly induced in response to β₂-adrenoceptor stimulation.

Supplementary data related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.07.019>.

3.2. Formoterol administration increases β₂-adrenoceptor protein content and CREB phosphorylation on Ser¹³³

We first determined the expression level of proteins involved in β₂-adrenoceptor signal transduction. Total β₂-adrenoceptor protein content was markedly increased by about 5.5-fold at day 3 (P < 0.001) and returned below control values at day 10 (P < 0.01) (Fig. 2A). Desensitization of β₂-adrenoceptor by G protein coupled receptor kinases, which has been reported in response to β₂-agonist administration (Hausdorff et al., 1989) can be determined by the phosphorylation of Ser residues at positions 355 and 356 in the C terminal domain of the receptor (Seibold et al., 2000). β₂-adrenoceptor phosphorylation was transiently increased by about 90% at day 3 of formoterol administration (P < 0.001) and returned below control values at day 10 (P < 0.001) (Fig. 2B). Consequently, when expressed relative to the total amount of β₂-adrenoceptor, the phosphorylation level of β₂-adrenoceptor was significantly reduced at all time points (Fig. 2C).

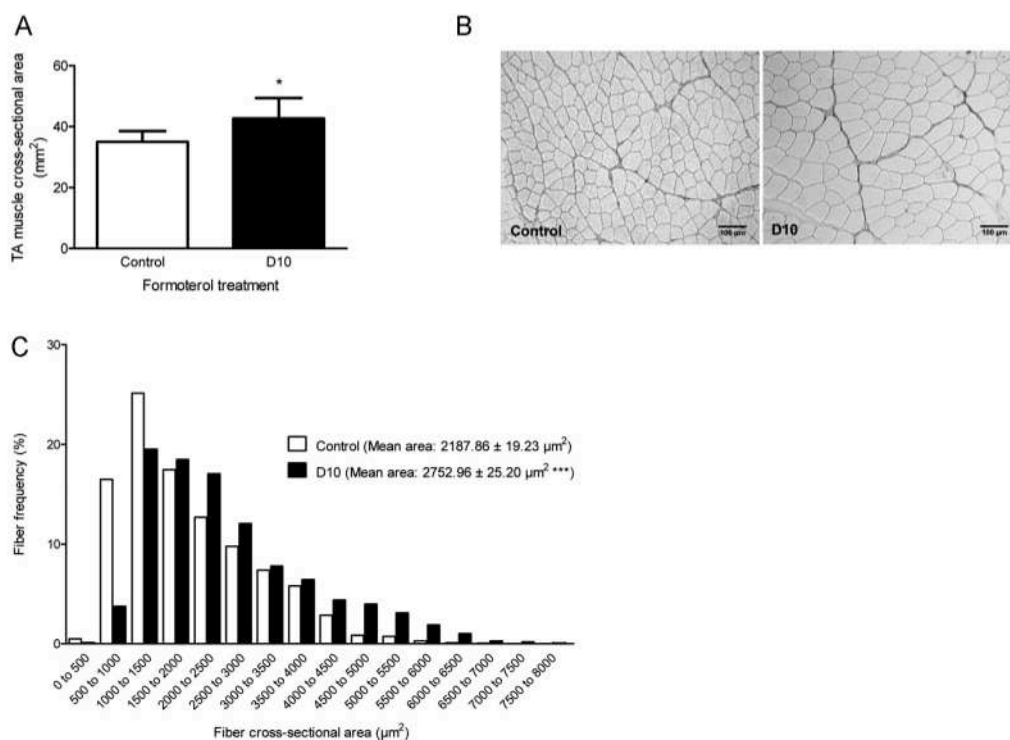


Fig. 1. Formoterol administration induces hypertrophy of *tibialis anterior* muscle. (A) Whole muscle cross-sectional area. (B) Magnified view of representative muscle sections in response to 10 days (D10) of formoterol administration (2000 µg/kg). Scale bars represent 100 µm. (C) Frequency histogram of muscle fiber cross-sectional area. Data are means ± SEM (n = 10/group). *P < 0.05 and ***P < 0.001: significantly different from control group.

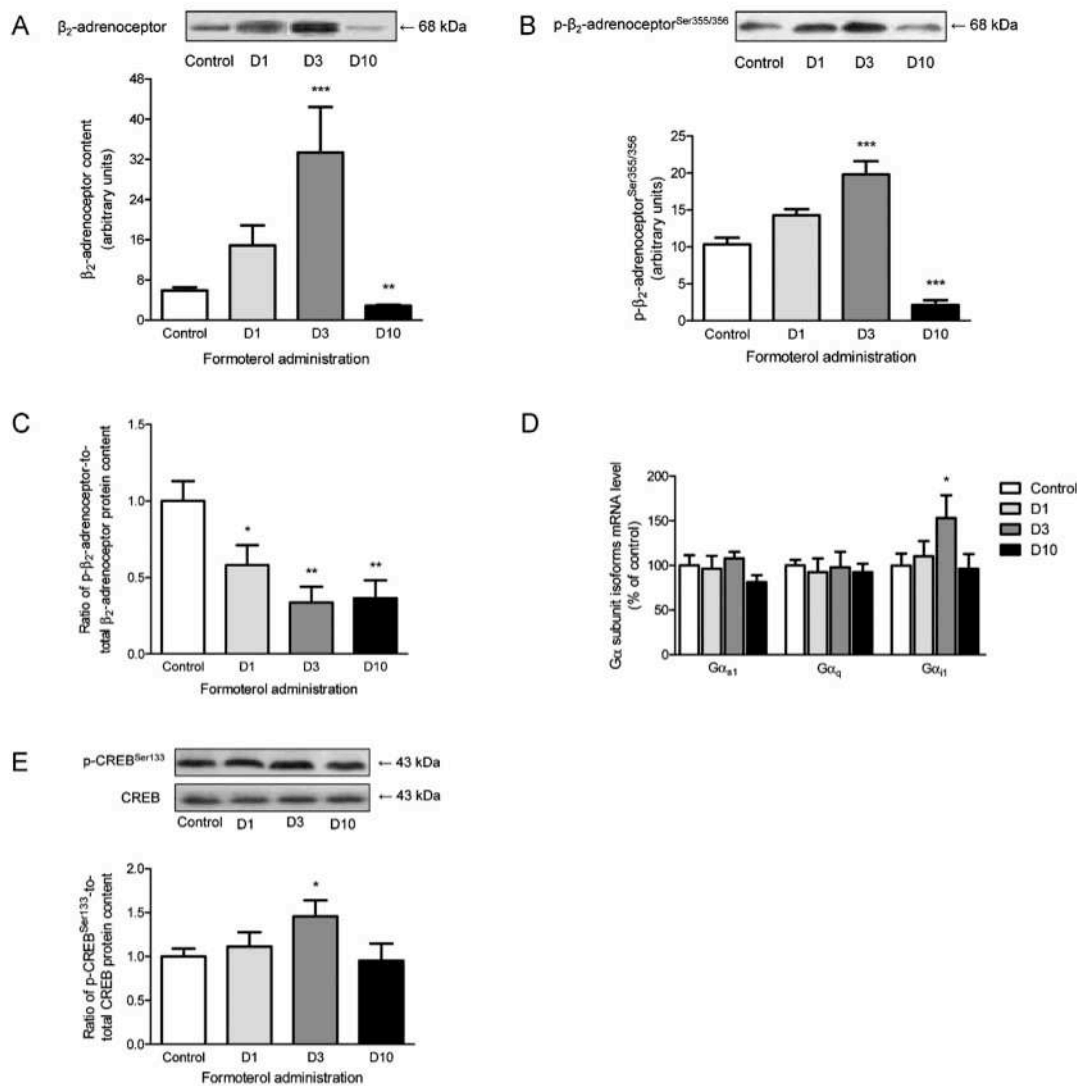


Fig. 2. Effect of formoterol administration on β_2 -adrenoceptor protein content, β_2 -adrenoceptor phosphorylation, mRNA level of $G\alpha$ subunits and CREB phosphorylation in *tibialis anterior* muscle. Representative immunoblot (upper panel) and protein content (lower panel) of (A) β_2 -adrenoceptor and (B) phosphorylated β_2 -adrenoceptor on Ser³⁵⁵ and Ser³⁵⁶ in response to 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). (C) Ratio of β_2 -adrenoceptor phosphorylation-to- β_2 -adrenoceptor protein content. (D) mRNA level of stimulatory $G\alpha$ ($G\alpha_{s1}$) subunit, $G\alpha_q$ and inhibitory $G\alpha$ ($G\alpha_{i1}$) subunits. (E) Representative immunoblot of phosphorylated CREB on Ser¹³³ and CREB protein content (upper panel), and ratio of phosphorylated CREB on Ser¹³³-to-CREB protein content (lower panel). Values are means \pm SEM ($n=6-10/\text{group}$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$: significantly different from control group.

mRNA level of $G\alpha$ subunits was next determined. mRNA level of the *stimulatory* $G\alpha$ subunit ($G\alpha_{s1}$), the predominant $G\alpha$ protein subunit isoforms in skeletal muscle (Suzuki et al., 1998), and $G\alpha_q$ subunit remained unchanged in response to formoterol administration (Fig. 2D). mRNA level of the *inhibitory* $G\alpha$ subunit ($G\alpha_{i1}$) was transiently elevated after 3 days of formoterol administration (Fig. 2D).

Canonical β_2 -adrenoceptor signaling pathway involves the activation of protein kinase A (PKA) by cAMP leading to the phosphorylation of cAMP response element binding protein (CREB) on Ser¹³³ and the expression of CREB-responsive genes (Altarejos and Montminy, 2011). CREB phosphorylation was significantly

increased at day 3 (Fig. 2E), indicating that the β_2 -adrenoceptor-CREB pathway was activated. However, after multiple injections of formoterol (10 days), CREB phosphorylation returned to control levels (Fig. 2E). Total CREB protein content remained unchanged.

3.3. Formoterol administration transiently activates the Akt-mTOR pathway

Total protein content of Akt, rpS6, and 4E-BP1 remained virtually unchanged during the entire experimental period. Formoterol administration activated the Akt-mTOR pathway as evidenced by the significant increase in Akt phosphorylation (Thr³⁰⁸ and Ser⁴⁷³)

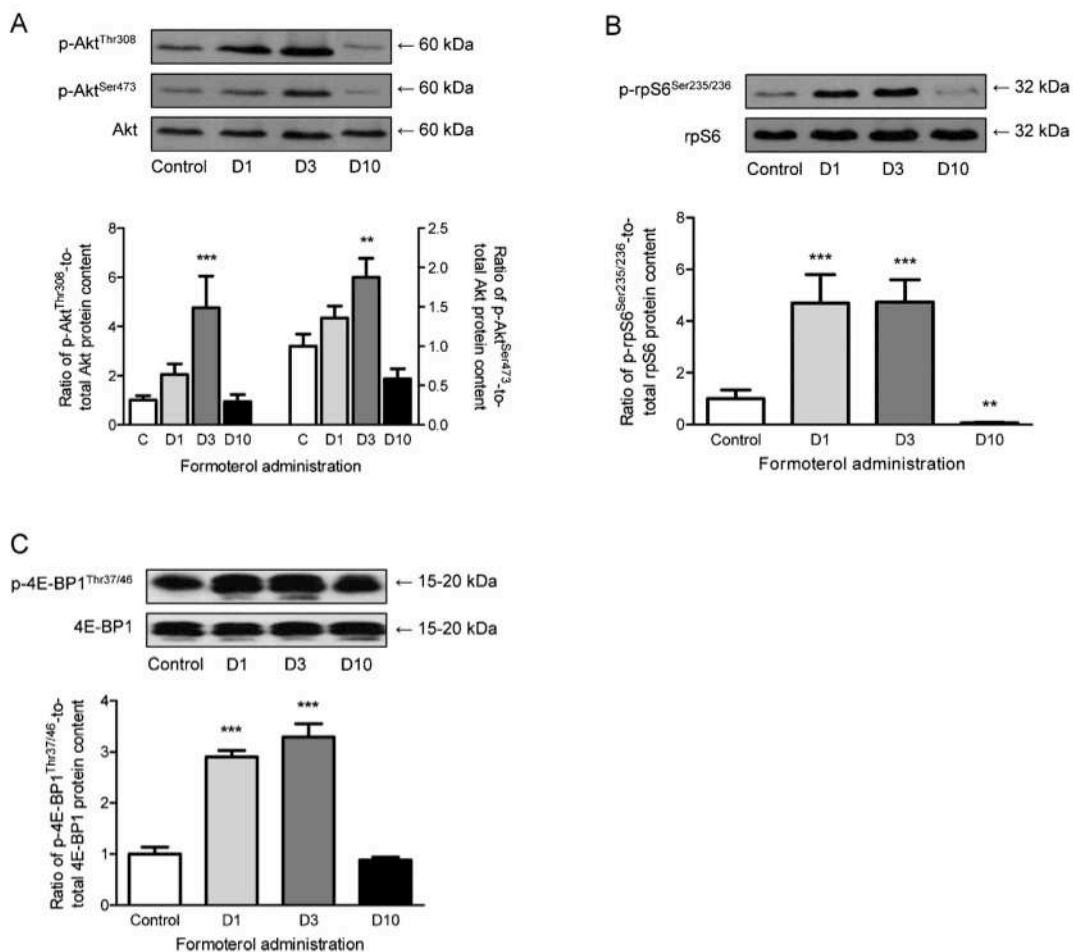


Fig. 3. Regulation of Akt/mTOR signaling pathway in response to formoterol administration in *tibialis anterior* muscle. Representative immunoblot (upper panel) and corresponding ratio of phosphorylated protein-to-total protein content (lower panel). (A) Akt phosphorylation on Ser⁴⁷³ and Thr³⁰⁸, (B) ribosomal protein S6 (rpS6) phosphorylation on Ser²³⁵ and Ser²³⁶, (C) eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) phosphorylation on Thr³⁷ and Thr⁴⁶. Western blotting analysis was performed after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2000 µg/kg). Values are means ± SEM (n = 6–10/group). **P < 0.01 and ***P < 0.001: significantly different from control group.

at day 3, together with a significant increase in eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) (Thr^{37/46}) and ribosomal protein (rp) S6 (Ser^{235/236}) phosphorylation at days 1 and 3 (Fig. 3A–C). Phosphorylation level returned to control values (Akt and 4E-BP1) and even below control values (rpS6) at day 10. Lower doses of formoterol (20 and 200 µg/kg/day for 10 days) gave similar results (Supplemental Fig. S2).

Supplementary data related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2013.07.019>.

β₂-agonists have been proposed to trigger skeletal muscle hypertrophy by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (Shi et al., 2007). ERK1/2 phosphorylation was significantly increased at days 1 and 3, and returned to control values at day 10 (Fig. 4A). Importantly, insulin receptor substrate-1 (IRS-1) phosphorylation on Ser^{636/639}, which induces a negative feedback on Akt-mTOR pathway (Harrington et al., 2004; Tzatsos and Kandror, 2006), was significantly increased by about 3-fold after 10 days of formoterol administration (Fig. 4B). Furthermore,

expression of *myostatin*, which negatively regulates the Akt-mTOR pathway in skeletal muscle (Amirouche et al., 2009), was also increased (P < 0.001) in response to 10 days of formoterol administration (Fig. 4C). Altogether, these data suggest that the observed hypertrophy at day 10 was no longer sustained by an activation of Akt-mTOR pathway. They also suggest that the inhibition of Akt-mTOR pathway after 10 days of formoterol administration could be explained by a negative regulatory function of both IRS-1 and myostatin on Akt-mTOR pathway.

3.4. Regulation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration

Phosphorylation of forkhead box O3a (FoxO3a) transcription factor by Akt triggers the cytoplasmic sequestration of FoxO3a. This prevents its nuclear translocation and the transcriptional activation of its target genes, such as E3 ubiquitin ligases of the

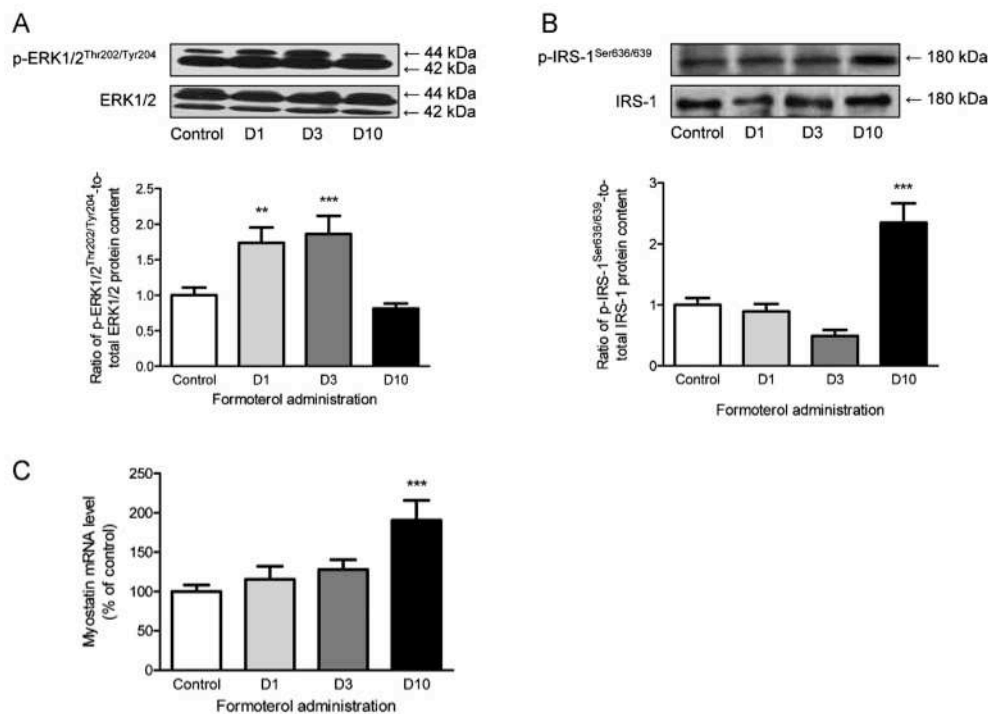


Fig. 4. Effect of formoterol administration on ERK1/2 phosphorylation, IRS-1 phosphorylation and *myostatin* mRNA level in *tibialis anterior* muscle. (A and B) Representative immunoblot (upper panel) and corresponding ratio of phosphorylated protein-to-total protein content of (A) extracellular regulated kinases 1/2 (ERK1/2) on Thr²⁰² and Tyr²⁰⁴ and (B) insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation on Ser⁶³⁶ and Ser⁶³⁹ after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2000 µg/kg). (C) *Myostatin* mRNA level. Values are means ± SEM (n = 6–10/group). **P < 0.01 and ***P < 0.001: significantly different from control group.

ubiquitin-proteasome pathway (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004), as well as the expression of autophagy-related genes (Mammucari et al., 2007; Zhao et al., 2007). In agreement with the increased phosphorylation of Akt, FoxO3a phosphorylation on Thr³² was significantly increased after 3 days of formoterol administration (Fig. 5A). This was associated with a reduction in *muscle atrophy F-box (MAFbx/atrogin-1)* mRNA level (Fig. 5B), whereas *Muscle RING finger1 (MuRF1)* mRNA level remained unchanged (Fig. 5C). Chymotrypsin-like and trypsin-like activities remained also unchanged (Fig. 5D).

Surprisingly, the mRNA level of autophagy-related genes, *light chain 3 beta (LC3b)* and *gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1 (Gabarapl1)*, as well as lysosomal hydrolases, *cathepsin B* and *cathepsin L*, was significantly increased in response to 1 and/or 3 days of formoterol administration (Fig. 6A). In support to the mRNA data, LC3b-I, the unlipidated cytoplasmic form, and LC3b-II, the lipidated membrane-bound form arising from the conjugation of soluble LC3b-I to phosphatidylethanolamine (PE), were transiently increased in response to 1 and 3 days of formoterol administration (Fig. 6B). Consequently, the LC3b-II-to-LC3b-I ratio tended to decrease after 3 days of formoterol administration (Fig. 6C). To get further insights into the regulation of autophagy-lysosome pathway, we extended our analysis to the expression of other genes. mRNA level of *Unc-51-like kinase 1 (Ulk1)*, *Bcl2/adenovirus E1B interacting protein3 (Bnip3)* and *transcription factor EB (TFEB)* were either unchanged or even decreased in response to formoterol administration (Fig. 7A). Protein level of *Ulk1* (Fig. 7B), *Atg13* (Fig. 7C), *Atg5-Atg12* complex (Fig. 7D) and *sequestosome 1 (p62/Sqstm1)* (Fig. 7E) remained also unchanged in response to formoterol administration.

4. Discussion

In the present study, we provide new insights into the regulation of intracellular events triggered by short-term administration of β₂-agonists. The data indicate that formoterol rapidly and transiently activates both β₂-adrenoceptor-CREB and Akt-mTOR pathways, together with a down-regulation of *MAFbx/atrogin-1* mRNA level and an up-regulation of *LC3b*, *Gabarapl1*, *cathepsin B* and *cathepsin L* mRNA level.

The increased CREB phosphorylation after 3 days of formoterol administration indicates that stimulation of β₂-adrenoceptor coupled to G_s increased cAMP production, activated adenylate cyclase, and ultimately increased phosphorylation of CREB transcription factor. Loss and gain of function studies strongly suggest that CREB-dependent transcription is probably involved in the hypertrophic action of formoterol. Indeed, mice expressing a dominant-negative CREB transgene harbor a dystrophic phenotype due to the absence of regulation of the transcriptional activity of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) (Berdeaux et al., 2007). CREB null mutant mice also exhibit strong myogenic defects with reduced expression of myogenic transcription factors MyoD and Myf5 during embryogenesis (Chen et al., 2005). Therefore, these studies point to an important role of CREB in the regulation of muscle-specific gene expression through the regulation of myogenic transcription factors. However, this needs to be confirmed in adult skeletal muscle cells. In differentiated C2C12 myotubes, CREB has been shown to interact with MyoD on *folliculin* promoter, thus promoting *folliculin* gene expression (Iezzi et al., 2004). *Folliculin* is known to induce skeletal muscle hypertrophy, notably by inhibiting myostatin (Gilson et al., 2009), a negative regulator

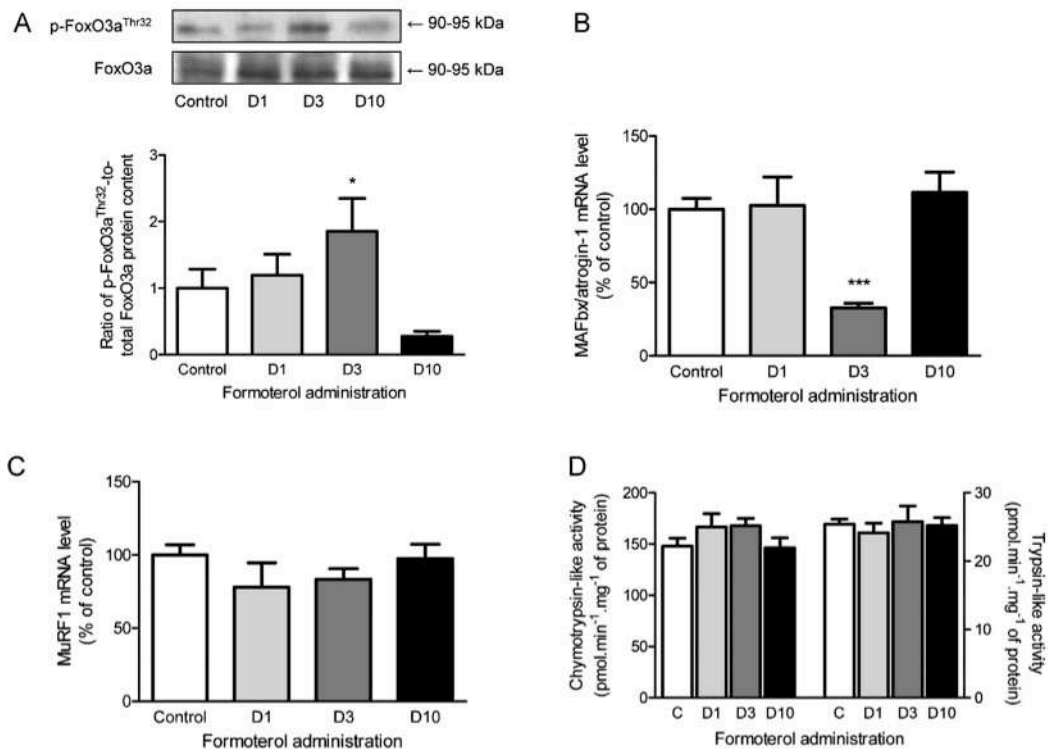


Fig. 5. Effect of formoterol administration on Forkhead box O (FoxO) 3a phosphorylation, muscle atrophy F-box (MAFbx/atrogin-1), Muscle RING finger 1 (MuRF1) mRNA level and proteasome enzyme activities in *tibialis anterior* muscle. (A) Representative immunoblot (upper panel) and corresponding ratio of phosphorylated FoxO3a on Thr³²-to-FoxO3a protein content (lower panel) after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2000 μ g/kg). (B) MAFbx/atrogin-1 and (C) MuRF1 mRNA levels. (D) Chymotrypsin-like and trypsin-like enzyme activities of proteasome. Values are means \pm SEM ($n = 6-10$ /group). * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$: significantly different from control group.

of skeletal muscle mass (Amirouche et al., 2009; Durieux et al., 2007; McPherron et al., 1997). *Follistatin* gene expression has not been determined in the present study, but *myostatin* mRNA level remained unchanged after 3 days of formoterol administration, whereas CREB phosphorylation was increased at this time, suggesting that such a regulation is probably not involved in the present study. β_2 -agonist-induced expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) coactivator 1 α (PGC-1 α) 1 could also contribute to the hypertrophy induced by formoterol. Indeed, PGC-1 α 1 mRNA level is increased in response to formoterol administration in mouse skeletal muscle (Koopman et al., 2010; Pearen et al., 2008), and CREB increases PGC-1 α 1 expression in differentiated C2C12 myotubes (Handschin et al., 2003). Furthermore, elevated expression of PGC-1 α 1 in skeletal muscle limits muscle wasting (Geng et al., 2011; Sandri et al., 2006; Wenz et al., 2009). This effect is mediated by PGC-1 α 1 interaction with FoxO3 transcription factor, which reduces the capacity of FoxO3 to transcribe *MAFbx/atrogin-1* and *MuRF1* promoters (Brault et al., 2010; Sandri et al., 2006). The reduction in *MAFbx/atrogin-1* expression observed in the present study (see below) could thus be partly explained by such a mechanism. Although the gain in muscle mass culminated at day 10, CREB phosphorylation had returned to control level at this time, suggesting that other signaling pathways are involved in the increase skeletal muscle mass with chronic administration of β_2 -agonists.

The increased phosphorylation of Akt, rpS6 and 4E-BP1 after 1 and/or 3 days of formoterol administration supports the notion

that the hypertrophy effect of formoterol is mediated through the stimulation of protein translation initiation by Akt-mTOR pathway (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010; Sneddon et al., 2001). This is in agreement with previous studies showing that β_2 -agonists can increase protein synthesis in skeletal muscle (Busquets et al., 2004; Emery et al., 1984; Koopman et al., 2010; MacLennan and Edwards, 1989; Navegantes et al., 2004). This also raises the question of the molecular mechanism(s) involved in the coupling between β_2 -adrenoceptor stimulation and activation of Akt-mTOR pathway. Previous studies have shown that β_2 -adrenoceptor utilized $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$ to activate Akt-mTOR pathway in cardiomyocytes (Zhu et al., 2001), but also ERK1/2 in HEK293 cells (Daaka et al., 1997; Shenoy et al., 2006). In agreement with these findings, β_2 -agonists promote skeletal muscle hypertrophy with concomitant activation of Akt-mTOR pathway (present study; (Kline et al., 2007; Koopman et al., 2010; Sneddon et al., 2001)) and ERK1/2 (Shi et al., 2007). In the present study, ERK1/2 phosphorylation was also increased 3 days after formoterol administration, and this was associated with a concomitant increase in $G\alpha_{i1}$ mRNA level. Although direct coupling between β_2 -adrenoceptor and $G\alpha_{i1}$ has not been determined in the present study, these data raise the interesting possibility that β_2 -adrenoceptor coupling to $G\alpha_i$ - $G\beta\gamma$, could activate Akt-mTOR pathway and ERK1/2 to trigger skeletal muscle hypertrophy in response to formoterol administration. Recent evidences also suggest that exchange protein activated by cAMP (Epac) may directly couple intracellular increase in cAMP concentration to the activation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Epac

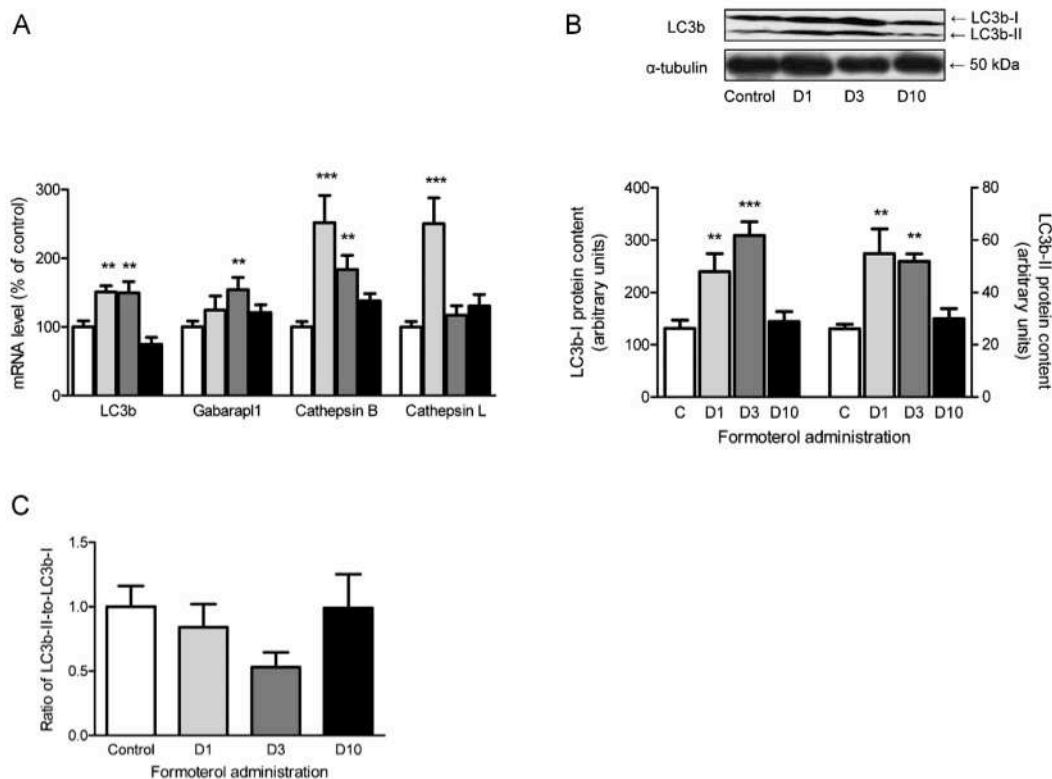


Fig. 6. Effect of formoterol administration on mRNA level and protein content of autophagy-related genes in *tibialis anterior* muscle. (A) light chain 3 beta (LC3b) and gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1 (Gabarapl1), cathepsin B and cathepsin L mRNA levels after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2000 μ g/kg). (B) Representative immunoblots (upper panel) and (lower panel) of LC3b-I and LC3b-II protein content. (C) LC3b-II-to-LC3b-I ratio. Values are means \pm SEM ($n=6-10$ /group). ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$: significantly different from control group.

is a guanine exchange factor activated by cAMP for Ras-related protein (Rap) 1 and 2 (de Rooij et al., 1998; Kawasaki et al., 1998). 007, an Epac-specific cAMP analog (Enserink et al., 2002), has been shown to potentiate Akt phosphorylation stimulated by insulin in rat *soleus* muscle in a similar manner as adrenalin does (Brennesvik et al., 2005), suggesting that Epac may mediate crosstalk between β_2 -adrenoceptor and Akt-mTOR pathway. More recently, it was also shown that incubation of rat *extensor digitorum longus* muscle with 007 increased Akt phosphorylation (Baviera et al., 2010). It remains therefore to determine whether such a mechanism triggers the activation of Akt-mTOR pathway in the present study.

As previously observed for CREB phosphorylation, phosphorylation of Akt and 4E-BP1 returned to control levels or even below (rpS6) at day 10, suggesting that other signaling pathways become activated to sustain skeletal muscle hypertrophy. Chronic β_2 -agonist administration can decrease β_2 -adrenoceptor density (Beitzel et al., 2004; Rothwell et al., 1987; Ryall et al., 2002, 2004, 2006), potentially leading to a decrease in Akt-mTOR pathway signal transduction. However, β_2 -adrenoceptor phosphorylation was markedly decreased at day 10, suggesting that a decrease in receptor sensitization is probably not involved in the down-regulation of Akt-mTOR pathway. By contrast, we cannot exclude that the down-regulation of Akt/mTOR pathway at day 10 could be due to a decrease in β_2 -adrenoceptor content, which was markedly reduced at day 10.

The increase in IRS-1 phosphorylation at day 10, suggests that chronic formoterol administration can lead to IRS-1 inhibition and

the subsequent down-regulation of Akt-mTOR pathway. Similarly, we also report an increase in *myostatin* expression at day 10. Myostatin negatively regulates the Akt-mTOR pathway (Amirouche et al., 2009). The increased myostatin expression at day 10 could thus contribute to down-regulate the Akt-mTOR pathway. Furthermore, this may also limit the extent of skeletal muscle hypertrophy and could protect myofibers from the potential harmful effects of an excessive increase in skeletal muscle mass (Abo et al., 2012).

The concomitant increase in FoxO3a phosphorylation and decrease in *MAFbx/atrogen-1* mRNA level after 3 days of formoterol administration are in agreement with the reported increase of Akt phosphorylation at day 3. *MAFbx/atrogen-1* promotes degradation of MyoD (Tintignac et al., 2005), a key muscle transcription factor, and eIF3-f (eukaryotic initiation factor-3f), an activator of translation initiation (Lagrand-Cantaloube et al., 2008). Therefore, a decrease in *MAFbx/atrogen-1* expression could specifically regulate muscle-specific gene expression via the regulation of MyoD expression, and protein translation via the regulation of eIF3-f protein content. In agreement with this hypothesis, MyoD protein level is increased in response to clenbuterol administration (Bricout et al., 2004). It should be noted, however, that a recent study has demonstrated that *MAFbx/atrogen-1* can interact with sarcomeric proteins (Lokireddy et al., 2011), but it is currently unknown whether this interaction results in ubiquitination of the target proteins. By contrast to *MAFbx/atrogen-1*, *MuRF1* expression remained unchanged after formoterol administration. *MuRF1* is associated with the loss of myofibrillar proteins including troponin I (Kedar et al., 2004),

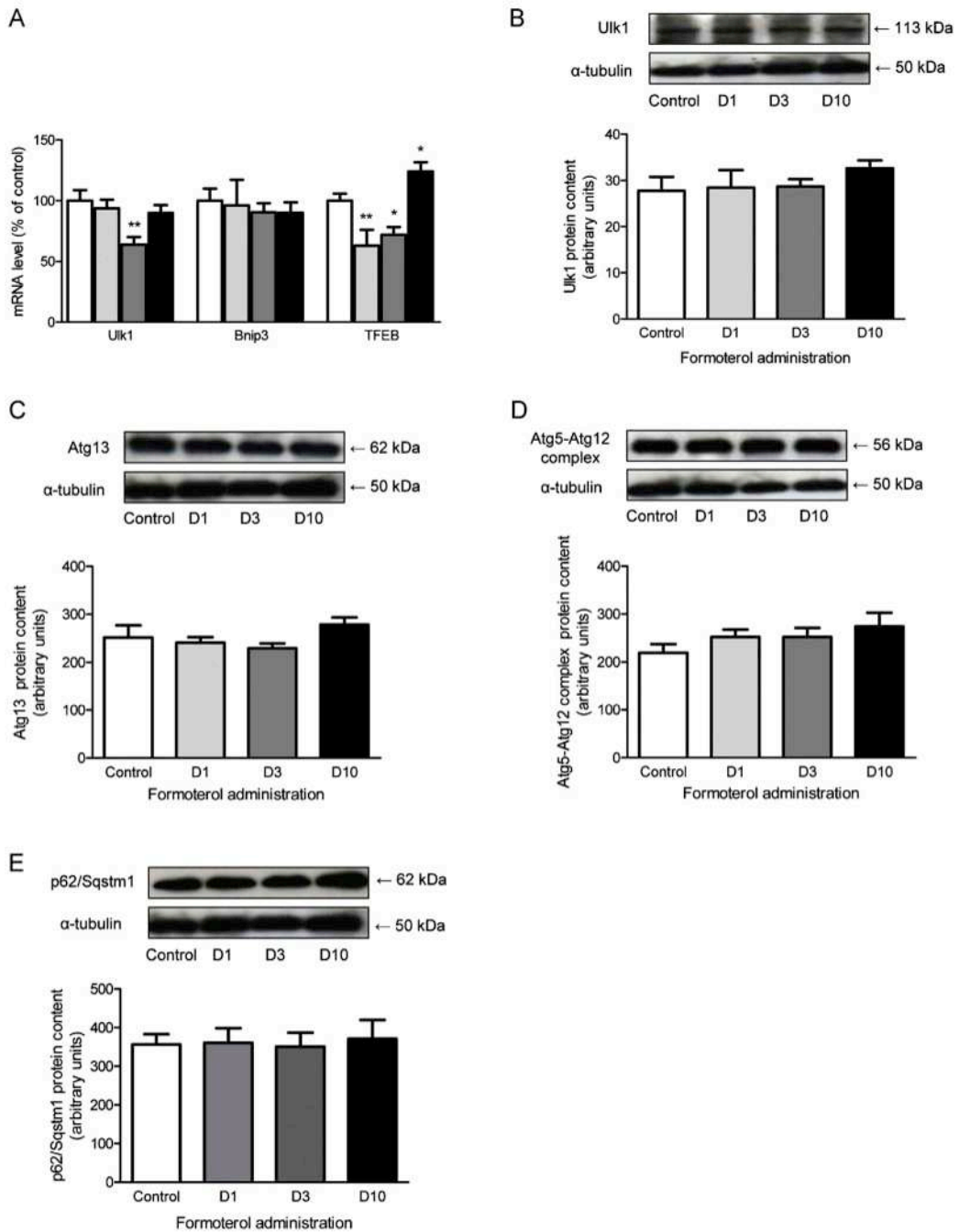


Fig. 7. Effect of formoterol administration on mRNA level and protein content of autophagy-related genes in *tibialis anterior* muscle. (A) Unc-51-like kinase 1 (Ulk1), Bcl2/adenovirus E1B interacting protein3 (Bnip3) and transcription factor EB (TFEB) mRNA level after 1 (D1), 3 (D3) and 10 (D10) days of formoterol administration (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). (B–E) Representative immunoblot (upper panel) and protein content (lower panel) of (B) Ulk1, (C) Atg13, (D) Atg5–Atg12 complex and (E) sequestosome 1 (p62/Sqstm1). Values are means \pm SEM ($n=6-10/\text{group}$). * $P<0.05$ and ** $P<0.01$: significantly different from control group.

myosin heavy chains (Clarke et al., 2007; Cohen et al., 2009; Fielitz et al., 2007), myosin light chains (Cohen et al., 2009) and actin (Polge et al., 2011). The unchanged *MuRF1* expression observed in the present study suggests that alteration in myofibrillar protein degradation is probably not involved in skeletal muscle hypertrophy. In support of this hypothesis, and in agreement with previous observations (Koopman et al., 2010), proteasome enzyme activities remained unchanged in response to formoterol administration.

One surprising finding of the present study was the increase in *LC3b*, *Gabarap1*, *cathepsin B* and *cathepsin L* transcripts, as well as the increase in unlipidated and lipidated forms of *LC3b*. *LC3b* and *Gabarap1* are required in the biogenesis of autophagosomes. *LC3b* mediates the elongation of the phagophore membrane (Nakatogawa et al., 2007; Weidberg et al., 2010; Xie et al., 2008), whereas *Gabarap1* would be involved in a downstream step by sealing autophagosomes (Weidberg et al., 2010). Our data would therefore suggest that autophagosome formation would be increased in response to formoterol administration. Furthermore, the increased expression of *cathepsin B* and *cathepsin L*, further suggests that downstream of autophagosome formation, the bulk degradation of autophagosome content by lysosomal proteases could be also increased in response to formoterol administration. However, this interpretation has to be relativized. Indeed, the mRNA level of autophagy-related genes *Ulk1*, *Snip3* and *TFEB*, as well as the protein content of *Ulk1*, *Atg13*, *Atg5-Atg12* complex and *p62/Sqstm1* remained unchanged or was even decreased in response to formoterol administration. Altogether, these data suggest that the autophagy-lysosome pathway would be not activated in response to formoterol administration. It remains to determine the physiological relevance of the reported increase in *LC3b-I*, *LC3b-II*, as well in the increase in *Gabarap1* and lysosomal proteases mRNA level.

In summary, the present findings demonstrate that formoterol does activate Akt-mTOR pathway. Activation of Akt and its downstream targets 4E-BP1 and rpS6 can lead to increase in protein translation and could explain previous studies that reported increase in protein synthesis following β_2 -agonist administration. The mechanisms through which formoterol activates Akt-mTOR pathway are currently unknown, but could possibly involve β_2 -adrenoceptor coupling to G_{α_i} and/or activation of Epac by cAMP. The ability of formoterol to repress *MAFbx/Atrogin1* transcript suggests that formoterol can also affect protein degradation of *MAFbx/Atrogin1* targeted substrates, including MyoD and eIF3-f. Finally, the observation that the highest gain in skeletal muscle mass was observed after 10 days of formoterol administration, i.e. when both β_2 -adrenoceptor-CREB and Akt-mTOR pathways had returned to control levels, strongly suggest that other signaling pathways are activated to sustain the anabolic response. It is clear from these data that multiple pathways mediate the effects of formoterol in skeletal muscle. A better knowledge of the actions of β_2 -agonists in skeletal muscle could lead to the development of pharmacological strategies aimed at treating skeletal muscle atrophy.

Acknowledgements

Robin Candau and Guillaume Py (Faculté des Sciences du Sport, Université Montpellier Sud-de-France, Montpellier, France) are gratefully acknowledged for their support. Ludivine Ducreux is gratefully acknowledged for her technical help. No author had any financial or personal conflict of interest. This work was supported by the Agence Française de Lutte contre le Dopage and the World Anti-Doping Agency. JOR was supported by an Allocation Doctorale de Recherche from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. DMM is supported by an Allocation Doctorale

de Recherche from the Région Rhône-Alpes (ARC2 Qualité de vie et vieillissement).

References

- Abo T, Iida RH, Kaneko S, Suga T, Yamada H, Hamada Y, et al. IGF and myostatin pathways are respectively induced during the earlier and the later stages of skeletal muscle hypertrophy induced by clenbuterol, a beta(2)-adrenergic agonist. *Cell Biochemistry and Function* 2012.
- Agbenyega ET, Wareham AC. Effect of clenbuterol on skeletal muscle atrophy in mice induced by the glucocorticoid dexamethasone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 1992;102:141–5.
- Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CREC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011;12:141–51.
- Amirouche A, Durieux AC, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, et al. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology* 2009;150:286–94.
- Baviera AM, Zanoni NM, Navegantes LC, Kettelhut IC. Involvement of cAMP/Epac/PI3K-dependent pathway in the antiproteolytic effect of epinephrine on rat skeletal muscle. *Molecular Cell Endocrinology* 2010;315:104–12.
- Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG, Plant DR, Silence MN, Lynch GS. Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *Journal of Applied Physiology* 2004;96:1385–92.
- Berdeaux R, Goebel N, Banaszynski L, Takemori H, Wandless T, Shelton GD, et al. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nature Medicine* 2007;13:597–603.
- Berthon P, Duguez S, Favier FB, Amirouche A, Feasson L, Vico L, et al. Regulation of ubiquitin-proteasome system, caspase enzyme activities, and extracellular proteinases in rat soleus muscle in response to unloading. *Pflügers Archiv* 2007;454:625–33.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001a;294:1704–8.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature Cell Biology* 2001b;3:1014–9.
- Braut JJ, Jespersen JG, Goldberg AL. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:19460–71.
- Brennesvik EO, Ktori C, Ruzzin J, Jebens E, Shepherd PR, Jensen J. Adrenaline potentiates insulin-stimulated PKB activation via cAMP and Epac: implications for cross talk between insulin and adrenaline. *Cellular Signalling* 2005;17:1551–9.
- Bricout VA, Serrurier BD, Bigard AX. Clenbuterol treatment affects myosin heavy chain isoforms and MyoD content similarly in intact and regenerated soleus muscles. *Acta Physiologica Scandinavica* 2004;180:271–80.
- Busquets S, Figueras MT, Fuster G, Almendro V, Moore-Carrasco R, Ametller E, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Research* 2004;64:6725–31.
- Cazzola M, Spina D, Matera MG. The use of bronchodilators in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Pulmonary Pharmacology and Therapeutics* 1997;10:129–44.
- Chen AE, Ginty DD, Fan CM. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature* 2005;433:317–22.
- Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metabolism* 2007;6:376–85.
- Cohen S, Braut JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *Journal of Cell Biology* 2009;185:1083–95.
- Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* 1997;390:88–91.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 1998;396:474–7.
- Durieux AC, Amirouche A, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Pasdeloup M, et al. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology* 2007;148:3140–7.
- Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ, Winter PD. Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Bioscience Reports* 1984;4:83–91.
- Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, et al. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nature Cell Biology* 2002;4:901–6.
- Fielitz J, Kim MS, Shelton JM, Latif S, Spencer JA, Glass DJ, et al. Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:2486–95.
- Gehrig SM, Koopman R, Naim T, Tjoarkarfa C, Lynch GS. Making fast-twitch dystrophic muscles bigger protects them from contraction injury and attenuates the dystrophic pathology. *American Journal of Pathology* 2010;176:29–33.
- Geng T, Li P, Yin X, Yan Z. PGC-1alpha promotes nitric oxide antioxidant defenses and inhibits FOXO signaling against cardiac cachexia in mice. *American Journal of Pathology* 2011;178:1738–48.

- Gilson H, Schakman O, Kalista S, Lause P, Tsuchida K, Thissen JP. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2009;297:E157–64.
- Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:7111–6.
- Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-P13 K signaling via regulation of IRS proteins. *Journal of Cell Biology* 2004;166:213–23.
- Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *Journal of Biological Chemistry* 1989;264:12657–65.
- Iezzi S, Di Padova M, Serra C, Caretti G, Simone C, Makian E, et al. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Developmental Cell* 2004;6:673–84.
- Joassard OR, Durieux AC, Freysenet DG. β_2 -adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbc.2013.06.025>.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 1998;282:2275–9.
- Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA, Patterson C. Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:18135–40.
- Kline WO, Panaro FJ, Yang H, Bodine SC. Rapamycin inhibits the growth and muscle-sparing effects of clenbuterol. *Journal of Applied Physiology* 2007;102:740–7.
- Koopman R, Gehrig SM, Leger B, Trieu J, Walrand S, Murphy KT, et al. Cellular mechanisms underlying temporal changes in skeletal muscle protein synthesis and breakdown during chronic (beta)-adrenoceptor stimulation in mice. *Journal of Physiology* 2010;588:4811–23.
- Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogenin 1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *Embo Journal* 2008;27:1266–76.
- Lokireddy S, McFarlane C, Ge X, Zhang H, Sze SK, Sharma M, et al. Myostatin induces degradation of sarcomeric proteins through a Smad3 signaling mechanism during skeletal muscle wasting. *Molecular Endocrinology* 2011;25:1936–49.
- MacLennan PA, Edwards RH. Effects of clenbuterol and propranolol on muscle mass, evidence that clenbuterol stimulates muscle beta-adrenoceptors to induce hypertrophy. *Biochemical Journal* 1989;264:573–9.
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metabolism* 2007;6:458–71.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997;387:83–90.
- Nakatogawa H, Ichimura Y, Atg8 Ohsumi Y. A ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 2007;130:165–78.
- Navegantes LC, Resano NM, Baviera AM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of sympathetic denervation on the rate of protein synthesis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2004;286:E642–7.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Role of adrenoceptors and cAMP on the catecholamine-induced inhibition of proteolysis in rat skeletal muscle. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2000;279:E663–8.
- Navegantes LC, Resano NM, Migliorini RH, Kettelhut IC. Catecholamines inhibit Ca(2+)-dependent proteolysis in rat skeletal muscle through beta(2)-adrenoceptors and cAMP. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2001;281:E449–54.
- Pearen MA, Myers SA, Raichur S, Ryall JG, Lynch GS, Muscat GE. The orphan nuclear receptor, NOR-1, a target of beta-adrenergic signaling, regulates gene expression that controls oxidative metabolism in skeletal muscle. *Endocrinology* 2008;149:2853–65.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001;29:e45.
- Polge C, Heng AE, Jarzaguat M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, et al. Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1. *Faseb Journal* 2011;25:3790–802.
- Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology* 2001;3:1009–13.
- Rothwell NJ, Stock MJ, Sudera DK. Changes in tissue blood flow and beta-receptor density of skeletal muscle in rats treated with the beta2-adrenoceptor agonist clenbuterol. *British Journal of Pharmacology* 1987;90:601–7.
- Ryall JG, Gregorevic P, Plant DR, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist fenoterol has greater effects on contractile function of rat skeletal muscles than clenbuterol. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 2002;283:R1386–94.
- Ryall JG, Plant DR, Gregorevic P, Sillence MN, Lynch GS. Beta 2-agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *Journal of Physiology* 2004;555:175–88.
- Ryall JG, Sillence MN, Lynch GS. Systemic administration of beta2-adrenoceptor agonists, formoterol and salmeterol, elicit skeletal muscle hypertrophy in rats at micromolar doses. *British Journal of Pharmacology* 2006;147:587–95.
- Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1(alpha) protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:16260–5.
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogenin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004;117:399–412.
- Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, et al. Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Molecular Pharmacology* 2000;58:1162–73.
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, et al. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:1261–73.
- Shi H, Zeng C, Ricome A, Hannon KM, Grant AL, Gerrard DE. Extracellular signal-regulated kinase pathway is differentially involved in beta-agonist-induced hypertrophy in slow and fast muscles. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2007;292:C1681–9.
- Sneddon AA, Delday MI, Steven J, Maltin CA. Elevated IGF-II mRNA and phosphorylation of 4E-BP1 and p70(S6k) in muscle showing clenbuterol-induced anabolism. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 2001;281:E676–82.
- Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular Cell* 2004;14:395–403.
- Suzuki Y, Shen T, Poyard M, Best-Belpomme M, Hanoune J, Defer N. Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology* 1998;274:C1674–85.
- Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:2847–56.
- Tzatsos A, Kandror KV. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology* 2006;26:63–76.
- van Noord JA, Smeets JJ, Raaijmakers JA, Bommer AM, Maesen FP. Salmeterol versus formoterol in patients with moderately severe asthma: onset and duration of action. *European Respiratory Journal* 1996;9:1684–8.
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar ZLC3. GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *Embo Journal* 2010;29:1792–802.
- Wenz T, Rossi SG, Rotundo RL, Spiegelman BM, Moraes CT. Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:20405–10.
- Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell* 2008;19:3290–8.
- Yimlamai T, Dodd SL, Borst SE, Park S. Clenbuterol induces muscle-specific attenuation of atrophy through effects on the ubiquitin-proteasome pathway. *Journal of Applied Physiology* 2005;99:71–80.
- Zeman RJ, Ludemann R, Etlinger JD. Clenbuterol, a beta 2-agonist, retards atrophy in denervated muscles. *American Journal of Physiology* 1987;252:E152–5.
- Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metabolism* 2007;6:472–83.
- Zhu WZ, Zheng M, Koch WJ, Lefkowitz RJ, Kobilka BK, Xiao RP. Dual modulation of cell survival and cell death by beta(2)-adrenergic signaling in adult mouse cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:1607–12.

Communications affichées lors de congrès nationaux et internationaux

L'invalidation du gène de la myostatine atténue l'atrophie musculaire dans un modèle murin de cachexie cancéreuse

Yann Simon Gallot, Barbara Vernus, Nathalie Perek, Anne Bonnieu, Damien Freyssenet
Séminaire CLARA-NACRe, Lyon, France (19 Mai 2011)

Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia

Yann Simon Gallot, Barbara Vernus, Léa Plantureux, Nathalie Perek, Anne Bonnieu, Damien Freyssenet

6th Cachexia Conference, Milan, Italie (9 Décembre 2011)

Publié dans J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2011 December; 2(4): 209–261.

Augmentation de la durée de vie de souris atteintes d'une cachexie cancéreuse

Yann Simon Gallot, Barbara Vernus, Anne Bonnieu, Damien Freyssenet

Journée de la Recherche de l'École Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé (EDSIS), Saint-Etienne, France (14 Juin 2012)

Myostatin gene inactivation increases lifespan in a mouse model of cancer cachexia

Yann Simon Gallot, Barbara Vernus, Josiane Castells, Anne Bonnieu, Damien Freyssenet

Journée scientifique de l'Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé (IFRESIS), Saint-Etienne, France (15 Novembre 2012)

Ce travail a fait l'objet d'un poster lors du

Séminaire CLARA-NACRe

Lyon, France

19 Mai 2011

L'invalidation du gène de la myostatine atténue l'atrophie musculaire dans un modèle murin de cachexie cancéreuse

¹[GALLOT Y.S.](#), ²VERNUS B., ¹PEREK N., ²BONNIEU A., ¹FREYSSENET D.

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France.

²UMR 0866 DMEM Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

L'invalidation du gène de la myostatine atténue l'atrophie musculaire dans un modèle murin de cachexie cancéreuse

¹GALLOT Y.S., ²VERNUS B., ¹PEREK N., ²BONNIEU A., ¹FREYSSENET D.

Objectif :

La cachexie cancéreuse est caractérisée par une atrophie musculaire extrêmement importante qui affecte jusqu'à 80% des patients, et représente plus de 20% des décès liés au cancer. Cette diminution progressive du muscle squelettique se produit de façon concomitante à la perte de tissu adipeux. Nous avons émis l'hypothèse que l'inactivation du gène de la myostatine pourrait atténuer l'atrophie des muscles squelettiques et la perte de tissu adipeux.

Méthodes :

Des cellules du Carcinome de Poumon de Lewis (Lewis lung carcinoma cells, LLC) ont été utilisées pour induire la cachexie. Des souris C57BL/6J mâles âgés de 14 mois de type sauvage (WT) et des souris invalidées pour le gène de la myostatine (KO), ont subi une injection sous-cutanée dans le flanc droit de 5×10^6 cellules LLC repris dans 150 μ l de DPBS stérile. Des souris WT et KO subissaient une injection de DPBS seul (WT-Sham et KO-Sham). Les muscles ont été prélevés 5 semaines après l'injection des cellules LLC.

Résultats :

Le poids des tumeurs chez les souris WT-LLC était supérieur à celui des souris KO-LLC (+30%, $p < 0,05$). Le tissu adipeux était protégé chez les souris KO. En effet, nous avons constaté que la perte de tissu adipeux était plus importante chez les souris WT-LLC que chez les souris KO-LLC (-80% vs -60%, $p < 0,05$). L'injection de cellules LLC induisait une cachexie marquée chez les souris WT comme en témoignaient les diminutions de 25%, 30%, 25% et 20% de la masse des muscles *tibialis anterior* (TA), *extensor digitorum longus* (EDL), *soleus* (SOL) et *gastrocnemius* (GAS), après 5 semaines, par rapport aux souris WT-Sham. L'hypertrophie musculaire chez les souris KO réduisait considérablement l'ampleur de cette perte. L'injection de cellules LLC réduisait la masse musculaire squelettique de seulement 10% dans les muscles TA et EDL ($p < 0,05$ et $p < 0,001$; souris WT-LLC vs souris KO-LLC) et de 6% dans les muscles SOL et GAS ($p < 0,01$ et $p < 0,05$; souris WT-LLC vs souris KO-LLC).

Conclusions et perspectives :

L'invalidation du gène de la myostatine atténuait fortement l'atrophie musculaire squelettique et protégeait les réserves de tissu adipeux dans un modèle murin de cachexie cancéreuse, tout en affectant la croissance tumorale. Ces résultats mettent en évidence le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la myostatine lors de la cachexie cancéreuse.

L'invalidation du gène de la myostatine atténue l'atrophie musculaire dans un modèle murin de cachexie cancéreuse



¹GALLOT Y.S., ²VERNUS B., ¹PEREK N., ²BONNIEU A., ¹FREYSSENET D.



¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France.

²UMR 0866 DMEM Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

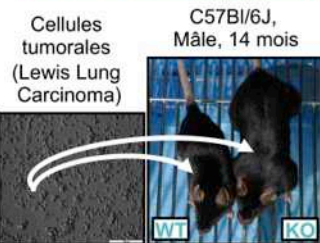
Introduction

La cachexie cancéreuse est caractérisée par une atrophie musculaire extrêmement importante qui affecte jusqu'à 50% des patients, et représente plus de 20% des décès liés au cancer. Cette perte progressive de masse et de fonction musculaire se produit de façon concomitante à la perte de tissu adipeux. Nous avons émis l'hypothèse que l'inactivation du gène de la myostatine, un régulateur négatif de la masse musculaire, pourrait atténuer l'atrophie des muscles squelettiques et la perte de tissu adipeux.

Matériels et méthodes

- WT : souris sauvage
- KO : délétion du 3^{ème} exon de la myostatine → hypermusculature

- WT-Sham (n=9) et KO-Sham (n=8) (inj. s.c. DPBS)
- WT-LLC (n=12) et KO-LLC (n=11) (inj. s.c. 5x10⁶ cellules LLC)



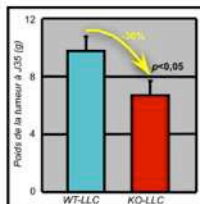
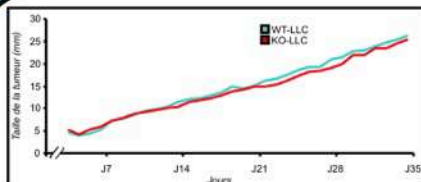
5 semaines de protocole

- Prélèvement des muscles : *tibialis anterior*, *extensor digitorum longus*, *soleus* et *gastrocnemius*

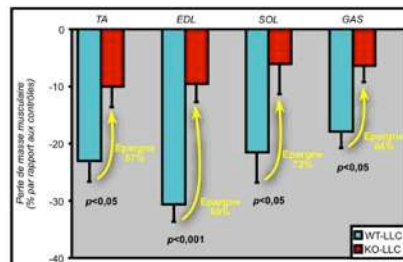
- Prélèvement du tissu adipeux et de la tumeur

- Pesée des animaux, mesure de la taille et du poids de la tumeur

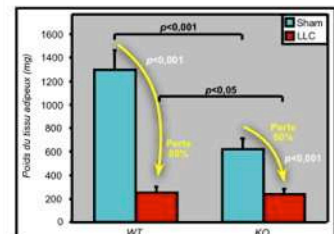
Résultats



L'invalidation du gène de la myostatine réduit la croissance tumorale.



L'invalidation du gène de la myostatine limite la perte de masse musculaire → effet d'épargne.



L'invalidation du gène de la myostatine limite la perte de tissu adipeux.

Conclusions et perspectives

L'invalidation du gène de la myostatine atténue fortement l'atrophie musculaire squelettique et protège les réserves de tissu adipeux dans un modèle murin de cachexie cancéreuse, tout en réduisant la croissance tumorale. Ces résultats mettent en évidence le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la myostatine pour lutter contre la cachexie cancéreuse.



Ce travail a fait l'objet d'un poster lors de la
6th Cachexia Conference
Milan, Italie
9 Décembre 2011

**Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor
growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia**

¹[Yann S. GALLOT](#), ²Barbara VERNUS, ¹Léa PLANTUREUX, ¹Nathalie PEREK, ²Anne BONNIEU
and ¹DAMIEN FREYSSENET

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France.

²UMR 0866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia

¹Yann S. GALLOT, ²Barbara VERNUS, ¹Léa PLANTUREUX, ¹Nathalie PEREK, ²Anne BONNIEU and ¹DAMIEN FREYSSENET

Aims :

Cancer cachexia is a devastating wasting syndrome that affects up to 50% of patients, and accounts for >20% of cancer-related deaths. Wasting results from depletion of adipose tissue and skeletal muscle. We tested the hypothesis that inactivation of myostatin, a potent inhibitor of skeletal muscle mass, would prolong survival and attenuate muscle atrophy and adipose tissue loss.

Methods :

Fourteen month old C57Bl/6J wild-type (WT) mice and myostatin knock-out mice (KO) received a subcutaneous injection of 5×10^6 Lewis lung carcinoma (LLC) cells to induce cachexia or vehicle alone (n=10 per group). A second cohort was used for a survival analysis on WT and KO mice injected with LLC cells as described above.

Results :

Five weeks later, myostatin gene inactivation significantly increased food intake ($p < 0.01$; WT-LLC: -9.3% and KO-LLC: +6.52%). WT-LLC mice had a greater tumor weight than KO-LLC mice (+30%; $p < 0.05$). Adipose tissue loss was partially prevented in KO mice, with a fat loss that reached 80% in WT-LLC mice vs. 60% in KO-LLC mice ($p < 0.05$). LLC injection induced skeletal muscle atrophy in WT mice as evidenced by the decrease in *tibialis anterior* and *soleus* muscle weights (TA and SOL; -25%), *extensor digitorum longus* (EDL; -30%) and *gastrocnemius* (GAS; -20%) compared to control WT. Myostatin gene inactivation significantly reduced the magnitude of this loss. Skeletal muscle mass was only reduced by 10% in TA and EDL muscles ($p < 0.05$ and $p < 0.001$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice) and 6% both in SOL and GAS muscles ($p < 0.01$ and $p < 0.05$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice). Finally, myostatin gene inactivation prolonged lifespan from 32 to 41 days ($p < 0.001$).

Conclusions :

Myostatin gene inactivation potently prolongs animal survival together with attenuating skeletal muscle atrophy and protecting adipose stores, while increasing food intake and reducing tumor growth. These findings highlight the therapeutic potential of myostatin inhibition for cancer cachexia.

Myostatin gene inactivation increases lifespan in a mouse model of cancer cachexia

¹Yann S. GALLOT, ²Barbara VERNUS, ¹Léa PLANTUREUX, ¹Nathalie PEREK,
²Anne BONNIEU and ¹Damien FREYSSENET



¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France.

²UMR 0866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.



Introduction

Cancer cachexia is a devastating wasting syndrome that affects up to 50% of patients, and accounts for at least 20% of cancer-related deaths. Cachexia results from losses of adipose tissue and skeletal muscle. We tested the hypothesis that inactivation of myostatin, a negative regulator of skeletal muscle mass, would prolong survival and attenuate muscle atrophy and adipose tissue loss.

Materials and Methods

Animals: C57Bl/6J male mice, 14 ± 1 months
- WT: wild-type mouse
- KO: myostatin knock-out mouse (double-muscling phenotype)

Model of cancer cachexia:
- Subcutaneous injection of 5x10⁶ Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells
- Sham injected with DPBS

Experiment 1 (5 weeks):

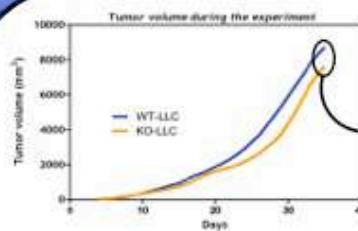
- WT-Sham (n=9) and KO-Sham (n=8)
- WT-LLC (n=12) and KO-LLC (n=11)
- Skeletal muscle weight (*Tibialis Anterior*, *Extensor Digitorum Longus*, *Soleus* and *Gastrocnemius*)
- Adipose tissue weight
- Tumor volume and weight

Experiment 2 (until death):

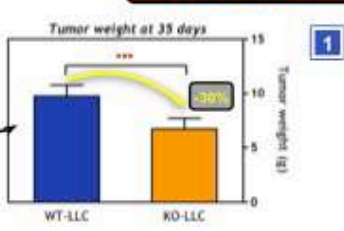
- WT-LLC (n=20)
- KO-LLC (n=17)
- Tumor weight at death
- Kaplan-Meier survival curve

Data are means ± SE, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

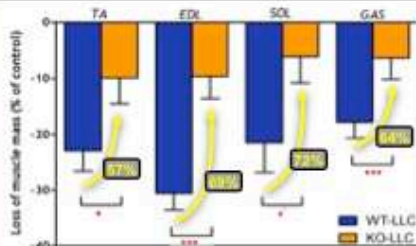
Results



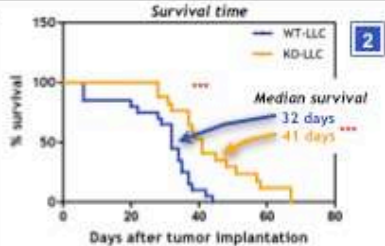
Myostatin gene inactivation decreased tumor weight.



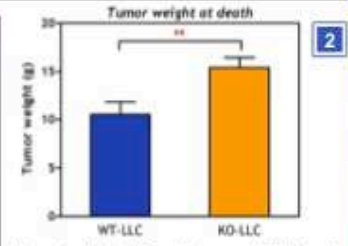
Adipose tissue loss was partially prevented in myostatin KO mice.



Skeletal muscle loss was strongly reduced in myostatin KO mice.



Myostatin gene inactivation prolonged lifespan.



Myostatin KO mice exhibited a greater tolerance to tumor growth.

Conclusion

Myostatin gene inactivation prolongs animal survival, attenuates skeletal muscle atrophy and adipose tissue loss, and reduces tumor growth. These findings highlight the therapeutic potential of myostatin inhibition for the treatment of cancer cachexia.

Ce travail a fait l'objet d'un poster lors de la
Journée de la Recherche de l'Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie, Santé (EDSIS)
Saint-Etienne, France
14 Juin 2012

**Augmentation de la durée de vie de souris atteintes d'une cachexie
cancéreuse**

¹[Yann S. GALLOT](#), ²Barbara VERNUS, ²Anne BONNIEU et ¹DAMIEN FREYSSENET

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France.

²INRA, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, 2 place Viala, F-34060 Montpellier, France.

Augmentation de la durée de vie de souris atteintes d'une cachexie cancéreuse

¹Yann S. GALLOT, ²Barbara VERNUS, ²Anne BONNIEU et ¹Damien FREYSSINET

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France.

²INRA, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, 2 place Viala, F-34060, Montpellier, France.

Introduction

La cachexie cancéreuse :



est caractérisée par une perte de masse musculaire extrêmement importante, affecte jusqu'à 50% des patients atteints d'un cancer, représente plus de 20% des décès liés au cancer.

La myostatine :

est une protéine qui régule négativement la masse musculaire.

L'inactivation du gène de la myostatine est à l'origine d'une « hypermusculature ».

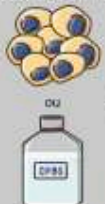


Hypothèse

L'inactivation du gène de la myostatine pourrait atténuer la perte de masse musculaire et prolonger la durée de vie des souris atteintes d'une cachexie cancéreuse.

Matériels et méthodes

Cellules cancéreuses
Lewis Lung Carcinoma (LLC)



Solution saline

Souris



Sauvage Hypermusclée

Expérience n° 1 :

- Sauvage + sol. saline (n = 9)
- Hypermusclée + sol. saline (n = 8)
- Sauvage + LLC (n = 12)
- Hypermusclée + LLC (n = 11)



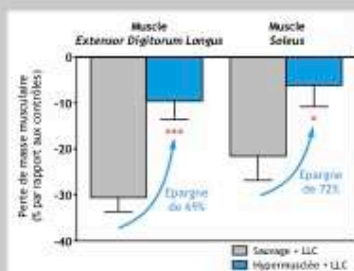
Expérience n° 2 :

- Sauvage + LLC (n = 20)
- Hypermusclée + LLC (n = 17)



Résultats

Expérience n° 1 :

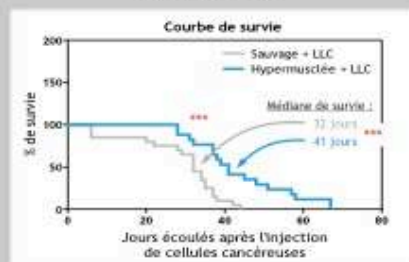


L'inactivation de la myostatine atténue la perte de masse musculaire

⇒ Effet d'épargne chez les souris hypermusclées

Les données sont exprimées en moyennes ± SE. *p<0.05 et ***p<0.001.

Expérience n° 2 :



L'inactivation de la myostatine prolonge la durée de vie

Conclusion

Ces résultats mettent en évidence le potentiel thérapeutique de l'inactivation du gène de la myostatine pour lutter contre la cachexie cancéreuse.

Développer des stratégies d'intervention ciblant la myostatine pourrait permettre une meilleure prise en charge des patients atteints d'une cachexie cancéreuse.



Ce travail a fait l'objet d'un poster lors de la
Journée scientifique de l'Institut Fédératif de Recherche en Sciences et Ingénierie de la Santé
(IFRESIS)
Saint-Etienne, France
15 Novembre 2012

**Myostatin gene inactivation increases lifespan in a mouse model of cancer
cachexia**

¹[Yann Simon GALLOT](#), ² Barbara VERNUS, ¹ Josiane CASTELLS, ² Anne BONNIEU and ¹ DAMIEN
FREYSSENET

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France.

²UMR 0866 DMEM Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

Myostatin gene inactivation increases lifespan in a mouse model of cancer cachexia

¹Yann Simon GALLOT, ²Barbara VERNUS, ¹Josiane CASTELLS, ²Anne BONNIEU and ¹Damien FREYSSENET.



¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France.

²UMR0866 DMEM Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

Introduction

Cancer cachexia is a devastating wasting syndrome that affects up to 50% of patients, and accounts for at least 20% of cancer-related deaths. Cachexia results from losses of adipose tissue and skeletal muscle. We tested the hypothesis that inactivation of myostatin, a negative regulator of skeletal muscle mass, would prolong survival and attenuate muscle atrophy and adipose tissue loss.

Materials and Methods

Animals: C57Bl/6J male mice, 14 ± 1 months
 - WT: wild-type mouse
 - KO: myostatin knock-out mouse (double-muscling phenotype)

Model of cancer cachexia:
 - Subcutaneous injection of 5x10⁶ Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells
 - Sham injected with DPBS

Experiment 1 (5 weeks):

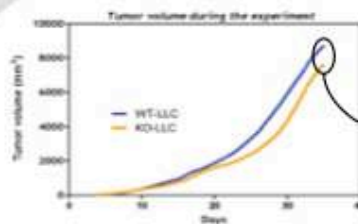
- WT-Sham (n=9) and KO-Sham (n=8)
- WT-LLC (n=12) and KO-LLC (n=11)
- Skeletal muscle weight (*Tibialis Anterior*, *Extensor Digitorum Longus*, *Soleus* and *Gastrocnemius*)
- Adipose tissue weight
- Tumor volume and weight

Experiment 2 (until death):

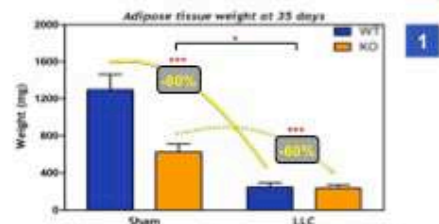
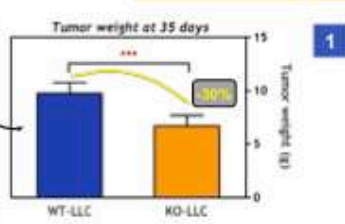
- WT-LLC (n=20)
- KO-LLC (n=17)
- Tumor weight at death
- Kaplan-Meier survival curve

Data are means ± SE, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

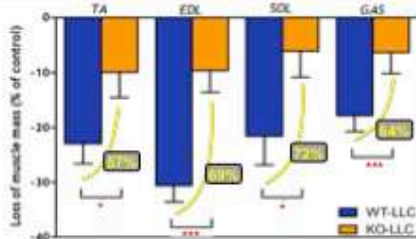
Results



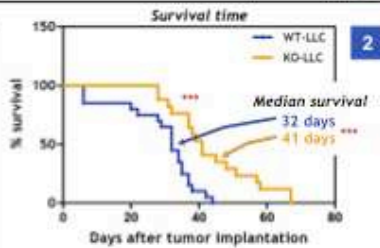
Myostatin gene inactivation decreased tumor weight.



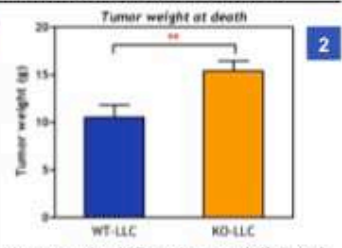
Adipose tissue loss was partially prevented in myostatin KO mice.



Skeletal muscle loss was strongly reduced in myostatin KO mice.



Myostatin gene inactivation prolonged lifespan.



Myostatin KO mice exhibited a greater tolerance to tumor growth.

Conclusion

Myostatin gene inactivation prolongs animal survival, attenuates skeletal muscle atrophy and adipose tissue loss, and reduces tumor growth. These findings highlight the therapeutic potential of myostatin inhibition for the treatment of cancer cachexia.

Communications orales lors de congrès nationaux et internationaux

Inactivation of the myostatin gene significantly attenuated skeletal muscle atrophy in a murine model of cancer cachexia

Yann Simon Gallot, Anne Bonnieu, Damien Freyssenet

Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T), Grenoble, France (22 Mars 2011)

Publié dans *Fundam Clin Pharmacol.* 2011 Apr;25 Suppl 1:1-125.

Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia

Yann Simon Gallot, Barbara Vernus, Nathalie Perek, Anne Bonnieu, Damien Freyssenet

Club Myogénèse XIV, Lyon, France (27 Octobre 2011)

Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia

Yann Simon Gallot, Barbara Vernus, Nathalie Perek, Anne Bonnieu, Damien Freyssenet

6th Cachexia Conference, Milan, Italie (10 Décembre 2011)

YOUNG INVESTIGATORS AWARD SESSION: Clinical & Basic

Publié dans *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2011 December; 2(4): 209–261.

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors du
Congrès de Physiologie, Pharmacologie et Thérapeutique (P2T)
Grenoble, France
22 Mars 2011

**Inactivation of the myostatin gene significantly attenuated skeletal muscle
atrophy in a murine model of cancer cachexia**

¹[Yann S. GALLOT](#), ²Anne BONNIEU et ¹DAMIEN FREYSSENET

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France.

²INRA, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, 2 place Viala, F-34060 Montpellier, France.

Inactivation of the myostatin gene significantly attenuated skeletal muscle atrophy in a murine model of cancer cachexia

¹Yann S. GALLOT, ²Anne BONNIEU et ¹DAMIEN FREYSSENET

Aims :

Cancer cachexia is characterized by extremely severe muscle atrophy that affects up to 80% of patients, and accounts for >20% of cancer-related deaths. This progressive depletion of skeletal muscle occurs in concert with the loss of adipose tissue. We tested the hypothesis that inactivation of the myostatin gene would attenuate the atrophy in skeletal muscle and the loss of adipose tissue.

Methods :

Lewis lung carcinoma cells (LLC) were used to induce cachexia. Fourteen-months-old C57Bl/6J wild-type (WT) mice and knock-out myostatin mice (KO) were injected subcutaneously in the right flank with 5×10^6 Lewis lung carcinoma cells (LLC) in 150 μ L sterile DPBS. Control sham-injected WT and KO mice were injected with DPBS alone. Muscles were removed 5 weeks after LLC injection.

Results :

WT-LLC mice had a greater tumor weight than KO-LLC mice (+30% ; $p < 0.05$). Adipose tissue was protected in KO mice, with a fat loss that was greater in WT-LLC mice compared to KO-LLC mice (-80% vs -60% ; $p < 0.05$). LLC injection induced cachexia in WT mice as evidenced by the 25%, 30%, 25% and 20% decrease in skeletal muscle mass of *tibialis anterior* (TA), *extensor digitorum longus* (EDL), *soleus* (SOL) and *gastrocnemius* (GAS), respectively, after 5 weeks than compared to WT-sham-injected mice. Muscular hypertrophy in KO mice significantly reduced the magnitude of this loss. LLC injection only reduced skeletal muscle mass by 10% both in TA and EDL muscles ($p < 0.05$ and $p < 0.001$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice) and by 6% both in SOL and GAS muscles ($p < 0.01$ and $p < 0.05$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice).

Conclusions :

Inactivation of the myostatin gene potently attenuated the skeletal muscle atrophy and protected adipose stores in a murine model of cancer cachexia, while affecting tumor growth. These findings highlight the therapeutic potential of myostatin inhibition for cancer cachexia.

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors du

Club Myogenèse XIV

Lyon, France

27 Octobre 2011

Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia

¹[Yann S. GALLOT](#), ²Barbara VERNUS, ¹Nathalie PEREK, ²Anne BONNIEU and ¹DAMIEN FREYSSENET

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France.

²INRA, UMR 866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, 2 place Viala, F-34060 Montpellier, France.

Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia

¹[Yann S. GALLOT](#), ² Barbara VERNUS, ¹ Nathalie PEREK, ² Anne BONNIEU and ¹ DAMIEN FREYSSENET

Aims :

Cancer cachexia is a devastating wasting syndrome that affects up to 50% of patients, and accounts for >20% of cancer-related deaths. Wasting results from depletion of adipose tissue and skeletal muscle. We tested the hypothesis that inactivation of myostatin, a potent inhibitor of skeletal muscle mass, would prolong survival and attenuate muscle atrophy and adipose tissue loss.

Methods :

Fourteen month old C57Bl/6J wild-type (WT) mice and myostatin knock-out mice (KO) received a subcutaneous injection of 5×10^6 Lewis lung carcinoma (LLC) cells to induce cachexia or vehicle alone (n=10 per group). A second cohort was used for a survival analysis on WT and KO mice injected with LLC cells as described above.

Results :

Five weeks later, myostatin gene inactivation significantly increased food intake ($p < 0.01$; WT-LLC: -9.3% and KO-LLC: +6.52%). WT-LLC mice had a greater tumor weight than KO-LLC mice (+30%; $p < 0.05$). Adipose tissue loss was partially prevented in KO mice, with a fat loss that reached 80% in WT-LLC mice vs. 60% in KO-LLC mice ($p < 0.05$). LLC injection induced skeletal muscle atrophy in WT mice as evidenced by the decrease in *tibialis anterior* and *soleus* muscle weights (TA and SOL; -25%), *extensor digitorum longus* (EDL; -30%) and *gastrocnemius* (GAS; -20%) compared to control WT. Myostatin gene inactivation significantly reduced the magnitude of this loss. Skeletal muscle mass was only reduced by 10% in TA and EDL muscles ($p < 0.05$ and $p < 0.001$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice) and 6% both in SOL and GAS muscles ($p < 0.01$ and $p < 0.05$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice). Finally, myostatin gene inactivation prolonged lifespan from 32 to 41 days ($p < 0.001$).

Conclusions :

Myostatin gene inactivation potently prolongs animal survival together with attenuating skeletal muscle atrophy and protecting adipose stores, while increasing food intake and reducing tumor growth. These findings highlight the therapeutic potential of myostatin inhibition for cancer cachexia.

Ce travail a fait l'objet d'une communication orale lors de la
6th Cachexia Conference

YOUNG INVESTIGATORS AWARD SESSION: Clinical & Basic

Milan, Italie

9 Décembre 2011

**Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor
growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia**

¹[Yann S. GALLOT](#), ²Barbara VERNUS, ¹Nathalie PEREK, ²Anne BONNIEU and ¹DAMIEN
FREYSSENET

¹Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (EA 4338), Université de Lyon, F-42023 Saint-Etienne, France.

²UMR 0866 Dynamique Musculaire et Métabolisme, INRA, 2 place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France.

Myostatin gene inactivation reduces skeletal muscle mass loss and tumor growth, and increases lifespan in mice with cancer cachexia

¹Yann S. GALLOT, ²Barbara VERNUS, ¹Nathalie PEREK, ²Anne BONNIEU and ¹DAMIEN FREYSSENET

Aims :

Cancer cachexia is a devastating wasting syndrome that affects up to 50% of patients, and accounts for >20% of cancer-related deaths. Wasting results from depletion of adipose tissue and skeletal muscle. We tested the hypothesis that inactivation of myostatin, a potent inhibitor of skeletal muscle mass, would prolong survival and attenuate muscle atrophy and adipose tissue loss.

Methods :

Fourteen month old C57Bl/6J wild-type (WT) mice and myostatin knock-out mice (KO) received a subcutaneous injection of 5×10^6 Lewis lung carcinoma (LLC) cells to induce cachexia or vehicle alone (n=10 per group). A second cohort was used for a survival analysis on WT and KO mice injected with LLC cells as described above.

Results :

Five weeks later, myostatin gene inactivation significantly increased food intake ($p < 0.01$; WT-LLC: -9.3% and KO-LLC: +6.52%). WT-LLC mice had a greater tumor weight than KO-LLC mice (+30%; $p < 0.05$). Adipose tissue loss was partially prevented in KO mice, with a fat loss that reached 80% in WT-LLC mice vs. 60% in KO-LLC mice ($p < 0.05$). LLC injection induced skeletal muscle atrophy in WT mice as evidenced by the decrease in *tibialis anterior* and *soleus* muscle weights (TA and SOL; -25%), *extensor digitorum longus* (EDL; -30%) and *gastrocnemius* (GAS; -20%) compared to control WT. Myostatin gene inactivation significantly reduced the magnitude of this loss. Skeletal muscle mass was only reduced by 10% in TA and EDL muscles ($p < 0.05$ and $p < 0.001$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice) and 6% both in SOL and GAS muscles ($p < 0.01$ and $p < 0.05$; WT-LLC-injected mice vs. KO-LLC-injected mice). Finally, myostatin gene inactivation prolonged lifespan from 32 to 41 days ($p < 0.001$).

Conclusions :

Myostatin gene inactivation potently prolongs animal survival together with attenuating skeletal muscle atrophy and protecting adipose stores, while increasing food intake and reducing tumor growth. These findings highlight the therapeutic potential of myostatin inhibition for cancer cachexia.


Invalidation du gène de la myostatine dans un modèle murin de cachexie associée au cancer : implication dans la régulation de la masse musculaire

Résumé

La cachexie est un syndrome clinique et métabolique complexe, de définition imprécise, caractérisé par une perte incontrôlée de tissu adipeux et de tissu musculaire squelettique, et fréquemment observé chez les patients atteints de cancer. Elle conduit dans 25% des cas à la mort des patients. La myostatine (Mstn) est un régulateur négatif de la masse musculaire squelettique et un facteur déterminant de l'homéostasie du muscle squelettique. Bien que la régulation des mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la masse musculaire squelettique joue un rôle central dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer, les relations existant entre la Mstn et les mécanismes physiopathologiques restent largement inconnues. Suite à l'inoculation sous-cutanée de cellules Lewis lung carcinoma (LLC) à des souris, nous avons montré que l'inactivation du gène de la Mstn (souris $Mstn^{-/-}$) confère une résistance au développement de la cachexie associée au cancer par rapport à des souris de phénotype sauvage. La déficience en myostatine prévient la perte de masse du muscle squelettique et réduit la croissance tumorale, trente-cinq jours après l'injection des cellules tumorales. De plus, ceci est associé à un allongement de la durée de vie des animaux. L'inactivation du gène de la myostatine provoque également une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales, ainsi qu'une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et le métabolisme tumoraux. L'activation des systèmes protéolytiques ubiquitine-protéasome et autophagie-lysosome, déclenchée par le développement tumoral, est considérablement réduite voire supprimée dans le muscle squelettique des souris $Mstn^{-/-}$. L'accumulation de céramides intramusculaires, un sphingolipide synthétisé en réponse à une lipolyse exacerbée, est étroitement corrélée à la perte de masse musculaire, suggérant que les céramides pourraient être un médiateur cellulaire impliqué dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer. L'ensemble de ces résultats montre que la myostatine joue un rôle essentiel dans la pathogenèse de la cachexie associée au cancer.

Mots clés

Atrophie musculaire, autophagie, cachexie associée au cancer, céramides, Lewis lung carcinoma, myostatine, ubiquitine-protéasome



Myostatin gene inactivation in a mouse model of cancer cachexia : involvement in the regulation of muscle mass

Abstract

Cachexia is a complex clinical and metabolic syndrome, whose definition is imprecise, characterized by an uncontrolled loss of adipose tissue and skeletal muscle mass, frequently observed in cancer patients. This process leads to death in 25% of cancer patients. Myostatin (Mstn) is a negative regulator of skeletal muscle mass and a critical determinant of skeletal muscle homeostasis. Although the regulation of the molecular mechanisms involved in the control of skeletal muscle mass plays a central role in the pathogenesis of cancer cachexia, the relationships between Mstn and the pathophysiological mechanisms remain largely unknown. Following subcutaneous inoculation of Lewis lung carcinoma cells (LLC) in mice, we showed that the Mstn gene inactivation ($Mstn^{-/-}$ mice) confers resistance to the development of cancer cachexia, compared to wild type mice. Myostatin deficiency prevents the loss of skeletal muscle mass and reduces tumor growth, thirty-five days after the inoculation of tumor cells. Furthermore, this is associated with a longer life of animals. Mstn gene inactivation also causes an increased apoptosis of tumor cells and decreases expression of genes involved in tumor proliferation and metabolism. Activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome proteolytic systems, triggered by tumor growth is significantly reduced or suppressed in skeletal muscle of $Mstn^{-/-}$ mice. Accumulation of intramuscular ceramides, a sphingolipid synthesized in response to excessive lipolysis, is closely correlated with the loss of muscle mass, suggesting that ceramides may be a cellular mediator involved in the pathogenesis of cancer cachexia. Overall, these results show that myostatin plays an critical role in the pathogenesis of cancer cachexia.

Keywords

Muscle atrophy, autophagy, cancer cachexia, ceramides, Lewis lung carcinoma, myostatin, ubiquitin-proteasome