



**HAL**  
open science

**Impact de la prise chronique de paracétamol sur le  
muscle et le besoin en cystéine chez le rat âgé. :  
Nutrition Humaine**

Carole Mast

► **To cite this version:**

Carole Mast. Impact de la prise chronique de paracétamol sur le muscle et le besoin en cystéine chez le rat âgé. : Nutrition Humaine. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2014. Français. NNT : 2014CLF1MM17 . tel-01657408

**HAL Id: tel-01657408**

**<https://theses.hal.science/tel-01657408>**

Submitted on 6 Dec 2017

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

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

**Université Blaise Pascal**

Année 2014

**Université d'Auvergne**

N° d'ordre : 17-DOC

***ECOLE DOCTORALE***

***DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE, AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT***

N° d'ordre : 17-DOC

***Thèse***

Présentée à l'Université d'Auvergne pour l'obtention du grade de DOCTEUR  
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Nutrition Humaine

Soutenue le 31 Octobre 2014

**MAST Carole**

---

**Impact de la prise chronique de paracétamol sur le muscle  
et le besoin en cystéine chez le rat âgé**

---

**Président:** Pr. Yves Boirie, PU-PH, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

**Rapporteurs:** Dr. Sophie Tesseraud, DR, INRA, Tours

Dr. François Mariotti, MCU, AgroParisTech, Paris

Pr. Yves Rolland, PU-PH, Université Toulouse III, Toulouse

**Membres:** Dr. Gisèle Pickering, MCU-PH, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Dr. Isabelle Papet, CR, INRA, Clermont-Ferrand

Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019  
INRA, Centre de Clermont-Ferrand-Theix  
63122 Saint-Genès-Champanelle



## Résumé

Le vieillissement conduit à une perte de masse et de fonctionnalité musculaire : la sarcopénie. Ce phénomène physiologique est reconnu comme une cause directe de fragilité et ces deux syndromes gériatriques ont été reliés à de nombreux facteurs dont le statut nutritionnel et la médication. Cependant, les interactions médication-muscle n'ont été que peu étudiées notamment au cours du vieillissement. Le médicament le plus prescrit et consommé, est le paracétamol dont la détoxification hépatique nécessite un nutriment : la cystéine (Cys).

Au cours de cette thèse, un modèle animal permettant l'administration du paracétamol dans le régime a été mis au point. Il a permis de mettre en évidence, chez le rat âgé, une perte spécifique de masse musculaire de 12% suite à des cures répétées de paracétamol. Ces effets ont été associés à une perturbation du métabolisme des acides aminés soufrés générée par le paracétamol et se traduisant par une diminution du glutathion (GSH, tripeptide contenant de la Cys) et de la Cys circulants. L'étude de l'importance de l'apport protéique en période de traitement a mis en évidence un besoin protéique augmenté par le traitement se traduisant par une augmentation du rapport protéines/paracétamol ingéré. La supplémentation en Cys à hauteur du besoin généré par la détoxification du paracétamol, a permis de préserver la masse musculaire et le statut en GSH lors de l'administration répétée de paracétamol chez le rat âgé.

L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence que la perte de masse musculaire induite par des cures répétées de paracétamol chez l'âgé découlerait de l'augmentation du besoin protéique et plus spécifiquement en Cys. Sous réserve de la validité de ces résultats chez l'homme, les données obtenues indiquent qu'il serait d'intérêt de mettre en place des recommandations nutritionnelles basées sur une augmentation de l'apport protéique ou la supplémentation en Cys au cours des périodes de traitement. Ceci permettrait d'accroître le bénéfice/risque du paracétamol, qui est largement prescrit en première intention pour traiter les douleurs chroniques d'intensité faible à modérée chez les personnes âgées.

**Mots clefs** : vieillissement, sarcopénie, paracétamol, cystéine, glutathion, rat

## Abstract

The age-related muscle mass and functionality loss, named sarcopenia is a physiological process known as a direct cause of frailty. Both geriatrics syndromes have been correlated to various factors as nutritional status and medication. However, the interactions between medication and muscle have not being deeply investigated, especially in elderly. The major prescribed and used medication especially in elderly is paracetamol, whose hepatic detoxification needs cysteine (Cys).

Within this thesis, an animal model allowing paracetamol administration in food has been set up. Using this model, we have highlighted a 12% loss of muscle mass in old rat under repeated paracetamol cures. This loss was associated with paracetamol-induced sulfur amino acid disturbances leading to altered glutathione (GSH a Cys containing tripeptide) status and circulating Cys. An increased protein need induced by treatment has been revealed by an increase in the ratio of proteins/paracetamol ingested. A Cys supplementation equivalent to the quantity of Cys needed for paracetamol detoxification allowed to reverse muscle mass and GSH status alterations induced by repeated cures with paracetamol in old rats.

All together, these results emphasize that muscle mass loss induced by repeated cures with paracetamol in old rats arise from the increased protein and more specifically Cys requirements. The relevance of these results for older persons needs to be further evaluated before considering whether it could be of interest to develop nutritional recommendations aimed to optimized protein intake or Cys supplementation during cures with paracetamol. That could further increase the benefit/risk ratio of paracetamol which is widely prescribed for pain relief, especially in older people.

**Key words** : aging, sarcopenia, paracetamol, cysteine, glutathione, rat





## Remerciements

---

*Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement tous les membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail. Monsieur Yves Boirie, professeur à l'Université d'Auvergne, pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Madame Sophie Tesseraud, Directrice de Recherche à l'INRA Centre Val de Loire, Monsieur François Mariotti, Maître de Conférence à AgroParisTech et Monsieur Yves Rolland, professeur au CHU de Toulouse, d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je tiens aussi à remercier Madame Gisèle Pickering, Maître de Conférence à l'Université d'Auvergne, d'avoir accepté d'examiner cette thèse.*

*Je remercie ma directrice de thèse, Isabelle Papet, j'ai beaucoup appris et progressé dans le monde de la recherche durant ces trois années. Merci pour l'autonomie et le choix dans les décisions importantes que tu m'as accordé. Merci pour ton encadrement qui a participé à construire « la chercheuse en herbe » que je suis devenue.*

*Je tiens à adresser un remerciement particulier à mes encadrants de Master 2, Cécile Polge et Daniel Taillandier qui m'ont donné goût à la recherche et la motivation pour poursuivre en thèse.*

*Un grand merci à toutes les personnes de l'équipe NuTriM avec qui j'ai partagé ces trois années, et plus particulièrement « NuTriM Haut ». Merci à Caroline Buffière pour les dépannages avec ce chers Pentra ! Merci à Noredine Hafnaoui pour ton aide avec les appareils et pour les acides aminés. Merci à Laurent Mosoni pour ton aide avec les statistiques, merci de m'avoir aidé à y voir plus clair dans ce domaine complexe ! Je remercie particulièrement Didier Rémond et Isabelle Savary-Auzeloux, merci pour les discussions scientifiques, les nombreux conseils, votre aide et votre soutien. Un grand merci à Dominique Dardevet, merci pour tes nombreux conseils, ton aide et ta disponibilité. Merci pour tout. Un merci aussi à Fabienne Béchereau, Jérémie David, Marianne Jarzaguet, Charline Buisson et Lorène Salis, merci pour les moments d'échanges tant scientifiques qu'autour d'un café. Merci aussi à Mélanie Pouget et Emilie Priac pour ces mois passés ensemble.*

*Je tiens aussi à remercier Lydie Combaret, merci de m'avoir accordé du temps, pour tes conseils et pour m'avoir initié à la protéolyse.*

*Merci à toutes mes collègues de thèses, Eva, Rosa, Marine, Wafa, Lamia, Camille, Audrey, Laurie, Marie-Laure et Emilie. Merci pour les bons moments que nous avons partagés !*

*Un grand merci à Aurélia aussi, merci pour les moments passés ensemble, les échanges, ton soutien et tes encouragements.*

*Je ne pourrais pas ne pas remercier particulièrement Eva Gatineau, tu as été à mes côtés durant ces deux dernières années, merci pour ton aide, pour les échanges scientifiques mais aussi pour les discussions, pour ta présence et ton soutien permanent. Je te remercie sincèrement d'avoir été présente dans tous les moments de cette thèse et d'avoir su me soutenir, me remotiver et me redonner le sourire. Merci pour tout.*

*Un grand merci à Agnès Claustre qui me côtoie depuis mon Master 2. Je te remercie sincèrement pour ta présence, tes conseils, ta gentillesse et ta disponibilité. Merci aussi pour cette rando au Pariou où j'ai appris ce que signifiait avoir froid... Je crois qu'elle restera longtemps dans ma mémoire ! En espérant que nous en referons d'autres.*

*Je tiens également à remercier tout le personnel de l'Installation Expérimentale de Nutrition. Plus particulièrement Philippe Denis, Mehdi Djelloul-Mazouz, Julien Hermet, Philippe Lhoste, Arlette Cissoire et Christophe Del'Homme. Merci pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée au cours des expérimentations animales, et surtout pour m'avoir appris tout ce que je sais aujourd'hui sur ces petits rats.*

*Un merci aux personnes de la Plateforme d'Exploration du Métabolisme, merci à Delphine Centeno, Carole Migne et Corinne Pouyet pour les mesures d'enrichissement. Un grand merci à Charlotte Joby pour les nombreux dosages et mises au point. Je remercie Estelle Pujos-Guillot, Charlotte Joby, Delphine Centeno, Bernard Lyan ainsi que Franck Giacomoni et Jean-François Martin pour le travail partagé sur le développement de la méthodologie et de m'avoir permis de comprendre en partie ce domaine complexe qu'est la spectrométrie de masse.*

*J'adresse également un immense merci à Charlene Pourpe. Merci d'avoir choisi d'effectuer ton stage de Master 2 avec nous et surtout un grand merci pour tout le travail que tu as fait. Ton travail et ton investissement ont permis d'obtenir de beaux résultats. Je te remercie aussi pour les échanges et pour ton soutien durant ces 6 mois.*

*Je ne peux pas oublier de remercier Julien Amat, nous nous sommes côtoyés par intermittence depuis mon Master 2. Merci pour les bons moments passés ensemble, ton positivisme, ton dynamisme et ta motivation constante ! Je te remercie aussi sincèrement pour ton soutien et ta présence, merci d'avoir été et d'être toujours là. Une petite dédicace à Baptiste Jude, nos échanges culturels et culinaires étaient très sympathiques, bon courage pour ta thèse.*

*Enfin pour finir, je ne peux que remercier tous mes proches, famille et amis. Merci à tous mes amis pour votre patience et votre compréhension de mon manque de disponibilité. Merci à vous d'avoir été et d'être toujours là, merci de m'avoir soutenue et encouragée dans tous les moments et jusqu'au bout.*

*Un grand merci à ma famille, merci à mes frères, Stéphane, Christian et Olivier et à ma sœur, Céline. Merci de m'avoir soutenue, encouragée et motivée à continuer et aller plus loin, je crois que cette fois je suis enfin arrivée au bout ! Un immense merci en particulier à Stéphane et Céline, merci pour votre présence infaillible, votre joie de vivre et votre positivisme. Merci pour tous les bons moments passés ensemble qui me font toujours oublier tout le reste. Votre présence dans les pires comme les meilleurs moments m'est indispensable, merci d'être toujours là pour moi. Votre petite sœur est finalement devenue « grande »...*

*Je tiens à adresser un immense merci à celui qui partage ma vie et me supporte au quotidien. Je te remercie d'avoir la patience et le courage de me supporter dans tous les moments, merci d'être à mes côtés et de me soutenir. Merci d'être là, de m'aider et m'écouter autant que possible, gracias por todo... Je te remercie aussi de m'avoir fait voyager et découvrir la culture espagnole ! Merci de m'avoir appris ce que signifiait « osu que calor... » Je me rappellerai longtemps de la visite de Cordoba par 44°C à l'ombre... Un grand merci aussi à ta famille et tes amis pour leur patience avec mon manque de disponibilité et mon espagnol (inexistant au départ) et qui ressemble aujourd'hui à votre dialecte andalous...*

*Je tiens à adresser un immense merci du fond du cœur à ma Maman, je ne pourrais jamais assez te remercier... Merci de m'avoir poussé à faire des études, d'avoir toujours cru en moi, merci d'être fière de moi aujourd'hui. Merci de m'avoir toujours aidé autant que possible, merci pour ta patience et ta compréhension, pour ta présence constante... Merci pour le modèle de force et de courage que tu m'as donné... Infiniment merci pour tout !*

*Enfin je tiens à remercier du fond du cœur mon Papa, je n'aurais jamais les mots suffisants... Merci de m'avoir poussé à aller plus loin, merci d'avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui. Merci d'être toujours auprès de moi.*

## *Publications*

---

1. **C. Mast**, C. Joly, I. Savary-Auzeloux, D. Rémond, D. Dardevet, I. Papet (2014). Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol (acetaminophen) when glutathione-dependent detoxification is highly activated. *Journal of Physiology and Pharmacology*. October 2014, Vol. 65, No 5.
2. **C. Mast**, B. Lyan, C. Joly, D. Centeno, F. Giacomoni, J-F. Martin, L. Mosoni, D. Dardevet, E. Pujos-Guillot, I. Papet. Assessment of protein alterations in liver of rats under chronic treatment with paracetamol (acetaminophen) using two complementary mass spectrometry-based metabolomic approaches. *Soumis (Journal of Proteomics)*
3. **C. Mast**, I. Savary-Auzeloux, D. Rémond, C. Pouyet, D. Centeno, G. Voyard, L. Combaret, D. Dardevet, I. Papet. Loss of muscle mass and decreased protein synthesis in long-term therapeutic paracetamol (acetaminophen) treatment in old rats. *En cours de soumission (Journals of Gerontology-Serie A)*
4. **C. Mast**, C. Pourpe, I. Savary-Auzeloux, D. Rémond, C. Migne, D. Centeno, G. Voyard, D. Dardevet, I. Papet. Nutritional cysteine supplementation prevents glutathione alterations and loss of muscle mass in aged rats chronically treated with paracetamol. *En préparation*

## *Communications en congrès*

---

### **Communication orales :**

1. **Mast C.**, Centeno D., Pouyet C., Dardevet D., Papet I. (2013). Le traitement par cures au paracétamol induit une réduction de la masse et de la synthèse des protéines musculaires chez le rat âgé. *11<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Nutrition*, Bordeaux, France.
2. **Mast C.**, Joly C., Glomot F., Lhoste P., Dardevet D., Papet I. (2012). Le traitement au paracétamol induit des perturbations du statut en glutathion dans les tissus autres que le foie chez le rat. *10<sup>ème</sup> Journée Scientifique du CRNH Auvergne*, Clermont-Ferrand, France

### **Communication affichées :**

1. **Mast C.**, Joly C., Glomot F., Lhoste P., Dardevet D., Papet I. (2013) Le traitement au paracétamol induit des perturbations du statut en glutathion dans les tissus autres que le foie chez le rat. *Journée de l'École Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement*, Clermont-Ferrand, France.
2. **Mast C.**, Joly C., Martin JF., Dardevet D., Pujos-Guillot E., Papet I. (2013) The utilization of sulfur amino acid in the mercapturate pathway to detoxify maximal therapeutic dose of acetaminophen is associated with glutathione and protein homeosteny in adult rats. *Experimental Biology*, Boston, USA
3. **Mast C.**, Joly C., Glomot F., Lhoste P., Dardevet D., Pujos-Guillot E., Papet I. (2013). Analysis of post-translational modifications of rat liver proteins induced by chronic paracetamol treatment using targeted and global metabolomics. *2<sup>nd</sup> International Congress of Translational Research in Human Nutrition*, Clermont- Ferrand, France.
4. **Mast C.**, Joly C., Glomot F., Lhoste P., Dardevet D., Papet I. (2012) Le traitement au paracétamol induit des perturbations du statut en glutathion dans les tissus autres que le foie chez le rat. *10<sup>èmes</sup> Journées Francophones de Nutrition*, Lyon, France

---

<i>Introduction générale</i> .....	1
<i>Etude bibliographique</i> .....	3
<b>Chapitre I: Le muscle : Physiologie, métabolisme et évolution au cours du vieillissement</b> .....	<b>4</b>
1. Le muscle squelettique : Structure, Métabolisme & Fonctions.....	4
a. Structure du muscle .....	4
i. Généralités .....	4
ii. Types de fibres.....	5
b. Renouvellement protéique musculaire .....	6
i. Synthèse.....	7
ii. Dégradation .....	7
c. Contrôle de la masse cellulaire.....	9
i. Apoptose ou mort cellulaire programmée .....	9
ii. La régénération cellulaire .....	10
d. Aspects fonctionnels et métaboliques du muscle squelettique.....	11
i. Propriétés contractiles.....	11
ii. Réservoir d'acides aminés .....	12
iii. Rôle dans l'homéostasie glucidique .....	12
iv. Métabolisme lipidique .....	12
2. Le vieillissement musculaire : la sarcopénie .....	13
a. La sarcopénie : définition & prévalence.....	14
i. La sarcopénie : une définition difficile.....	14
ii. Vieillesse de la population .....	15
iii. Epidémiologie et prévalence de la sarcopénie.....	16
iv. Vieillesse & syndrome de fragilité.....	16
b. Les multiples conséquences du vieillissement musculaire.....	18
i. Sur la perte de masse musculaire & la structure.....	18
ii. Sur la fonctionnalité musculaire .....	19
iii. Sur le renouvellement protéique musculaire .....	19
3. Sarcopénie : Mécanismes en causes & Stratégies thérapeutiques potentielles.....	20
a. Modulations nutritionnelles.....	20
i. Quantité & qualité des apports protéiques.....	20
ii. Rythme d'apport, vitesse de digestion et notion de seuil anabolique.....	21
iii. Extraction splanchnique .....	22
b. Perturbations Hormonales .....	23
i. Insuline .....	23
ii. Hormones sexuelles .....	23
iii. Hormone de croissance.....	24
c. Implication du stress oxydant .....	24
i. Stress oxydant & mitochondries.....	24
ii. Stress oxydant & vieillissement .....	25
iii. Stress oxydant, vieillissement & métabolisme protéique musculaire .....	25
iv. Stress oxydant, vieillissement & jonction neuro-musculaires.....	26
d. Implication de l'inflammation .....	27
i. Inflammation à bas bruit.....	27
ii. Inflammation aiguë.....	28
e. Rôle de l'inactivité et de l'activité physique .....	28
i. Inactivité .....	28

ii.	Rôle de l'exercice .....	29
f.	Autres mécanismes mis en jeu.....	30
<b>Chapitre II: Vieillessement &amp; Acides Aminés Soufrés : cas de la cystéine.....</b>		<b>32</b>
1.	Les acides aminés soufrés : .....	32
2.	Besoin, sources et renouvellement des acides aminés soufrés .....	33
a.	Besoin en acides aminés soufrés chez l'homme.....	33
b.	Sources d'acides aminés soufrés .....	33
c.	Biodisponibilité .....	34
d.	Renouvellement des acides aminés soufrés.....	34
3.	Métabolisme de la Méthionine .....	35
a.	La transméthylation: de la méthionine à l'homocystéine.....	35
b.	La transsulfuration : de l'homocystéine à la cystéine.....	37
4.	Métabolisme de la Cystéine.....	37
a.	Synthèse du glutathion.....	38
i.	Le glutathion.....	38
ii.	Rôle du glutathion .....	38
iii.	Synthèse et dégradation du glutathion.....	39
iv.	Transport extracellulaire du glutathion.....	40
b.	Oxydation de la Cys : synthèse de taurine, pyruvate et sulfite.....	42
c.	Désulfuration de la cystéine : synthèse de pyruvate et sulfure d'hydrogène.....	43
5.	Acides aminés soufrés et détoxification hépatique.....	44
a.	Rôle du glutathion dans la détoxification.....	45
b.	Rôle du sulfate dans la détoxification.....	45
6.	Régulations & altérations du métabolisme des acides aminés soufrés.....	46
a.	Effet du stress oxydant (inflammation et sepsis).....	46
i.	Sur le métabolisme de la méthionine.....	46
ii.	Sur le métabolisme de la cystéine.....	46
iii.	Sur le métabolisme du glutathion .....	47
b.	Effet de l'apport alimentaire protéique.....	47
i.	Sur le métabolisme de la méthionine.....	47
ii.	Sur le métabolisme de la cystéine.....	48
iii.	Sur le métabolisme du glutathion .....	49
c.	Effets du vieillissement .....	50
i.	Effets du vieillissement sur le métabolisme des acides aminés soufrés .....	50
ii.	Sur la concentration & l'équilibre redox du glutathion.....	50
<b>Chapitre III: Vieillessement &amp; médication : cas du paracétamol .....</b>		<b>52</b>
1.	Prescription et recommandations.....	52
a.	Prescription.....	52
b.	Posologie .....	53
c.	Controverse sur la dose maximale autorisée .....	53
2.	Mécanismes d'action du paracétamol.....	54
a.	Mode d'action du paracétamol : effet antalgique .....	54
i.	Inhibitions des cyclooxygénases .....	54
ii.	Voies sérotoninergiques .....	55
iii.	Système des endocanabinoïdes.....	55
iv.	Oxyde d'azote.....	56
b.	Mode d'action du paracétamol : effet antipyrétique.....	56
3.	Métabolisme de détoxification du paracétamol.....	56
a.	Métabolisme hépatique de détoxification.....	57



i.	Sulfatation.....	57
ii.	Glucuronidation.....	57
iii.	Métabolisme via le cytochrome P450.....	58
b.	Régulation du métabolisme hépatique de détoxification.....	59
i.	Sulfatation.....	59
ii.	Glucuronidation.....	59
c.	Métabolisme de détoxification extra-hépatique.....	60
d.	Transport et élimination rénale.....	60
4.	Toxicité & autres effets du paracétamol.....	61
a.	Dose toxique.....	61
b.	Mécanismes de la toxicité.....	61
i.	Toxicité hépatique.....	61
ii.	Toxicité rénale.....	62
c.	Marqueurs de toxicité.....	63
i.	Transaminases.....	63
ii.	Adduits protéiques.....	63
d.	Antidote.....	64
e.	Effet anti-inflammatoire du paracétamol.....	65
5.	Paracétamol & vieillissement.....	65
a.	Prévalence & chronicité des douleurs.....	65
b.	Recommandations pour la prise en charge de la douleur.....	66
i.	Recommandations.....	66
ii.	Prévalence des traitements au paracétamol.....	67
iii.	Etudes sur les conséquences du paracétamol chez le sujet âgé.....	67
6.	Paracétamol & masse musculaire.....	67
7.	Paracétamol & acides aminés soufrés.....	69
	<b>Conclusion générale.....</b>	<b>71</b>
	<b>Objectif et stratégie expérimentale de la thèse.....</b>	<b>72</b>
	<b>Résultats expérimentaux.....</b>	<b>76</b>
	<b>Expérience 1 :.....</b>	<b>77</b>
	<b>Publication n°1.....</b>	<b>78</b>
	<b>Publication n°2.....</b>	<b>88</b>
	<b>Expérience 2 :.....</b>	<b>128</b>
	<b>Données préliminaires.....</b>	<b>129</b>
	<b>Publication n°3.....</b>	<b>132</b>
	<b>Données complémentaires.....</b>	<b>153</b>
	<b>Expérience 3:.....</b>	<b>157</b>
	<b>Expérience 4 :.....</b>	<b>163</b>
	<b>Publication n°4.....</b>	<b>164</b>
	<b>Discussion générale.....</b>	<b>181</b>
1.	Aspects méthodologiques.....	182
a.	Administration du paracétamol dans le régime.....	182
i.	Choix du mode d'administration.....	182
ii.	Variabilité du modèle : Effet sur la prise alimentaire.....	182
iii.	Avantages du modèle expérimental.....	184
b.	Analyse des altérations protéiques liées au traitement.....	184
2.	Mise en évidence de la fonte musculaire et de l'aggravation de la sarcopénie induite par le paracétamol.....	185

a.	Perte de masse musculaire chez le rat adulte.....	185
b.	Aggravation de la sarcopénie chez le rat âgé et mécanismes en cause .....	186
3.	Importance de l'apport protéique et de la cystéine.....	188
a.	Importance de l'apport protéique .....	188
b.	Importance de la cystéine .....	190
	<b>Conclusion générale et Perspectives de la thèse.....</b>	<b>192</b>
	<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b><i>193</i></b>

## *Liste des abréviations*

---

4E-BP1 : Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1

AA : Acide aminé

AAI : Acides aminés indispensables

AAS : Acides aminés soufrés

ABC : ATP-binding cassette

AG : Acides gras

AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALT : Alanine aminotransférase

AM404 : Acide gras *N*-arachidonoylphénolamine

APS : Adénosine phosphosulfate

ARN : Acide ribonucléique

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

AST : Aspartate aminotransférase

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma-2

BIA : Impédancemétrie

CBS : Cystathionine  $\beta$  synthase

CDO : Cystéine dioxygénase

COX : Cyclooxygénases

CRM : Caloric restriction mimetics

CSA : Cystéinesulfinate

CSD : Cystéinesulfinate decarboxylase

CSE : Cystathionine  $\gamma$  liase

CT : Tomodensitométrie

CYP : Cytochrome P

Cys : Cystéine

CySS : Cystine

CySSH : Thiocystéine

Cysta : Cystathionine

DXA : Absorptiométrie par rayons X

eIF2 : Eukariotic translation initiation factor 2  
eIF4E : Eukaryotic translation initiation factor 4E  
EROs : Espèces réactives de l'oxygène  
EWGSOP : European Working Group on Sarcopenia in Older People  
FAAH : Fatty acid amine hydrolase  
FAT/CD36 : Fatty Acid Translocase/cluster of differentiation 36  
FATP4 : Fatty Acid Transport Protein  
FDA : Food and Drug Administration  
FSR : Taux de synthèse fractionnaire  
GCL :  $\gamma$ -glutamate cystéine ligase  
GFST : Gérontopôle Frailty Screening Tool  
 $\gamma$ GT :  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase  
GH : Hormone de croissance  
GLUT : Glucose transporteur  
GP : Glutathion peroxydase  
GR : Glutathion réductase  
GS : Glutathion synthétase  
GRX : Glutaredoxine  
GSH : Glutathion  
GSSG : Glutathion oxydé  
GST : Glutathion-S-transférase  
Hcy : Homocystéine  
Htau : Hypotaurine  
IGF-1 : Insulin growth factor 1  
IL : Interleukine  
IRM : Imagerie par résonance magnétique  
MAPK : Mitogen-activated protein kinase  
MAT : Methionine-S-adenosyl-transferase  
MEC : Matrice extracellulaire  
Met : Méthionine  
MRP : Multidrug resistance associated protein  
mTOR : Mammalian target of rapamycin  
NAC : *N*-acétylcystéine  
NAPQI : *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine

NK : Natural killer  
NO : Oxyde d'azote  
OATP : Organic anion transporter polypeptides  
ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite  
PAPS : 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate  
PG : Prostaglandines  
PI3-K : Phosphatidylinositol-3-kinase  
p70S6K : p70S6kinase  
S-OH : Acide sulfénique  
S-O2H : Acide sulfinique  
S-O3H : Acide sulfonique  
SAH : S-Adenosylhomocystéine  
SAM : S-Adosylmethionine  
SOD : Superoxyde dismutase  
S6K1 : Ribosomal protein S6 kinase of 70 kDa  
Tau : Taurine  
THF : N<sup>5</sup>-méthyl- tetrahydrofolate  
TNF : Tumor necrosis factor  
TRX : Thioredoxine  
Ub : Ubiquitine  
UDPGA : UDP-glucuronique  
UGT : UDP-glucuronosyltransferase  
UPS : Ubiquitine protéasome dépendant système

## *Liste des illustrations*

---

### ○ Figures

**Figure 1:** Pyramide des âges au 1<sup>er</sup> janvier 2014 et projection 2050 en France.

**Figure 2:** Nombre de personnes âgées de 60, 75 et 85 ans ou plus selon les hypothèses de mortalité.

**Figure 3:** Evolution de la composition corporelle au cours du vieillissement.

**Figure 4 :** Structure du muscle squelettique.

**Figure 5 :** Schéma général du métabolisme protéique au niveau corps entier chez l'homme.

**Figure 6 :** Schéma de la voie de signalisation mTOR-S6K1.

**Figure 7 :** Schéma des différentes voies lysosomales impliquées dans la dégradation des protéines musculaires.

**Figure 8 :** Schéma du système protéolytique ubiquitine-protéasome dépendant impliqué dans la dégradation des protéines contractiles musculaires.

**Figure 9 :** Les quatre voies protéolytiques connues et leur coopération dans la dégradation des protéines musculaires.

**Figure 10 :** Principaux facteurs impliqués dans les voies de signalisation intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.

**Figure 11 :** Schéma de la structure du sarcomère et de ses principaux composants au sein de la myofibre.

**Figure 12 :** La contraction et relaxation musculaire, illustration de la théorie des « filaments glissants ».

**Figure 13 :** Utilisations non protéinogènes des acides aminés. Les acides aminés dit glucogéniques sont en bleu et les cétogéniques en rouge.

**Figure 14 :** Population mondiale, 1950-2100 en fonction des différentes projections.

**Figure 15 :** Projections de l'évolution de la population par classe d'âge de 2010 à 2100 pour les Etats-Unis et la France.

**Figure 16:** Projections de l'évolution de la population et de la dépendance liée à l'âge d'ici à 2100, au niveau mondial, américain et français.

**Figure 17 :** Coupe transversale représentative de la partie supérieure de la cuisse d'un jeune adulte (23 ans, A) et d'une personne âgée (71 ans, B).

**Figure 18** : Visualisation par coloration immunohistochimique de l'aire des fibres du muscle *vastus lateralis* d'un jeune adulte (23 ans, A) et d'une personne âgée (71 ans, B).

**Figure 19** : Physiopathologie de la sarcopénie.

**Figure 20** : Seuil anabolique et de altération de l'anabolisme protéique musculaire post-prandial.

**Figure 21** : Schéma des modifications de la réponse postprandiale anabolique musculaire en réponse au repas conduisant à l'élévation du seuil anabolique.

**Figure 22** : Différents facteurs responsables de la baisse des apports et de l'augmentation des besoins protéiques chez les personnes âgées.

**Figure 23** : Scénario possible des altérations mitochondriales pouvant conduire à l'atrophie musculaire lors du vieillissement.

**Figure 24** : Mécanismes d'action de différents agents nutritionnels potentiellement responsables de la sarcopénie.

**Figure 25** : Structure des 4 acides aminés sulfurés de l'organisme, (méthionine, homocystéine, cystéine, taurine) et de leurs intermédiaires métaboliques.

**Figure 26** : Schéma général du métabolisme de la méthionine.

**Figure 27** : Les trois voies principales du métabolisme de la méthionine.

**Figure 28** : Voie de la transsulfuration conduisant à la dégradation de l'homocystéine et la synthèse de la cystéine.

**Figure 29** : Synthèse du glutathion.

**Figure 30** : Synthèse et transport intra- et extracellulaire du glutathion.

**Figure 31** : Voies de synthèse, régénération et utilisation du glutathion.

**Figure 32** : Rétrocontrôle de la synthèse du glutathion.

**Figure 33** : Cycle  $\gamma$ -glutamyl du glutathion.

**Figure 34** : Voies métaboliques de la cystéine : synthèse du glutathion, de la taurine et molécules sulfurées.

**Figure 35** : Voies métaboliques de la cystéine conduisant à la formation d' $H_2S$  et sa conversion mitochondriale en  $SO_4^{2-}$ .

**Figure 36** : Structure chimique du paracétamol et des deux anilines dont il dérive : l'acetanilide et la phénacétine.

**Figure 37** : Synthèse des prostaglandines depuis l'acide arachidonique.

**Figure 38** : Synthèse de l'acide gras N-arachidonoylphénolamine (AM404) depuis le paracétamol (Acétaminophène).

**Figure 39** : Métabolisme hépatique complet du paracétamol.

**Figure 40** : Structure de l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS ou 'sulfate activé'). Le sulfure entouré en jaune sera transféré sur le paracétamol lors de la sulfatation.

**Figure 41** : Réaction de synthèse de l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS ou 'sulfate activé') et de sulfatation du paracétamol.

**Figure 42** : Structure de l'acide UDP-glucuronique (UDPGA).

**Figure 43** : Voie de détoxification du paracétamol conduisant à la formation du N-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) puis d'acide mercapturique.

**Figure 44** : Les différents transporteurs des conjugués du paracétamol.

**Figure 45** : Mécanismes conduisant à l'hépatotoxicité liée au paracétamol.

**Figure 46** : Rôle de la N-acétylcystéine dans la prévention de l'hépatotoxicité due à une overdose de paracétamol.

**Figure 47** : Schéma récapitulatif des expériences de la thèse

○ **Tableaux**

**Tableau 1** : Définitions et critères de diagnostic de la sarcopénie suggérés par plusieurs groupes provenant des Etats Unis et de l'Europe.

**Tableau 2** : Hétérogénéité des données concernant l'âge d'apparition, la prévalence et la vitesse d'évolution de la sarcopénie.

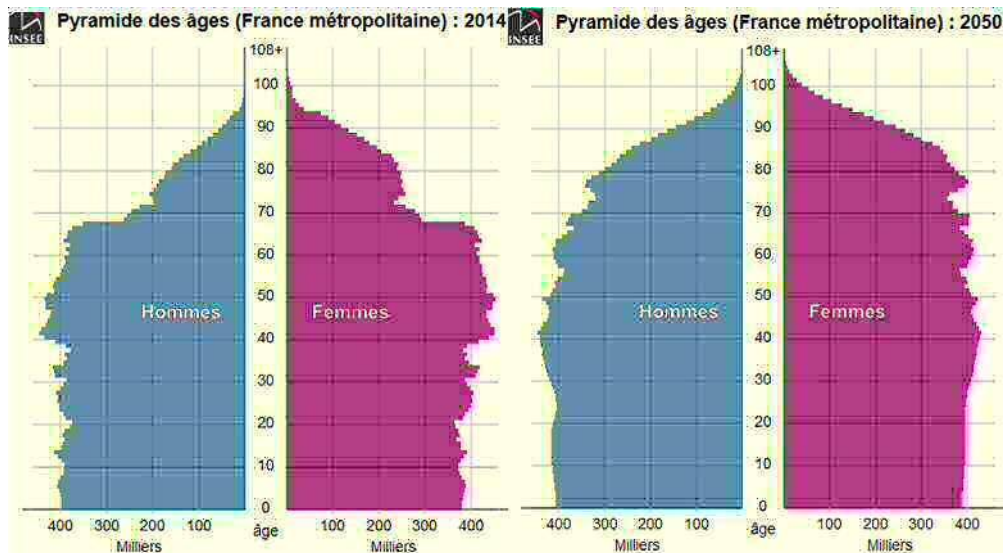
**Tableau 3** : Guide pour des apports protéiques journaliers optimaux et recommandations concernant l'exercice physique journalier chez les personnes âgées à partir de 65 ans.

**Tableau 4** : Prévalence des douleurs chroniques chez les personnes âgées (France, Europe, USA)

**Tableau 5** : Bilan des principaux résultats obtenus au cours de la thèse sur la masse musculaire.

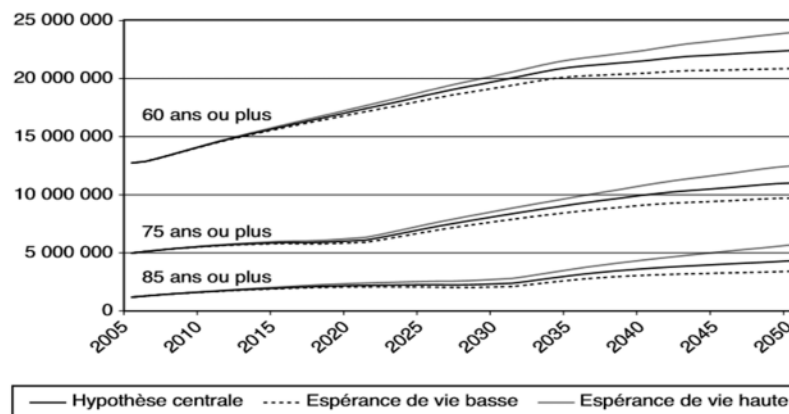






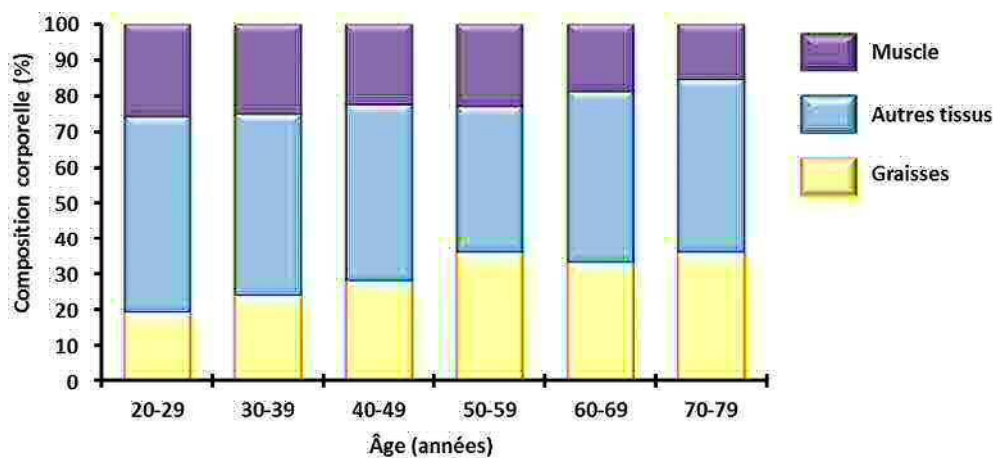
**Figure 1:** Pyramide des âges au 1<sup>er</sup> janvier 2014 et projection 2050 en France.

Source : Insee, « *Estimations de population* » (résultats arrêtés fin 2013).



**Figure 2:** Nombre de personnes âgées de 60, 75 et 85 ans ou plus selon les hypothèses de mortalité.

Source : Insee, « *Projections de population 2005-2050* ».



**Figure 3:** Evolution de la composition corporelle au cours du vieillissement.

Adapté de : Cohn *et al.*, 1980

## *Introduction générale*

---

La population âgée est en constante augmentation dans les pays industrialisés. Alors que les personnes âgées ( $\geq 65$  ans) ne représentaient que 8% de la population en 1950, elles en représentent 18% en 2014 et selon les prévisions devraient atteindre 22% en 2050 (**Figure 1**). Les 75 ans et plus représentent aujourd'hui 6 millions de personnes et en représenteraient 10,9 millions en 2050 et les plus de 85 ans 4,1 millions de personnes (**Figure 2**).

L'avancée en âge est caractérisée par un déclin de nombreuses fonctions physiologiques qui s'accompagne de modifications de la composition corporelle. Le plus important de ces changements est sans doute le déclin de la masse maigre, au profit de la masse grasse (**Figure 3**). Cette perte de masse maigre est majoritairement due à une perte de masse musculaire. Les nombreuses études réalisées sur la prévalence et la vitesse de cette perte montrent que globalement, l'homme perd 1 à 2% de masse musculaire par an au-delà de 50 ans. Ainsi, vers 80 ans il a perdu environ 50% de la masse musculaire qu'il possédait à 30 ans. Cette diminution de masse est associée à une perte de force et de fonctionnalité musculaire appelée sarcopénie. Sa progression se traduit par une augmentation du risque de chutes, une progressive incapacité à effectuer les tâches de la vie quotidienne, une perte d'autonomie, et conduit finalement à une réduction de l'espérance de vie.

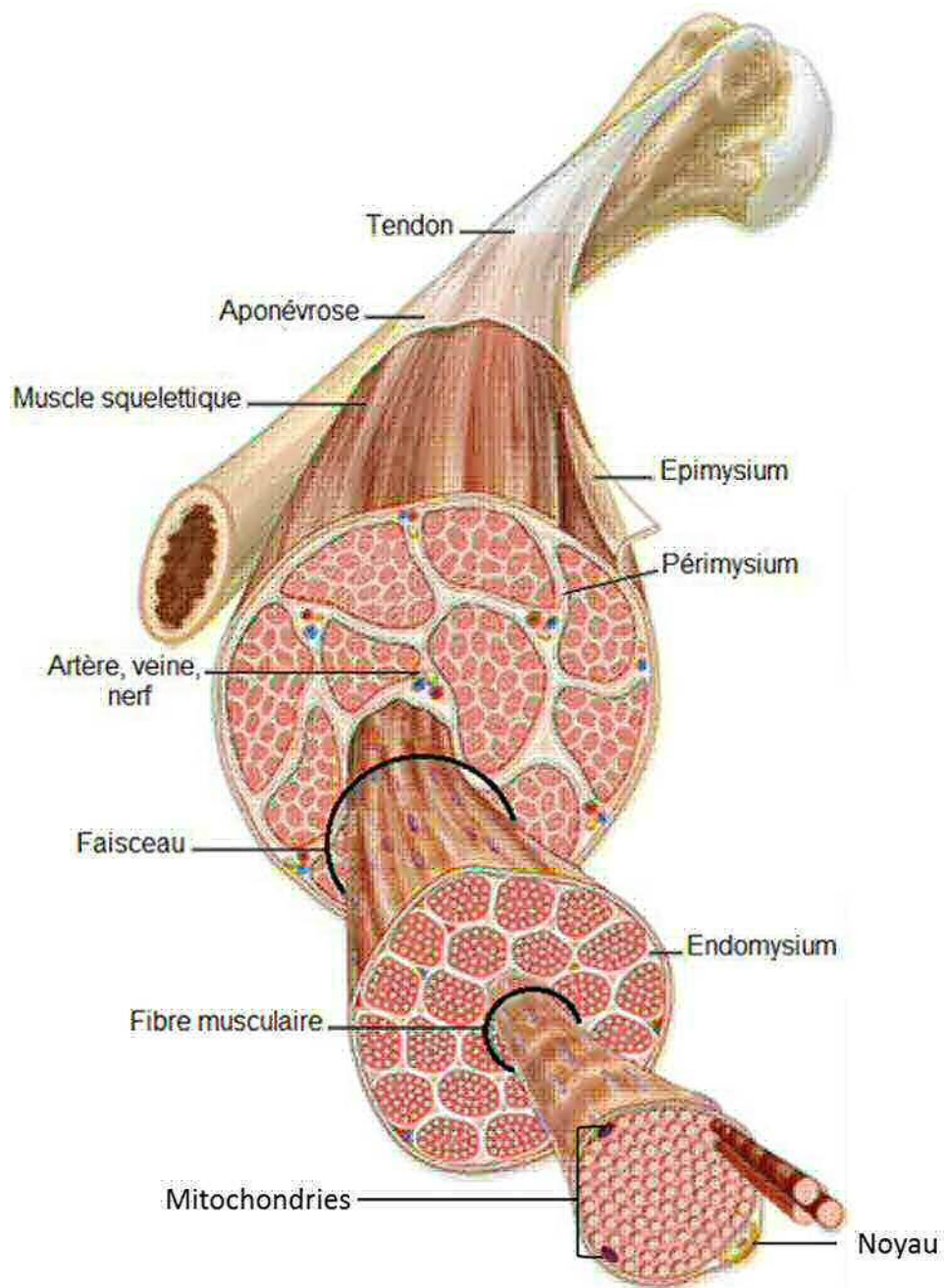
Le muscle représente environ 40% des protéines de l'organisme. Hors son rôle fonctionnel, il possède un rôle majeur de réservoir d'acides aminés mobilisables par l'organisme en cas d'agressions d'ordre nutritionnel, infectieux ou traumatique. L'atrophie musculaire chez la personne âgée est donc responsable à la fois d'une réduction de la mobilité, mais aussi d'une moindre capacité de réponse aux agressions et ainsi d'une augmentation de nombreuses pathologies. La sarcopénie est un phénomène complexe et multifactoriel dont les causes et les mécanismes ne sont pas encore clairement identifiés.

L'apparition de pathologies avec le vieillissement conduit à une augmentation de la médication et donc des coûts de soin et de santé publique. Parmi ces pathologies, les altérations du système musculo-squelettique, telles que l'arthrose et les lombalgies sont fortement présentes. Ces pathologies génèrent des douleurs chroniques dont la prévalence est forte dans la population âgée. Le traitement de ces douleurs est primordial car leur non prise en charge conduit à un risque accru de dépression, une altération de l'activité physique et du sommeil, une augmentation des chutes et de la malnutrition et donc une qualité de vie diminuée. La première recommandation pour la prise en charge de ces douleurs est la médication. Cependant, bien que la médication soit fortement présente dans la population

âgée et qu'elle soit reconnue comme un facteur de risque en termes de dénutrition, de fragilité et de sarcopénie, elle a été peu étudiée. Dans ce cadre, le travail de cette thèse a porté sur le paracétamol, antalgique recommandé en première intention pour le soulagement des douleurs chroniques, notamment chez les personnes âgées.

L'étude bibliographique présentée en première partie de ce travail permet de résumer l'état des connaissances sur le métabolisme musculaire, en lien avec la sarcopénie et sa physiopathologie. Elle fait un bilan sur le rôle spécifique des acides aminés soufrés, à la fois au niveau de la sarcopénie via leur rôle capital dans la défense contre le stress oxydant, mais aussi dans le métabolisme de détoxification du paracétamol. Cet antalgique, le plus prescrit et consommé en Europe et aux Etats-Unis, fait l'objet de la dernière partie de cette bibliographie. Elle s'attache en particulier à son lien avec le métabolisme des acides aminés soufrés. La seconde partie de ce manuscrit est consacrée à la présentation de la stratégie expérimentale développée durant cette thèse ainsi que des résultats obtenus, présentés sous formes d'une publication, trois articles en préparation ainsi que des données complémentaires non publiées. La troisième partie est consacrée à la discussion générale de ces résultats suivie d'une conclusion et des perspectives de la thèse.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



**Figure 4** : Structure du muscle squelettique.

D'après: Bannister, 1989, "Gray's Anatomy". Thirty-seventh edition. Churchill Livingstone

# *Chapitre I: Le muscle : Physiologie, métabolisme et évolution au cours du vieillissement*

---

Le tissu musculaire est le plus abondant de l'organisme, en effet chez l'homme à l'âge adulte il représente en moyenne 40-50% de la masse corporelle. Il joue un rôle primordial, autant en termes de locomotion que de métabolisme. Le maintien de la masse musculaire repose sur un équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines musculaires, deux processus complexes et finement régulés. Un déséquilibre en faveur de la synthèse conduit à l'hypertrophie musculaire, alors qu'une balance en faveur de la dégradation conduit à l'atrophie musculaire. Avec l'avancée en âge, l'accumulation de dysfonctionnements métaboliques et d'épisodes de stress conduit à un déséquilibre de cette balance en faveur d'une perte progressive de la masse musculaire.

## 1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE : STRUCTURE, METABOLISME & FONCTIONS

### a. STRUCTURE DU MUSCLE

#### *i. GENERALITES*

Le muscle strié squelettique est constitué de faisceaux musculaires, de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et de fibres nerveuses. Les fibres musculaires sont caractérisées par un aspect en longs fuseaux ainsi qu'une plurinucléation périphérique, plusieurs centaines de noyaux aplatis accolés à la membrane sarcoplasmique (sarcolemme). Ces fibres ont un diamètre de 5 à 100  $\mu\text{m}$  et une longueur pouvant aller de 1 mm à plusieurs centimètres. Parallèles les unes aux autres, elles sont regroupées en un faisceau entouré de tissu conjonctif (périmysium). Chaque fibre est elle-même entourée de tissu conjonctif (endomysium) et composée de myofibrilles qui occupent presque la totalité du volume cellulaire (Turrina *et al.*, 2013) (**Figure 4**). Les myofibrilles sont des structures très organisées de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre, composées d'une part de protéines contractiles, dont les représentants majeurs sont l'actine et la myosine et d'autre part, de protéines responsables de l'architecture, de l'élasticité et de l'intégrité du tissu musculaire. Un autre composé important des myofibrilles est le réticulum endoplasmique qui permet de stocker et libérer le calcium (Al-Qusairi & Laporte, 2011). Il est impliqué dans la transmission du signal nerveux *via* la jonction neuromusculaire. La libération du calcium déclenche la contraction musculaire, sa recapture conduisant au

relâchement musculaire. Le sarcolemme entoure le réticulum endoplasmique et possède une zone particulière spécialisée : la jonction neuromusculaire ou plaque motrice. Il s'agit d'une synapse permettant le contact entre la fibre nerveuse et le muscle (Takamori, 2012). L'innervation du muscle est déterminante pour son activité et sa fonctionnalité et elle est découpée en unités motrices. Chaque unité comprend un seul motoneurone dont le corps est situé dans la moelle épinière et le prolongement innerve plusieurs fibres musculaires. Une unité est composée du motoneurone et de toutes les cellules qu'il innerve. On distingue deux types d'unités motrices, les lentes et les rapides, ceci dépendant des propriétés à la fois du motoneurone et des fibres qu'il innerve (Clamann, 1993).

La matrice extracellulaire (MEC) est composée majoritairement de tissu conjonctif et d'un grand nombre de protéines différentes telles que le collagène et l'élastine. La MEC entoure chaque cellule et est aujourd'hui reconnue comme ayant un rôle actif en plus de son rôle structurel, en particulier dans le développement et la régénération (Sanes, 2003). Elle intervient dans de nombreuses fonctions : elle peut lier différents facteurs externes comme les facteurs de croissance, elle est un déterminant de l'élasticité musculaire et de la transmission de force. De plus, l'irrigation du muscle se fait par un réseau de capillaires particulièrement dense situé au sein de la MEC.

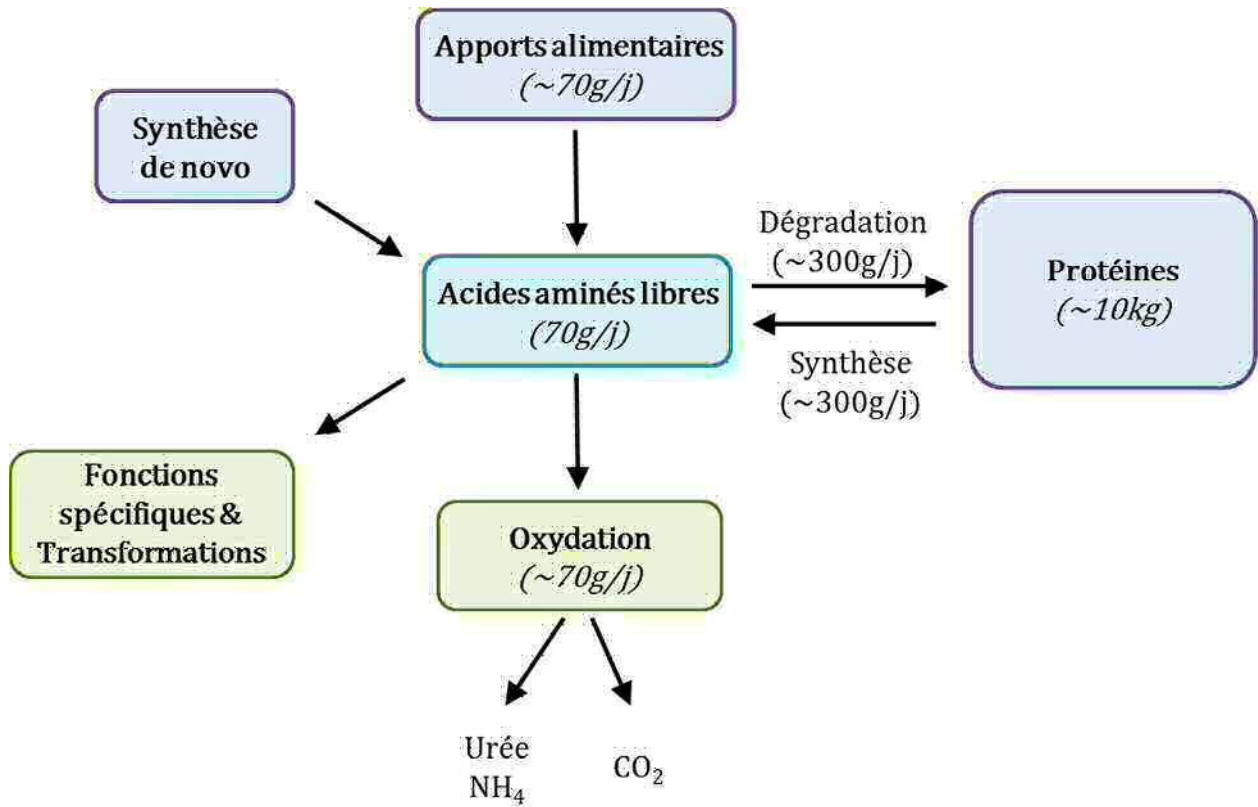
## *ii. TYPES DE FIBRES*

Il existe différents types de fibres musculaires qui sont présents en proportion variable selon le muscle et l'âge. La première classification établie se basait sur la couleur des muscles (Needham, 1926) qui corrèle avec la vitesse de contraction et la fatigabilité :

- Les muscles rouges, riches en myoglobine et en mitochondries, sont des muscles lents caractérisés par un métabolisme oxydatif et impliqués dans une activité tonique. Ce sont des muscles résistants contenant des fibres dites de type I.
- Les muscles blancs, pauvres en myoglobine et en mitochondries, sont des muscles rapides caractérisés par un métabolisme glycolytique. Ils sont impliqués dans une activité intense et sont fatigables, ce sont les fibres dites de type II.

Les techniques colorimétriques de mesure d'activité enzymatique ont permis de mettre en évidence l'existence de deux classes de fibres de type II, différentes par leur métabolisme (Close, 1967; Schiaffino *et al.*, 1970). En effet, les travaux de Brooke et Kaiser ont véritablement permis de distinguer trois types de fibres musculaires via un marquage de l'activité ATPasique (Brooke & Kaiser, 1970). Elles sont nommées I, dites « lentes oxydatives », IIA, dites « rapides oxydatives et glycolytiques », et IIB dites « rapides





**Figure 5** : Schéma général du métabolisme protéique au niveau corps entier chez l'homme.

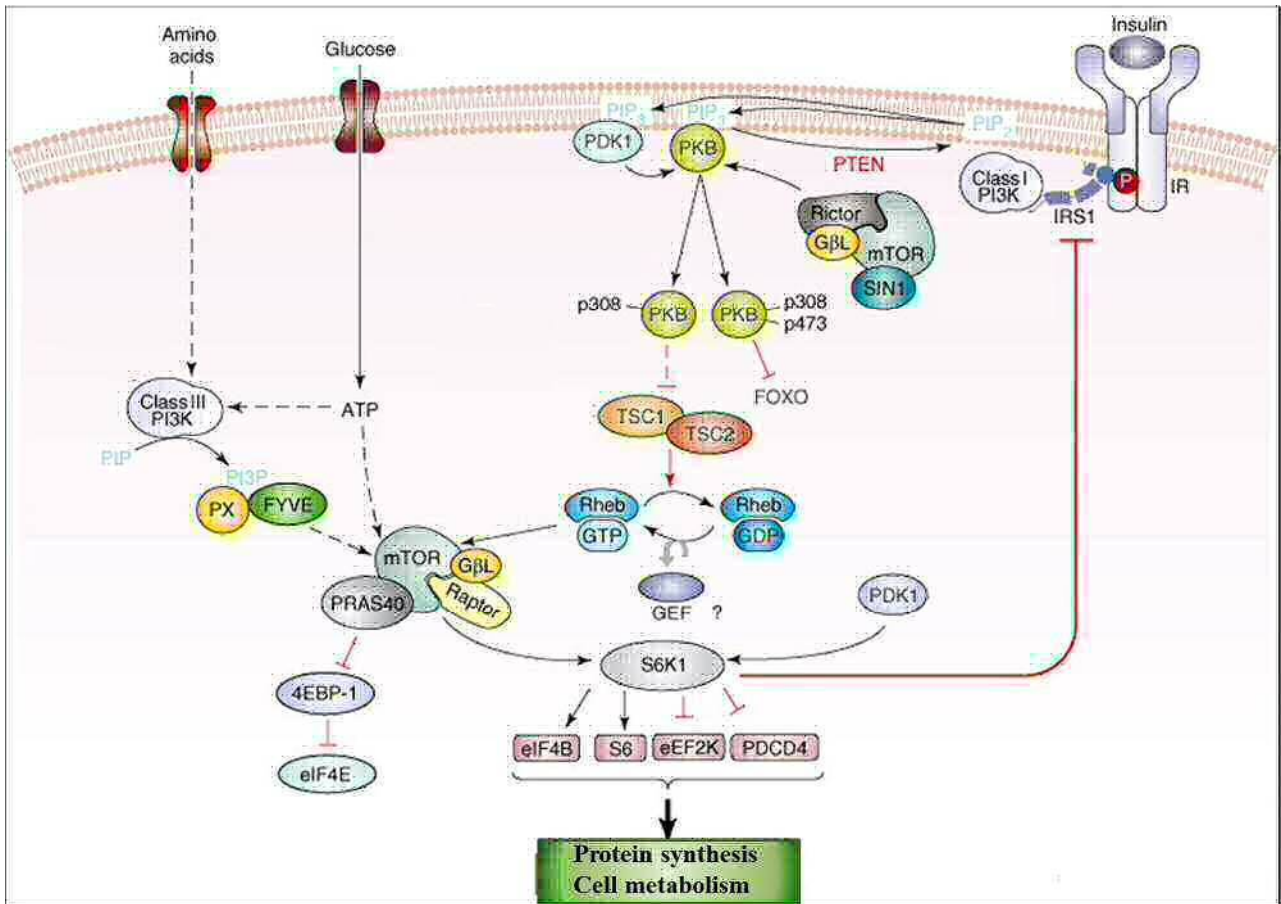
D'après : Leverve, 2001 « *Traité de Nutrition artificielle de l'adulte* » SFNEP, Ed., 2001

glycolytiques ». Jusqu'ici les fibres étaient considérées comme étant composées d'une seule isoforme de myosine. Le développement d'anticorps spécifiques a permis de mettre en évidence l'expression de différentes isoformes de myosines et la classification actuelle des fibres est basée sur l'utilisation d'anticorps spécifique des différentes isoformes de myosine. Les fibres musculaires sont classées en : type I, IIa, IIb et IIx composées respectivement de myosine lente, 2A, 2B et 2X (Greising *et al.*, 2012). Il existe des isoformes de myosine néonatale et embryonnaire qui ne s'expriment que dans les stades précoces de développement. Au cours de certaines pathologies (maladies neurodégénératives) ainsi qu'au cours du vieillissement, il a été observé une co-expression de différentes myosines (Gosselin *et al.*, 1994). Cette co-expression refléterait une reconversion des types de fibres qui est aujourd'hui connue pour avoir lieu au cours du vieillissement (*voir paragraphe 2.b p17*).

#### **b. RENOUELEMENT PROTEIQUE MUSCULAIRE**

Les protéines musculaires se renouvellent en permanence à un rythme assez lent (~2%/jour chez l'homme). Au niveau corps entier, ce sont environ 4g de protéines qui sont dégradées et resynthétisées quotidiennement par kg de masse corporelle (Mitch & Goldberg, 1996) (**Figure 5**). Le foie et l'intestin présentent un renouvellement protéique plus rapide (~25 et 40%/jour respectivement) mais pour une masse protéique plus faible. Ainsi, au regard de la masse protéique totale, le muscle contribue le plus fortement au renouvellement protéique, à hauteur de ~35% devant le foie (~28%) et le tube digestif (~20%) (Leverve, 2001).

Les taux de synthèse et dégradation protéiques sont régulés par de nombreux signaux hormonaux ainsi qu'en réponse aux signaux induits par le repas et le jeûne. En période postprandiale (consécutive au repas), les acides aminés fournis par les protéines alimentaires affluent dans le plasma. Ils vont être utilisés pour la synthèse des protéines corporelles qui vont alors être stockées. Il s'agit de l'anabolisme postprandial qui est caractérisé par une balance azotée positive. Des mesures effectuées chez le porcelet montrent que durant cette période, la rétention de l'azote ingéré au niveau des protéines corporelles est d'environ 75%, dont 10% au niveau hépatique et 31% au niveau musculaire (Bos *et al.*, 2005). A l'inverse, au cours de la période postabsorptive (éloignée du repas), les protéines corporelles sont dégradées afin d'approvisionner les tissus en acides aminés libres. Il s'agit d'une période de catabolisme caractérisée par une balance azotée négative.



**Figure 6** : Schéma de la voie de signalisation mTOR-S6K1.

mTOR existe sous forme de deux complexes distincts : mTORC1 contenant Raptor et mTORC2 contenant Rictor. La phosphorylation de S6K1 par mTORC1 permet l'activation de S6K1.

Abbreviations: eEF2K: eukaryotic elongation factor 2K ; eIF4B: eukaryotic initiation factor 4B ; FYVE: Fab1/YOTB/2K632.12/Vac1/EEA1 domain ; GEF: guanosine nucleotide exchange factor ; IRS: insulin receptor substrate; mTOR: mammalian target of rapamycin; PDCD4: programmed cell death protein 4; PI3K: phosphoinositide 3 kinase; PIP2: phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate; PIP3: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate ; PKB: protein kinase B; PRAS40: proline-rich Akt substrate 40 kDa; PX, Phox homology domain; Raptor: regulatory associated protein of mTOR; Rictor : rapamycin-insensitive companion of mTOR; S6K1: ribosomal protein S6 kinase 1; SIN1: stress-activated protein kinase interacting protein; TSC: tuberous sclerosis complex

Adapté de: Dann *et al.*, 2007

### *i. SYNTHÈSE*

La synthèse protéique permet la formation de chaînes polypeptidiques par assemblage de leur unité de base: les acides aminés. Cette synthèse a lieu dans le cytoplasme où les ARN messagers sont lus par la machinerie traductionnelle afin de traduire la protéine correspondante par assemblages d'acides aminés préalablement chargés sur des ARN de transfert (ARNt). Cette synthèse s'effectue en trois étapes :

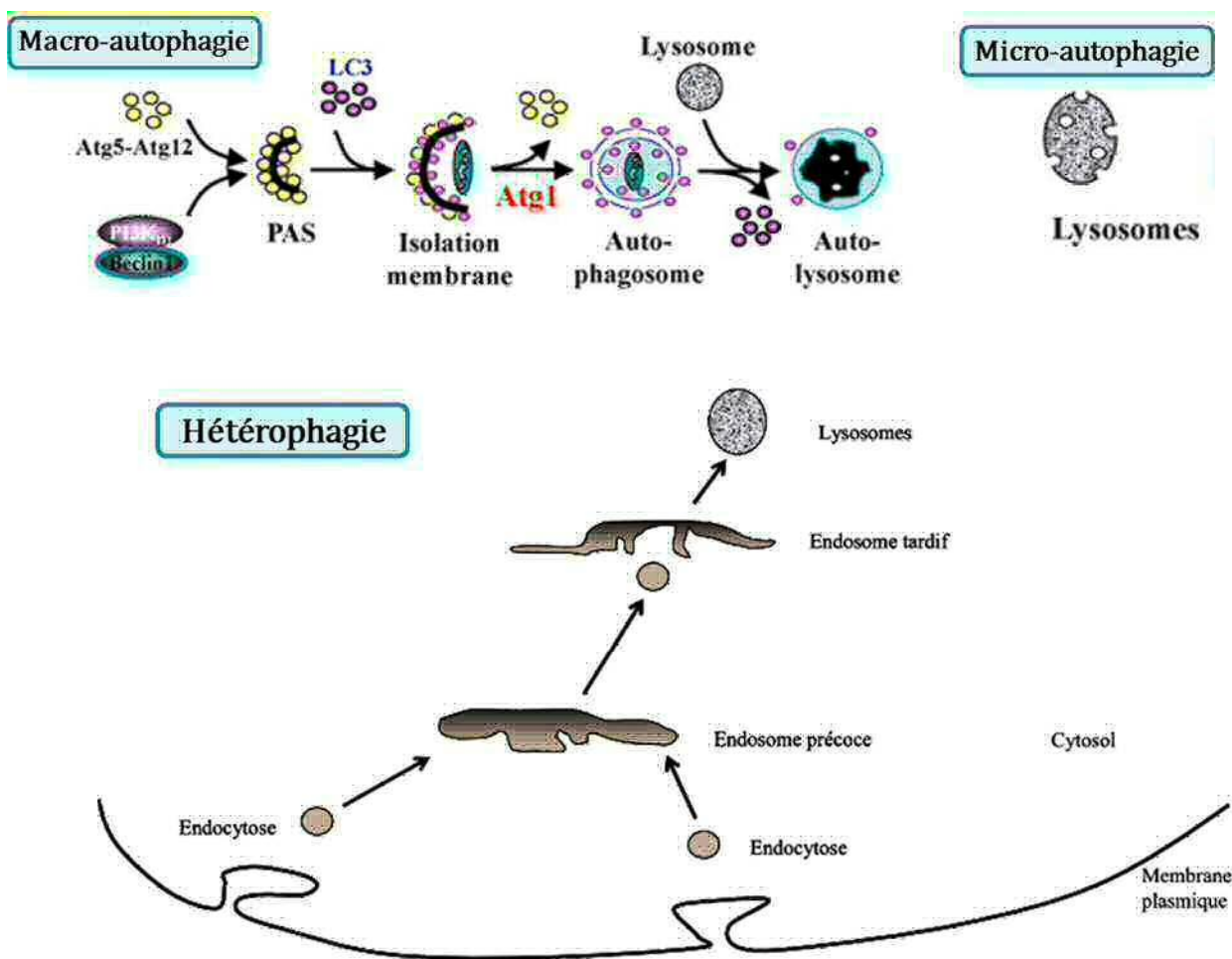
- *Initiation* : les sous-unités 40S et 60S du ribosome vont s'assembler et l'ARNt contenant la méthionine (1<sup>er</sup> AA incorporé) va être chargé.
- *Elongation* : l'ARNt contenant l'AA spécifique du codon en cours de lecture va être chargé, puis la liaison peptidique va être formée. La répétition de ce cycle conduit à la formation progressive de la chaîne polypeptidique, le ribosome avançant au fur et à mesure de la formation pour lire les codons suivants.
- *Terminaison* : la chaîne polypeptidique terminée est relâchée dans le cytoplasme où elle va subir diverses modifications post-traductionnelles nécessaires à sa fonctionnalité.

L'activité de synthèse protéique au niveau cellulaire est régulée par plusieurs voies et l'étape la plus régulée est l'étape d'initiation. Cette étape est principalement régulée par la voie Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-K)/Akt/mammalian Target Of Rapamycin (mTOR). Elle contrôle la synthèse protéique via p70S6K (p70S6kinase/S6K1), eIF4E et 4E-BP1 (Spangenburg, 2009; Sakuma *et al.*, 2014). Les protéines les plus importantes dans cette régulation sont l'eukariotic Initiation Factor-2 (eIF2), Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) et p70S6K. En fonction de leur état de phosphorylation, ces facteurs vont réguler la protéosynthèse musculaire (**Figure 6**).

### *ii. DEGRADATION*

La dégradation des protéines musculaires (protéolyse) est un processus permanent et finement régulé. Il conduit à la fourniture d'acides aminés libres pour la cellule mais aussi à la dégradation de protéines de signalisation ou de protéines altérées. Ces AA ainsi libérés pourront être recyclés pour la synthèse protéique ou utilisés à d'autres fins (*voir section d.ii p11*). A ce jour, quatre systèmes protéolytiques complémentaires ont été identifiés dans le muscle : la voie lysosomale, la voie calcium dépendante, la voie des caspases et le système ubiquitine protéasome dépendant (UPS).

- Les lysosomes sont des petits organites intracellulaires qui dégradent différentes protéines, suite à leur internalisation (Teixeira *et al.*, 2012). Cette voie est



**Figure 7 :** Schéma des différentes voies lysosomales impliquées dans la dégradation des protéines musculaires.

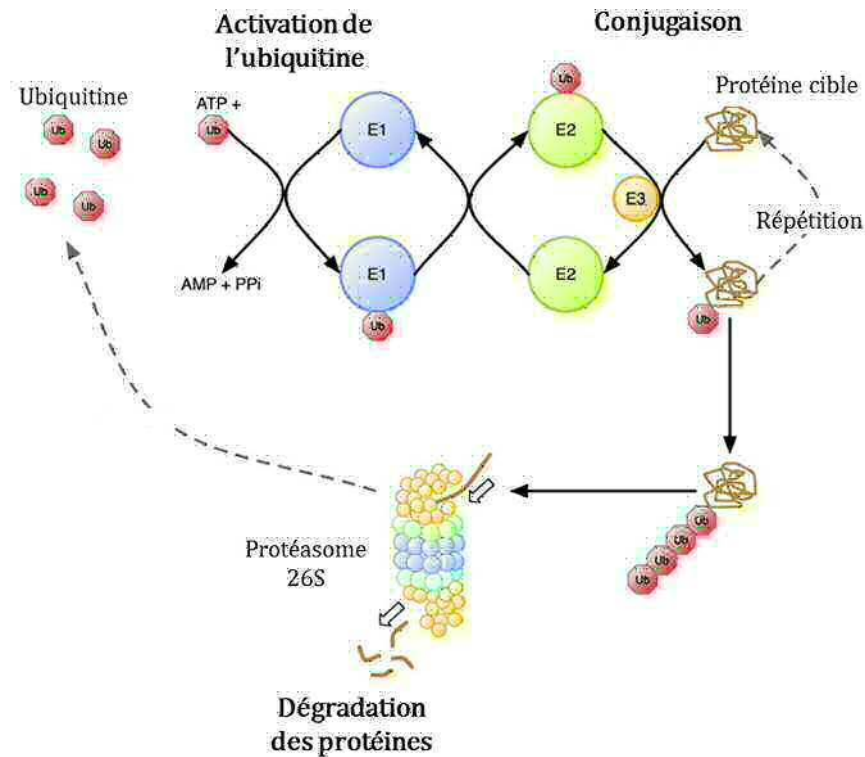
ATG : autophagy related ; LC3 : microtubule-associated protein light chain 3 ; PAS : pre-autophagosomal structure.

D'après: Bechet *et al*, 2005

préférentiellement impliquée dans la dégradation des protéines membranaires ou extracellulaires (Jackson *et al.*, 2004). Les lysosomes conduisent à la dégradation protéique selon trois voies différentes. La voie de l'autophagie est surtout induite dans des conditions de stress ou de carence en acides aminés, elle existe sous deux formes (**Figure 7**). La macro-autophagie conduit à la formation de vésicules à double membrane (phagosomes) qui capturent des constituants cytoplasmiques et la micro-autophagie est une invagination de la membrane lysosomale internalisant ainsi des portions de cytoplasme (Bechet *et al.*, 2005). L'hétérophagie quant à elle permet la dégradation de protéines extracellulaires. Ces trois voies mènent systématiquement à la fusion avec les lysosomes qui conduit à la formation d'un autolysosome assurant la dégradation des protéines grâce aux hydrolases acides (cathepsines) qu'il contient.

- La voie calcium dépendante fait intervenir les calpaïnes ( $\mu$  et  $m$ ) qui sont des cystéine-endopeptidases cytosoliques agissant à pH neutre (Goll *et al.*, 2003). Leur activité, dépendante principalement du calcium et minoritairement des phospholipides, est activée lors de dommages cellulaires (Dayton *et al.*, 1976a, 1976b). Les calpaïnes ne peuvent pas dégrader les protéines en AA ou peptides et ne sont donc pas responsables de la dégradation de l'actine et la myosine. Elles clivent les protéines d'ancrage du sarcomère, libérant ainsi les protéines du sarcomères qui seront dégradées par les autres systèmes (Huang & Forsberg, 1998). Leur activité est régulée par un inhibiteur endogène, la calpastatine (Goll *et al.*, 2003).
- Les caspases sont des cystéine-protéases qui clivent leurs substrats après un résidu aspartate. Elles sont non calcium-dépendantes et interviennent surtout dans la mort cellulaire programmée (apoptose) et sont activées lors d'atrophie musculaire. La Caspase 3 peut dégrader spécifiquement les complexes d'actine (Du *et al.*, 2004), libérant ces dernières pour être dégradées par les autres systèmes (Teixeira *et al.*, 2012).
- L'UPS quant à lui est responsable de la dégradation de nombreuses protéines de signalisation régulant de nombreux processus, tels que la prolifération et l'apoptose (Wolf & Hilt, 2004). C'est l'UPS qui est principalement impliqué dans la dégradation des protéines myofibrillaires et il est systématiquement activé en cas d'atrophie musculaire (Attaix *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2007; Polge *et al.*, 2011). Pour être dégradées par ce système, les protéines doivent tout d'abord être ubiquitinées, c'est-à-dire se voir adduire une chaîne de polyubiquitine (**Figure 8**). L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 AA dont l'ajout requiert l'intervention d'enzymes spécifiques, les enzymes « E ». L'E1 active l'Ub en présence d'ATP. L'Ub sera ensuite transférée sur une E2 (enzyme de

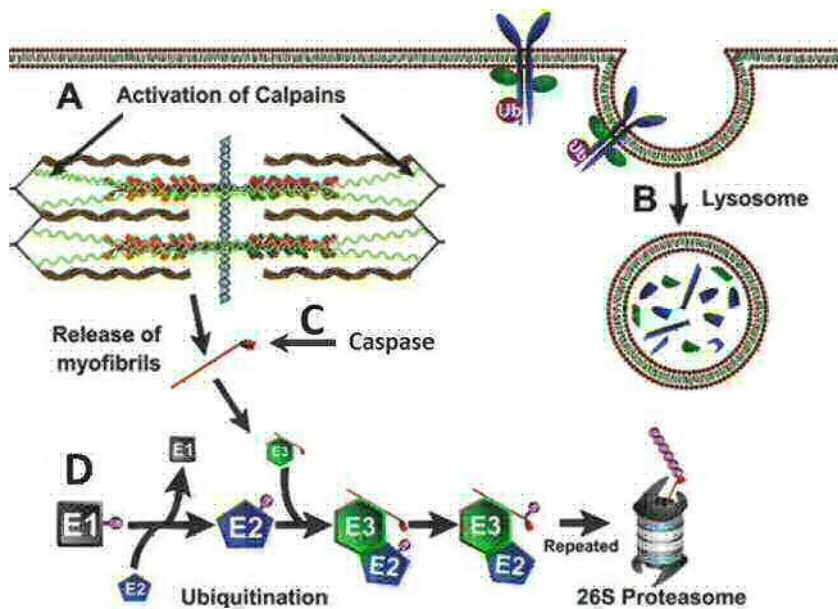




**Figure 8** : Schéma du système protéolytique ubiquitine-protéasome dépendant impliqué dans la dégradation des protéines contractiles musculaires.

ATP : Adénosine triphosphate ; AMP : Adénosine monophosphate ; E1 : enzyme d'activation ; E2 : enzyme de conjugaison ; E3 : enzyme ligase ; PPi : phosphate inorganique ; Ub : ubiquitine.

D'après: Murton *et al.*, 2008



**Figure 9** : Les quatre voies protéolytiques connues et leur coopération dans la dégradation des protéines musculaires.

A : La voie des calpaïnes. B : La voie lysosomale. C : La voie des caspases et D : la voie ubiquitine-protéasome dépendante.

D'après: Jackman & Kandarian, 2004

conjugaison). L'E2 permet, avec ou sans transfert de l'Ub sur l'E3 (enzyme ligase), de conjuguer l'Ub sur une lysine du substrat ou sur les Ubs déjà présentes. Une E3 agit de concert avec une E2, elles forment un couple qui reconnaît spécifiquement certaines protéines à dégrader. Une même E3 peut agir avec différentes E2 et inversement, et une même protéine peut être reconnue par différents couples. Ce système de reconnaissance confère à l'UPS un haut niveau de régulation des protéines à dégrader. Lorsque la chaîne d'Ub est assez longue (>4 Ub), le protéasome 26S assure la dégradation de la protéine marquée (Thrower *et al.*, 2000). Cependant pour les protéines transmembranaires une mono/bi-ubiquitination peut être observée mais celle-ci conduit à leur internalisation et leur dégradation via la voie lysosomale (Hicke, 1999).

Ces systèmes ont des spécificités différentes et sont complémentaires (**Figure 9**). Leur coopération est nécessaire en particulier pour parvenir à la dégradation des protéines myofibrillaires hautement structurées. La dégradation des protéines contractiles, actine et myosine, est assurée par la voie UPS, (Solomon & Goldberg, 1996; Morris *et al.*, 2005) qui assure quantitativement la majorité de la protéolyse musculaire, ~80% (Mitch & Goldberg, 1996; Attaix *et al.*, 1998). Cependant, son travail est impossible sans l'intervention préalable des autres systèmes protéolytiques assurant le clivage initial des protéines myofibrillaires (Morris *et al.*, 2005). Celui-ci est assuré par les voies lysosomale et calcium-dépendante qui comptent pour 10 à 20% de la protéolyse musculaire totale (Mitch & Goldberg, 1996; Attaix *et al.*, 1998). Elles permettent la déstructuration de l'architecture myofibrillaire.

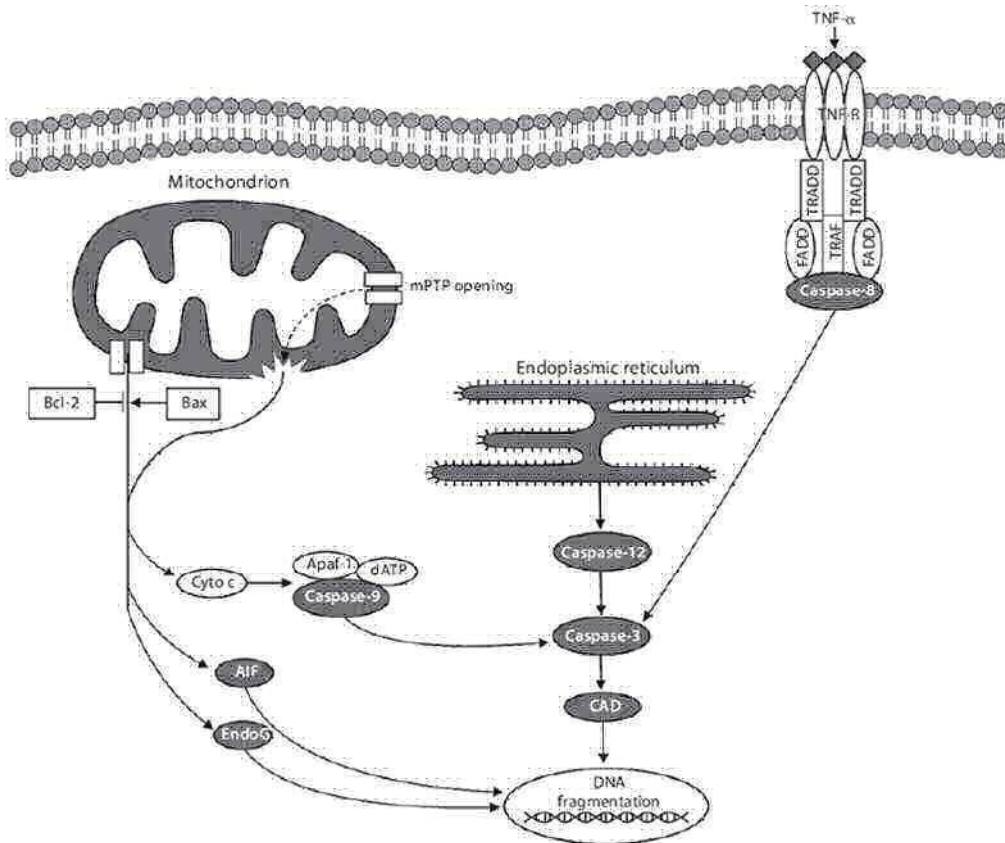
### c. CONTROLE DE LA MASSE CELLULAIRE

Le nombre de myocytes est contrôlé par deux mécanismes complémentaires qui sont, l'apoptose qui permet d'éliminer les cellules, et la régénération qui permet la différenciation de nouvelles cellules musculaires.

#### i. APOPTOSE OU MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE

L'apoptose est un processus différent de la nécrose (mort non programmée). Il s'agit d'une autodestruction physiologique des cellules sans inflammation (Kerr *et al.*, 1972). Ce processus permet de contrôler le nombre de cellules d'un tissu et en particulier d'éliminer celles ayant un défaut de conformation, de localisation ou étant en excès. L'apoptose peut être médiée par deux voies : la voie des récepteurs de mort et la voie mitochondriale (Zimmermann *et al.*, 2001; Parsons & Green, 2010). L'une ou l'autre de ses voies est activée





**Figure 10:** Principaux facteurs impliqués dans les voies de signalisation intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose.

La liaison du TNF $\alpha$  initialise la voie extrinsèque ; la voie intrinsèque implique le relargage par la mitochondrie de facteurs apoptotiques. La régulation de la voie intrinsèque repose sur la balance de facteurs tels que Bax et Bcl-2.

AIF: Apoptosis-inducing factor; Apaf-1: apoptotic protease-activating factor-1; Bcl-2: B-cell lymphoma-2; Bax: Bcl-2-associated X protein; CAD: caspase-activated DNase; Cyto c: cytochrome c; EndoG: endonuclease G; FADD: Fas-associated death domain; TRADD: TNF-receptor-associated death domain; TRAF: TNF-receptor-associated factor.

D'après: Marzetti *et al.*, 2012

en fonction de l'origine du stimulus (élimination des cellules en excès, réponse à des dommages cellulaires).

- La voie des récepteurs de mort est activée par fixation d'un ligand spécifique et la cascade réactionnelle est médiée par la voie des caspases
- La voie mitochondriale est médiée par un grand nombre de facteurs, principalement mitochondriaux, et elle conduit à une apoptose de la mitochondrie qui est induite ou non par les caspases.

La machinerie apoptotique fait intervenir des protéines régulatrices : des endonucléases, des inhibiteurs des protéases ainsi que des enzymes protéolytiques. Elle est régulée entre autres par des facteurs pro et anti-apoptiques, tels que B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) et Bcl-2-associated X protein (Bax) (**Figure 10** ; pour revue voir Zimmermann *et al.*, 2001; Parsons & Green, 2010).

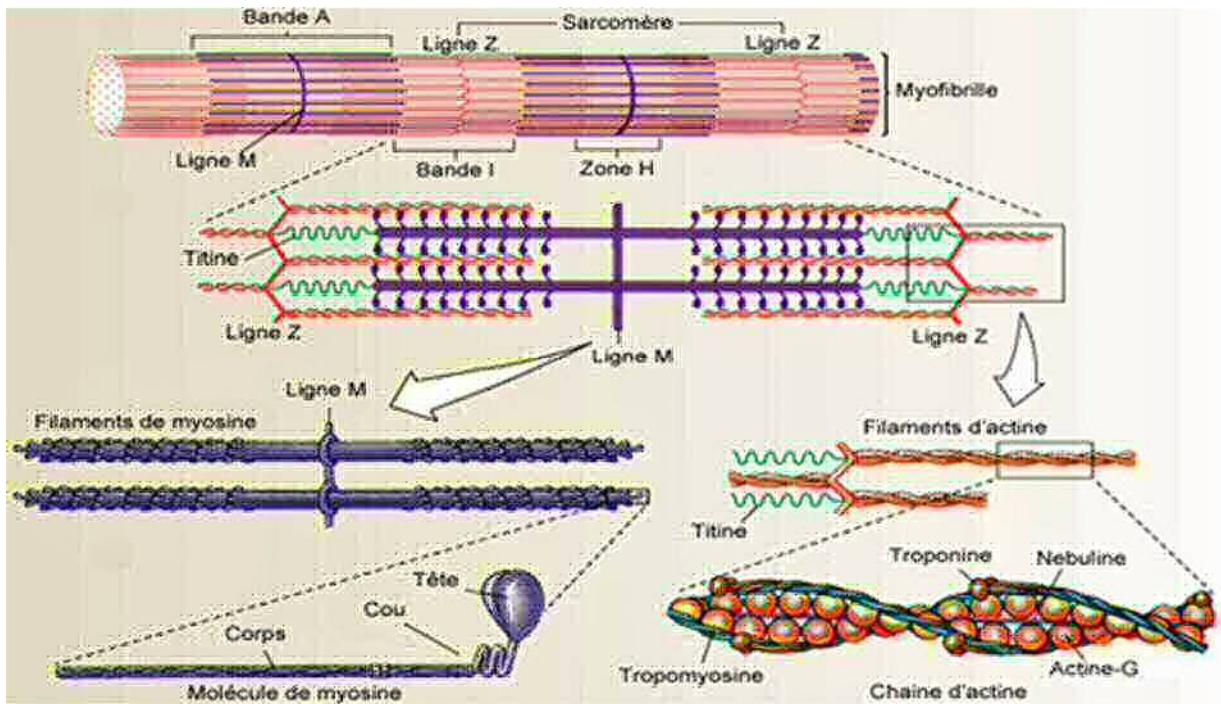
Dans le muscle dont les cellules sont plurinuclées, l'apoptose est responsable de l'élimination des noyaux des cellules. Dans les myocytes, chaque noyau contrôle un volume de cytoplasme connu sous le nom de « domaine myonucléaire » (Hall & Raston, 1989). La modulation du nombre de noyaux d'une fibre musculaire est un moyen de contrôler sa taille et ses caractéristiques (Allen *et al.*, 1999; Favier *et al.*, 2008).

## *ii. LA REGENERATION CELLULAIRE*

La régénération/différenciation musculaire (myogenèse), permet notamment le remplacement des cellules musculaires éliminées par apoptose. Il s'agit d'un mécanisme à part entière dans la réparation et la régénération du muscle squelettique (Kadi *et al.*, 2004).

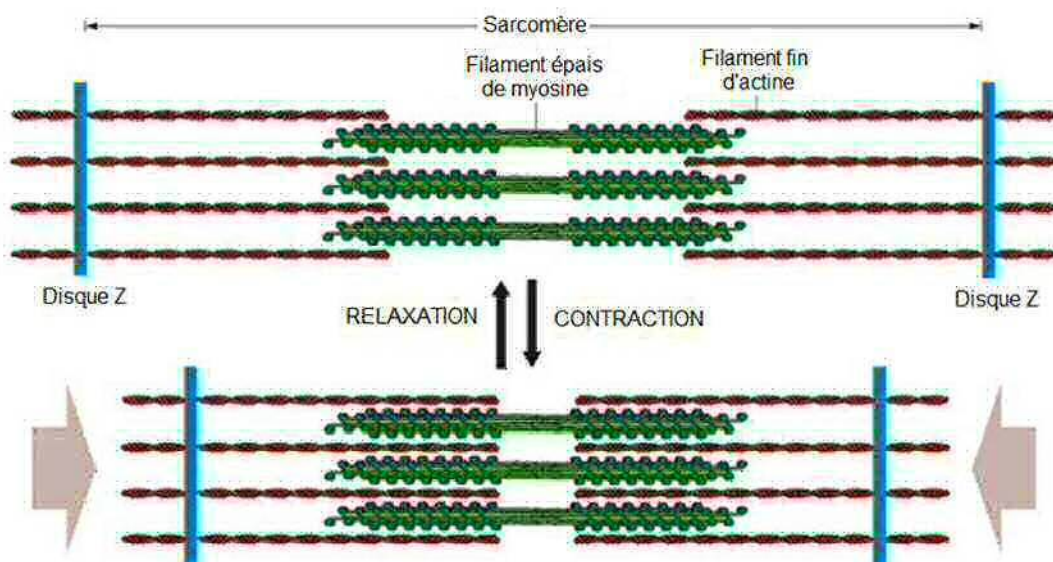
Les cellules satellites, découvertes dans les années 1960 (Mauro, 1961), sont localisées sous la lame basale, juxtaposées aux fibres musculaires. Ce sont des cellules souches mononucléées responsables de la régénération des myofibres. Chez l'adulte, elles sont maintenues dans un état quiescent, leur rôle étant d'assurer la croissance des fibres musculaires en maintenant constant le domaine myonucléaire.

La première étape de la myogénèse passe par l'activation des cellules satellites (Charge & Rudnicki, 2004). Les cellules satellites activées prolifèrent (on parle alors de myoblastes) puis fusionnent entre elles pour donner des myotubes. La différenciation des myoblastes en myocytes donne des fibres musculaires terminales (Charge & Rudnicki, 2004). Ceci explique la plurinucléation des cellules musculaires. Ces différents phénomènes sont sous la dépendance de facteurs de régulation, appelés facteurs myogéniques comme MyoD ou la myogénine (Langley *et al.*, 2002; Koopman *et al.*, 2014).



**Figure 11** : Schéma de la structure du sarcomère et de ses principaux composants au sein de la myofibrille.

D'après [http://www.corpshumain.ca/les\\_muscles.php](http://www.corpshumain.ca/les_muscles.php)



**Figure 12** : La contraction et relaxation musculaire, illustration de la théorie des « filaments glissants ».

D'après: Huxley, 1957

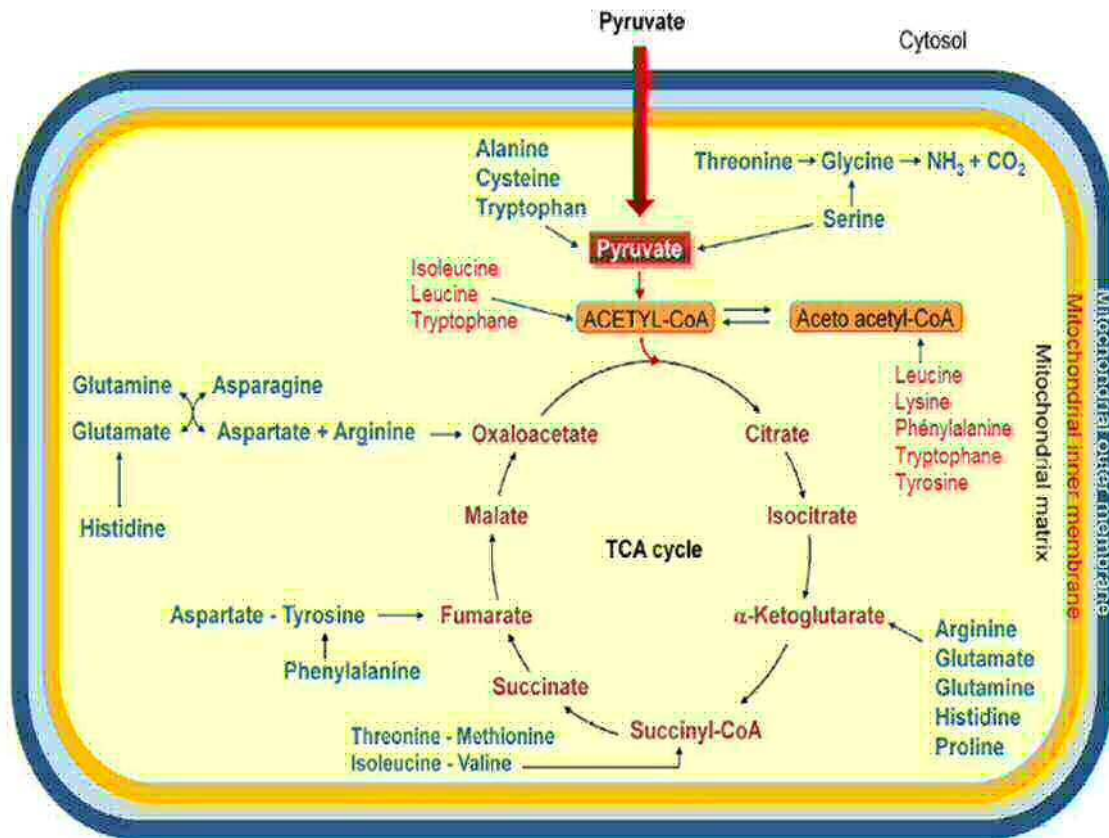
#### d. ASPECTS FONCTIONNELS ET METABOLIQUES DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Le muscle squelettique présente deux rôles principaux : d'une part il assure la locomotion et le maintien de la posture via sa fonction essentielle de contraction ; d'autre part, il constitue la principale réserve en acides aminés de l'organisme, et contribue à l'homéostasie glucidique et lipidique de l'organisme.

##### i. PROPRIETES CONTRACTILES

La fonction de contraction du muscle squelettique est permise par la présence d'une succession d'unités structurales et contractiles, les sarcomères. Ces structures sont caractérisées par une organisation répétée constituée d'une alternance de bandes claires et de bandes sombres. Cet arrangement structurel est responsable de l'aspect strié du muscle en microscopie photonique. Ainsi on observe des bandes sombres dites bandes A (pour Anisotrope) au milieu desquelles se trouve une bande plus claire, la zone H (du mot allemand *Heller* : « plus pâle ») (**Figure 11**). Cette zone H est coupée au centre par une bande plus sombre : la ligne M (de l'allemand *Mittel* signifiant « au centre »). Les bandes claires ou bandes I (pour Isotrope) encadrent les bandes A et on peut observer en leur centre une zone foncée : le disque Z (de l'allemand *Zwischen*, signifiant « entre »). Une unité de contraction ou sarcomère représente la zone comprise entre deux disques Z (Sciote & Morris, 2000).

Les sarcomères contiennent deux types de filaments : les filaments fins d'actine et épais de myosine. Les filaments fins sont attachés au niveau du complexe protéique qu'est le disque Z et les filaments épais au niveau de la ligne M. La contraction musculaire génère un glissement des filaments les uns sur les autres qui conduit à une réduction de la zone H et de la bande I. Ceci engendre un rapprochement des disques Z et par conséquent un raccourcissement des sarcomères. En revanche, la bande A et les filaments fins et épais gardent toujours la même longueur. C'est suite à ces observations qu'Huxley en 1957 a proposé la théorie des « filaments glissants » où les filaments d'actine glissent le long des filaments de myosine grâce à la succession d'attachements et détachements des têtes de myosine (Huxley, 1957). En effet, la contraction musculaire a lieu *via* une cascade réactionnelle calcium-dépendante où les têtes de myosines, par hydrolyse d'ATP, peuvent se fixer sur des sites spécifiques de l'actine, masqués hors période de contraction. C'est cette utilisation de l'ATP et plus spécifiquement le relargage du phosphate inorganique + ADP qui provoque la flexion angulaire des têtes de myosine, mouvement à l'origine de la contraction musculaire (Lymn & Taylor, 1971) (**Figure 12**). Les myofibrilles contiennent de nombreuses



**Figure 13** : Utilisations non protéinogènes des acides aminés. Les acides aminés dit glucogéniques sont en bleu et les cétogéniques en rouge.

D'après: Valerio *et al.*, 2011



protéines, autres que l'actine et la myosine, permettant le maintien et le fonctionnement de la structure (**Figure 11**).

#### *ii. RESERVOIR D'ACIDES AMINES*

Comme évoqué précédemment, le tissu musculaire représente la réserve d'acides aminés, stockés sous forme de protéines, la plus importante de l'organisme. Les protéines de ce tissu constituent une source d'acides aminés libres qui peuvent être mobilisés dans différentes situations : jeûne, certaines situations physiologiques (vieillesse, exercice) ou pathologiques (cancer, infections, insuffisance rénale...). Ces acides aminés issus du muscle squelettique sont destinés à être oxydés comme source d'énergie, à servir de précurseurs des protéines de la réponse inflammatoire synthétisées par le foie et des protéines dites vitales (cœur, poumon, cerveau) (Jagoe & Goldberg, 2001; Obled *et al.*, 2002; Attaix *et al.*, 2005). En effet, en plus de leur rôle principal dans la synthèse protéique, les acides aminés ont aussi un rôle dans différentes voies métaboliques : cycle de Krebs, de l'urée et de la néoglucogénèse ainsi que la synthèse d'acides aminés non protéiques comme la taurine. Ils permettent aussi la synthèse de certains neuromédiateurs (GABA, glutamate), d'hormones (sérotonine) ainsi que de molécules « signal » (oxyde nitrique) (Szyperski, 1995; Deng *et al.*, 2008; Delgado, 2013) (**Figure 13**).

#### *iii. ROLE DANS L'HOMÉOSTASIE GLUCIDIQUE*

Le muscle est un site primordial pour l'utilisation du glucose puisqu'il contribue à ~75% de son utilisation corporelle totale (Baron *et al.*, 1988). Le muscle présente deux transporteurs spécifiques au glucose : les Glucose Transporters type 1 (GLUT1) qui permettent un transport basal en faible quantité, et les GLUT4 dont la translocation membranaire est induite par l'élévation de l'insulinémie et qui permettent un transport actif important. Les GLUT4 permettent d'augmenter l'entrée du glucose dans la cellule musculaire lorsqu'il est abondant dans le plasma soit en phase postprandiale. Les myocytes utilisent ce glucose soit comme source directe d'énergie (ATP) soit le stockent sous forme de glycogène pour un besoin énergétique futur. Ainsi, de la sensibilité à l'insuline du muscle dépend grandement le maintien de l'homéostasie glucidique corporelle (Sinacore & Gulve, 1993).

#### *iv. MÉTABOLISME LIPIDIQUE*

Une autre source énergétique pour le muscle sont les acides gras (AG) qu'il peut oxyder *via* la  $\beta$ -oxydation mitochondriale. Lors du jeûne, les adipocytes libèrent des AG qui

**Tableau 1** : Définitions et critères de diagnostic de la sarcopénie suggérés par plusieurs groupes provenant des Etats Unis et de l'Europe.

Groupe de travail	Définition	Critères de diagnostique
<b>ESPEN Special Interest Group (1)</b>	« La sarcopénie est caractérisée par la perte de masse et de force musculaire. Bien qu'elle touche principalement les personnes âgées, son développement peut être associé avec d'autres conditions qui ne sont pas exclusivement observées lors du vieillissement, comme l'inactivité, la malnutrition ou la cachexie. De la même façon que l'ostéopénie, la sarcopénie peut également être observée chez des personnes atteintes de maladies inflammatoires. »	<p><b>1.</b> Masse musculaire faible, ex, pourcentage de masse musculaire &gt; à 2 SD en-dessous de la moyenne observée chez des individus âgés de 18 à 39 ans et appartenant à la cohorte NHANES III.</p> <p><b>2.</b> Vitesse de marche &lt; à 0,8 m/s durant un test de 4 minutes ou une performance réduite dans tous les tests fonctionnels utilisés pour une évaluation gériatrique complète.</p>
<b>European Working Group on Sarcopenia in Older People (2)</b>	« La sarcopénie est un syndrome caractérisé par la perte progressive et généralisée de la masse et de la force musculaire squelettique avec un risque d'effets indésirables tels qu'un handicap physique, une mauvaise qualité de vie et le décès. » Ce syndrome est appelé « sarcopénie primaire » lorsque la cause est uniquement le vieillissement, et « sarcopénie secondaire » quand une maladie, une inactivité ou une malnutrition contribue à son apparition.	<p><b>1.</b> Faible masse musculaire</p> <p><b>2.</b> Faible force musculaire (ex, force de préhension)</p> <p><b>3.</b> Faible performance physique (ex, vitesse de marche)</p> <p>Le critère 1 avec le critère 2 ou 3 doivent être &lt; à 2 SD par rapport à la moyenne d'une population de référence composée de personnes jeunes et saines.</p>
<b>International Working Group on Sarcopenia (3)</b>	« La sarcopénie est définie comme étant une perte de masse et de fonction du muscle squelettique lié à l'âge avancé. Les causes de la sarcopénie sont multifactorielles et peuvent inclure l'inactivité, une altération de la fonction endocrinienne, une maladie chronique, l'inflammation, l'insulino-résistance, ainsi que des déficiences nutritionnelles. Bien que la cachexie puisse être une composante de la sarcopénie, ces deux états sont différents. »	<p><b>1.</b> Vitesse de marche &lt; à 1 m/s</p> <p><b>2.</b> Faible masse musculaire mesurée objectivement, ex, mesure de la masse appendiculaire par rapport à la taille au carré dont les valeurs doivent être à 7,23 kg/m<sup>2</sup> pour les hommes et à 5,67 kg/m<sup>2</sup> pour les femmes.</p>
<b>Society of Sarcopenia, Cachexia and Wasting Disorders (4)</b>	« La sarcopénie avec une mobilité réduite est une condition spécifique montrant une nette perte de masse musculaire et étant une cible claire d'interventions. Ainsi, elle diffère de la notion générale de fragilité. » « La limitation de la mobilité ne doit pas être clairement attribuable à une maladie spécifique ou à des troubles du système nerveux périphérique et central, des démences ou une cachexie. »	<p><b>1.</b> Vitesse de marche ≤ à 1 m/s ou une distance de marche &lt; à 400 m au cours d'une durée de marche de 6 minutes.</p> <p><b>2.</b> La masse maigre appendiculaire doit être &lt; à 2 SD par rapport à la moyenne de personnes saines âgées de 20 à 30 ans appartenant au même groupe ethnique.</p>

D'après : Muscaritoli *et al.*, 2010 (1); Cruz-Jentoft *et al.*, 2010 (2); Fielding *et al.*, 2011 (3); Morley *et al.*, 2011(4)

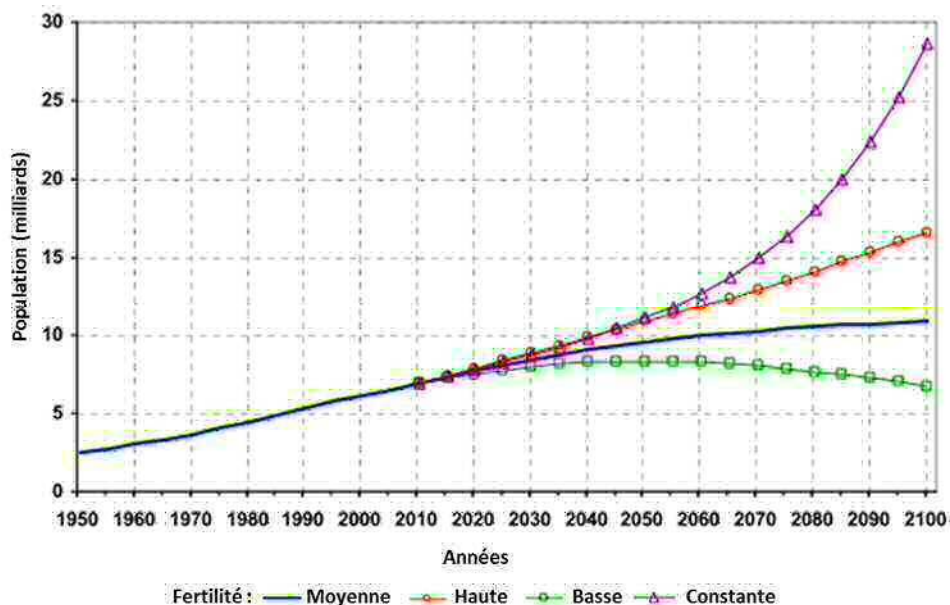
circulent liés à l'albumine. Les cellules musculaires capturent ces AG par diffusion passive et par transport médié par des protéines. Les protéines régulatrices majeures de ce transport sont la Fatty Acid Translocase/cluster of differentiation 36 (FAT/CD36) et la Fatty Acid Transport Protein (FATP4) (Watt & Hoy, 2012). De plus, le muscle dispose de sa propre réserve d'AG, stockés sous forme de triglycérides, ce qui constitue une réserve énergétique importante. En effet, en cas de jeûne ou d'effort prolongé, les réserves glycogéniques s'épuisent rapidement et le métabolisme musculaire bascule alors vers l'utilisation des lipides comme substrat énergétique (Dagenais *et al.*, 1976).

*Le muscle squelettique est donc un organe hautement spécialisé pourvu de capacités régénératives et de propriétés d'excitabilité, de contraction, d'élasticité et de plasticité. Cependant, le muscle squelettique n'a pas qu'une fonction dans la posture et la mobilité, c'est également un acteur métabolique important. En effet, le muscle participe à l'homéostasie du glucose et est impliqué dans le métabolisme lipidique. Il est aussi un acteur capital dans la lutte contre les agressions de l'organisme par la réserve d'acides aminés protéiques qu'il représente. Cependant, la mécanique musculaire est régulée et affectée par de nombreux mécanismes, et de nombreuses fonctions physiologiques sont altérées par le vieillissement. En effet, l'avancée en âge conduit à des altérations structurelles et fonctionnelles du muscle squelettique. Ce sont ces aspects qui seront décrits dans le sous-chapitre suivant.*

## 2. LE VIEILLISSEMENT MUSCULAIRE : LA SARCOPENIE

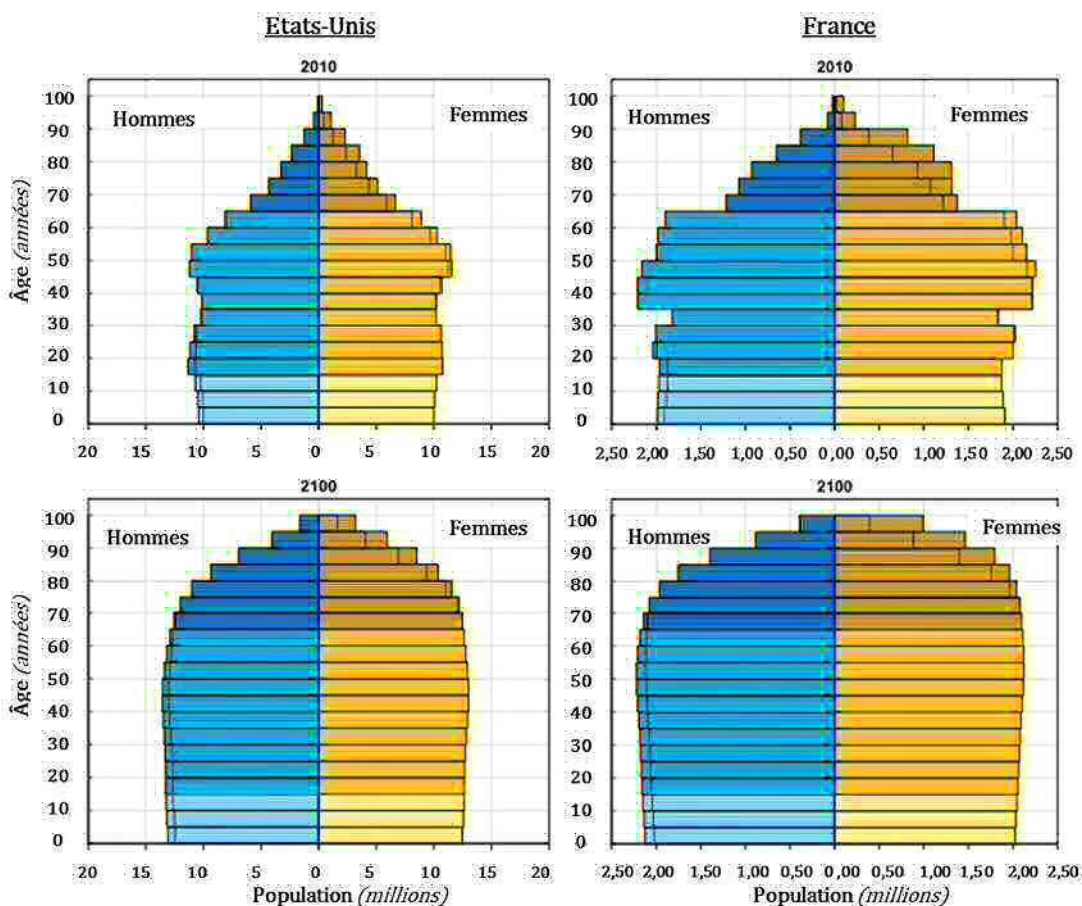
La prise en compte du vieillissement musculaire est un phénomène relativement récent. Ainsi, la perte de masse musculaire est reconnue aujourd'hui comme part intégrante du vieillissement, mais entraîne avec elle un large spectre de conséquences métaboliques et fonctionnelles. Ces conséquences sont une augmentation précoce de la dépendance, de dysfonctionnements métaboliques et de la morbidité, nécessitant une prise en charge. De ce fait, l'augmentation croissante du coût associé à sa prise en charge place la sarcopénie comme un enjeu socio-économique majeur. Cependant la complexité de la pathogénèse combinée à l'hétérogénéité des symptômes cliniques associés à la sarcopénie, font de sa prévention et de sa prise en charge thérapeutique un réel challenge du XXIème siècle.





**Figure 14 :** Population mondiale, 1950-2100 en fonction des différentes projections.

D'après: United Nations, 2013. Department of Economic & Social Affairs, Population Division



**Figure 15 :** Projections de l'évolution de la population par classe d'âge de 2010 à 2100 pour les Etats-Unis et la France. Les lignes en pointillé marquent un excès de population dans certaines tranches d'âge, créant un déséquilibre.

D'après: United Nations, 2013. Department of Economic and Social Affairs, Population Division

## a. LA SARCOPENIE : DEFINITION & PREVALENCE

### i. LA SARCOPENIE : UNE DEFINITION DIFFICILE

Le terme sarcopénie, proposé pour la 1<sup>ère</sup> fois par Rosenberg en 1989, vient du grec *sarx* « la chair » et *penia* « pauvreté ». La première définition proposée définit la sarcopénie comme une perte de masse musculaire liée à l'âge (Rosenberg, 1989). Par la suite, Baumgartner et al. ont proposé une autre approche de la sarcopénie en 1998, considérant qu'elle ne touchait pas toutes les personnes âgées de manière égale, et qu'il fallait identifier une valeur seuil. Ce seuil a été établi selon la formule suivante : masse maigre appendiculaire divisée par la taille au carré. Cette formule permet de calculer un index de masse musculaire relative (Baumgartner *et al.*, 1998). Plus tard, Janssen et al. ont proposé un index de masse musculaire relative qui se rapporte à la masse maigre appendiculaire divisée par la masse corporelle totale et multipliée par 100 (Janssen *et al.*, 2002). Dans les deux cas, ces index doivent être inférieurs à deux écarts-types par rapport à la moyenne d'une population de référence de « jeunes adultes » (18-40 ans) pour diagnostiquer une sarcopénie. Depuis, les chercheurs ont soulevé la nécessité de prendre en compte la fonctionnalité musculaire en plus de la masse. De nombreux travaux ont été réalisés pour déterminer un seuil de référence, avec différentes méthodes d'évaluation de la masse musculaire : l'absorptiométrie par rayons X (DXA) (Heymsfield *et al.*, 1990), l'impédancemétrie (BIA) (Janssen *et al.*, 2002), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), la tomодensitométrie (CT) (Visser *et al.*, 2002) ou encore l'excrétion de créatinine (*pour revue voir Kim & Choi, 2013*)).

Ces nombreux travaux ont conduit récemment plusieurs groupes de travail à se réunir afin de fournir une définition et une mesure de référence de la sarcopénie. Ces différents groupes définissent la sarcopénie comme une perte de masse et fonctionnalité musculaire, liée à l'avancée en âge. Les critères de diagnostic pris en compte incluent tous la masse musculaire et considèrent en plus, soit la vitesse de marche, soit la force développée (**Tableau 1**). D'après ces groupes de travail, la sarcopénie est donc un syndrome conduisant à une perte progressive et involontaire de masse, de force et de fonctionnalité musculaire, associée à une augmentation de la morbidité, d'incapacité fonctionnelle et de mortalité, l'ensemble conduisant à une altération de la santé et la qualité de vie des sujets âgés. Ces groupes de travail se sont attachés à l'importance de prendre en compte les tests de force musculaire ou de performance physique pour établir le diagnostic (Muscaritoli *et al.*, 2010; Cruz-Jentoft *et al.*, 2010; Fielding *et al.*, 2011; Morley *et al.*, 2011).

## World

	1950	2010	2015	2050	2075	2100
<b>Total Population</b>						
Total population (thousands) .....	2 525 779	6 916 183	7 324 782	9 550 945	10 409 149	10 853 849
Population density (persons per square km) .....	19	51	54	70	76	80
Median age (years) .....	23.5	28.5	29.6	36.1	38.7	41.2
<b>Dependency ratios (per 100)</b>						
Total dependency ratio (a) .....	65.1	52.2	52.1	58.5	62.4	66.1
Child dependency ratio (b) .....	56.7	40.6	39.5	33.8	31.6	29.8
Old-age dependency ratio (c) .....	8.4	11.7	12.5	24.7	30.8	36.4

## Northern America

	1950	2010	2015	2050	2075	2100
<b>Total Population</b>						
Total population (thousands) .....	171 615	346 501	361 128	446 201	489 712	513 065
Population density (persons per square km) .....	8	16	17	20	22	24
Median age (years) .....	29.8	37.3	37.9	40.9	42.5	44.6
<b>Dependency ratios (per 100)</b>						
Total dependency ratio (a) .....	54.9	48.5	51.3	66.0	70.6	77.2
Child dependency ratio (b) .....	42.1	29.0	28.9	29.9	29.7	29.4
Old-age dependency ratio (c) .....	12.7	19.6	22.4	36.2	40.9	47.8

## France

	1950	2010	2015	2050	2075	2100
<b>Total Population</b>						
Total population (thousands) .....	41 832	63 231	64 983	73 212	76 702	79 059
Population density (persons per square km) .....	76	115	118	133	139	143
Median age (years) .....	34.5	40.0	41.0	43.4	44.7	46.7
<b>Dependency ratios (per 100)</b>						
Total dependency ratio (a) .....	51.7	54.2	58.3	73.7	77.4	84.5
Child dependency ratio (b) .....	34.5	28.3	28.6	29.5	29.3	29.2
Old-age dependency ratio (c) .....	17.3	25.9	29.7	44.2	48.2	55.3

« Old age dependency ratio » est le ratio de la population âgée de 65+ ans et la population des 15-64 ans. Ils sont représentés en nombre de dépendants pour 100 personnes en âge de travailler (15-64).

**Figure 16:** Projections de l'évolution de la population et de la dépendance liée à l'âge d'ici à 2100, au niveau mondial, américain et français.

D'après: United Nations, 2013. Department of Economic and Social Affairs, Population Division

L' « European Working Group on Sarcopenia in Older People » (EWGSOP) a ajouté à sa définition la notion de risques associés pour l'état de santé des personnes et divise la sarcopénie en deux classes : primaire, où seul le vieillissement intervient, et secondaire, où des pathologies sont associées à l'apparition de la sarcopénie (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010). En effet, la sarcopénie n'est pas toujours une perte linéaire de masse et de fonctionnalité au cours du temps. Elle peut être aggravée ponctuellement par des épisodes de « crise » tels que l'immobilisation, les maladies infectieuses ou l'inflammation aiguë. Ces épisodes génèrent un catabolisme protéique accru et une mobilisation des réserves protéiques corporelles se traduisant par une aggravation brusque de la perte de masse. Il s'agit du « Crisis catabolic model » proposé par English & Paddon-Jones (2010). Ces pertes ne sont pas ou peu récupérées chez la personne âgée et provoquent une aggravation de la sarcopénie primaire.

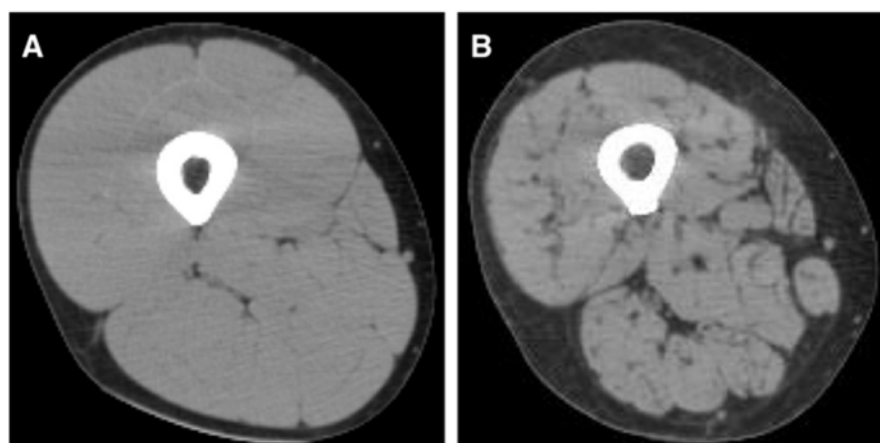
## *ii. VIEILLISSEMENT DE LA POPULATION*

Le vieillissement biologique peut être défini comme des changements conduisant à la détérioration des systèmes biologiques après que la croissance soit terminée. Ces changements sont associés à un déclin fonctionnel, une augmentation du risque de maladie, de morbidité et de mortalité (Cooper *et al.*, 2012). Le processus de détérioration de l'organisme et de ses fonctions n'est cependant pas influencé uniquement par l'âge puisque même des individus non pathologiques ont un niveau d'atteinte fonctionnelle hétérogène. La population âgée représente donc un large panel d'états de santé allant de la personne active sans pathologie associée jusqu'à la personne dépendante multi-pathologique.

Depuis le début du 21<sup>ème</sup> siècle, l'espérance de vie augmente de façon constante, en particulier grâce aux progrès de la médecine. D'après les projections récentes, la population mondiale qui était de 7,2 milliards de personnes en 2013 serait de 9,6 milliards en 2050 et atteindrait 10,9 milliards en 2100 (**Figure 14**). Dans les régions les plus développées, les personnes âgées de 60 ans ou plus devraient augmenter de 287 millions en 2013 à 417 millions en 2050 puis 440 millions en 2100. Cette classe de population représentait en 2013 23% de la population des pays développés et devrait atteindre 32% en 2050 et 34% en 2100 (United Nations, 2013). On parle de vieillissement de la population, c'est-à-dire que l'augmentation du nombre de personnes âgées s'accompagne d'une diminution du nombre d'enfants (moins de 15 ans) et du nombre d'actifs (15-59 ans). Les projections futuristes s'accordent pour dire que d'ici à 2050, le nombre de personnes âgées de plus de 65 ans devrait augmenter d'environ 80 millions (**Figure 15**). A titre d'exemple, aux USA ceci représenterait plus de 20% de leur population dont 4,3% seraient âgés de plus de 80 ans

**Tableau 2** : Hétérogénéité des données concernant l'âge d'apparition, la prévalence et la vitesse d'évolution de la sarcopénie.

Référence	Prévalence		Perte de masse		Perte de force
	60 - 80 ans	> 80 ans	Début	Vitesse d'évolution	Vitesse d'évolution
Lexell <i>et al.</i> , 1988; Frontera <i>et al.</i> , 2000	-	-	20 ans	30% en 60 ans	-
Lynch <i>et al.</i> , 1999; Holloszy, 2000; Melton <i>et al.</i> , 2000	-	-	20-35 ans	3-8% /décennie	-
Montero-Fernández & Serra-Rexach, 2013	-	-	20 -30 ans	1%/an	-
Ali & Garcia, 2014	10-25%	50%	30 ans	1-2%/an	-
Hughes <i>et al.</i> , 2002	-	-	> 35 ans	1-2%/an	1,5%/an 3% >60 ans
Baumgartner <i>et al.</i> , 1998	30%	>50%	40 ans	0,5-1%/an	-
Young <i>et al.</i> , 1985; Lexell <i>et al.</i> , 1988; Akima <i>et al.</i> , 2001	-	-	40 ans	30-40% en 40 ans	-
Grimby & Saltin, 1983	-	-	40 ans	8%/décennie 15% >80 ans	10-15%/10 ans 25-40% >70ans
Lexell, 1995; Sehl & Yates, 2001; Fielding <i>et al.</i> , 2011	-	-	50 ans	1-2%/an	-
Ferrucci <i>et al.</i> , 1997; Morley, 2008	5-13%	11-50%	50 ans	1-2%/an	-
Walrand <i>et al.</i> , 2011	-	-	> 55 ans	40% en 60 ans	-



**Figure 17** : Coupe transversale représentative de la partie supérieure de la cuisse d'un jeune adulte (23 ans, A) et d'une personne âgée (71 ans, B).

D'après: Nilwik *et al.*, 2013



(Kinsella & Wan, 2009). D'après l'INSEE la France compterait en 2050, 69 habitants âgés de plus de 60 ans pour 100 habitants de 20-59 ans ((Robert-Bobée, 2006) ; **Figure 16**).

### *iii. EPIDEMIOLOGIE ET PREVALENCE DE LA SARCOPENIE*

La sarcopénie est fréquente chez les personnes âgées et sa prévalence augmente avec l'âge. Elle est de plus en plus reconnue comme un syndrome gériatrique et, du fait de l'augmentation du nombre de personnes âgées, comme un enjeu sociétal majeur en terme de santé publique. En effet, la perte de masse musculaire touche toutes les personnes âgées et sa prise en charge étant encore peu efficace, le vieillissement de la population se traduit par une augmentation de la prévalence de la sarcopénie. Le coût direct attribué à la sarcopénie en 2000 était de 1,5% des coûts de soins totaux aux Etats-Unis soit 18,5 milliards de dollars. Il est estimé que réduire la prévalence de la sarcopénie de seulement 10% permettrait d'épargner 1,1 milliards de dollars rien qu'aux USA (Janssen *et al.*, 2004). Dans les nombreuses études sa prévalence varie considérablement d'une population à l'autre. Ceci est dû à la forte variabilité des groupes de population étudiés, ainsi qu'aux différences de mesures utilisées et de normalisation en fonction de la population témoin choisie (**Tableau 2**). De même, l'âge auquel débute la sarcopénie diffère selon les sources, 20 ans, 30 ans, 40 ans, ou même 50 ans. Le rythme de la perte est lui aussi variable et serait compris entre 0,5 et 2% par an jusqu'à 80 ans, au-delà de 80 ans les données s'accordent pour une accélération rapide de la perte (**Tableau 2**). Chez l'homme, alors que la masse musculaire moyenne à 30 ans est d'environ 40-50% de la masse corporelle, elle n'est plus que de 25% à 80 ans (**Figure 17**). Ainsi, entre 20 et 80 ans, 30 à 40% de la masse musculaire seraient perdus (Frontera *et al.*, 2000; Walrand *et al.*, 2011) et la prévalence de la sarcopénie atteindrait 50% chez les plus de 80 ans (Fielding *et al.*, 2011). La perte de force évolue elle aussi au fil des ans, à un rythme plus rapide de 1 à 1,5% par an puis de 2,5 à 4% au-delà de 80 ans (**Tableau 2**).

D'après ces divers travaux, la prévalence de la sarcopénie avant 80 ans serait donc de 5 à 13% et augmenterait de 11 à 50% après 80 ans. L'OMS considère que dans les 40 prochaines années la sarcopénie touchera plus de 200 millions de personnes (Janssen, 2011).

### *iv. VIEILLISSEMENT & SYNDROME DE FRAGILITE*

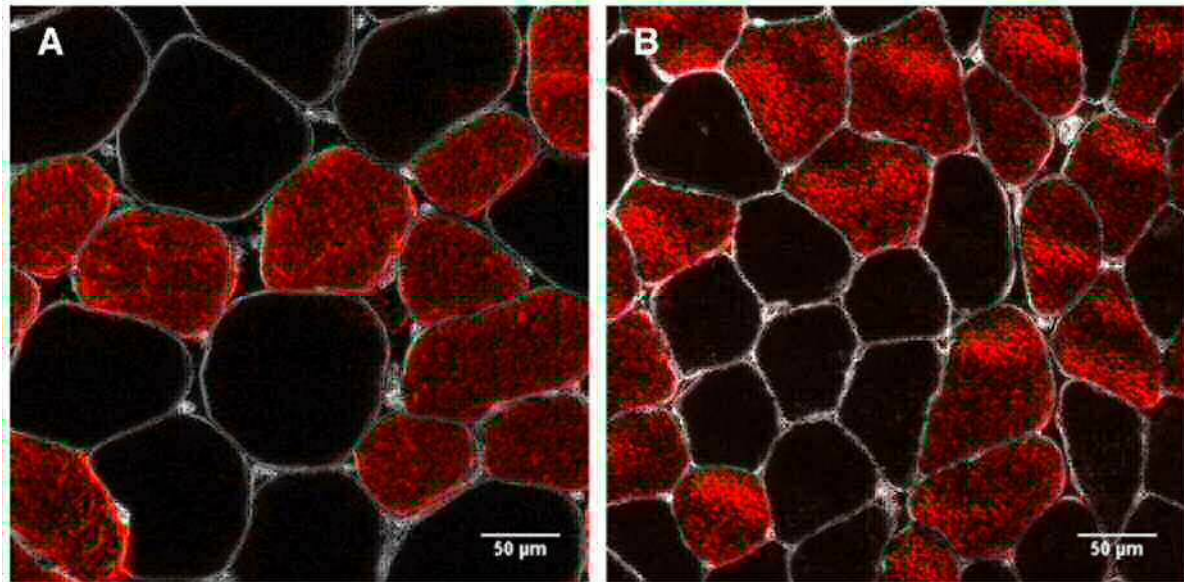
Un autre syndrome gériatrique est en constante augmentation avec le vieillissement de la population : la fragilité (« frailty ») qui est estimée toucher aujourd'hui 25 à 50% des 85 ans et plus (Song *et al.*, 2010; Tavassoli *et al.*, 2014). La notion de fragilité est apparue comme un syndrome lié au vieillissement dans les années 1990. La première définition a été

fournie par Rockwood et al. en 1999. Celle-ci inclut quatre classes d'incapacités et considère la fragilité comme un facteur de risque pour le développement d'incapacités (Rockwood *et al.*, 1999). La fragilité est aujourd'hui considérée comme une atteinte multi-système associée à une augmentation de la vulnérabilité aux stress et agressions. Les personnes fragiles ont un risque augmenté de chute, d'incapacité physique, de maladie, d'augmentation de la durée d'hospitalisation, d'entrée en institution et de mortalité (Fried *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2010). L'âge est un déterminant majeur de la fragilité mais n'explique pas à lui seul ce syndrome. La prise en charge des déterminants de la fragilité permet de réduire ou retarder ses conséquences. Ainsi, la fragilité s'inscrirait dans un processus potentiellement réversible (Rolland *et al.*, 2011).

La seconde définition de la fragilité, proposée par Fried et al. en 2001, prend plutôt en compte des critères physiques. Elle est aujourd'hui la plus utilisée et est un modèle de fragilité validé. Elle considère l'accumulation de troubles dans 5 domaines : la perte involontaire de poids, la faiblesse musculaire, l'épuisement, la diminution de la vitesse de marche ainsi que la faible activité physique (Fried *et al.*, 2001). La présence de 3 ou plus de ces facteurs est synonyme de fragilité, les personnes sont considérées « pré-fragiles » si au moins un des critères est présent. Un second modèle validé est celui de Rockwood, proposé en 2005, qui prend plutôt en compte des critères cognitifs et sociaux, regroupés sous le terme de « fragilité multi-domaine ». Ce modèle intègre : cognition, humeur, motivation, motricité, équilibre, capacités pour les activités de la vie quotidienne, nutrition, condition sociale et comorbidités (Rockwood *et al.*, 2005). Comme pour la sarcopénie, de nombreux autres modèles ont été proposés avec un ajustement de ces définitions, se basant sur différents critères de mesure.

Récemment un outil de détection de la fragilité a été développé et a reçu l'approbation de la Haute Autorité de Santé (Haute Autorité de Santé, 2013). « The Gérontopôle Frailty Screening Tool (GFST) » a été mis au point par Vellas et al. (2013) et prend en compte à la fois des critères cognitifs, sociaux et physiques. Des travaux récents ont mis en évidence son efficacité dans la détection et la prise en charge des patients (Tavassoli *et al.*, 2014).

*La fragilité et la sarcopénie sont donc deux syndromes gériatriques dont les prévalences sont en constante augmentation avec l'accroissement de la population âgée. Elles présentent des causes, telles que l'inflammation et la nutrition, et des conséquences, telles que la dépendance et une moindre réponse aux agressions, communes. La sarcopénie est reconnue comme une cause directe de fragilité et comme un symptôme clinique de son expression (Rolland & Vellas, 2009; Rolland *et al.*, 2011).*



**Figure 18** : Visualisation par coloration immunohistochimique de l'aire des fibres du muscle *vastus lateralis* d'un jeune adulte (23 ans, A) et d'une personne âgée (71 ans, B).

Les fibres de types I sont en rouge et la lame basale en gris.

D'après: Nilwik *et al.*, 2013



## b. LES MULTIPLES CONSEQUENCES DU VIEILLISSEMENT MUSCULAIRE

### i. SUR LA PERTE DE MASSE MUSCULAIRE & LA STRUCTURE

Le vieillissement musculaire conduit à des changements à la fois dans la composition et dans la structure des fibres musculaires, ainsi c'est leur nombre et leur taille qui diminuent (**Figure 18**). Lexell a décrit ces changements dans les années 1980 en montrant une diminution de l'aire totale occupée par le muscle et du nombre de fibres (Lexell *et al.*, 1983, 1988). Les travaux de Larsson (1978) ont été les premiers à montrer une diminution spécifique de l'aire des fibres de type I de 23% et de 42% pour les types II, chez des individus de 55-60 ans comparés à des adultes de 20-29 ans. Plus récemment, Andersen a confirmé ces résultats en montrant une diminution de 25% des fibres de type I et 57% des types II chez des sujets >85 ans versus des adultes de 25 ans (Andersen, 2003). En revanche, Lexell dans ces travaux a montré une différence équivalente pour les fibres de type II, mais aucune pour les types I. De même, en ce qui concerne la proportion des fibres, plusieurs auteurs sont en désaccord. En effet, certains n'observent pas ou peu de changements dans les proportions relatives des fibres (Lexell *et al.*, 1983, 1986, 1988) alors que d'autres voient une diminution spécifique des fibres de type II (Larsson, 1978). Ceci peut s'expliquer d'une part, par la forte hétérogénéité du vieillissement mais aussi d'autre part, par une évolution muscle dépendante. Un autre point important à prendre en compte est qu'au cours du vieillissement, le typage des fibres est rendu complexe par le fait qu'au moins 30% des fibres seraient mixtes et exprimeraient les deux phénotypes (Andersen, 2003; D'Antona *et al.*, 2003). De plus, dans leur revue Narici et Maffulli (2010), expliquent que les deux types de fibres sont perdus, mais dans une chronologie distincte. En effet, les fibres de type II seraient perdues majoritairement en premier jusqu'aux environs de 70 ans, puis au-delà de 80 ans, les types I seraient à leur tour perdus, établissant un nouvel équilibre dans les proportions respectives de fibres.

Un des facteurs participant à ces phénomènes est l'apoptose dont l'activation des mécanismes est augmentée avec l'âge (Strasser *et al.*, 2000; Dirks & Leeuwenburgh, 2002; Chung & Ng, 2006; Marzetti *et al.*, 2010). En effet, la diminution du nombre de noyaux contribue à l'atrophie et la diminution du nombre de fibres. L'apoptose est ainsi un des facteurs participant à l'atrophie musculaire lors de la sarcopénie (Marzetti *et al.*, 2012).

Ces pertes se traduisent par une baisse de la quantité totale de protéines musculaires. Ce phénomène a été montré chez le rat, Mosoni *et al.* (1993) ont montré une perte de 29% de la quantité de protéines chez le rat âgé (24 mois) par rapport à l'adulte (12 mois). Ces résultats ont été confirmés par plusieurs auteurs (Dardevet *et al.*, 2002; Arnal *et al.*, 2002).

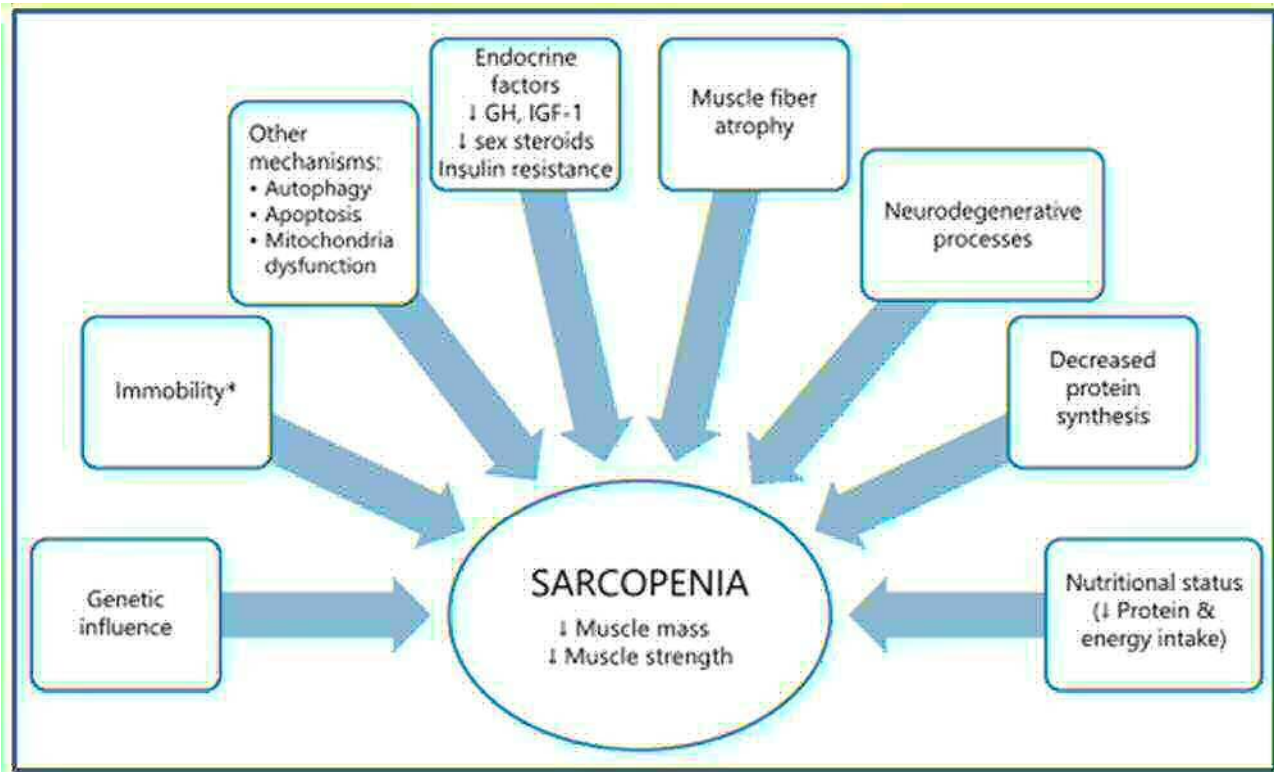
## *ii. SUR LA FONCTIONNALITE MUSCULAIRE*

En termes de fonctionnalité, la perte de puissance et de force isométrique au cours du vieillissement est bien établie. En effet, la force diminuerait de 3-4%/an soit presque deux fois plus que la force isométrique (1-2%/an) (Skelton *et al.*, 1994). Les travaux de Thom *et al.* (2007), ont montré que chez le sujet âgé (~74 ans) la diminution de force isométrique serait de l'ordre de 40% alors que celle du pic de puissance attendrait 60%, en comparaison au sujet adulte (~26 ans). D'un point de vue fonctionnel, une perte de puissance plus que de force a des conséquences majeures sur la qualité de vie des personnes âgées. En effet, les actions basiques de la vie quotidienne, telles que se lever d'une chaise, demandent de la puissance musculaire plus que de la force (Narici & Maffulli, 2010).

Ainsi, la diminution de force et puissance musculaires observée au cours de la sarcopénie excède celle de la masse et du volume. Ceci conduit par conséquence à une diminution de la force générée par unité de section musculaire (pour revue voir Narici & Maffulli, 2010). C'est ce phénomène qui est nommé baisse de « la qualité musculaire ». Parmi les facteurs contribuant à cette altération de la qualité musculaire, la diminution de la force générée par surface de fibre serait le plus important (D'Antona *et al.*, 2003). Cette diminution vient pour partie de l'apparition avec l'âge d'un découplage du signal excitation-contraction contribuant à une moindre efficacité de la contraction musculaire. De plus, l'accumulation d'altérations structurelles sur les protéines contractiles les rend moins fonctionnelles et contribue à cette diminution. D'autres facteurs tels qu'une altération des qualités du tendon et une altération de la transmission du signal neuronal seraient eux aussi en cause (pour revue voir Narici & Maffulli, 2010).

## *iii. SUR LE RENOUVELLEMENT PROTEIQUE MUSCULAIRE*

La sarcopénie est aujourd'hui bien reconnue comme le résultat d'une inadéquation entre synthèse et dégradation protéique. Chez l'homme la dégradation protéique à jeun a été montrée aussi bien in affectée (Welle *et al.*, 1994; Balagopal *et al.*, 1997; Volpi *et al.*, 2000), que légèrement augmentée (Volpi *et al.*, 2001), chez le sujet âgé comparé au sujet adulte. Étonnamment, la synthèse protéique basale apparaît elle aussi non modifiée par l'avancée en âge (Volpi *et al.*, 2000, 2001). Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence une réponse altérée de l'anabolisme musculaire spécifiquement en réponse au repas (Mosoni *et al.*, 1995; Dardevet *et al.*, 2003; Guillet *et al.*, 2004; Cuthbertson *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2009). Les travaux de Wilkes *et al.*, (2009) vont dans le même sens puisqu'ils montrent que l'inhibition de la protéolyse, ainsi que la stimulation de la synthèse protéique en réponse au repas, sont



**Figure 19** : Physiopathologie de la sarcopénie.

\*Immobilité est un aussi un processus lié à une pathologie annexe et non uniquement le vieillissement.

GH: Growth Hormone, IGF-1: insulin growth factor-1

D'après: Ali & Garcia, 2014

toutes deux altérées chez le sujet âgé. Ces travaux montrent que le muscle âgé est à la fois moins sensible au signal de synthèse ainsi qu'à l'inhibition de la protéolyse. Cette baisse de sensibilité musculaire apparaît due à une altération de la voie mTOR chez le rat (Dardevet *et al.*, 2000; Guillet *et al.*, 2004).

*Ainsi le développement de la sarcopénie génère une perte progressive de masse et de protéines musculaires qui est liée à une diminution du nombre et de l'aire des myofibrilles. Ces diminutions sont dues à l'altération du renouvellement protéique, en particulier en réponse au repas, ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose. Les conséquences majeures de la sarcopénie sont une augmentation du risque de chute, la perte d'autonomie et l'augmentation de la dépendance, qui la placent comme un facteur central de la fragilité. Ainsi, son apparition est corrélée à une augmentation de la morbidité et de la mortalité. Les causes de ces altérations induites par la sarcopénie sont multiples et ont conduit à utiliser différents angles d'approche pour trouver un remède à la sarcopénie. Ce sont ces causes et leurs solutions potentielles qui sont abordées dans la partie suivante.*

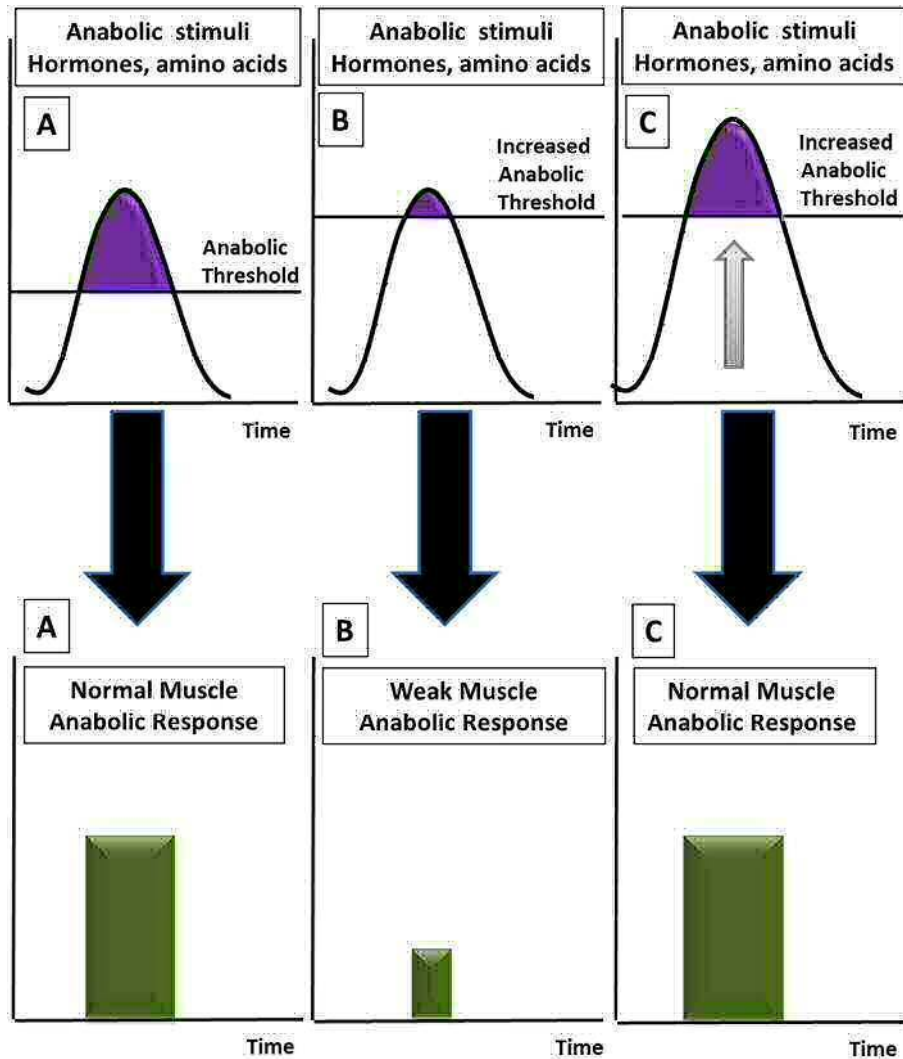
### 3. SARCOPENIE : MECANISMES EN CAUSES & STRATEGIES THERAPEUTIQUES POTENTIELLES

De nombreux mécanismes liés à des facteurs aussi bien intra qu'extrin-sèques, ont été mis en évidence comme potentiels contributeurs de la sarcopénie. Il est donc difficile d'établir une importance ou une chronologie parmi ces acteurs. Ces facteurs peuvent être classés en grandes catégories : les facteurs endocriniens, liés à l'âge, à la pathologie, aux maladies neurodégénératives ou à la nutrition. Ils comprennent entre autres la synthèse et dégradation protéiques, l'intégrité neuromusculaire, l'infiltration lipidique, l'insulino-résistance musculaire, l'inflammation et le stress oxydant (Cruz-Jentoft *et al.*, 2010) (**Figure 19**).

#### a. MODULATIONS NUTRITIONNELLES

##### i. QUANTITE & QUALITE DES APPORTS PROTEIQUES

Les données épidémiologiques indiquent que chez les personnes âgées, les recommandations de 0,8g de protéines/kg poids corporel/jour ne seraient pas atteintes chez 32-41% des hommes et 22-38% des femmes de plus de 50 ans (Calvani *et al.*, 2013). Or, il a été montré que chez les personnes âgées, lorsque la quantité d'Acides Aminés Indispensables (AAI) ingérée est réduite, la réponse anabolique musculaire au repas est elle aussi réduite (Katsanos *et al.*, 2005). La qualité des protéines ingérées a aussi un impact et repose sur leur



**Figure 20** : Seuil anabolique et de altération de l'anabolisme protéique musculaire post-prandial.

A & B: L'élévation du seuil anabolique fait qu'un même apport alimentaire n'atteint plus le stimulus anabolique, l'anabolisme est alors réduit. C: L'augmentation des apports en facteurs anaboliques, en particulier les AA, permet d'atteindre le seuil et de restaurer la réponse anabolique musculaire.

D'après: Dardevet et al., 2012

composition en AAI qui constituent des stimuli primaires de la synthèse protéique. Certains AA en particulier ont un rôle spécifique sur l'anabolisme musculaire, en particulier les AA à chaîne ramifiée. C'est le cas de la leucine qui est aujourd'hui reconnue comme un des principaux régulateurs du renouvellement protéique. En effet, la leucine a la capacité de stimuler la synthèse protéique par une activation de la voie mTOR (Anthony *et al.*, 2000, 2001; Dardevet *et al.*, 2000, 2002; Greiwe *et al.*, 2001; Rieu *et al.*, 2003, 2006, 2007) et d'inhiber la voie UPS (Nakashima *et al.*, 2005; Combaret *et al.*, 2005).

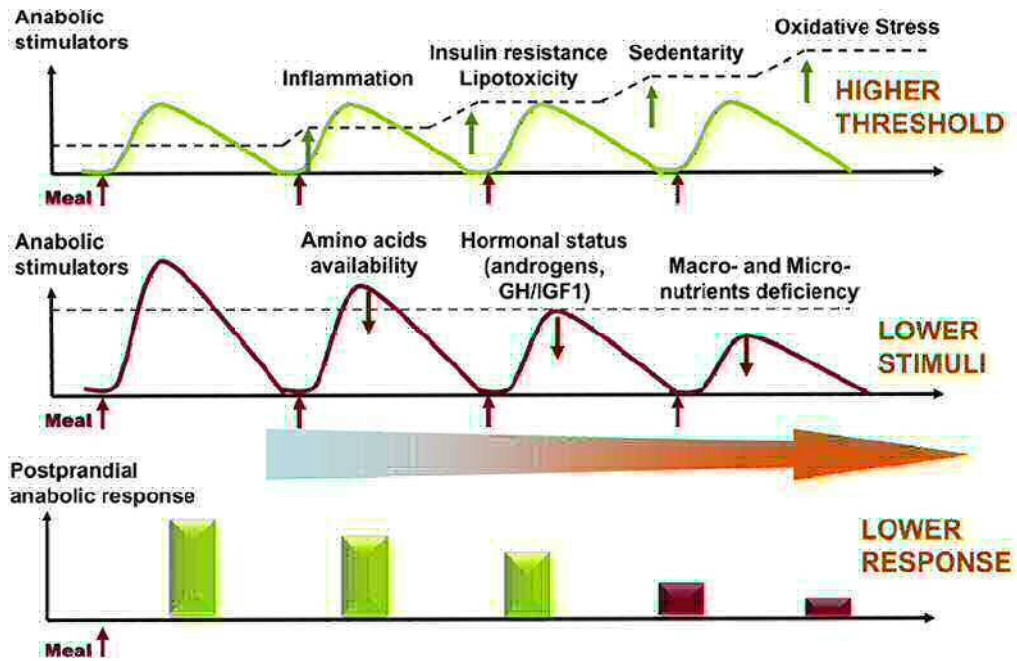
Il apparaît donc important de recommander aux personnes âgées la consommation de protéines de « haute qualité » c'est-à-dire riches en AAI (Dardevet *et al.*, 2003, 2012; Paddon-Jones *et al.*, 2006). Plusieurs auteurs s'accordent sur ce point et recommandent que les personnes âgées soient encouragées à consommer plus que les 0,8g protéines/kg/jour (Wolfe, 2012; Volpi *et al.*, 2013). Les recommandations seraient plutôt 1-1,5g protéines/kg/jour (Morais *et al.*, 2006; Wolfe *et al.*, 2008; Gaffney-Stomberg *et al.*, 2009; Morley *et al.*, 2010; Bauer *et al.*, 2013; Deutz *et al.*, 2014) avec un minimum de 25-30g de protéines par repas, contenant 2,5 à 2,8g de leucine (Bauer *et al.*, 2013). Ceci pourrait être à pondérer par les potentiels effets négatifs d'un régime haut en protéines chez l'âgé, mais ces apports resteraient en dessous des apports hyperprotéiques présentant une toxicité potentielle au niveau rénal, osseux ou cardiovasculaire (Wolfe *et al.*, 2008). Bien que peu d'études le prouvent réellement, une étude de corrélation a montré qu'une concentration plasmatique élevée en AA à chaîne ramifiée serait associée à un risque accru de diabète (Wang *et al.*, 2011). D'autres travaux chez le rat ont montré une intolérance au glucose et une augmentation de la masse grasse (Balage *et al.*, 2010; Zeanandin *et al.*, 2012). La nutrition protéique montre donc un réel intérêt contre la sarcopénie cependant elle doit être surveillée de près.

#### *ii. RYTHME D'APPORT, VITESSE DE DIGESTION ET NOTION DE SEUIL ANABOLIQUE*

En plus de la nature et quantité des protéines apportées par le repas, la répartition des apports protéiques journaliers est importante et conditionne également la réponse au repas. En effet, Arnal *et al.* ont montré que donner 80% de l'apport protéique journalier sur un seul repas (pulse feeding) était plus efficace pour stimuler la balance azotée et la synthèse protéique (Arnal *et al.*, 1999, 2002). Les travaux de Bouillanne *et al.* (2013) ont confirmé l'intérêt du pulse feeding chez des sujets âgés dénutris ou à risque de dénutrition, ce rythme permettant d'obtenir un gain de masse musculaire.

Cette différence d'efficacité « dose-dépendante » est expliquée par la notion de seuil anabolique développée par Dardevet *et al.* Ce seuil représente la quantité minimale en AA

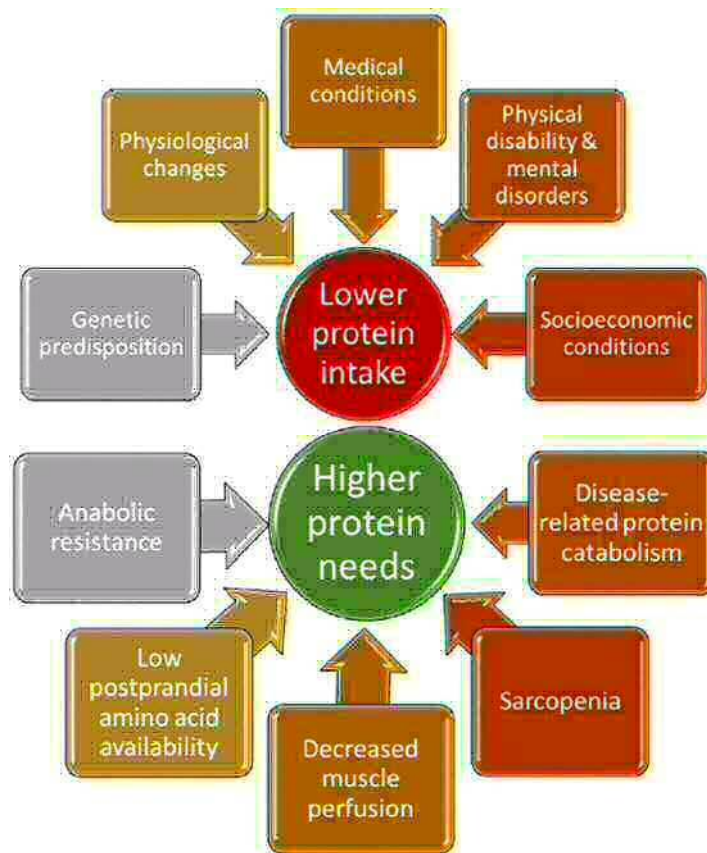




**Figure 21** : Schéma des modifications de la réponse postprandiale anabolique musculaire en réponse au repas conduisant à l'élévation du seuil anabolique.

GH: Growth Hormone, IGF-1: insulin growth factor-1

D'après: Boirie, 2013



**Figure 22** : Différents facteurs responsables de la baisse des apports et de l'augmentation des besoins protéiques chez les personnes âgées.

Adapté de: Deutz *et al.*, 2014

nécessaire pour déclencher la stimulation de la synthèse protéique musculaire (**Figure 20**). Chez la personne âgée, ce seuil serait augmenté (Dardevet *et al.*, 2012) ceci conduisant à une moindre stimulation de la synthèse protéique pour un apport protéique égal. Ainsi le pulse feeding serait une des solutions pour outre passer ce seuil et restaurer la réponse anabolique au repas. Un autre facteur important à prendre en compte est la vitesse de digestion des protéines. En effet, en fonction de l'âge, la vitesse de digestion a un impact différent sur l'anabolisme musculaire (Mosoni & Patureau-Mirand, 2003). Alors que chez le sujet jeune, les protéines à digestion lente permettent une meilleure rétention protéique, c'est le contraire chez le sujet âgé (Dangin *et al.*, 2001, 2003). Ceci a été confirmé par Pennings *et al.* (2011), qui ont montré que les protéines à digestion rapide ont un effet plus favorable sur la synthèse post-prandiale que les lentes chez le sujet âgé. En effet, une digestion rapide des protéines permet une arrivée massive des AA dans le plasma ce qui permet de passer au-delà du seuil anabolique musculaire.

L'élévation du seuil est causée par plusieurs facteurs tels que, l'inflammation, l'insulino-résistance, la sédentarité et le stress oxydant qui conduisent à une moindre réponse anabolique musculaire et donc une élévation du seuil (Dardevet *et al.*, 2012; Boirie, 2013) (**Figure 21**).

### *iii. EXTRACTION SPLANCHNIQUE*

Des travaux de Boirie *et al.*, menés chez l'homme ont montré une augmentation de l'extraction splanchnique des AA chez la personne âgée en comparaison à l'adulte (Boirie *et al.*, 1997). Ses résultats ont été confirmés par Volpi *et al.* (1999) et plus récemment chez le rat (Jourdan *et al.*, 2008). Cette augmentation de l'extraction splanchnique des AA conduit à une moindre disponibilité des AA pour les tissus périphériques tels que le muscle.

Ainsi les personnes âgées auraient besoin d'une quantité plus importante d'acides aminés pour stimuler l'anabolisme et les travaux de Levine *et al.* indiquent une augmentation de la mortalité globale chez les plus de 65 ans ayant un apport protéique faible (Levine *et al.*, 2014). De nombreux facteurs conduisent à une baisse des apports (**Figure 22**) et environ une personne de plus de 50 ans sur trois ne consommerait pas les 0,8g/kg/j recommandés (Calvani *et al.*, 2013).



*Les données précédentes montrent clairement que l'apport en AA au muscle est déterminant. En effet, la quantité d'AA apportés ainsi que leur qualité doivent être pris en compte, en particulier leur teneur en AAI. La notion de seuil anabolique et sa possible diminution par les facteurs anaboliques est aussi de grande importance. En effet, les facteurs augmentant le seuil anabolique sont nombreux tels que l'inflammation, l'insulino-résistance, le stress oxydant. L'amélioration de chacun d'entre eux peut contribuer à une restauration de l'anabolisme musculaire chez la personne âgée.*

## b. PERTURBATIONS HORMONALES

### i. INSULINE

L'insuline est une hormone anabolique dont la sécrétion est induite par la prise de repas et plus particulièrement son contenu en glucides. Avec l'âge, la sensibilité du métabolisme protéique musculaire à l'action de l'insuline apparaît diminuée (insulino-résistance) (Guillet *et al.*, 2004; Guillet & Boirie, 2005; Bourdel-Marchasson *et al.*, 2007; Fujita *et al.*, 2009). Or, la voie de signalisation majeure responsable de la synthèse protéique, mTOR est sous contrôle de la leucine mais aussi d'hormones et principalement l'insuline. L'activation de cette voie a en plus un rôle inhibiteur sur l'activité de la voie UPS. Ainsi chez le sujet âgé, l'apparition de l'insulino-résistance est un des facteurs responsables de la résistance à l'effet inhibiteur du repas sur la protéolyse et stimulateur sur la protéosynthèse. L'une des solutions pour combattre cette insulino-résistance serait de lutter contre le stress-oxydant et l'inflammation qui sont deux facteurs impliqués dans sa mise en place (*voir sections c. p24 et d. p26*).

### ii. HORMONES SEXUELLES

D'autres changements hormonaux accompagnent le vieillissement comme la diminution des niveaux circulants des hormones sexuelles (œstrogènes et testostérone), qui conduisent à la ménopause pour la femme et l'andropause pour l'homme (Welle, 2002). La testostérone est une hormone anabolisante, sa diminution avec l'âge est considérée comme un facteur favorisant la mise en place de la sarcopénie. Son implication a été confirmée par différentes études montrant qu'une supplémentation physiologique en testostérone chez les hommes âgés permet d'augmenter la masse et la force musculaire (pour revue voir Walrand *et al.*, 2011).

Des supplémentations en testostérone chez des hommes âgés sains ont montré un effet bénéfique sur la masse maigre, mais les effets sur la force et la fonctionnalité sont plus

controversés (Emmelot-Vonk *et al.*, 2008). Il est à noter qu'une étude clinique conduite sur une population âgée présentant des comorbidités a dû être arrêtée du fait de l'augmentation de la mortalité cardio-vasculaire dans le groupe recevant la testostérone, indiquant que ce traitement ne serait pas sans risque (Basaria *et al.*, 2010).

### *iii. HORMONE DE CROISSANCE*

L'hormone de croissance (GH, Growth Hormone) est elle aussi affectée par le vieillissement et sa diminution (somatopause) induit au niveau hépatique une diminution de la synthèse de l'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1). L'IGF-1 a plusieurs rôles au niveau musculaire, dont celui d'augmenter la protéosynthèse ainsi que la prolifération et différenciation myoblastique (pour revue voir Rooyackers & Nair, 1997). Cette hormone agit comme l'insuline *via* la voie mTOR pour stimuler protéosynthèse musculaire. Ainsi, la baisse du taux circulant d'IGF-1 contribue à la diminution de la synthèse protéique et de la régénération musculaire observées au cours du vieillissement.

Des suppléments en IGF-1 ont montré un effet protecteur de cette hormone contre les dommages oxydatifs musculaires (Yang *et al.*, 2010). La GH a elle aussi été testée et chez l'homme âgé sain, elle conduit à une augmentation de la masse maigre mais sans effet sur la fonctionnalité. De plus, elle est associée à des effets secondaires importants tels que œdèmes et insulino-résistance (Giannoulis *et al.*, 2012).

*Ainsi, la plupart des traitements hormonaux testés ont montré leur efficacité. Cependant ces traitements présentent des effets secondaires non négligeables, leur utilisation est donc très controversée et leur rapport bénéfice/risque reste à discuter (pour revue voir Ali & Garcia, 2014).*

## **c. IMPLICATION DU STRESS OXYDANT**

### *i. STRESS OXYDANT & MITOCHONDRIES*

La notion de stress oxydant définit un état où la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) dépasse les défenses antioxydantes. Le terme ERO englobe différentes espèces à la durée de vie variable (pour exemple :  $O^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ), produites principalement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. En condition normale, elles sont maintenues à un niveau physiologique grâce à plusieurs systèmes enzymatiques antioxydants : superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathion peroxydases (GP) et réductases (GR). D'autres systèmes antioxydants impliquent les groupements thiols (molécules possédant un SH,

comme le glutathion (GSH)) ou encore des protéines cytosoliques telles que la thioredoxine (TRX) et la glutaredoxine (GRX). Un niveau physiologique d'EROs a un rôle important dans la signalisation cellulaire, alors qu'un niveau pathologique va générer des dommages oxydatifs pouvant conduire à la mort cellulaire (Dai *et al.*, 2014). Ces dommages oxydatifs sont générés à plusieurs niveaux dont celui de l'ADN mitochondrial (Yakes & Van Houten, 1997). Ceci engendre la production de protéines altérées avec pour conséquences d'entretenir et augmenter la production d'EROs. Ces EROs vont aussi générer des dommages oxydatifs directs tels que la peroxydation lipidique et la carbonylation des protéines cellulaires, altérant ainsi leur fonctionnalité (Dai *et al.*, 2014). La production de ces EROs, en particulier au niveau musculaire, a été montrée augmentée au cours du vieillissement.

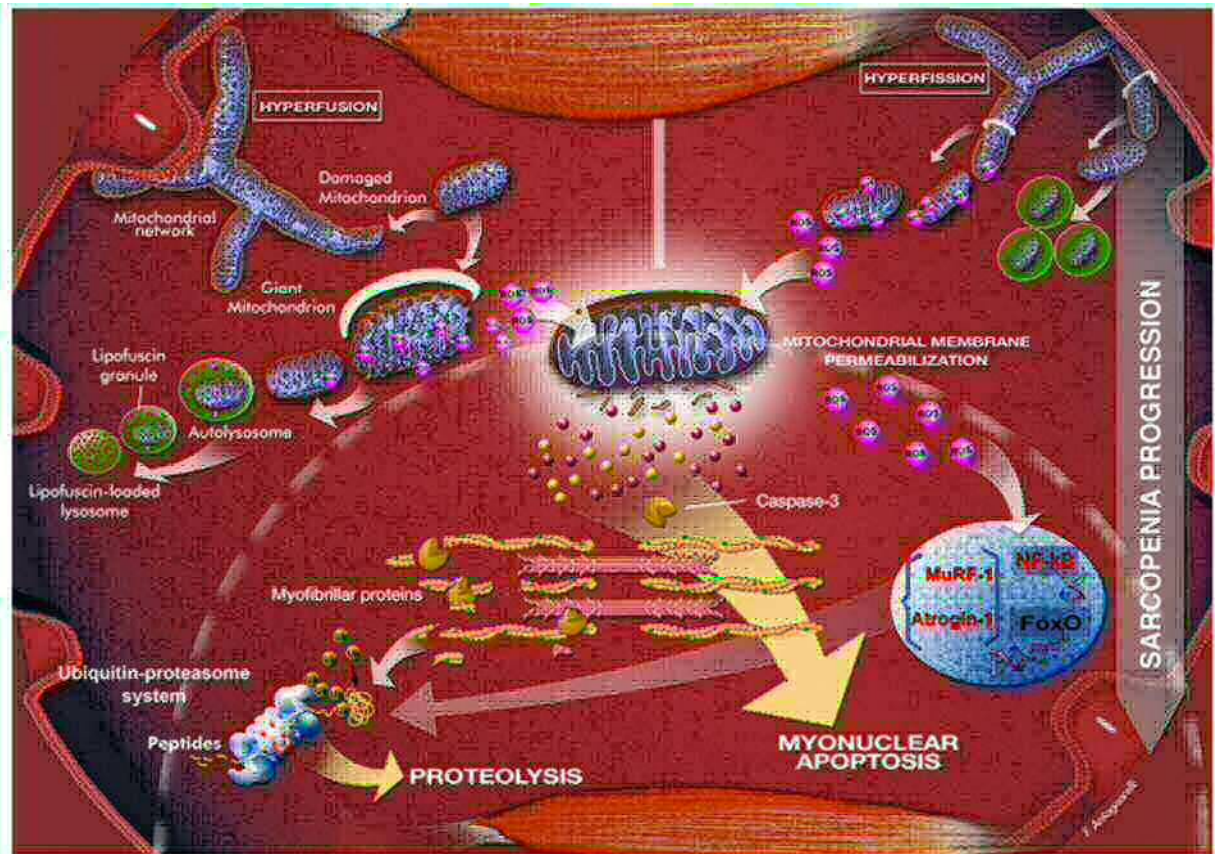
### *ii. STRESS OXYDANT & VIEILLISSEMENT*

« The free radical theory of aging », cette théorie proposée pour la première fois par Harman en 1956, suggère que les radicaux libres sont les principaux responsables du vieillissement et sont un déterminant de la longévité (Harman, 1956). Elle est la base des nombreux travaux effectués par la suite sur la production d'EROs et leurs conséquences.

Les dérégulations du fonctionnement mitochondrial sont fréquentes avec l'âge et représentent la principale source de production d'EROs au niveau musculaire, principalement produites par la chaîne respiratoire (Capel *et al.*, 2004, 2005). Le cas du muscle est particulier puisque l'augmentation des EROs est un processus physiologique normal en réponse à un besoin énergétique augmenté lors de l'activité physique. Avec le vieillissement, le muscle serait moins apte à tamponner ces élévations transitoires de production, le rendant ainsi plus vulnérable et permissif aux effets du stress oxydant. Cependant, les effets du vieillissement sur l'activité des enzymes anti-oxydantes musculaires sont controversés, certains auteurs les voient diminuées (Pansarasa *et al.*, 1999; Mosoni *et al.*, 2004), d'autres augmentées (Gianni *et al.*, 2004; Marzani *et al.*, 2005). Ces observations semblent être muscle et enzyme-dépendantes et le niveau d'activité physique a une influence sur ces enzymes (Navarro-Arévalo *et al.*, 1999; Parise *et al.*, 2005).

### *iii. STRESS OXYDANT, VIEILLISSEMENT & METABOLISME PROTEIQUE MUSCULAIRE*

La plupart des études ont montré une claire augmentation liée au vieillissement des dommages sur les macromolécules : lipides, protéines et ADN, preuves indirectes de l'élévation du stress-oxydant avec l'âge (Fraga *et al.*, 1990; Nuttall *et al.*, 1998; Mecocci *et al.*, 1999; Pansarasa *et al.*, 1999; Kasapoglu & Özben, 2001; İnal *et al.*, 2001; Levine &



**Figure 23:** Scénario possible des altérations mitochondriales pouvant conduire à l'atrophie musculaire lors du vieillissement.

Atrogin-1: muscle atrophy F-box (MAF-box); MuRF-1: Muscle RING-finger protein 1; NF-κB: nuclear factor kappa B; ROS: espèces réactives de l'oxygène.

D'après: Marzetti *et al.*, 2013

Stadtman, 2001; Cakatay *et al.*, 2003; van der Loo *et al.*, 2003). L'accumulation de ces modifications, en particulier sur les protéines, peut affecter la contraction musculaire et est ainsi un facteur de baisse de fonctionnalité et force musculaire liée à l'âge (Reid, 2001; Bonetto *et al.*, 2009).

La production chronique d'EROs est aussi reconnue pour altérer la balance protéolyse/protéosynthèse en faveur de la dégradation. En effet, les EROs conduisent à une moindre stimulation de la voie mTOR et une activation de la voie UPS (Grune *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998b, 2003), voie par laquelle les protéines oxydées sont préférentiellement dégradées. La mitochondrie joue un rôle important dans les voies de signalisation de l'apoptose et elle serait impliquée dans l'augmentation âge dépendante de la stimulation de cette voie (Esteve *et al.*, 1999; Chung & Ng, 2006; Marzetti *et al.*, 2010).

Ainsi, les EROs sont impliquées à la fois dans l'altération de la contraction, la perte de masse musculaire ainsi que dans l'augmentation de l'apoptose (**Figure 23** pour revue voir Derbré *et al.*, 2014).

#### *iv. STRESS OXYDANT, VIEILLISSEMENT & JONCTION NEURO-MUSCULAIRES*

La perte des neurones est elle aussi un processus progressif et irréversible augmentant avec l'âge qui pourrait contribuer de façon non négligeable à la sarcopénie. Les jonctions neuromusculaires sont à l'interface entre le système nerveux et le muscle. Il apparaît que la dégénération des motoneurones conduirait à une altération structurelle et fonctionnelle des jonctions neuromusculaires. L'ensemble contribuant à la progression de la sarcopénie (pour revue voir Jang & Van Remmen, 2011).

Les jonctions neuromusculaires sont affectées au cours de l'avancée en âge par des remodelages pré et post-synaptiques qui conduisent à leur dégradation. Ces mécanismes sont complexes et seraient altérés à plusieurs niveaux, tant par une diminution du nombre de récepteurs à l'acétylcholine que par une baisse du nombre de vésicules présynaptiques et de terminaisons nerveuses par jonction neuromusculaire (pour revue voir Jang & Van Remmen, 2011; Sakuma *et al.*, 2014). Toutes ces altérations contribuent à la dénervation fonctionnelle observée au cours du vieillissement. Cette dénervation conduit à une moindre fonctionnalité musculaire et serait un des mécanismes antérieurs à la perte de myofibres (Deschenes *et al.*, 2010). Des travaux récents suggèrent un rôle du stress oxydant et du dysfonctionnement mitochondrial associé dans l'apparition de ces altérations (Jang & Van Remmen, 2011).



Ce rôle majeur de la mitochondrie et du stress oxydant lié à l'âge explique le faible effet des antioxydants donnés en supplémentation lors d'études sur le vieillissement. En effet, il apparaît que ceux-ci ne seraient que peu distribués au niveau mitochondrial, et ne pourrait par conséquent pas agir au niveau de la source (pour revue voir Marzetti *et al.*, 2013; Dai *et al.*, 2014). Malgré tout certaines supplémentations ont montré un effet positif sur la synthèse protéique, par restauration de l'effet stimulant de la leucine sur la voie mTOR (Marzani *et al.*, 2008). Cependant les recommandations actuelles sont de ne pas prescrire de supplémentation pour traiter la sarcopénie car au vu de leurs propriétés, dans un contexte pro-oxydant, ces composés peuvent à l'inverse aggraver le statut redox. En effet plusieurs revues et méta-analyses ont montré un lien clair entre supplémentation en antioxydants et augmentation de la mortalité. De plus, comme évoqué précédemment, il serait nécessaire de cibler spécifiquement la mitochondrie. Il reste d'intérêt de recommander un régime riche en fruits et légumes, apportant naturellement ces composés (pour revue voir Calvani *et al.*, 2013).

#### d. IMPLICATION DE L'INFLAMMATION

La réponse inflammatoire conduit à la sécrétion par les cellules phagocytaires et les cellules Natural Killer (NK), cellules du système immunitaire inné, de cytokines inflammatoires dont les principaux représentant sont l'Interleukine (IL)-6, IL-1 $\beta$ , et le de Tumor Necrosis Factor (TNF).

##### i. INFLAMMATION A BAS BRUIT

Au cours du vieillissement, les taux plasmatiques d'IL-6, IL-1 $\beta$ , et de Tumor Necrosis Factor (TNF)  $\alpha$  ont été montrés comme augmentés (O'Mahony *et al.*, 1998; Ershler & Keller, 2000; Bruunsgaard *et al.*, 2003). Ces facteurs sont responsables d'une activation continue du système immunitaire chez la personne âgée conduisant à l'apparition d'une inflammation dite à bas bruit chronique, ou « inflamm-aging » (Franceschi *et al.*, 2000). Ces cytokines pro-inflammatoires agissent directement sur la perte de masse musculaire en augmentant la dégradation (Fong *et al.*, 1989). Elles diminuent aussi la synthèse des protéines musculaires (Lang *et al.*, n.d.2002; Rieu *et al.*, 2009; Balage *et al.*, 2010) générant ainsi un déséquilibre favorable au catabolisme. L'augmentation de ces cytokines avec le vieillissement est corrélée à une perte de masse et force musculaire (Schaap *et al.*, 2006, 2009). Une étude longitudinale chez l'homme confirme ces résultats et montre une nette corrélation entre l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et la baisse de la force musculaire (Baylis *et al.*, 2014). Cependant des travaux chez le rat âgé ont montré l'absence d'effet de l'inflammation à bas bruit sur la masse et la synthèse protéique

musculaires (Mayot *et al.*, 2008). Cependant dans ces travaux, le fibrinogène et l' $\alpha$ -2-macroglobuline sont à la limite du seuil d'inflammation à bas bruit déterminé chez le rat (Mayot *et al.*, 2007). Il est donc probable que l'inflammation à bas bruit n'altère la masse musculaire que lorsqu'elle est bien installée.

Les différentes cytokines n'agissent pas sur les mêmes voies de signalisation. En effet, le TNF $\alpha$  agirait sur la synthèse protéique (Zoico & Roubenoff, 2002) et l'IL-6, considérée comme une cytokine catabolique, agirait sur la dégradation protéique *via* une stimulation de la voie UPS (pour revue voir Walrand *et al.*, 2011). Les perturbations du statut redox liées à l'âge apparaissent comme étant la cause primaire conduisant à cette inflammation à bas bruit et le TNF $\alpha$  conduirait aussi à la production d'EROs (Sriram *et al.*, 2011). Cette cytokine est aussi impliquée dans l'activation de l'apoptose par la voie des récepteurs de mort qui a été montrée augmentée au cours du vieillissement (Marzetti *et al.*, 2008, 2009).

## *ii. INFLAMMATION AIGUË*

En plus de cette inflammation basale, le vieillissement est marqué par une augmentation de la sévérité des épisodes inflammatoires dus aux maladies. Ce phénomène est dû à un vieillissement du système immunitaire qui est considéré comme étant le principal responsable de l'augmentation de la prévalence et la gravité des maladies infectieuses avec l'âge (Weiskopf *et al.*, 2009). Ces épisodes infectieux engendrent une anorexie liée à l'inflammation et un catabolisme protéique musculaire accru pour permettre la synthèse des protéines inflammatoires.

Certains anti-inflammatoires, comme l'ibuprofène, ont montré un effet positif sur la diminution de l'inflammation à bas bruit, la restauration de synthèse et le maintien de la masse musculaires chez l'âgé (Rieu *et al.*, 2009). Cependant l'utilisation d'anti-inflammatoire est soumise à contre-indications et ne peut pas être systématique chez les personnes âgées.

## *e. ROLE DE L'INACTIVITE ET DE L'ACTIVITE PHYSIQUE*

### *i. INACTIVITE*

La baisse d'activité physique ou l'immobilisation sont des situations courantes car elle peuvent être causées par de nombreux facteurs tels que la maladie, une chute ou la sarcopénie. Il a été démontré que l'alitement induisait un certain nombre de modifications notamment une perte osseuse, une atrophie musculaire et une perte de force musculaire (Booth, 1982; Pavy-Le Traon *et al.*, 2007). Ces modifications entraînent une perte de fonctionnalité et une

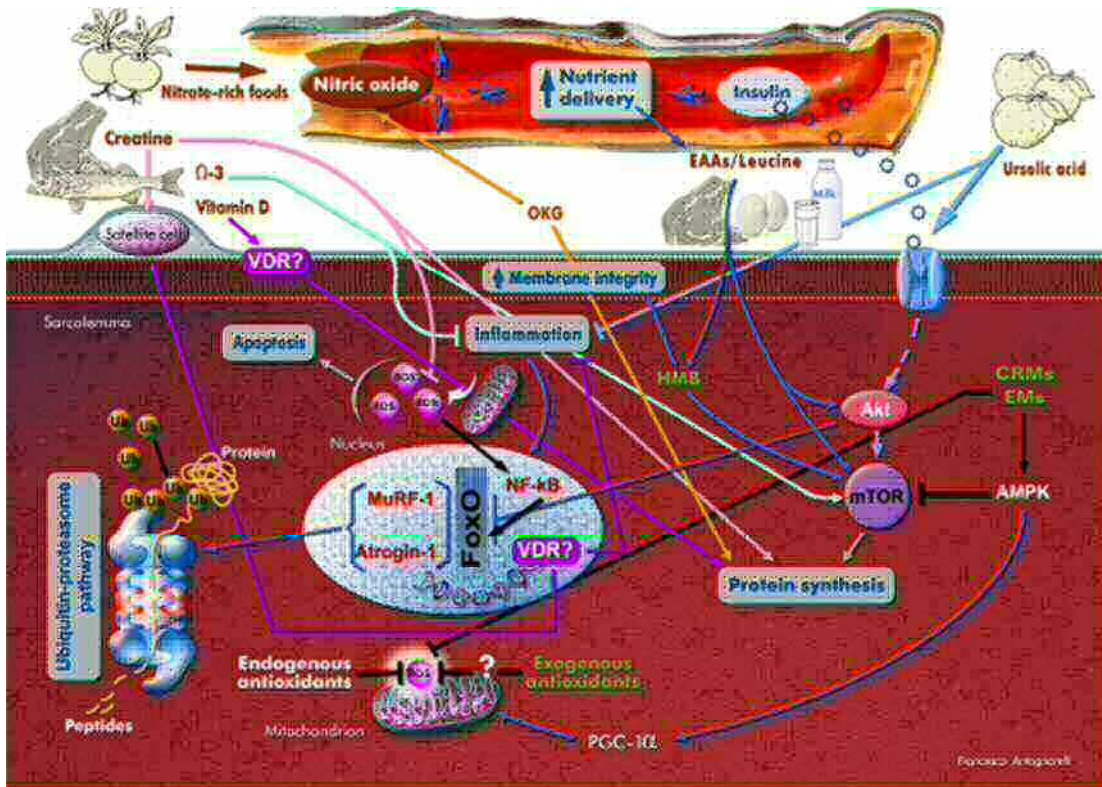
faiblesse des muscles (Adams *et al.*, 2003; Pavy-Le Traon *et al.*, 2007) et il a été montré que chez la personne âgée, les altérations sont plus importantes. La réduction de l'activité physique est une situation fréquemment observée chez la personne âgée (Hollman *et al.*, 2007; Topinkova, 2008). Il peut s'agir d'une diminution générale de l'activité physique, liée à un affaiblissement musculaire, ou d'une diminution ponctuelle à la suite d'une pathologie. Chez la personne âgée, la diminution d'activité physique a été bien démontrée comme un facteur d'atrophie musculaire et donc de sarcopénie (Park *et al.*, 2010; Ikezoe *et al.*, 2011a, 2011b).

## *ii. ROLE DE L'EXERCICE*

Les exercices d'endurance et de résistance ont tous deux montré un effet bénéfique sur la force et la fonctionnalité musculaire, ainsi que sur la masse musculaire (pour revue voir Landi *et al.*, 2014). Pour le moment aucune intervention n'a montré d'effet aussi bénéfique que l'activité physique, en particulier les exercices de résistance. Une revue Cochrane (Liu & Latham, 2009) combinant 121 études a conclu que, pratiquer des exercices de résistance au moins 3 fois par semaine avait un effet : faible mais positif sur la fonction, petit à modéré sur la diminution des limitations fonctionnelles et un effet important sur l'augmentation de la force. Des études menées sur la dégénérescence des jonctions neuromusculaires ont là aussi montré un impact positif de l'exercice chez la personne âgée (Rudolf *et al.*, 2014). De même, l'âge induit une diminution de l'activation et du nombre de cellules satellites dans les muscles (Welle, 2002; Snijders *et al.*, 2009) et l'exercice physique est capable d'inverser ce phénomène en activant leur prolifération (Snijders *et al.*, 2009). De plus, la restriction calorique combinée à l'exercice physique semblerait améliorer la fonction mitochondriale et le métabolisme protéique musculaires chez l'âgé (Marzetti *et al.*, 2008).

*Il apparait donc que l'exercice est une solution efficace pour lutter contre la sarcopénie. Il permet de restaurer au moins partiellement de nombreux mécanismes altérés lors du vieillissement. Ainsi, l'exercice permet à la fois d'améliorer la force, la fonctionnalité et le maintien de la masse musculaires. Cependant l'accessibilité à cette solution reste limitée puisque les personnes doivent avoir accès à un centre sportif et être accompagnées par un spécialiste. De plus, une proportion importante des personnes âgées souffre de douleurs chroniques (voir chapitre III. p52), ceci pouvant être un obstacle à la pratique d'une activité physique régulière selon l'intensité et la localisation des douleurs.*





**Figure 24 :** Mécanismes d'action de différents agents nutritionnels potentiellement responsables de la sarcopénie.

AMPK: AMP-activated protein kinase; CRMs: Caloric Restriction Mimetics; EAAs: Acides Aminés Essentiels; EMs: Exercise Mimetics; FoxO: Forkhead box O; HMB:  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylbutyrate; mTOR: mammalian Target Of Rapamycin; MuRF-1: Muscle specific RING Finger-1; OKG: ornithine  $\alpha$ -ketoglutarate; PGC-1 $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ; ROS: Espèces réactives de l'oxygène; Ub: Ubiquitine; VDR: Recepteur à la Vitamine D;  $\Omega$ 3: omega-3.

D'après: Calvani et al., 2013

**Tableau 3 :** Guide pour des apports protéiques journaliers optimaux et recommandations concernant l'exercice physique journalier chez les personnes âgées à partir de 65 ans.

Recommandations
Pour des personnes âgées en bonne santé, nous recommandons une alimentation incluant au moins 1-1,2g protéines/kg/jour.
Pour certains adultes présentant des maladies aiguës ou chroniques, 1,2-1,5g protéines/kg/jour pourrait être recommandé et éventuellement plus chez les individus avec une pathologie sévère.
Nous recommandons une activité physique journalière pour toutes les personnes âgées, aussi longtemps que l'activité est possible. Nous suggérons aussi l'entraînement en résistance, quand il est possible, comme une partie de l'entraînement global.

D'après: Deutz et al., 2014.

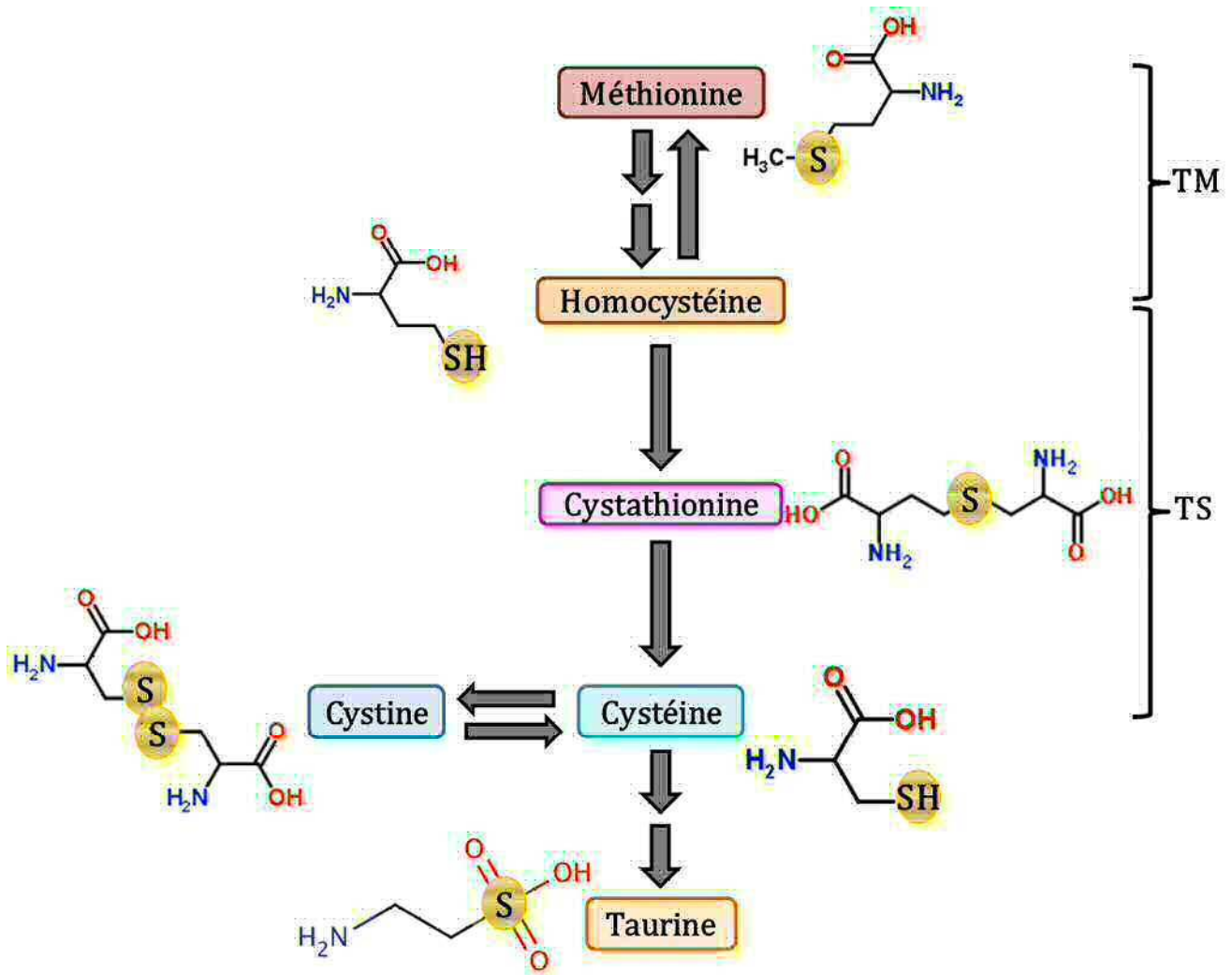
#### f. AUTRES MECANISMES MIS EN JEU

De nombreux autres mécanismes sont mis en jeu dans la sarcopénie. La myostatine, un régulateur négatif de la croissance musculaire, serait augmentée avec l'âge et jouerait elle aussi un rôle dans la sarcopénie (White & LeBrasseur, 2014). De plus, avec l'avancée en âge, il est montré que la perte de masse musculaire est concomitante avec une infiltration lipidique et de tissus conjonctif nommée myosteatose qui va venir perturber le métabolisme du muscle squelettique (Taaffe *et al.*, 2009). Ces adipocytes produisent des adipokines (leptine, resistine) et sont responsables d'une infiltration de macrophages générant une production locale de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1, TNF $\alpha$ ) (Neels & Olefsky, 2005). De nombreux composés ont été testés et ont montré des résultats plus ou moins convaincants sur la sarcopénie (**Figure 24**). Parmi eux on retrouve la vitamine D, la créatine, les omégas 3 et la restriction calorique (pour revue voir Calvani *et al.*, 2013). La vitamine D serait capable de potentialiser l'effet de l'insuline et de la leucine sur la voie mTOR (Salles *et al.*, 2013). Des substances bioactives de végétaux ont été suggérées comme mimant ces effets combinés : les CRM (Caloric Restriction Mimetics). Ces composés ont montré leur efficacité chez les modèles animaux cependant, leur intérêt et innocuité chez l'homme reste à prouver (pour revue voir Lee & Min, 2013).

*Les nombreux travaux menés dans la compréhension des mécanismes menant à la sarcopénie montrent que ce syndrome présente un large panel de facteurs impliqués dans sa pathogénèse et imbriqués entre eux. Il n'existe aujourd'hui aucun traitement clef pour prévenir, traiter ou guérir la sarcopénie. Cependant, il apparaît que la solution la plus adéquate pour combattre la sarcopénie serait à la fois de maintenir une activité physique régulière ainsi qu'une nutrition adéquate en vitamines et antioxydants et surtout maintenir un apport en protéines de qualités riches en AAI suffisant (**Tableau 3**) (Boirie, 2013; Bauer *et al.*, 2013; Deutz *et al.*, 2014).*

Comme présenté dans ce chapitre, les AA en général sont bien connus comme des facteurs anaboliques qui peuvent stimuler la synthèse protéique et inhiber la protéolyse. Ces effets sur le turn-over protéique ont été bien démontrés sur différents modèles (Muramatsu, 1990; Garlick *et al.*, 1991; Grizard *et al.*, 1995; Tesseraud *et al.*, 1996; Lobley, 1998; Prod'homme *et al.*, 2004). Cependant la carence en un seul AA indispensable est suffisante pour inhiber la synthèse protéique. C'est le cas par exemple des acides aminés soufrés (AAS) chez le poulet où leur seule carence peut inhiber la croissance (Tesseraud *et al.*, 2009). Les

AAS en plus de leur rôle important dans le métabolisme protéique, ont un rôle primordial dans la défense contre le stress oxydant. En effet, ils sont les précurseurs des principaux antioxydants intracellulaires synthétisés par notre organisme (GSH et taurine). Ils sont aussi impliqués dans la détoxification de nombreux composés, tels que les certains médicaments, *via* les réactions de conjugaison impliquant le GSH et le sulfate dont ils sont les précurseurs (Stipanuk, 2004; Stipanuk & Ueki, 2011). La médication est un facteur important du vieillissement et ainsi la prise chronique de médicament peut conduire à une utilisation augmentée des AAS pour assurer l'élimination de ces composés. Cette utilisation pourrait générer une baisse de disponibilité des AAS au niveau musculaire, la méthionine étant essentielle, ceci pourrait conduire à une altération du renouvellement protéique musculaire.



**Figure 25** : Structure des 4 acides aminés soufrés de l'organisme, (méthionine, homocystéine, cystéine, taurine) et de leurs intermédiaires métaboliques.

TM : transméthylation ; TS : transsulfuration

## *Chapitre II: Vieillessement & Acides Aminés Soufrés : cas de la cystéine*

---

### 1. LES ACIDES AMINES SOUFRES :

Dans l'organisme les acides aminés soufrés (AAS) sont au nombre de quatre (**Figure 25**): la méthionine (Met), la cystéine (Cys), l'homocystéine (Hcy) et la taurine (Tau). Les deux premiers sont les seuls AAS protéinogènes et seule la Met est indispensable. La Cys et la Met sont métaboliquement liées via les voies de transméthylation et transsulfuration (**Figure 25**). L'Hcy est un intermédiaire métabolique entre la Met et la Cys et n'est que très peu présente dans notre alimentation. La Tau est issue du catabolisme de la Cys et se retrouve dans les viandes et les produits de la mer (Huneau *et al.*, 2008). En plus d'être des AA substrats de la synthèse protéique, la Met et la Cys ont des rôles métaboliques importants dans la synthèse de composés soufrés, tel que le sulfate, et le glutathion (GSH), molécule antioxydante. Ils ont ainsi un rôle métabolique et fonctionnel important dans le maintien de la santé et la réponse aux maladies. Les données cliniques actuelles indiquent que leur métabolisme est fortement corrélé à l'état de santé, conduisant en cas de dérégulation telle que l'hyper-homocystéinémie, à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires (Graham *et al.*, 1997; Janošíková *et al.*, 2003) et de maladie d'Alzheimer (Selhub, 1999; Stipanuk *et al.*, 2004b). Les liens causaux exacts ne sont pas établis mais les propriétés pro-oxydantes de l'homocystéine seraient mises en jeu dans ces pathologies. La Cys totale plasmatique a elle aussi été impliquée comme un agent responsable de dommages oxydatifs, ou un indicateur du statut oxydatif (El-Khairi *et al.*, 1999, 2001, 2003; Ozkan *et al.*, 2002).

L'organe le plus important quantitativement dans le métabolisme des AAS est le foie. En effet, grâce à son irrigation par la veine porte, il est le premier organe à recevoir l'apport alimentaire en AAS. Par cette position, il joue un rôle critique dans la régulation du niveau plasmatique en AAS et leur disponibilité pour les tissus extra-hépatiques (Garcia & Stipanuk, 1992). Le foie joue aussi un rôle important dans la fourniture de la Tau puisqu'il est quantitativement le principal organe responsable de sa synthèse, depuis la Cys, et de sa distribution plasmatique (Stipanuk, 2004). En effet, il a été montré que chez le rat le foie capte de la Cys et de la Met et libère du GSH, de la Tau et du sulfate dans le plasma (Garcia & Stipanuk, 1992). Dans ces travaux, le rein à l'inverse du foie, capte du GSH et de la Tau et

libère de la Cys et la patte arrière ne capte pas de façon détectable les AAS mais libère du GSH et de la Met.

## 2. BESOIN, SOURCES ET RENOUVELLEMENT DES ACIDES AMINES SOUFRES

### a. BESOIN EN ACIDES AMINES SOUFRES CHEZ L'HOMME

Le besoin en AAS repose sur le besoin strict en Met de l'organisme. Cependant ce besoin en Met comprend à la fois le besoin en Met *per se* ainsi que le besoin en Cys, dont la synthèse n'est possible que depuis la Met (Huneau *et al.*, 2008). Le besoin moyen a été estimé chez l'adulte par plusieurs méthodes : le bilan azoté (Rose & Wixom, 1955), la balance méthionine (Young *et al.*, 1991), l'oxydation d'un AA indicateur (Di Buono *et al.*, 2001a) et l'oxydation d'AA indicateur combinée à la balance azotée des 24h (Kurpad *et al.*, 2003) (*pour revue voir* Courtney-Martin *et al.*, 2012). Toutes ces méthodes ont trouvé un besoin similaire compris entre 13 et 15mg AAS/kg/jour (Young & Borgonha, 2000; Di Buono *et al.*, 2001a; Turner *et al.*, 2006). La Cys a été clairement montrée comme diminuant le besoin en Met d'environ 60% lorsqu'elle est présente dans l'alimentation, chez différents modèles ainsi que l'homme. Ce phénomène « d'épargne » est associé à une modification des flux métaboliques se traduisant par une baisse de la transsulfuration et une augmentation de la reméthylation de la Met (Rose & Wixom, 1955; Baker *et al.*, 1966; Said & Hegsted, 1970; Finkelstein *et al.*, 1988; Di Buono *et al.*, 2001b, 2003; Ball *et al.*, 2006). Ainsi, les flux métaboliques d'AAS vont dépendre de l'apport alimentaire à la fois en Met et en Cys.

D'autres travaux ont montré que le sulfate pouvait lui aussi réaliser un phénomène d'épargne de la Cys et donc indirectement de la Met. Ces travaux effectués chez le poulet, le rat et l'homme, ont montré que la supplémentation en sulfate d'un régime limitant en AAS permettait une diminution de l'oxydation de la Met et une meilleure accréation protéique (Smith, 1973; Sasse & Baker, 1974; Zezulka & Calloway, 1976). Ainsi au niveau de l'organisme, les synthèses de la Cys et du sulfate sont indispensables et régulées en fonction de leurs biodisponibilités.

### b. SOURCES D'ACIDES AMINES SOUFRES

Les AAS protéiques sont présents dans les protéines de notre alimentation à une teneur comprise entre 2 et 5%. Les protéines animales et céréalières sont les plus riches en AAS (3,5 à 5%) alors que les légumineuses en contiennent moins de 3,5%. Certaines sources se



distinguent par leur richesse en Cys, c'est le cas du blé, du colza, du lactosérum et de l' $\alpha$ -lactalbumine (Huneau *et al.*, 2008).

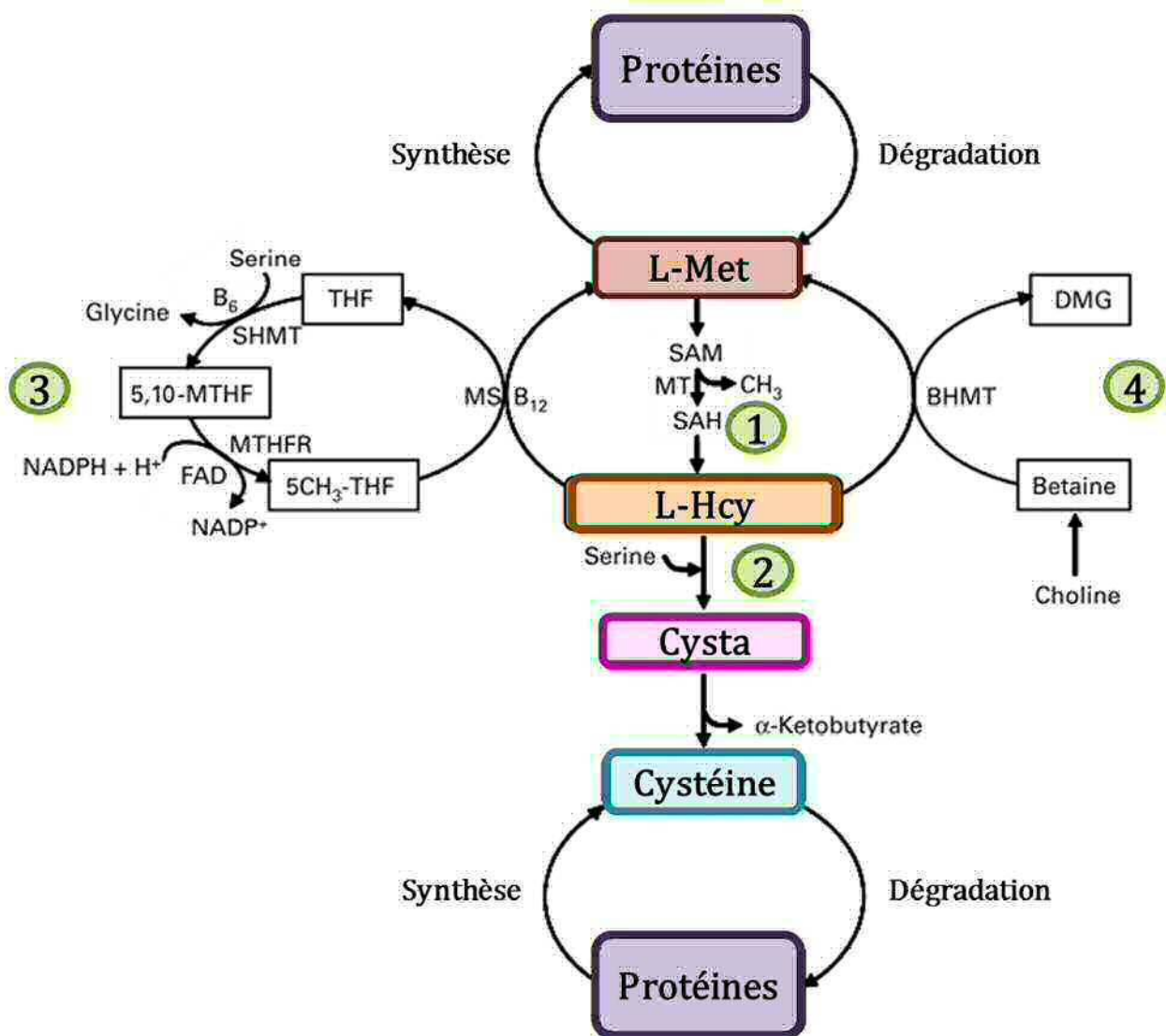
### c. BIODISPONIBILITE

L'absorption des AA issus de la digestion des protéines par l'épithélium intestinal est très efficace, de l'ordre de 95-99% (Stipanuk, 2004). La Met est transportée sous forme d'AA seul via des transporteurs aux AA de type neutre ( $B^{0,+}$ , ASC & L), ou comme peptide par un système de transport dédié. La Met est transportée à la fois par des transporteurs dépendants et indépendants du sodium ( $Na^+$ ) (Soriano-García *et al.*, 1998). La Cys est transportée sous forme AA ou cystine (CySS, deux Cys liées par un pont disulfure) ou comme peptide par des transporteurs présents au niveau de la muqueuse intestinale (Shanker & Aschner, 2001). La Cys est transportée via des transporteurs (B, ASC)  $Na^+$  dépendants (Segawa *et al.*, 1999) alors que le transport de la cystine est assuré par des transporteurs ( $b^{0,+}$ , a)  $Na^+$  indépendants (McBean & Flynn, 2001).

Le foie utilise les AAS pour la synthèse protéique mais aussi pour la synthèse du GSH, de la Tau et du sulfate (Garcia & Stipanuk, 1992). Les tubules rénaux ont un système de transporteurs semblable à celui de l'épithélium intestinal, ainsi l'absorption rénale de la Cys et de la Met est normalement très élevée, de l'ordre de 94%. Cependant les reins en relibèrent une quantité importante, en particulier de Cys. La perte urinaire d'AAS est faible, entre 22 et 285  $\mu\text{mol}/\text{jour}$  chez l'homme (Rana & Sanders, 1986), les apports moyens en AAS étant de 26  $\text{mmol}/\text{jour}$  (Stipanuk, 2004). Des études réalisées chez l'adulte et l'enfant montrent que dans les composés soufrés retrouvés dans l'urine, le sulfate compte pour 77-92%, l'ester de sulfate 7-9%, la taurine 2-6% et la Cys + CySS pour 0,6-0,7% du total. La Met, l'Hcys et la Cystationine (Cysta) sont retrouvées à moins de 0,2% (pour revue voir Stipanuk, 2004).

### d. RENOUVELLEMENT DES ACIDES AMINES SOUFRES

En plus des apports alimentaires, le renouvellement protéique et peptidique alimente les pools de Cys et Met libres. D'après plusieurs travaux réalisés chez l'homme, la protéolyse apporterait environ 38 et 32  $\text{mmol}/\text{jour}$  de Cys et de Met, respectivement (Fukagawa *et al.*, 1998; Raguso *et al.*, 2000; MacCoss *et al.*, 2001). Ce turnover protéique a majoritairement lieu au sein de la cellule, mais il prend aussi en compte les protéines sécrétées dans le tractus gastro-intestinal, qui sont digérées et réabsorbées sous forme d'AA et peptides (Stipanuk, 2004). Chez l'adulte, ce turnover est relativement constant et une quantité de protéines équivalente à la quantité dégradée est resynthétisée quotidiennement. La dégradation du GSH



**Figure 26** : Schéma général du métabolisme de la méthionine.

1) Voie de transméthylation ; 2) Voie de transsulfuration ; 3) Reméthylation folate-dépendante ; 4) Reméthylation indépendante des folates.

B<sub>6</sub> : vitamine B<sub>6</sub> ; B<sub>12</sub> : vitamine B<sub>12</sub> ; BHMT : Bétaïne Homocystéine Méthyltransférerase ; 5-CH<sub>3</sub>THF : 5-méthyltetrahydrofolate ; DMG : diméthylglycine ; MS : Méthionine Synthase ; MT : Méthyl Transférerase ; 5,10-MTHF : 5,10-Méthyl Tetrahydrofolate ; MTHFR : Méthylène-tetrahydrofolate réductase ; SAH : S-AdenosylHomocystéine ; SAM : S-AdenosylMéthionine ; SHMT : Sérine HydroxyméthylTransférerase ; THF : TétraHydroFolate

D'après: Tesseraud *et al.*, 2009



contribue elle aussi à l'apport de Cys. En cas d'apports faibles en AAS, le GSH servirait de stock de Cys (Cho *et al.*, 1981, 1984) pour fournir cet AA à la synthèse protéique. En effet, des études ont montré qu'en cas d'apports limités en AAS, le GSH tissulaire est dépleté alors que la synthèse protéique est maintenue (Stipanuk *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2004). Ces travaux montrent par ailleurs que la synthèse protéique est prioritaire sur celle du GSH.

En revanche en cas d'apports suffisants, chez l'homme le flux de GSH a été estimé aux alentours de 40 mmol/jour ce qui est légèrement supérieur à celui estimé pour la Cys dans le pool protéique corporel (Lauterburg & Mitchell, 1987; Storch *et al.*, 1988, 1990; Fukagawa *et al.*, 1996, 1998).

### 3. METABOLISME DE LA METHIONINE

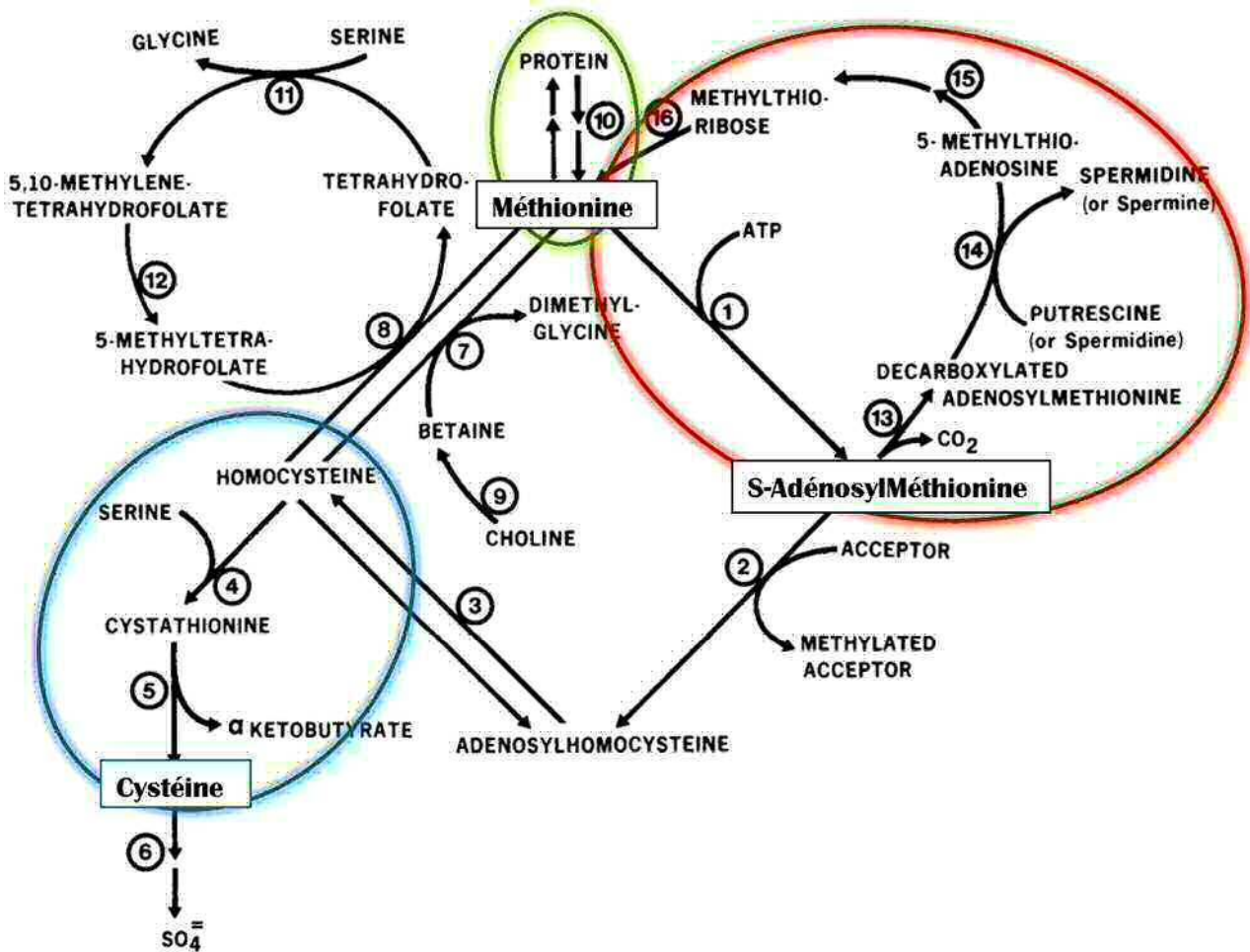
La Met est le seul AAS strictement indispensable chez les mammifères. En effet, la Cys peut être synthétisée depuis la Met et la sérine par la plupart des organes du système digestif (foie, reins, pancréas et intestin) (Finkelstein & Martin, 2000; Stipanuk & Ueki, 2011). Au sein de l'organisme, la Met présente trois fonctions métaboliques principales (**Figure 26**):

- La formation du donneur de méthyl, S-AdenosylMéthionine (SAM), *via* la transméthylation qui conduit à la formation d'Hcy. La Met est ainsi le donneur de méthyl principal de l'organisme (Stipanuk, 1986; Griffith, 1987). L'utilisation de la SAM conduit à la formation de produits tels que la créatine et la phosphatidylcholine ainsi que les polyamines.
- La formation de Cys *via* la transsulfuration depuis l'Hcy.
- La synthèse des protéines corporelles.

Chez l'homme, la Met est cependant principalement utilisée pour la synthèse protéique. En effet, avec une alimentation couvrant les besoins, 75 à 85% de l'utilisation de la Met en phase postprandiale est dédiée à la synthèse protéique (Hiramatsu *et al.*, 1994; MacCoss *et al.*, 2001).

#### a. LA TRANSMETHYLATION: DE LA METHIONINE A L'HOMOCYSTEINE

La première étape de la transméthylation conduit à la formation de SAM (**Figure 27(1)**). Cette étape est catalysée par une Méthionine-S-Adenosyl-Transférase (MAT) qui utilise l'ATP pour adényler la Met et former la SAM. Deux gènes codent pour cette enzyme, *MAT1A* spécifique du foie et *MAT2A* qui s'exprime dans tous les tissus (Chou, 2000). La forme hépatique codée par *MAT1A* est présente sous forme de tétramère (MAT1) ou de



**Figure 27** : Les trois voies principales du métabolisme de la méthionine.

Rouge : formation du donneur de méthyl S-Adénosylméthionine ; Bleu : formation de la cystéine depuis l'homocystéine ; Vert : synthèse des protéines corporelles.

Les numéros représentent les enzymes ou réaction suivantes :

1) Méthionine AdénosylTransférase ; 2) S-adenosylmethionine transméthylation ; 3) Adenosylhomocystéinase ; 4) Cystathionine- $\beta$ -synthase (CBS) ; 5) Cystathionine- $\gamma$ -liase (CSE) ; 6) Série de réactions conduisant à la formation du sulfate ; 7) Bétaïne-homocystéine méthyltransférase ; 8) Méthylfolate-homocystéine méthyltransférase ; 9) Choline déhydrogénase & bétaïne aldehyde déhydrogénase ; 10) Equilibre entre utilisation de la méthionine pour la synthèse protéique et libération par la protéolyse ; 11) Sérine hydroxyméthylase ; 12) Méthylentetrahydrofolate reductase ; 13) Adenosylmethionine decarboxylase ; 14) Spermidine et spermine synthases ; 15) Méthylthioadenosine phosphorylase ; et 16) Conversion du méthylthioribose-l-phosphate en méthionine.

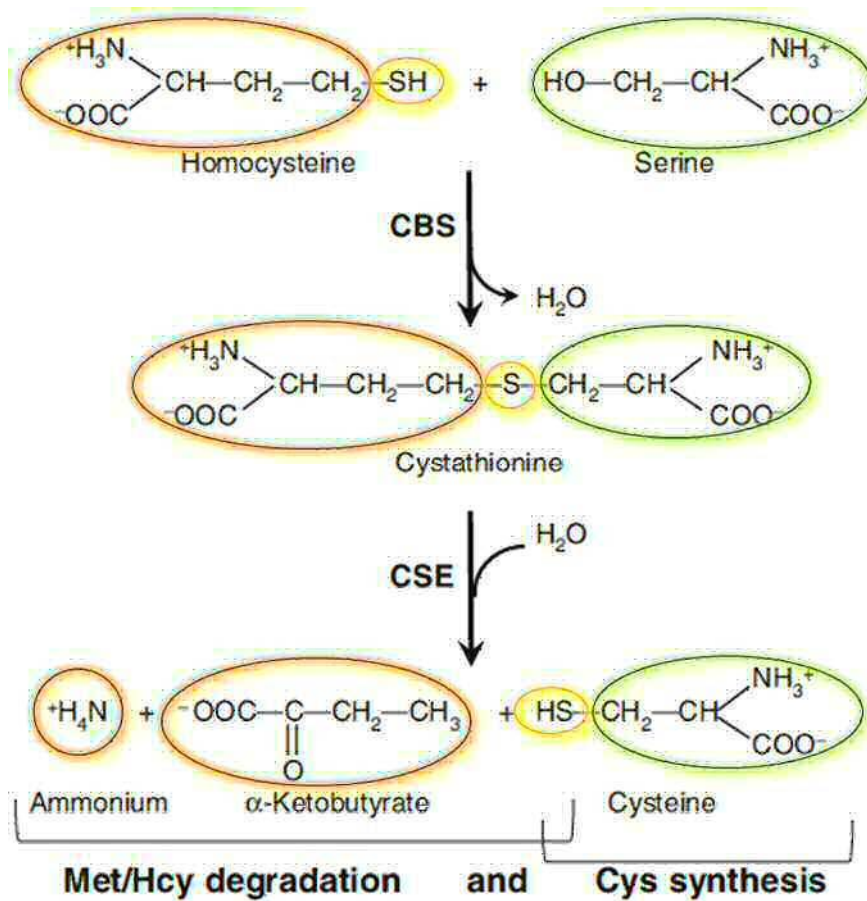
D'après: Finkelstein, 1990

dimère (MAT3). Ces deux formes sont régulées par la concentration hépatique en Met, le substrat, ainsi que celle en SAM, le produit de la réaction. La MAT1 a un  $K_m$  modéré et est peu inhibée par la SAM alors que la MAT3, forme majoritaire dans le foie, a un  $K_m$  élevé et est activée par la SAM (Sullivan & Hoffman, 1983; Finkelstein, 1990). En revanche la protéine MAT2, présente dans tous les tissus, a un faible  $K_m$  pour la Met et est inhibée par la SAM (Sullivan & Hoffman, 1983; Kotb & Geller, 1993). Ainsi, le foie peut répondre à un excès de Met en la transformant rapidement en SAM. En revanche, les autres tissus ne possédant que la MAT2, sont à la vitesse maximale et relativement insensibles à une augmentation de la concentration en Met, mais sensibles au rétrocontrôle négatif de la SAM (Stipanuk, 2004).

La SAM est un donneur de méthyl primordial pour de nombreux composés cellulaires tels que la créatine, les protéines et l'ADN. Elle est le donneur de méthyl essentiel utilisé par de nombreuses méthyltransférases, excepté pour la méthylation de l'Hcy (servant à redonner la Met). Son groupement méthyl est transféré sur un atome d'oxygène, de soufre ou d'azote. En donnant son méthyl, la SAM produit un accepteur méthylé et la S-Adenosylhomocystéine (SAH), deuxième intermédiaire de la transméthylation. Dans un troisième temps, la SAH est hydrolysée en Hcy + adénosine par la SAH hydrolase (**Figure 27(3)**) (Eloranta *et al.*, 1982; Eloranta & Kajander, 1984; Finkelstein, 1990). Cette enzyme est présente dans tous les tissus et elle contient un NAD lié qui participe à la réaction, son  $K_m$  est proche de la concentration physiologique tissulaire en SAH (Elrod *et al.*, 2002; Kloor *et al.*, 2003).

L'Hcy formée peut soit entrer de façon irréversible dans la voie de la tanssulfuration, soit entrer dans la voie de reméthylation pour redonner de la Met. La reméthylation est catalysée par la Met synthétase, enzyme distribuée dans tous les tissus qui utilise la méthylcobalamine comme cofacteur (**Figure 27(8)**). Le groupement méthyl provient du  $N^5$ -méthyl- tetrahydrofolate (THF) qui est synthétisé par la voie des folates (Kutzbach & Stokstad, 1971; Sullivan & Hoffman, 1983). La reméthylation de l'Hcy peut aussi être assurée par la bétaine-Hcy méthyltransférase, enzyme présente seulement dans le foie, les reins et l'œil (Sunden *et al.*, 1997; Delgado-Reyes *et al.*, 2001). C'est une zinc métaloenzyme qui utilise la bétaine comme donneur de méthyl (Millian & Garrow, 1998) (**Figure 27(7,9)**).

Ainsi l'Hcy se situe au carrefour de deux voies métaboliques conduisant à la synthèse des deux AAS protéinogènes : la Met et la Cys. Elle est l'unique intermédiaire du métabolisme des AAS qui peut être reméthylé pour resynthétiser de la Met.



**Figure 28** : Voie de la transsulfuration conduisant à la dégradation de l'homocystéine et la synthèse de la cystéine.

CBS : Cystathionine- $\beta$ -synthase ; CSE : Cystathionine- $\gamma$ -liase

D'après: Stipanuk & Ueki, 2011

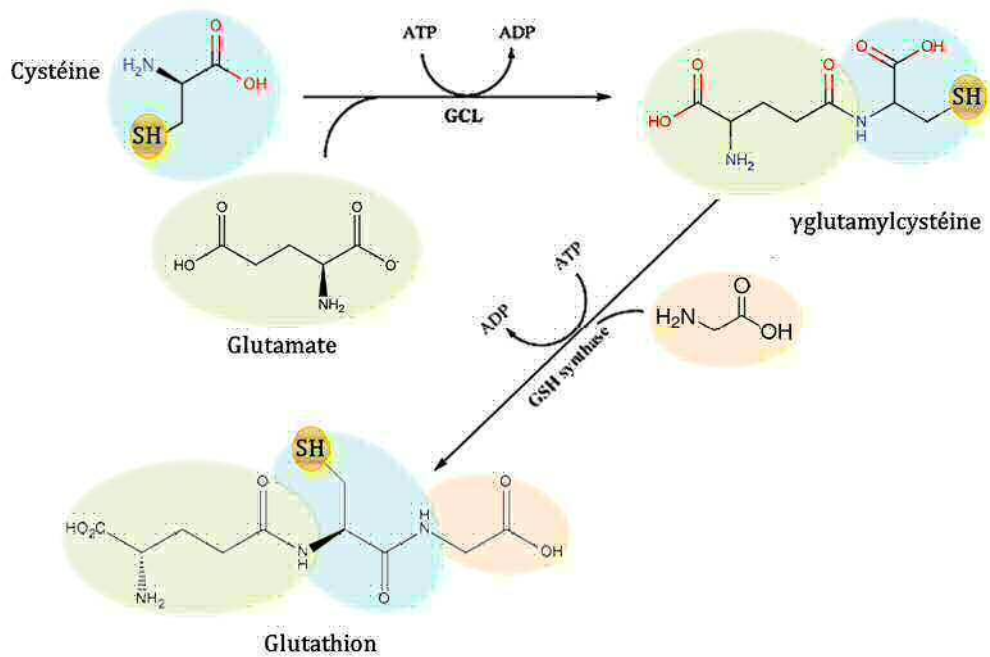
## b. LA TRANSSULFURATION : DE L'HOMOCYSTEINE A LA CYSTEINE

La voie de la transsulfuration est essentiellement la seule voie catabolique de la Met en condition physiologique normale, bien que comme tout AA, elle puisse être transaminée et décarboxylée, cette contribution serait très faible (Bloom *et al.*, 1989; Finkelstein, 1990). La transsulfuration se fait en plusieurs étapes, elle part de l'Hcy et passe par la formation d'un autre composé intermédiaire, la cystathionine (Cysta) pour aboutir à la Cys. La transsulfuration implique le transfert du soufre de la Met sur le squelette carboné d'une sérine qui formera la Cys (Finkelstein & Mudd, 1967; Finkelstein *et al.*, 1988; Rao *et al.*, 1990) (**Figure 27(4-6)**). Elle représente une source significative de Cys, chez l'homme elle est estimée représenter 5 à 14% du flux de Cys (Hiramatsu *et al.*, 1994; Fukagawa *et al.*, 1996). Cette réaction est catalysée par deux enzymes dépendantes du pyridoxal 5'-phosphate (forme active de la vitamine B6): la cystathionine  $\beta$  synthase (CBS) et la cystathionine  $\gamma$  liase (ou cystathionase, CSE). La CBS permet la formation de la Cysta par condensation de l'Hcy et de la sérine dans une réaction irréversible (Finkelstein, 2000; Banerjee *et al.*, 2003). La Cysta est alors hydrolysée par la CSE pour former la Cys. La chaîne carbonée de l'Hcy donnera de l' $\alpha$ -cétobutyrate et son groupement amine de l'ammoniac (**Figure 28**). Contrairement à la transméthylation qui est ubiquitaire, la transsulfuration est restreinte à certains tissus et ceux qui n'en sont pas pourvus nécessitent un apport de Cys. La CBS présente la plus forte activité dans le foie et le pancréas chez le rat et plus faiblement dans les reins, l'intestin, le cerveau et le tissu adipeux (Mudd *et al.*, 1965; Stipanuk & Ueki, 2011). Chez l'homme, le foie et le pancréas sont aussi les deux sites présentant la plus forte activité (Mudd *et al.*, 1965). Les plus hauts niveaux de CSE ont eux aussi été trouvés dans le foie, le pancréas et les reins (Mudd *et al.*, 1965; Stipanuk & Ueki, 2011). Les muscles cardiaque et squelettiques sont incapables de synthétiser la Cys car ils ne possèdent aucune des enzymes nécessaires (Stipanuk & Ueki, 2011). Ces tissus vont donc être dépendants d'un apport en Cys assuré par le plasma.

## 4. METABOLISME DE LA CYSTEINE

La Cys pouvant être synthétisée à partir de la Met, elle peut donc être considérée comme non indispensable. Cependant, elle devient conditionnellement indispensable dans des situations particulières, comme le stress et certains états inflammatoires, où son besoin est fortement augmenté. Ces aspects sont détaillés dans le paragraphe 6.a p45. Au niveau de l'organisme, la Cys a plusieurs fonctions métaboliques importantes :

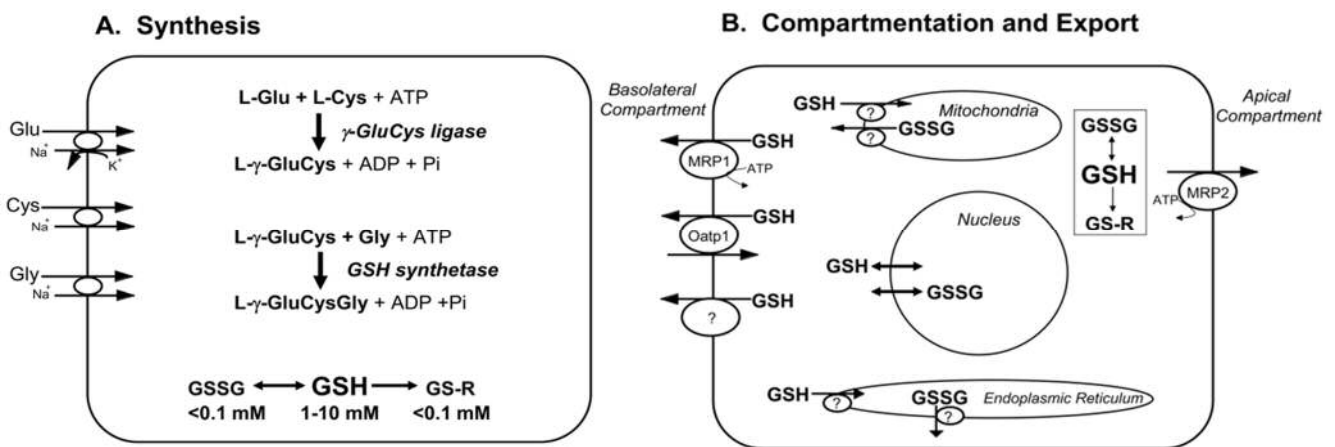
- La synthèse de composés anti-oxydants : GSH et Tau
- La synthèse du coenzyme A



**Figure 29** : Synthèse du glutathion.

Les réactions ATP-dépendante créent une liaison amide entre la cystéine et le groupement carboxyl du glutamate puis entre la cystéine et la glycine. GCL : Glutamate cystéine ligase.

Adapté de: Forman *et al.*, 2009



**Figure 30** : Synthèse et transport intra- et extracellulaire du glutathion.

A) Le glutathion est synthétisé dans le cytoplasme depuis la cystéine, le glutamate et la glycine. B) Le glutathion est distribué dans la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau en petites quantités, ainsi que hors de la cellule dans le sang et la bile.

Cys : Cystéine ; Glu : glutamate ; Gly : glycine ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; MRP : Multidrug Resistance associated Protein ; OATP1 : Organic Anion Transporter Polypeptides

D'après: Ballatori *et al.*, 2009



- La synthèse du sulfate
- La synthèse des protéines corporelles

De plus, la Cys constitue un couple redox entre sa forme sulhydryle prédominante au niveau intracellulaire et sa forme dissulfide, cystine (CySS), prédominante dans le milieu extra-cellulaire (Lu, 1999). En effet, dans les fluides extracellulaires la Cys s'auto-oxyde rapidement en CySS et est rapidement réduite en Cys dès son entrée dans la cellule (Bannai & Tateishi, 1986).

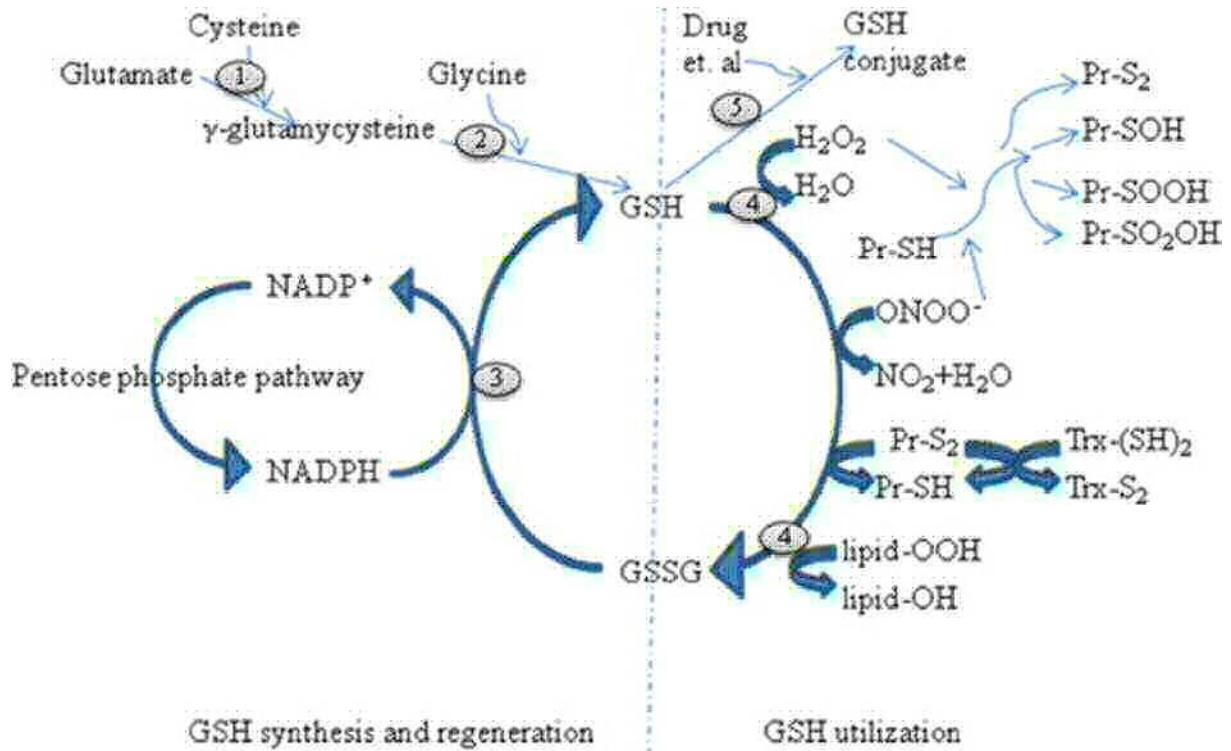
#### a. SYNTHÈSE DU GLUTATHION

##### i. LE GLUTATHION

Le GSH ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl-glycine) est un tripeptide composé de glutamate, glycine et cystéine (**Figure 29**). C'est l'antioxydant soluble intracellulaire le plus abondant chez les mammifères. Sa concentration cellulaire varie de 1 à 10 mM, le foie présentant la plus forte abondance. Il est synthétisé uniquement dans le cytoplasme et une petite partie est transportée dans la mitochondrie, le pool mitochondrial est estimé à 10-15% du total (Yuan & Kaplowitz, 2009; Bachhawat *et al.*, 2013). Une petite partie serait aussi transportée dans le noyau et le réticulum endoplasmique (Ballatori *et al.*, 2009) (**Figure 30**). Le GSH est aussi un élément important de la signalisation liée au stress oxydant ainsi que de la détoxification des xénobiotiques. Il peut ainsi moduler la prolifération cellulaire, l'apoptose, la fonction immunitaire et la fibrogenèse. Chez l'homme, il est diminué dans de nombreuses pathologies telles que la cirrhose (Bianchi *et al.*, 2000), le diabète (Ghosh *et al.*, 2004) ou encore la maladie d'Alzheimer (Liu *et al.*, 2005) et le SIDA (Jahoor *et al.*, 1999). Sa concentration est aussi diminuée après intervention chirurgicale (Luo *et al.*, 1998), en cas de sepsis (Lyons *et al.*, 2001), ou de malnutrition protéino-énergétique (Hum *et al.*, 1992; Reid, 2001; Badaloo *et al.*, 2002) (*pour revue voir Courtney-Martin et al.*, 2012).

##### ii. ROLE DU GLUTATHION

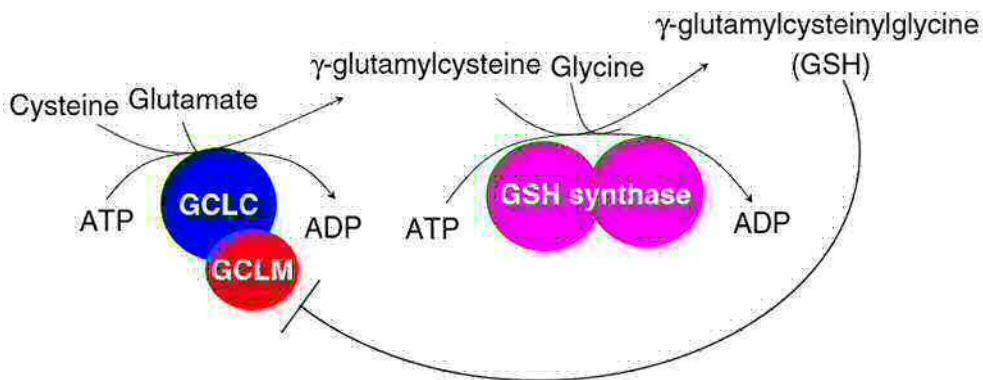
Le GSH joue un rôle important dans les différents compartiments cellulaires. Au niveau mitochondrial il joue un rôle primordial dans la régulation des processus de nécrose et apoptose ainsi que dans la défense contre les EROs produites par la chaîne respiratoire (*pour revue voir Yuan & Kaplowitz, 2009*). Au niveau cytosolique, la concentration en GSH est 100 à 10 000 fois plus importante que les autres couples redox, il joue donc un rôle primordial dans le statut redox (Yuan & Kaplowitz, 2009). Il catalyse la transformation de l' $H_2O_2$  en agissant comme un donneur d'hydrogène au niveau des Glutathione Peroxydases (GPx) qui



**Figure 31** : Voies de synthèse, régénération et utilisation du glutathion.

1)  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase; 2) GSH synthétase; 3) glutathione reductase; 4) glutathione peroxydase  
 5) glutathione S-transférase. GSH: glutathion réducté; GSSG: glutathion oxydé; Pr: protéine; SH: cystéine réduite ; SOH: acide sulfénique ; SOOH: acide sulfinique ; SO<sub>2</sub>OH: acide sulfonique ; S<sub>2</sub>: disulfure.

D'après: Yuan & Kaplowitz, 2009



**Figure 32** : Rétrocontrôle de la synthèse du glutathion.

La synthèse du GSH est catalysée par la glutamate cystéine ligase (GCL) et la GSH synthase. La GCL est composée de deux sous-unités, une catalytique (GCLC) et une modulatrice (GCLM). Dans une première étape, la GCL catalyse la formation de  $\gamma$ -glutamylcystéine puis la GSH Synthase catalyse l'ajout de la glycine pour former le GSH. Le GSH agit lui-même comme inhibiteur de sa propre synthèse.

D'après: Lu, 2013

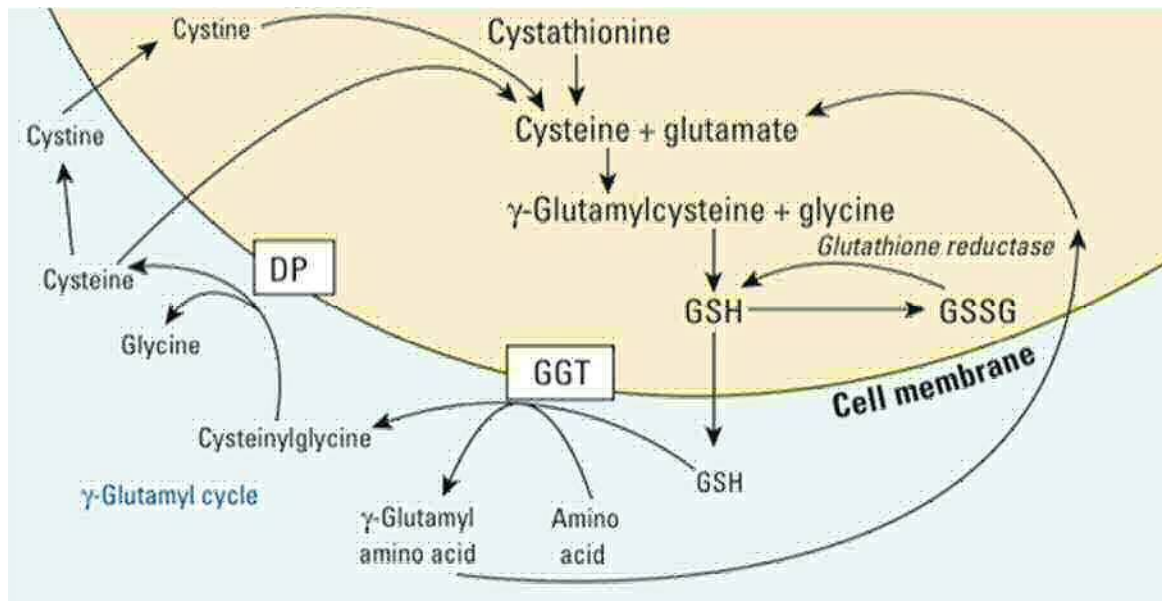


catalysent la réduction de l'  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  + GSSG. Le GSSG ainsi formé est potentiellement toxique pour les cellules mais celles-ci possèdent un niveau élevé de Glutathione Reductase (GR) qui permet de le réduire et de l'éliminer. Les Cys accessibles dans les protéines, peuvent être oxydées sur leur groupement SH libre dans un milieu pro-oxydant formant alors un acide sulfénique (S-OH). Cette forme est réversible mais peut être à nouveau oxydée en acide sulfonique (S-O<sub>2</sub>H) puis sulfonique (S-O<sub>3</sub>H), tous deux irréversibles. Le GSH joue un rôle primordial en réagissant avec l'acide sulfénique pour donner un dissulfure mixte, protéine-GSH. La glutaredoxine peut réduire ce dissulfure mixte en libérant du GSSG et ainsi préserver les groupements SH des résidus Cys des protéines. De même, le GSH protège des espèces réactives de l'azote, comme le peroxy-nitrite (ONOO<sup>-</sup>) et de l'oxydation des lipides (**Figure 31**) (Yuan & Kaplowitz, 2009). Le GSH a aussi un rôle primordial dans la conjugaison des médicaments et autres xénobiotiques (*voir paragraphe 5.a p44*).

### iii. SYNTHÈSE ET DÉGRADATION DU GLUTATHION

A part de la synthèse protéique, le GSH représente la voie principale d'utilisation de la Cys et chez l'homme plus de 50% du flux plasmatique en Cys seraient expliqués par la synthèse du GSH (Fukagawa *et al.*, 1996; Obled *et al.*, 2004). Cette synthèse s'effectue en deux étapes, catalysées par la  $\gamma$ -glutamylcystéine ligase (GCL) et la GSH synthétase (GS). La GCL est composée de deux sous-unités, une catalytique et une modulatrice, et nécessite du zinc ou du magnésium comme co-facteurs (Lu, 2009). Dans une première étape, la GCL catalyse la formation de  $\gamma$ -glutamylcystéine depuis le glutamate et la Cys. Dans un deuxième temps, la GS catalyse l'ajout de la glycine pour former le GSH (Wang & Ballatori, 1998) (**Figure 32**). Les deux facteurs limitants de cette synthèse sont l'activité de la GCL et la disponibilité en Cys (Lyons *et al.*, 2000; Badaloo *et al.*, 2002). De plus, la GCL est hautement régulée par un rétrocontrôle négatif du GSH lui-même. Au sein de la cellule c'est à la fois la concentration en GSH et le ratio GSH/GSSG (forme réduite/forme oxydée) qui sont très régulés. La forme GSH est largement prédominante, ~98% du total (Akerboom *et al.*, 1982; Ballatori *et al.*, 2009; Forman *et al.*, 2009).

Le GSH est soumis à un turn-over permanent, comme celui des protéines. Chez l'homme, le flux de Cys estimé qui y contribue est de 40 mmol/jour soit un flux similaire à celui du turn-over protéique (Lauterburg & Mitchell, 1987; Fukagawa *et al.*, 1996). Le renouvellement du GSH prend en compte son efflux, le transport inter-organelle ainsi que son utilisation par la cellule (Yuan & Kaplowitz, 2009). Ce turn-over n'est pas le même dans tous les organes. Il a été montré chez le rat qu'il est élevé dans le foie et les reins et faible dans le



**Figure 33** : Cycle  $\gamma$ -glutamyl du glutathion.

Le cycle  $\gamma$ -glutamyl est responsable du turn-over du glutathion qui est exporté hors de la cellule. La  $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT) transfère le  $\gamma$ -glutamyl sur un acide aminé, produisant du cysteinylglycine et du  $\gamma$ -glutamyl amino acid. Le cysteinylglycine est converti en cysteine et glycine par la dipeptidase (DP) et les produits peuvent être transportés dans la cellule.

D'après: Hall *et al.*, 2013

sang et le muscle, l'intestin étant intermédiaire (Potter & Tran, 1993). Le turn-over du GSH passe par sa dégradation et resynthèse, or la dégradation de ce composé nécessite son efflux de la cellule. La dégradation du GSH n'est possible que par la  $\gamma$ -GlutamylTranspeptidase ( $\gamma$ GT). Cette enzyme située sur la membrane externe des cellules est responsable de la dégradation du GSH en cystéinyl-glycine et glutamate. La  $\gamma$ GT est supposée être active à la surface de toutes les cellules de mammifères et plus fortement au niveau rénal (Deneke & Fanburg, 1989; Bachhawat *et al.*, 2013). C'est ce cycle de synthèse, transport et dégradation du GSH qui est nommé «  $\gamma$ -glutamyl cycle », il permet aussi l'excrétion des composés conjugués au GSH (Ballatori *et al.*, 2009).

#### iv. TRANSPORT EXTRACELLULAIRE DU GLUTATHION

Le cycle  $\gamma$ -glutamyl a été décrit pour la première fois par Meister (1988). Dans ce cycle, le GSH est exporté de la cellule puis hydrolysé par la  $\gamma$ GT. Le glutamate résultant est accepté par un AA (généralement la cystine) et la cysteinylglycine est libérée puis coupée par une dipeptidase en Cys et glycine (**Figure 33**). Le glutamate-AA peut être retransporté à l'intérieur de la cellule où il est dégradé pour refournir du glutamate. Ainsi, une fois retourné dans la cellule, les trois AA peuvent être réutilisés pour la synthèse du GSH mais aussi la synthèse des protéines, du sulfate et de la Tau. Pour ces raisons, le GSH est considéré comme une forme de réserve en Cys mobilisable en fonction des besoins cellulaires (Cho *et al.*, 1981, 1984; Meister, 1988; Lu, 2009; Ballatori *et al.*, 2009). Dans le foie en particulier, le GSH et les composés liés au GSH peuvent aussi être excrétés vers la bile et y être dégradés (Ballatori *et al.*, 1986, 1988, 1989). Ainsi les produits de dégradation sont réabsorbés par la cellule et réutilisés (Ballatori *et al.*, 1986, 1988; Simmons *et al.*, 1991, 1992; Ballatori & Rebeor, 1998; Rebeor *et al.*, 2002 ; *pour revue voir* Ballatori *et al.*, 2009).

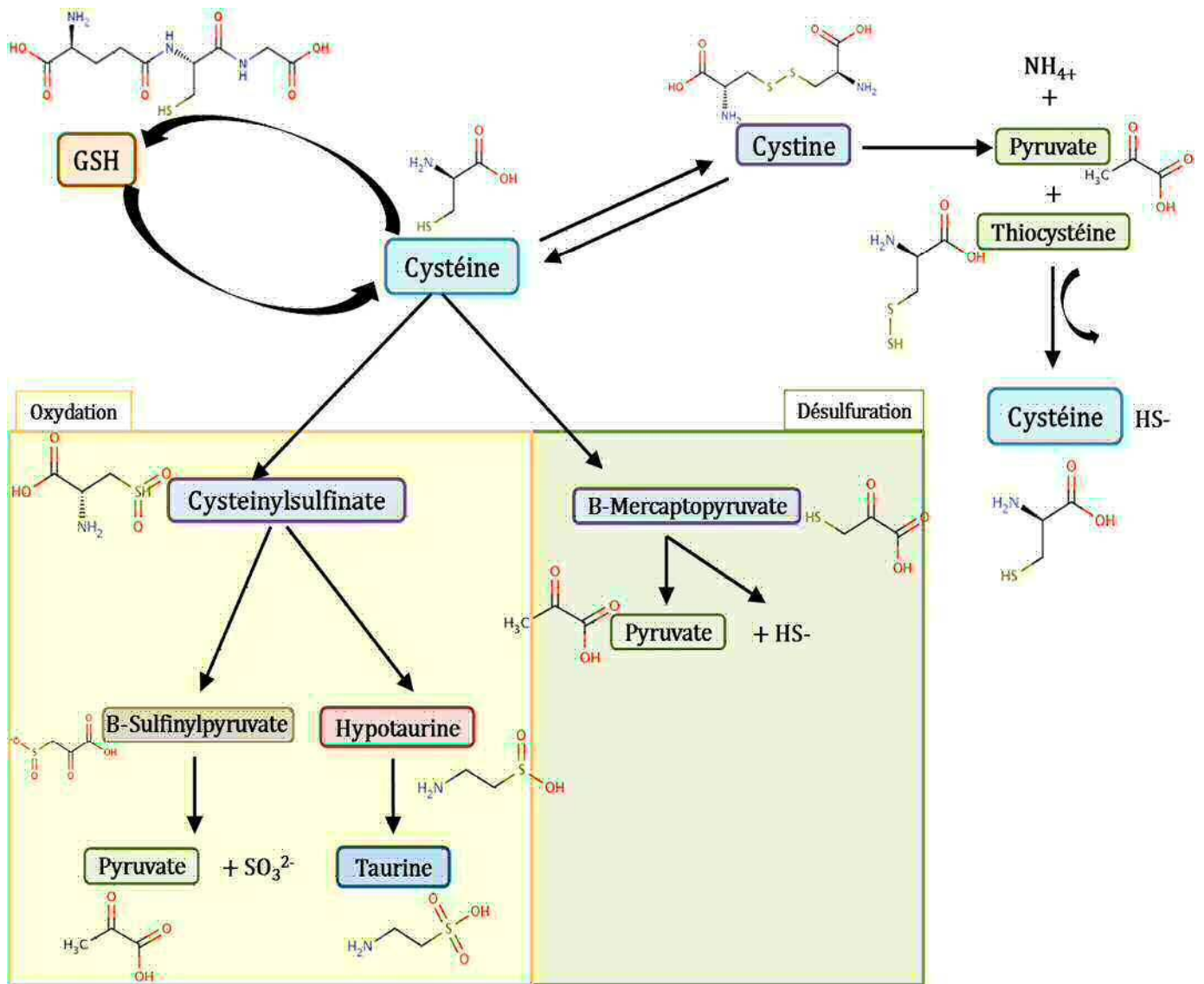
L'étude des transporteurs responsables de l'export du GSH chez les mammifères a présenté de nombreuses contraintes techniques : le manque d'inhibiteurs, la réactivité du GSH avec de nombreuses molécules (Ballatori, 1994, 2002) et l'apparente faible affinité et efficacité des transporteurs (Ballatori & Dutczak, 1994; Paulusma *et al.*, 1997; Rebeor *et al.*, 2002; *pour revue voir* Bachhawat *et al.*, 2013). Malgré ces difficultés, le rôle des Multidrug Resistance associated Protein (MRP), protéines localisées sur la membrane plasmique, a été mis en évidence dans plusieurs travaux. Des travaux sur cultures cellulaires ont montré leur implication dans l'efflux du GSH des cellules pulmonaires (Zaman *et al.*, 1995). Des souris KO pour la MRP1, montrent d'importantes perturbations de la concentration intracellulaire en GSH. Chez ces souris, tous les organes connus pour exprimer la MRP1 (Ballatori *et al.*, 2009)

tels que le cerveau, le cœur et les muscles ont donc des concentrations largement supérieures (20-90%) en GSH. En revanche, le foie et l'intestin n'expriment pas ou très peu la MRP1 et leur quantité de GSH n'est pas affectée par son absence (Lorico *et al.*, 1997). Le rôle de la MRP1 dans l'export du GSH a été confirmé sur culture cellulaire humaine (Marchan *et al.*, 2008). Pour la MRP2, des travaux sur des souris KO ont montré cette fois une augmentation du GSH hépatique, indiquant que le GSH est exporté par le foie vers la bile, plus spécifiquement par la MRP2 (Chu *et al.*, 2006). La protéine MRP2 a été détectée majoritairement au niveau de la membrane apicale des cellules hépatiques, ainsi qu'au niveau intestinal et rénal (Schaub *et al.*, 1999; Mottino *et al.*, 2002). Le rôle de la MRP2 dans l'export du GSH par les cellules hépatiques a aussi été montré chez le rat (Ballatori & Rebbear, 1998; Rebbear *et al.*, 2002). La MRP2 est aussi impliquée dans l'export de molécules conjuguées au GSH pour leur détoxification.

Les MRP effectuent un transport ATP dépendant, or les travaux de Ballatori & Dutczak, ont mis en évidence chez le rat un export du GSH hépatique vers la bile ATP indépendant (Ballatori & Dutczak, 1994). Ceci laisse donc supposer qu'il existe un autre système de transport du GSH. Récemment, la famille des Organic Anion Transporter Polypeptides (OATP) et le membre 1A2 en particulier, a été mise en évidence comme ayant un rôle dans le transport du GSH indépendant de l'ATP (Li *et al.*, 1998a). Cependant ces données n'ont pas été confirmées et il existe de nombreuses isoformes (Hagenbuch & Meier, 2003). L'étude de certaines isoformes humaines a fourni des résultats opposés, accordant un rôle de l'OATP 1B3 dans l'efflux du GSH (Briz *et al.*, 2006; Mahagita *et al.*, 2007).

Un autre type de transporteur ATP dépendant a été étudié, les ATP-Binding Cassette transporteurs (ABC) et l'ABCG2 a montré les mêmes capacités de protection cellulaire contre les dommages chimiques (Hardwick *et al.*, 2007). Ce transporteur a été étudié sur des cellules humaines et son inhibition/activation est montrée clairement corrélée à l'augmentation/diminution du GSH (Brechtbuhl *et al.*, 2010). Cette protéine est située au niveau de la membrane plasmique (Hardwick *et al.*, 2007) et permettrait donc chez l'homme un efflux du GSH hépatique vers le plasma.

En ce qui concerne l'import du GSH, il peut entrer entier dans la cellule grâce à des transporteurs spécifiques qui ne sont pas présents sur tous les types cellulaires (Obled *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré que certains tissus présentent des transporteurs sodium dépendant ou indépendant (Bachhawat *et al.*, 2013). Au niveau rénal, le rat présente un transporteur Na<sup>+</sup>-dépendant permettant l'absorption du GSH circulant, sans dégradation du tripeptide (Lash & Jones, 1983, 1984). Le rein présente un métabolisme particulier concernant



**Figure 34** : Voies métaboliques de la cystéine : synthèse du glutathion, de la taurine et molécules soufrées.

Adapté de: Stipanuk, 2004

la Cys et le GSH. En effet, il présente des concentrations très élevées de Cys et une activité GCL 10 à 30 fois plus élevée que le foie (Finkelstein *et al.*, 1982; Stipanuk *et al.*, 2002). Le turnover du GSH est très élevé dans le rein, il apparaît donc probable que la Cys soit surtout utilisée pour la synthèse du GSH que pour la synthèse protéique et le catabolisme.

Au niveau intestinal, des travaux sur culture de cellules humaines ont mis en évidence la présence d'un transporteur au GSH permettant l'entrée dans les cellules intestinales du GSH circulant (Iantomasi *et al.*, 1997). Au niveau cérébral, des travaux sur culture de cellules murines ont montré la présence de transporteurs Na<sup>+</sup> dépendants (Kannan *et al.*, 1999).

Plusieurs travaux ont été effectués afin d'étudier le possible échange inter-organes du GSH et de ses métabolites. Les travaux de Garibotto *et al.*, (2003) montrent que les organes splanchniques et la jambe libèrent de la cysteinylglycine dans la circulation qui est captée en quantité équivalente par les reins. Les reins libèrent de la Cys captée ensuite majoritairement par le foie. Dans ces travaux la quantité de cysteinylglycine libérée par la jambe représente 12-14% du GSH total musculaire. Les travaux de Burk et Hill montrent que chez le rat le muscle libère du GSH dans le plasma, en particulier lorsque les GSH plasmatique et hépatique sont déplétés (Burk & Hill, 1995). Chez le rat, le foie a aussi un rôle dans la fourniture de GSH au niveau plasmatique mais les données ne sont pas claires sur les proportions exactes, les chiffres allant de 40% à 83% (Ookhtens & Kaplowitz, 1998). Chez l'homme, le foie semble être un contributeur moins important à la fourniture du GSH au niveau plasmatique et les reins contribuent en proportion beaucoup plus restreinte à sa dégradation (Purucker & Wernze, 1990). Peu de données sont disponibles quant à la relation entre GSH plasmatique et érythrocytaire. Les travaux de Giustarini *et al.*, (2008) montrent que les érythrocytes humains sont capables de libérer du GSH et seraient donc une source de GSH pour le plasma, mais ces résultats n'ont été obtenus qu'*in vitro* et avec une carence totale de GSH plasmatique

#### b. OXYDATION DE LA CYS : SYNTHÈSE DE TAURINE, PYRUVATE ET SULFITE

La Cys a deux voies cataboliques principales, l'une indépendante et l'autre dépendante du cystéinesulfinate (CSA). La voie indépendante conduit à la dessulfuration de la Cys et la dépendante à son oxydation. Le CSA est formé par oxydation du groupe soufré avant sa séparation de la chaîne carbonée ou sa décarboxylation pour former l'hypotaurine (Htau ; **Figure 34**). C'est la Cys dioxygénase (CDO) qui est responsable de l'oxydation du groupement thiol de la Cys par ajout d'oxygène (Yamaguchi *et al.*, 1978; Bagley *et al.*, 1995; Stipanuk *et al.*, 2004b; Stipanuk & Ueki, 2011). Cette enzyme a une forte affinité pour la Cys et est très exprimée dans le foie (Hirschberger *et al.*, 2001; Bella *et al.*, 2002). La CDO n'est



pas présente dans tous les tissus, on la trouve cependant dans les reins, les poumons et le cerveau ainsi que dans le tissu adipeux chez le rat (Tsuboyama *et al.*, 1996; Hirschberger *et al.*, 2001; Stipanuk *et al.*, 2002; Ide *et al.*, 2002; Stipanuk & Ueki, 2011).

Le CSA a deux devenir possibles : la formation de Tau ou de pyruvate et sulfate (**Figure 34**). La synthèse de la taurine nécessite la cystéinesulfinate decarboxylase (CSD) qui est présente en forte concentration dans le foie et permet la conversion du CSA en Htau par élimination de CO<sub>2</sub> (Bella *et al.*, 2002; Stipanuk & Ueki, 2011). L'Htau est ensuite oxydée en Tau par un mécanisme non élucidé. La synthèse de Tau hépatique a bien été mise en évidence (Bagley & Stipanuk, 1995; Bella & Stipanuk, 1995; Bella *et al.*, 1996) et des mesures de différence artériovoineuse confirment ces résultats (Garcia & Stipanuk, 1992).

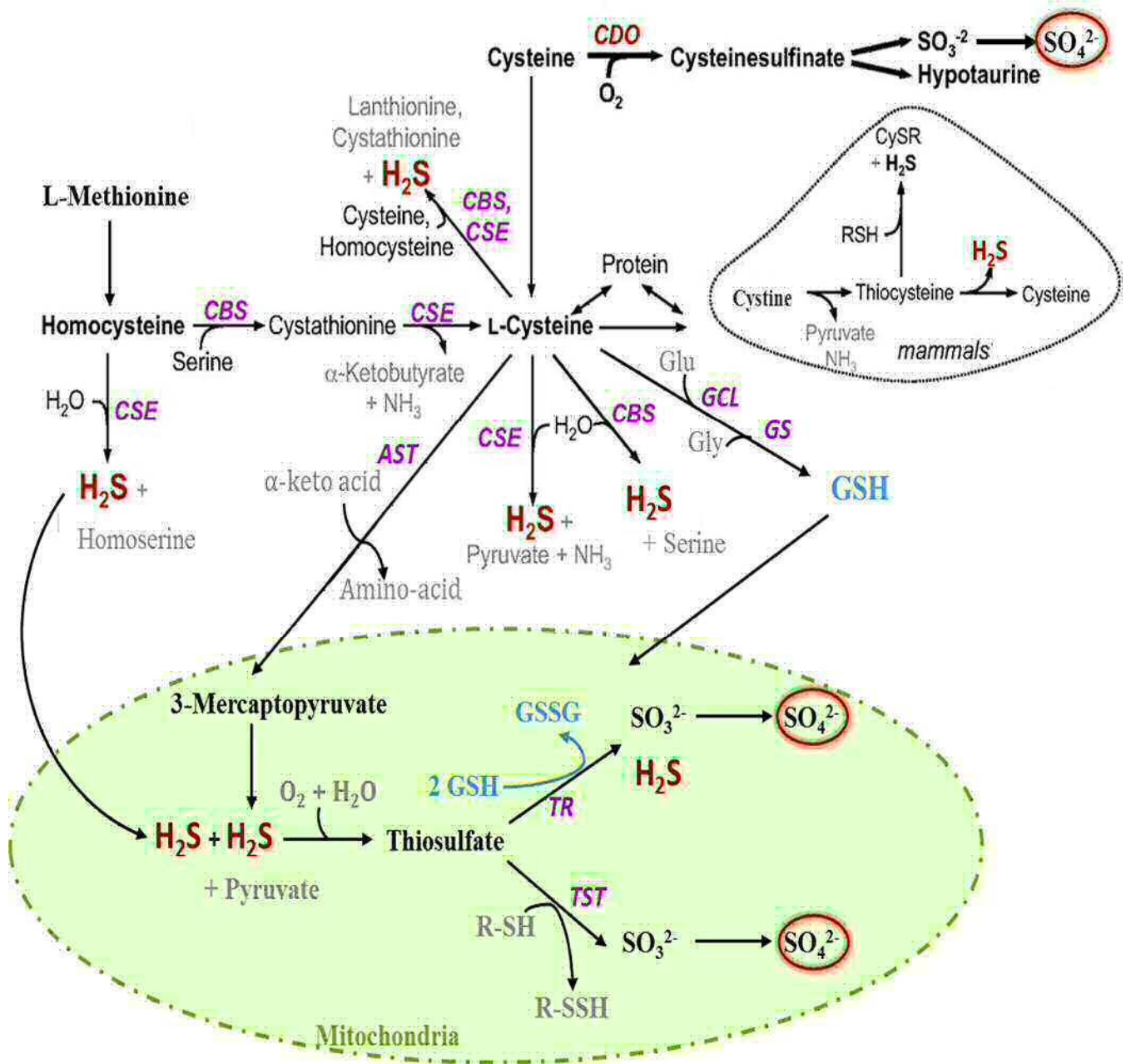
Le CSA peut aussi être transaminé par l'aspartate aminotransférase (AST) (Yagi *et al.*, 1979; Weinstein & Griffith, 1988; Stipanuk & Ueki, 2011), il en résulte du 3-Sulfinylpyruvate qui se dissocie spontanément en pyruvate et dioxyde de sulfate (SO<sub>2</sub>). Ce SO<sub>2</sub> est hydraté en sulfite qui sera lui-même rapidement oxydé en sulfate par les sulfites oxydases.

La taurine et le sulfate sont deux composés terminaux du catabolisme de la Cys ayant un rôle dans les réactions de conjugaison et présentant des fonctions physiologiques essentielles avant d'être un produit catabolique d'excrétion (Stipanuk, 2004).

### c. DESULFURATION DE LA CYSTEINE : SYNTHÈSE DE PYRUVATE ET SULFURE D'HYDROGÈNE

La voie non oxydative de la Cys conduit au catabolisme de la Cys par dessulfuration, son sulfure est clivé avant qu'il ne soit oxydé (Stipanuk & Beck, 1982). Cette voie passe par une transamination (AST ou autre) de la Cys en 3-Mercaptopyruvate. Cependant la Cys est un faible donneur pour les transaminases, par conséquent, cette réaction bien qu'ayant lieu *in vivo*, ne représente pas une voie quantitativement importante du catabolisme de la Cys (Stipanuk, 2004). La mercaptopyruvate sulfurtransférase métabolise le 3-Mercaptopyruvate en pyruvate et sulfide (SH<sup>-</sup>). La CySS peut elle aussi être dessulfurée par cette voie et conduire aux mêmes métabolites plus de la Cys (**Figure 34**).

La CSE, dont la fonction majeure est le clivage de la Cysta en Cys, peut aussi catalyser la formation d'H<sub>2</sub>S et serine depuis la Cys et une molécule d'eau (Stipanuk & Ueki, 2011). Les travaux de Chiku *et al.*, (Chiku *et al.*, 2009) montrent qu'en situation physiologique, environ 70% de la production d'H<sub>2</sub>S serait générée par cette voie chez l'homme. La forme CSE présente chez le rat pourrait catalyser la dessulfuration de la CySS ce qui libère du pyruvate et de l'ammoniac et conduit à la formation de thiocystéine (CySSH).



**Figure 35** : Voies métaboliques de la cystéine conduisant à la formation d'H<sub>2</sub>S et sa conversion mitochondriale en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

AST : Aspartate aminotransférase ; CBS : Cystathionine-β-Synthase ; CDO : Cystéine dioxygénase ; CSE : Cystathionine-γ-liase ; GCL : Glutamate cystéine ligase ; GS : Glutathione synthétase ; TR : Thiosulfate reductase ; TST : Thiosulfate sulfur transférase

Adapté de: Olson *et al.*, 2013



La CySSH est ensuite dissociée en Cys et SH<sup>-</sup> ou peut réagir avec la Cys pour former de la CySS et de l'H<sub>2</sub>S (Stipanuk, 2004; Stipanuk & Ueki, 2011).

La CBS peut aussi catalyser la substitution du groupement thiol de la Cys pour former divers thioethers (Stipanuk & Beck, 1982; Stipanuk, 1986).

Toutes ces voies de désulfuration conduisent potentiellement à la production d'H<sub>2</sub>S, et la régulation de son taux présente de nombreux rôles. L'H<sub>2</sub>S aurait un rôle au niveau cérébral et son taux serait modifié lors de la maladie d'Alzheimer. Il aurait aussi un rôle dans la relaxation des muscles lisses, en particulier au niveau des parois aortiques et de l'utérus (pour revue voir Szabó, 2007). Ce métabolite peut aussi entrer dans la mitochondrie où il peut être converti en thiosulfate (Stipanuk, 2004; Stipanuk & Ueki, 2011). L'oxydation de l'H<sub>2</sub>S en thiosulfate puis sulfate a été initialement montrée dans les travaux de Koj et al., (1967) et Szczepkowski (1961). La première réaction est catalysée par trois enzymes qui catalysent la formation de thiosulfate (**Figure 35**). Le thiosulfate peut ensuite être métabolisé par deux voies (Stipanuk & Ueki, 2011):

- une dépendante du GSH catalysée par la thiosulfate reductase qui produit du sulfite et de l'H<sub>2</sub>S en oxydant le GSH en GSSG
- une indépendante du GSH catalysée par la thiosulfate sulfurtransférase qui conduit à la formation de sulfite

Dans une dernière étape, la sulfite oxydase mitochondriale convertit les sulfites en sulfates (Feng *et al.*, 2007).

*La synthèse protéique est une voie majeure d'utilisation de la Cys mais l'autre voie primordiale est la synthèse de GSH dont elle constitue l'AA limitant. Les travaux concernant le GSH sont nombreux, cependant il n'y a toujours pas de consensus admis sur son efflux cellulaire vers le plasma et son rôle dans l'homéostasie inter-organe. La synthèse endogène de Tau et sulfate est aussi d'une grande importance et repose sur la disponibilité en Cys. Cet AAS a donc de nombreux rôles importants et des perturbations de son homéostasie peuvent avoir des conséquences majeures sur l'organisme.*

## 5. ACIDES AMINES SOUFRES ET DETOXIFICATION HEPATIQUE

Les AAS interviennent de deux façons importantes dans les mécanismes de détoxification de l'organisme : *via* le GSH et le sulfate dans les réactions de conjugaisons,

respectivement dites de phase II et I. Ces réactions de conjugaison impliquent une consommation de Cys et conduisent *in fine* à l'excrétion urinaire de composés soufrés.

#### a. RÔLE DU GLUTATHION DANS LA DÉTOXIFICATION

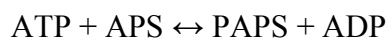
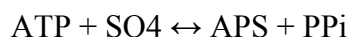
La détoxification des xénobiotiques et de leurs métabolites est une fonction majeure assurée par le GSH. Ces composés forment des conjugués avec le GSH, soit spontanément, soit enzymatiquement grâce à la Glutathion-S-Transférase (GST) (Meister, 1988). Dans les hépatocytes, ces composés sont généralement excrétés dans la bile par les transporteurs MRP. Ces composés conjugués au GSH subissent plusieurs réactions enzymatiques qui ont lieu dans la bile, l'intestin ou les reins. Ces réactions conduisent à la libération du glutamate, puis de la glycine du GSH. Il en résulte un adduit Cys fixé sur le composé qui peut être N-acétylé, au niveau rénal uniquement, afin de donner un acide mercapturique (DeLeve & Kaplowitz, 1990; Lu, 2009). Le composé ainsi conjugué à la Cys est éliminé par les urines et le GSH consommé est irréversiblement perdu (Lu, 2009).

#### b. RÔLE DU SULFATE DANS LA DÉTOXIFICATION

Le catabolisme de la Cys conduit systématiquement à la formation de pyruvate avec sa chaîne carbonée et de sulfate avec son groupement soufre, à l'exception de la Tau qui conserve les deux. Le groupement amine est libéré sous forme d'ammoniac ou transféré sur un céto acide. Dans le cas de la Tau, seul un carbone est décarboxylé et relargué sous forme de CO<sub>2</sub>. Ainsi, mis à part la synthèse de Tau, toutes les voies du catabolisme de la Cys conduisent à la formation de SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (voie du CSA), de SH<sup>-</sup> (voie du mercaptopyruvate) ou de H<sub>2</sub>S (par action de la CBS ou de la CSE). Le SH<sup>-</sup> est rapidement converti en H<sub>2</sub>S et le SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (sulfate). Le H<sub>2</sub>S est converti enzymatiquement dans la mitochondrie lui aussi en SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (voir 4.c p43). Une partie de cette conversion nécessite du GSH et les travaux de Huang et al., (1998) ont mis en évidence l'importance de cette réaction. En effet, la déplétion du GSH hépatique conduit à une diminution importante de la formation du SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et une accumulation du thiosulfate. Ainsi le GSH en plus de son utilisation propre dans les réactions de conjugaisons hépatiques est aussi oxydé pour permettre la formation du SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et donc de maintenir la sulfatation.

Avant de servir aux réactions de conjugaison, le SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> devra être « activé » en 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS). Le PAPS est le donneur de sulfate indispensable pour la sulfatation des xénobiotiques au niveau hépatique (réaction de conjugaison de phase II). Il est synthétisé par une réaction en deux étapes couplées (Mulder,

1990), via l'ATP sulfurylase et l'APS kinase, depuis l'ATP et le sulfate inorganique selon la formule suivante :



La première réaction est catalysée par l'ATP sulfurylase qui produit de l'adénosine phosphosulfate (APS) qui sera transformé en PAPS par l'APS kinase. La concentration hépatique en PAPS est de l'ordre de 30-70 nmol.g<sup>-1</sup> mais lorsqu'il est utilisé son taux de synthèse peut atteindre 100 nmol.min<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> (Mulder, 1990). Le PAPS est inhibiteur de sa propre synthèse, ainsi sa consommation va stimuler sa production par levée d'inhibition (Klaassen & Boles, 1997).

## 6. REGULATIONS & ALTERATIONS DU METABOLISME DES ACIDES AMINES SOUFRES

### a. EFFET DU STRESS OXYDANT (INFLAMMATION ET SEPSIS)

#### i. SUR LE METABOLISME DE LA METHIONINE

Les statuts redox et inflammatoires sont des régulateurs de la CBS (Hcy → Cys). En effet, le TNF $\alpha$ , connu pour augmenter la production d'EROs, dans un contexte pro-oxydant va augmenter l'activité de la CBS (Zou & Banerjee, 2003). Cette régulation permet d'engager le métabolisme vers la transsulfuration et donc d'augmenter la concentration en Cys. Des travaux sur culture de cellules humaines ont montré que 50% du GSH synthétisé en cas de stress oxydant venait de la transsulfuration de l'Hcy (Mosharov *et al.*, 2000). Ceci indique que la Met comme la Cys sont mobilisées. Au contraire, un contexte antioxydant va diminuer son activité et donc le flux d'Hcy par la voie de la transsulfuration (Vitvitsky *et al.*, 2003). Ainsi en cas de stress oxydant ou inflammatoire, le catabolisme de la Met est favorisé pour augmenter la biodisponibilité en Cys et permettre une meilleure réponse de l'organisme.

#### ii. SUR LE METABOLISME DE LA CYSTEINE

La Cys peut être synthétisée par le métabolisme de la Met et peut donc être considérée comme non indispensable. Elle devient cependant conditionnellement indispensable dans des situations particulières comme le sepsis et certains états inflammatoires (Breuillé & Obled, 2000; Malmezat *et al.*, 2000b, 2000a). Dans ces situations, le flux plasmatique de Cys est augmenté dû à son utilisation pour la synthèse des protéines de la réponse inflammatoire et surtout pour la synthèse du GSH dont le turn-over est fortement augmenté (Malmezat *et al.*, 1998, 2000a; Grimble & Grimble, 1998). Le métabolisme global des AAS est modifié en

conséquence avec une diminution du catabolisme de la Cys associé à une augmentation de la transsulfuration de l'Hcy (Malmezat *et al.*, 2000b, 2000a). Ce mécanisme permet d'augmenter la disponibilité de la Cys pour la synthèse du GSH.

Tous ces phénomènes se traduisent par une augmentation du besoin en Cys qui, malgré les adaptations métaboliques, ne peut pas être entièrement couvert par la synthèse endogène si les apports alimentaires ne sont pas augmentés (Obled *et al.*, 2004; Soeters *et al.*, 2004; Le Floch *et al.*, 2004).

### iii. SUR LE METABOLISME DU GLUTATHION

De nombreux facteurs peuvent intervenir dans la régulation de la première étape de synthèse du GSH. En plus du GSH lui-même (voir chapitre 4.a p37), le niveau d'oxydation est un facteur de régulation de la GCL. En effet, les espèces oxydantes sont capables d'augmenter la transcription de cette enzyme (Shi *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1997). De plus, la régulation de la GCL apparaît complexe car régulée par de nombreuses voies (pour revue voir Zhang & Forman, 2012). Parmi ces différentes voies, il apparaît que les espèces oxydantes sont capables d'augmenter l'expression de la GCL et la  $\gamma$ GT (Shi *et al.*, 1994; Rahman *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1997; Chikhi *et al.*, 1999). Cette signalisation serait médiée par NF- $\kappa$ B (Yang *et al.*, 2001) et Nrf2 (Zhang *et al.*, 2007), ce dernier est aussi un régulateur positif de la  $\gamma$ GT (Zhang *et al.*, 2006).

## b. EFFET DE L'APPORT ALIMENTAIRE PROTEIQUE

### i. SUR LE METABOLISME DE LA METHIONINE

Au niveau hépatique, la CBS est régulée positivement par la SAM ce qui conduit, lorsque la disponibilité en SAM et donc en Met est haute, à diriger le surplus d'Hcy vers la transsulfuration plutôt que la reméthylation (Oliveriusová *et al.*, 2002). De plus, la SAM inhibe la reméthylation de l'Hcy en inhibant la folate réductase (Kutzbach & Stokstad, 1967, 1971) et la bêtaïne Hcys méthyltransférase (Finkelstein & Martin, 1984). Ces régulations permettent d'éliminer un excès de Met et l'excès de SAM qui en résulte en dirigeant le métabolisme de la Met vers son catabolisme.

Pour des apports en AAS couvrant le besoin, il a été montré chez le rat que 46% de l'Hcy entrant dans la transsulfuration et seulement 34% en cas d'apports protéiques insuffisants (3,5%) (Finkelstein & Martin, 1984). Chez l'homme, la part d'Hcy entrant dans la transsulfuration diminue de 56-60%, avec des apports protéiques au besoin, à 21% avec un régime sans protéines (Storch *et al.*, 1988; Fukagawa *et al.*, 1996; Raguso *et al.*, 2000;

MacCoss *et al.*, 2001). Les travaux de Storch *et al.* (1990), montrent que chez des sujets consommant un régime sans AAS, la formation même de l'Hcy par la transméthylation est fortement diminuée.

L'apport excessif en protéines/AAS modifie aussi l'activité des enzymes du métabolisme des AAS. Les expériences réalisées chez le rat montrent une augmentation des activités de la MAT, des méthyltransférases ainsi que de la CBS et la CSE, associées à une diminution de l'activité Met synthétase (Finkelstein, 1967; Finkelstein & Martin, 1986; Sugiyama *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2003*b*, 2003*a*). Ceci se traduit par une augmentation de la part d'Hcy entrant dans la transsulfuration, aux environs de 89% chez le rat nourri avec un apport excessif de protéines (Finkelstein & Martin, 1984). Ces adaptations conduisent à une augmentation de la biodisponibilité en Cys, dont les voies métaboliques sont elles aussi régulées par l'alimentation (*voir point suivant*). L'organisme ne possédant pas de forme de stockage des AA en excès, ceci permet de maintenir un niveau physiologique d'AA malgré un apport excessif.

Les hormones ont aussi un rôle régulateur sur la CBS. Le glucagon et les glucocorticoïdes par exemple vont augmenter l'activité de la CBS et donc le catabolisme de la Met vers l' $\alpha$ -cétobutyrate, un substrat néoglucogénique. En revanche, l'insuline va l'inhiber, préservant la Met pour la synthèse protéique à l'état nourri (*pour revue voir* Stipanuk 2004).

## ii. SUR LE METABOLISME DE LA CYSTEINE

Comme vu dans les paragraphes précédents, la Cys, en plus de servir de précurseur pour la synthèse protéique, est un précurseur pour de nombreuses autres molécules essentielles telles que le GSH et la Tau. Lorsque les apports alimentaires couvrent le besoin, la majorité de la Cys est utilisée pour la synthèse des protéines et du GSH (Stipanuk, 2004). Des travaux sur cultures d'hépatocytes et sur animal ont montré que la synthèse du GSH est favorisée lorsque la disponibilité en Cys est faible, alors que lorsqu'elle est élevée, la synthèse de la Tau et du sulfate est également augmentée (Stipanuk *et al.*, 1992; Bella *et al.*, 1999*b*, 1999*a*; Cresenzi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). Cependant, lors d'une carence en AAS, la concentration en GSH diminue tout de même mais sa synthèse reste prioritaire sur les voies cataboliques de la Cys. Ceci permet de maintenir un niveau minimal de GSH. Le métabolisme de cet AAS est donc fortement modulé par l'alimentation, en particulier les apports protéiques/AAS dont va dépendre sa disponibilité. Ces régulations sont mises en place au niveau de la CDO (Cys  $\rightarrow$  CSA). En effet, dans le foie, elle est régulée par l'alimentation puisqu'un régime à forte teneur en AAS ou hyperprotéique conduit à une augmentation de son

activité (Kohashi *et al.*, 1978; Bagley & Stipanuk, 1994, 1995; Bella *et al.*, 1999b, 1999a; Kwon & Stipanuk, 2001). A l'inverse, un régime pauvre en protéines/AAS conduit à une polyubiquitination et dégradation rapide de la CDO, conduisant à une baisse importante de son niveau (Bella *et al.*, 2000; Stipanuk *et al.*, 2004a). La Cys elle-même est un inhibiteur de cette dégradation par l'UPS, ainsi cette régulation de la CDO au niveau hépatique permet une régulation fine en réponse aux changements d'apports alimentaires (Lee *et al.*, 2004; Stipanuk *et al.*, 2004a). En revanche, dans les tissus autres que le foie, la CDO n'est pas régulée par les apports alimentaires. Une explication serait que le foie étant servi en premier par la veine porte, il régulerait et tamponnerait l'afflux périphérique en AAS (Stipanuk *et al.*, 2002).

La régulation se fait aussi en aval puisqu'une alimentation riche en protéines ou AAS conduit à une forte diminution de la concentration hépatique de CSD (CSA → Htau), allant jusqu'à 80%. Cependant dans ces conditions la production hépatique et les niveaux tissulaires et urinaires de Tau sont quand même augmentés (Daniels & Stipanuk, 1982; Bagley & Stipanuk, 1995; Bella *et al.*, 1999b, 1999a; Stipanuk *et al.*, 2002). Cette augmentation est vraisemblablement due à une élévation de l'activité CSD (Bagley & Stipanuk, 1994, 1995; Bella & Stipanuk, 1995). Cette élévation est elle-même due à l'augmentation de la teneur en CAS, malgré la baisse des activités enzymatiques CDO et CSD, l'apport en Cys étant plus élevé, il y aura plus de substrat pour ces enzymes.

La majorité des travaux ont été effectués chez le rat et peu de données sont disponibles chez l'homme. Les travaux disponibles montrent une capacité de synthèse de la Tau chez l'homme (Rana & Sanders, 1986; Laidlaw *et al.*, 1988) similaire à celle observée chez le rat (Bella & Stipanuk, 1995).

### iii. SUR LE METABOLISME DU GLUTATHION

La disponibilité en Cys est le déterminant majeur de la concentration tissulaire en GSH (Deneke & Fanburg, 1989; White *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1996). Comme décrit précédemment, le GSH est synthétisé en deux étapes depuis la Cys qui représente l'AA limitant de sa synthèse (Meister, 1991). Dans des conditions physiologiques normales, le taux de synthèse du GSH est déterminé par deux facteurs : la disponibilité en Cys et l'activité de la GCL (Cys →  $\gamma$ -Glu-Cys). De plus, le GSH agit lui-même comme inhibiteur de la GCL (Richman & Meister, 1975; Huang *et al.*, 1993). Chez l'adulte, lors de la consommation d'un régime hypo-protéique ou dépourvu d'AAS, la synthèse du GSH est diminuée (Lyons *et al.*, 2000; Jackson *et al.*, 2004). Quand le GSH est dépleté, le rétrocontrôle qu'il exerce sur la GCL est perdu, son activité est alors augmentée et c'est uniquement la disponibilité en Cys

qui va réguler cette synthèse (Wang & Ballatori, 1998). Le jeûne provoque une déplétion du GSH hépatique, intestinal et musculaire chez le rat et la réalimentation permet de corriger ces effets (Cho *et al.*, 1981). De même, lorsque les apports protéiques ne sont pas suffisants, la concentration en GSH diminue dans le foie et le plasma (Hum *et al.*, 1992).

A l'inverse, un régime hyperprotéique ou très riche en AAS, conduit à une inhibition de la GCL favorisant ainsi l'oxydation de la Cys plus que la synthèse du GSH qui sera élevée de par la forte disponibilité en Cys (Bella *et al.*, 1999b, 1999a; Lee *et al.*, 2004). Cependant, un régime hyperprotéique ne permet pas d'augmenter le GSH au-delà d'une valeur seuil maximale (Hum *et al.*, 1992).

### c. EFFETS DU VIEILLISSEMENT

#### i. EFFETS DU VIEILLISSEMENT SUR LE METABOLISME DES ACIDES AMINES SOUFRES

Le vieillissement s'accompagne d'un grand nombre de perturbations des processus physiologiques de l'organisme (*voir chapitre I.2 p12*) qui perturbent le métabolisme des AAS. Ainsi, l'augmentation du stress oxydant favorise la formation de Cys depuis la Met, pouvant conduire à une moindre biodisponibilité de la Met pour la synthèse protéique et les tissus périphériques. La baisse de sensibilité à l'insuline, ou insulino-résistance liée à l'âge, lève l'inhibition de la transformation de la Met, augmentant ainsi sa baisse de biodisponibilité.

Les flux métaboliques de la Met ont été montrés modifiés avec l'âge, la proportion de Met entrant dans la transsulfuration étant plus élevée chez la personne âgée (Mercier *et al.*, 2006). Ceci suggère une augmentation du besoin en Cys pour la fourniture en GSH dont les taux et le renouvellement sont altérés avec le vieillissement (*voir point suivant*).

#### ii. SUR LA CONCENTRATION & L'EQUILIBRE REDOX DU GLUTATHION

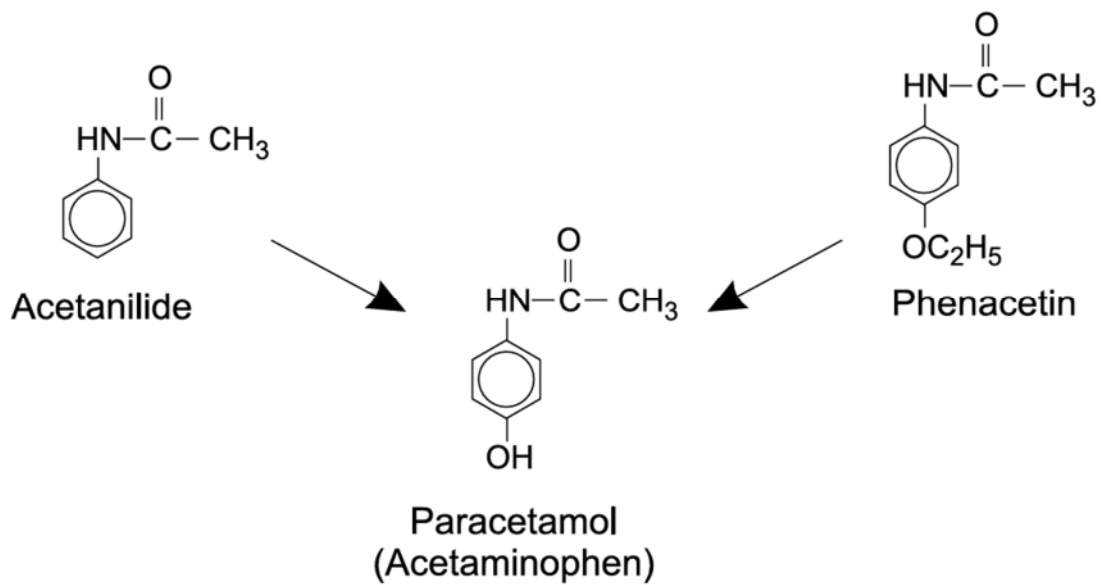
Une diminution âge-dépendante de la concentration cellulaire en GSH a été montrée dans plusieurs tissus chez le rat et la souris dont les reins, le foie et le sang (Chen *et al.*, 1989, 1990, 2000; Arivazhagan *et al.*, 2001). Les travaux de Liu *et al.* (2004) ont montré une baisse du niveau de GSH dans tous les tissus, correspondant à une diminution de l'expression de la GCL et la GS. La  $\gamma$ GT, la GR et la disponibilité en Cys ainsi que le taux de GSSG n'étaient pas affectés dans ces travaux (Wang *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004). Ceci traduit une altération de la synthèse du GSH en elle-même et non indirectement par une baisse des apports en Cys. Chez l'homme, le GSH est fortement associé aux pathologies âge-dépendantes (Samiec *et al.*, 1998). Le ratio forme réduite/forme oxydée des différents couples redox soufrés subit un basculement avec l'avancée en âge. Ce changement de statut redox a été montré pour le GSH



dans le sang, (érythrocytes principalement) (Samiec *et al.*, 1998; Erden-İnal *et al.*, 2002) et les lymphocytes (Lenton *et al.*, 2000; Hernanz *et al.*, 2000). Les niveaux de GSH érythrocytaire et plasmatique ont été montrés diminués (Lang *et al.*, 1992; Nuttall *et al.*, 1998; Samiec *et al.*, 1998) et associés à une baisse du rapport réduit/oxydé de plusieurs couples redox (Rothschild *et al.*, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1990; Jones *et al.*, 2000; Dröge, 2002a, 2002b). Les mécanismes exacts mis en jeu ne sont pas certains mais des travaux ont montré que dans les yeux les activités de la GCL et GS seraient diminuées (Sethna *et al.*, 1982) ainsi que celles de la CSE (Sastre *et al.*, 2005) et de la GR (Holleschau & Rathbun, 1994; Katakura *et al.*, 2004).

La capacité d'induction des systèmes antioxydants par une stimulation exogène est elle aussi diminuée avec l'âge (Lang *et al.*, 1992; Rikans & Hornbrook, 1997; Knight, 2000; Viveros *et al.*, 2007). Ces altérations sont liées à l'augmentation du stress-oxydant induite par le vieillissement (*voir point X ; pour revue voir* (Dröge, 2005). Cette diminution est associée à l'augmentation de la prévalence des maladies chroniques (Lang *et al.*, 2000).

Les maladies chroniques présentent une prévalence élevée chez les personnes âgées et sont systématiquement associées à médication. Le vieillissement en lui-même s'accompagne fréquemment de prise de médicaments, que ça soit pour cause de maladie ou de douleurs chroniques dues aux nombreuses altérations ostéo-musculaires (arthrose, ostéoporose...). Or, comme évoqué dans cette partie, un grand nombre de xénobiotiques dont certains médicaments sont détoxifiés au niveau hépatique par conjugaison au sulfate et/ou au GSH, tous deux produits depuis la Cys. Avec le vieillissement, la médication pourrait donc représenter un facteur venant s'ajouter aux perturbations déjà en place (stress-oxydant et l'inflammation) du métabolisme des AAS, en augmentant le catabolisme de la Cys. Dans la population générale, et en particulier chez les personnes âgées, l'antidouleur le plus prescrit et consommé est le paracétamol. Les quantités nécessaires pour obtenir un effet de cet antalgiques sont élevées pour un médicament puisqu'elles sont de l'ordre du gramme et son élimination corporelle a lieu via une métabolisation hépatique.



**Figure 36** : Structure chimique du paracétamol et des deux anilines dont il dérive : l'acetanilide et la phénacétine.

D'après: Benista & Nowak, 2014

## *Chapitre III: Vieillesse & médication : cas du paracétamol*

---

Le paracétamol (acétaminophène aux USA) est une amine aromatique comportant un cycle phénolique de formule  $C_6H_7N$  (**Figure 36**). C'est un métabolite actif de deux anilines, l'acétanilide et la phénacétine. Il a été synthétisé pour la première fois en 1852 et son effet antipyrétique a été découvert par Chan et Hepp (1886). Il a été commercialisé pour la première fois aux États-Unis en 1950 puis, son utilisation a fortement augmenté au milieu des années 1960 (Sneader, 2005). Il est aujourd'hui l'antipyrétique et l'analgésique le plus prescrit et utilisé en France et aux États-Unis (Kaufman DW *et al.*, 2002; ANSM, 2014). A titre d'exemple, rien qu'aux États-Unis en 2008, il s'est vendu plus de 24,6 milliards de doses (Krenzlok, 2009). En France d'après les rapports annuels de l'ANSM, depuis leur 1ère édition (2006) et jusqu'à aujourd'hui, il s'agit de la substance active la plus vendue. Les 3 médicaments les plus vendus, en valeurs et parts de marché, ne contiennent que du paracétamol (Afssaps, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011; ANSM, 2012, 2013, 2014) et la vente du paracétamol est en augmentation ces trois dernières années (ANSM, 2014).

Le paracétamol est considéré comme ayant un bon rapport bénéfice/risque car majoritairement éliminé par voie urinaire (Forrest *et al.*, 1982). Seuls environ 5% de la dose sont éliminés sans modification *via* les urines. Les 95% restants étant métabolisés *via* deux classes d'enzymes hépatiques : les enzymes de phase I et de phase II, ces aspects seront détaillés dans le paragraphe 3.p57.

### 1. PRESCRIPTION ET RECOMMANDATIONS

#### a. PRESCRIPTION

Le paracétamol est utilisé pour traiter des douleurs variées telles que le mal de tête, les douleurs musculaires, ainsi que des douleurs chroniques comme les lombalgies et l'arthrite (Airaksinen *et al.*, 2006 ; <http://www.drugs.com/acetaminophen.html>,2014). A dose thérapeutique, il est considéré comme sûr et il s'agit du médicament recommandé en première intention comme traitement des douleurs chroniques, en particulier chez les personnes âgées. Il est également utilisé pour le soulagement de diverses douleurs post-opératives (Klotz, 2012; Abdulla *et al.*, 2013).

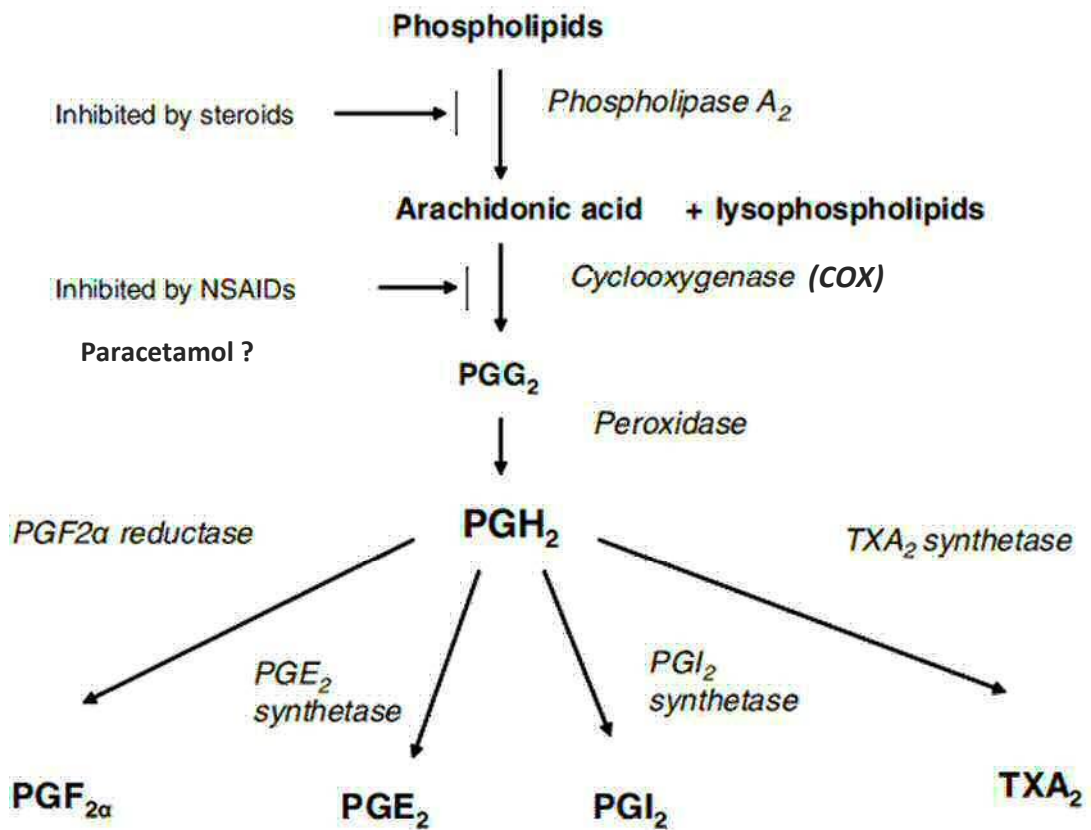
## b. POSOLOGIE

Le paracétamol est un médicament en vente libre sans ordonnance dans les pharmacies. La dose orale chez l'adulte pour le traitement de la douleur et/ou fièvre est de 650 - 1 000 mg toutes les 4h, l'effet analgésique n'étant pas augmenté pour des prises supérieures à 1 000 mg (Skoglund *et al.*, 1991). La dose maximale à ne pas dépasser étant de 4g /24h chez l'adulte sans insuffisance hépatique ou rénale ni alcoolisme.

## c. CONTROVERSE SUR LA DOSE MAXIMALE AUTORISEE

Le paracétamol est depuis longtemps, et encore aujourd'hui, reconnu comme étant l'antipyrétique et analgésique présentant le meilleur rapport bénéfice/risque sur le marché (Bertolini *et al.*, 2006; Klotz, 2012). Cependant, de plus en plus de travaux remettent en question l'innocuité du paracétamol, en particulier lorsqu'il est utilisé en chronique à la dose maximale de 4g /24h (Zarowitz, 2012; Moore *et al.*, 2013; Richette, 2014). La pertinence de ces observations reste encore à démontrer de façon certaine car elles reposent souvent sur des études de cas. La plus part des revues de synthèse récentes insistent néanmoins sur la sécurité du paracétamol à la dose de 4g /24h (Bertolini *et al.*, 2006; Klotz, 2012). Malgré tout, une revue très récente insiste sur le risque potentiel d'effets secondaires lorsque le paracétamol est pris à la dose maximale et (Brooks & Day, 1991) sur une longue période (Benista & Nowak, 2014). La Food and Drug Administration (FDA) n'a pour le moment pas modifié les recommandations thérapeutiques concernant la dose maximale de paracétamol autorisée par jour. En revanche, elle a diminué les doses autorisées dans les médicaments où le paracétamol est présent en combinaison avec un autre principe actif afin de diminuer le risque d'overdose accidentelle. En effet, les patients sont souvent peu conscients que ces médicaments contiennent du paracétamol, le plus grand risque concernant l'usage du paracétamol repose sur des overdoses accidentelles dues à cette méconnaissance.

*En résumé, les données actuelles s'accordent pour dire que sans contre-indications (insuffisance hépatique ou rénale, alcoolisme...) la prise occasionnelle d'au maximum 1g de paracétamol toutes les 4 à 6h, sans dépasser 4 prises par jour, est sans conséquence pour la santé. En revanche, la question est aujourd'hui moins claire pour ce qui est de la prise chronique à la dose maximale et entre autres pour des populations fragilisées, ce qui pourrait donc concerner les personnes âgées.*



**Figure 37** : Synthèse des prostaglandines depuis l'acide arachidonique.

La Prostaglandine H<sub>2</sub> synthétase (PGHS) est l'enzyme responsable du métabolisme de l'acide arachidonique en PGH<sub>2</sub>. Cette action est permise par les deux sites catalytiques de l'enzyme : une activité cyclooxygénase (COX) et une activité peroxidase (POX).

NSAIDs: anti-inflammatoires non-stéroïdiens; PGH<sub>2</sub>: Prostaglandine H<sub>2</sub> ; PGE<sub>2</sub>: Prostaglandine E<sub>2</sub>; PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandine F<sub>2α</sub>; PGI<sub>2</sub>: Prostaglandine I<sub>2</sub>; PGG<sub>2</sub> Prostaglandine G<sub>2</sub>; TXA<sub>2</sub>: Thromboxane A<sub>2</sub>

D'après: Anderson, 2008

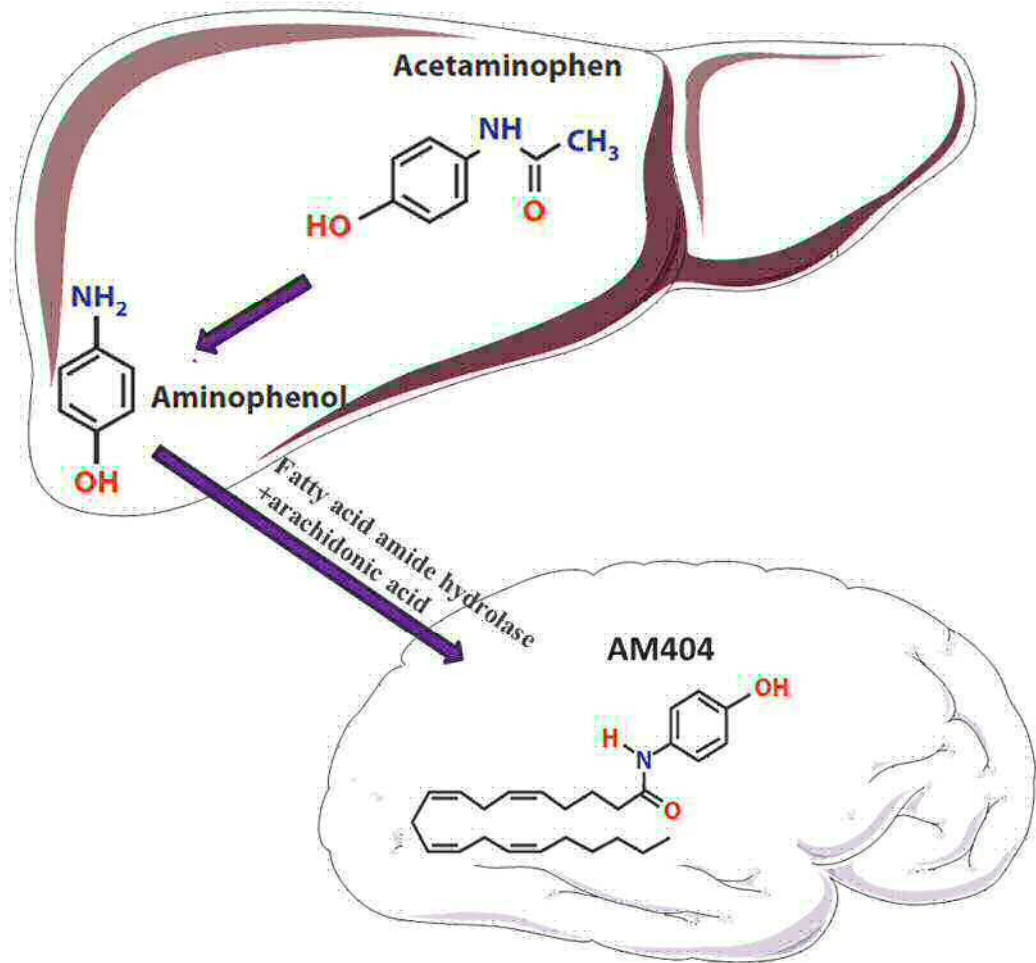
## 2. MÉCANISMES D'ACTION DU PARACÉTAMOL

Bien que le paracétamol ait été découvert il y a plus de 100 ans, commercialisé depuis plus de 60 ans, son mécanisme d'action n'est toujours pas clairement élucidé et est encore aujourd'hui très controversé. Beaucoup de travaux ont été menés dans le sens d'un mécanisme d'action commun entre le paracétamol et les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Le mécanisme d'action des AINS passe par l'inhibition de l'activité endoperoxyde synthétase des prostaglandines (PG) ou des cyclooxygénases (COX) (Brooks & Day, 1991). Cependant, le paracétamol ne possède pas d'activité anti-inflammatoire reconnue, contrairement aux AINS, mais supprime lui aussi la production des PG (*pour revue sur ces mécanismes voir Bertolini et al., 2006; Anderson, 2008; Benista & Nowak, 2014*).

### a. MODE D'ACTION DU PARACETAMOL : EFFET ANTALGIQUE

#### i. INHIBITIONS DES CYCLOOXYGENASES

Les COX sont responsables de la synthèse des PG depuis l'acide arachidonique (**Figure 37**). Il a longtemps été supposé que le paracétamol, au même titre que les AINS, devait ses effets antipyrétique et analgésique à son action inhibitrice sur les COX 1 et 2. Les nombreux travaux réalisés vont en faveur du fait que le paracétamol exerce bien un effet inhibiteur préférentiellement sur la COX-2. Cet effet dépendrait majoritairement du statut redox de la cellule et de la concentration en acide arachidonique. En effet, l'effet inhibiteur du paracétamol ne serait possible qu'en présence d'une faible concentration de peroxydes et d'acide arachidonique (*pour revue voir Bertolini et al., 2006; Graham et al., 2013; Benista & Nowak, 2014*). Le paracétamol aurait également un effet sur la COX-1, ceci étant démontré chez la souris KO pour la COX-1. Cet effet serait, au même titre que pour la COX-2, dépendant du niveau de peroxydes (Graham *et al.*, 2013). Cependant l'effet secondaire majeur des AINS est leur toxicité au niveau gastro-intestinale due à leur action sur la COX-1. Les inhibiteurs spécifiques de la COX-2 ne présentent pas ces effets et le paracétamol ne présentant pas non plus de toxicité gastro-intestinale, il s'agit de l'argument majeur remettant en doute son action sur la COX-1. D'autres auteurs ont émis l'hypothèse que le paracétamol n'aurait pas d'affinité pour le site actif des COX mais exercerait son action inhibitrice en bloquant la conversion de leur forme inactive en forme active (forme oxydée) (Ouellet & Percival, 2001; Lucas *et al.*, 2005). Ceci expliquerait son manque d'efficacité dans un contexte pro-oxydant.



**Figure 38** : Synthèse de l'acide gras N-arachidonoylphénolamine (AM404) depuis le paracétamol (Acétaminophène).

Le paracétamol est déacétylé en p-aminophénol dans le foie. Ce métabolite est ensuite conjugué au niveau central à l'acide arachidonique par la Fatty Acid Amine Hydrolase (FAAH), pour former l'acide gras N-arachidonoylphénolamine (AM404).

Adapté de: Shaw, 2013



L'existence d'une COX-3 au niveau cérébral, sensible à l'inhibition par le paracétamol, a été démontrée chez le chien (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Cependant, l'isoforme humaine de cette COX-3 présente une séquence en acides aminés très éloignée des COX-1 et 2 et n'a pas d'activité COX (*pour revue voir* Kis *et al.*, 2005; Anderson, 2008). Son implication dans l'action antalgique du paracétamol chez l'homme serait donc très peu probable.

Une preuve claire de l'implication du rôle inhibiteur du paracétamol au niveau des COX-1 ou 2 est toujours manquante aujourd'hui, mais l'ensemble de ces travaux vont nettement en faveur de son implication.

### ii. VOIES SÉROTONINÉRIQUES

Dans les années 1990, des travaux ont montré que l'effet anti-nociceptif du paracétamol passe par les voies sérotoninergiques spinales descendantes (Pini *et al.*, 1996). Ces résultats ont été confirmés par des travaux montrant la perte de l'effet analgésique lors de la co-administration d'un antagoniste du récepteur sérotoninergique 5-HT<sub>3</sub> (Alloui *et al.*, 2002; Mallet *et al.*, 2008). Ce mécanisme d'action n'exclut pas le précédent, les PG modulent de nombreuses voies physiologiques et pourraient agir sur la nociception en influençant le système sérotoninergique descendant (Nakamura *et al.*, 2001).

### iii. SYSTÈME DES ENDOCANABINOÏDES

Les travaux récents de Hogestatt (2005) et Ottani *et al.* (2006) ont démontré l'importance d'un métabolite actif du paracétamol généré au niveau cérébral. En plus de son métabolisme de détoxification (*voir paragraphe 3. p56*), le paracétamol est déacétylé dans le foie en p-aminophénol. Ce métabolite est ensuite conjugué au niveau central à l'acide arachidonique par la Fatty Acid Amine Hydrolase (FAAH), pour former l'acide gras *N*-arachidonoylphenolamine (AM404) (**Figure 38**). Ce métabolite va indirectement agir sur le récepteur aux canabinoïde CB<sub>1</sub>, engendrant un effet analgésique (Zygmunt *et al.*, 2000; Hogestatt, 2005; Ottani *et al.*, 2006). Ceci a été confirmé par les travaux de Mallet *et al.* (2008) et de Barriere *et al.* (2013) qui montrent que l'inhibition de l'enzyme de conversion du paracétamol en AM404, supprime l'effet antalgique de même que le blocage du CB<sub>1</sub>. Ces données sont en accord avec les propositions précédentes. En effet, l'effet antalgique médié par le récepteur CB<sub>1</sub> implique des voies spinales ascendantes inhibitrices, au même titre que les récepteurs sérotoninergiques. De plus, l'AM404 serait un inhibiteur des COX-1 et 2 (Zygmunt *et al.*, 2000; Bertolini *et al.*, 2006). Cependant, il n'est pas prouvé à l'heure actuelle

que les concentrations cérébrales d'AM404 nécessaires à cette inhibition puissent être atteintes in-vivo.

#### iv. OXYDE D'AZOTE

Un mécanisme alternatif expliquant l'effet analgésique du paracétamol pourrait être l'inhibition de l'oxyde d'azote (NO). Le NO joue sur les voies nociceptives spinales (Björkman *et al.*, 1994; Bujalska, 2004), cependant son rôle dans la nociception reste flou.

#### b. MODE D'ACTION DU PARACETAMOL : EFFET ANTIPYRETIQUE

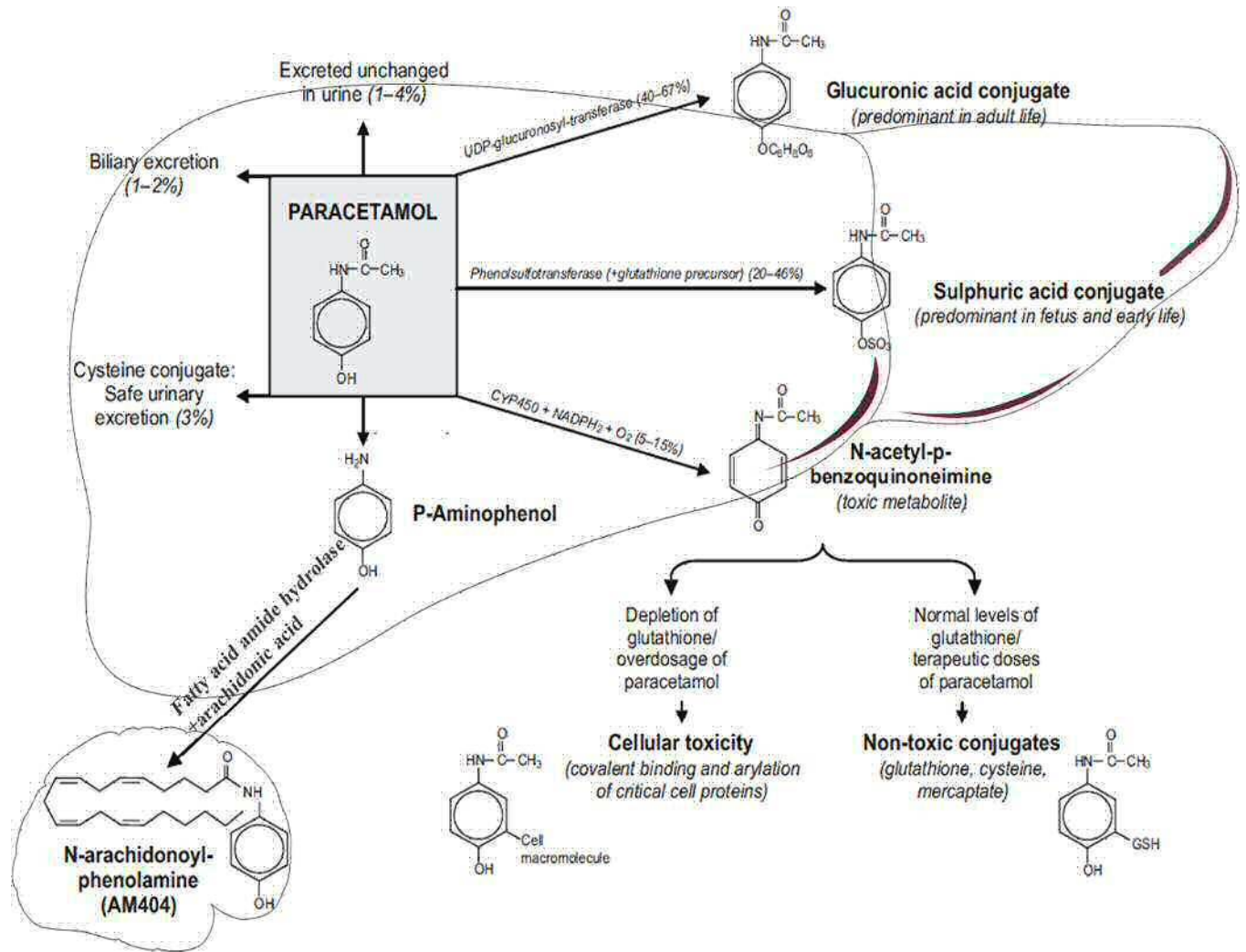
Les agents pyrogènes responsables de l'augmentation de la température interne agissent par augmentation des PGE<sub>2</sub> au niveau du fluide cérébrospinal (Ivanov & Romanovsky, 2004). C'est cette augmentation qui est bloquée par le paracétamol, son effet antipyrétique serait donc comme pour l'antalgie, médié par la COX-2. En effet, il disparaît chez des souris KO pour la COX-2 et certains inhibiteurs des COX-2 ont une action antipyrétique (*pour revue voir* Graham *et al.*, 2013).

*Les mécanismes d'action du paracétamol ont fait l'objet de nombreux travaux mais pour le moment aucun consensus n'est admis. Il apparaît que plusieurs voies d'action sont mises en jeu et que sa métabolisation en AM404 aurait un rôle important tout comme son action sur les COX 1 et 2.*

### 3. MÉTABOLISME DE DÉTOXIFICATION DU PARACÉTAMOL

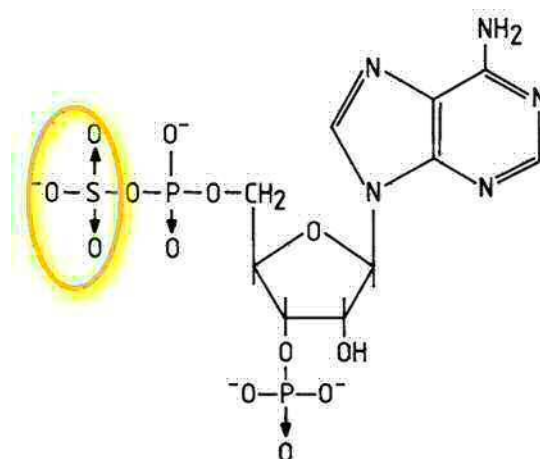
Après ingestion, la molécule de paracétamol est rapidement absorbée au niveau intestinal par diffusion passive via des voies trans- et para-cellulaires, et est distribuée uniformément dans les tissus (Lu *et al.*, 1992).

La concentration plasmatique de paracétamol, après une dose thérapeutique, varie de 8 à 32 µg/ml, le pic variant d'environ 20-30µg/ml (130-200 µM) après une prise de 1g (Bertolini *et al.*, 2006; Graham *et al.*, 2013). Sa demi-vie varie de 1h30 à 3h pour une dose unique (Hodgman & Garrard, 2012; McGill & Jaeschke, 2013), avec un pic maximal autour de 60-90min. Ces valeurs sont influencées par l'état nourri ou à jeun et par la dose ingérée (Stillings *et al.*, 2000). Le paracétamol subit un faible métabolisme intestinal et un important métabolisme hépatique, suivi par une élimination rénale des métabolites formés.



**Figure 39** : Métabolisme hépatique complet du paracétamol.

Adapté de: Bertolini *et al.*, 2006



**Figure 40** : Structure de l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS ou 'sulfate activé'). Le soufre entouré en jaune sera transféré sur le paracétamol lors de la sulfatation.

Adapté de: Mulder, 1990

#### a. METABOLISME HEPATIQUE DE DETOXIFICATION

La majeure partie (~90%) de la conjugaison est assurée par les enzymes de phase II qui réalisent la sulfatation et la glucuronidation du paracétamol. Le reste (~10%) est métabolisé par les enzymes de phase I (Prescott, 1980; Forrest *et al.*, 1982; Hodgman & Garrard, 2012) (**Figure 39**).

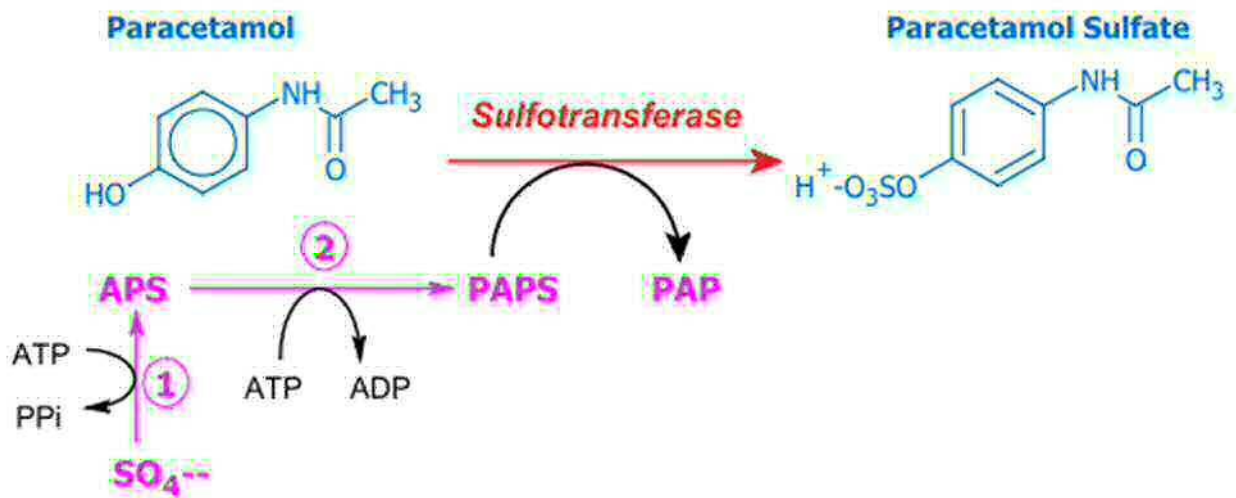
##### i. SULFATATION

La sulfatation est importante dans la biotransformation des xénobiotiques ainsi que de nombreux composés endogènes et joue un rôle régulateur important. Dans le cas du paracétamol, la sulfatation représente 25 à 30% du métabolisme d'une dose thérapeutique. Elle consiste en l'ajout d'un groupement sulfure ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) qui permet une élimination rénale rapide du paracétamol-sulfate formé. La sulfatation est catalysée par les sulfotransférases dont le co-substrat, ou donneur de sulfate, nécessaire est l'adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS ou « sulfate activé ») (**Figure 40**). Le PAPS est présent en très faible quantité dans les hépatocytes, bien que le foie présente la plus haute concentration de l'organisme (Mulder, 1990). Cependant, le PAPS peut être synthétisé très rapidement par une réaction en deux étapes couplées (**Figure 41**) (*voir chapitre II paragraphe 5.b p 46*). Il existe au minimum 13 isoformes de sulfotransférases chez l'homme, divisées en 4 familles (Lindsay *et al.*, 2008). Les isoformes responsables de la sulfatation du paracétamol seraient les sulfatases SULT1A1, 1A3/4 et 1E1 (Reiter & Weinshilboum, 1982; Adjei *et al.*, 2008; McGill & Jaeschke, 2013). Cependant seules les SULT1A1 et 1E1 sont retrouvées dans le foie chez l'adulte, la 1A3/4 semble spécifique du foie fœtal (Lindsay *et al.*, 2008).

Au niveau hépatique, la sulfatation est une réaction de forte affinité et faible capacité qui sera donc très réactive, mais rapidement saturée et limitée (Mulder, 1990). Chez le rat, dans le cas du paracétamol, la sulfatation est saturée dès 1 mmol/kg soit environ 151 mg/kg de paracétamol (Klaassen & Boles, 1997). Les raisons de cette limitation sont espèce dépendantes, chez la souris c'est l'enzyme de synthèse du cofacteur qui est limitante, chez l'homme et le rat c'est le sulfate inorganique qui est limitant (Liu & Klaassen, 1996).

##### ii. GLUCURONIDATION

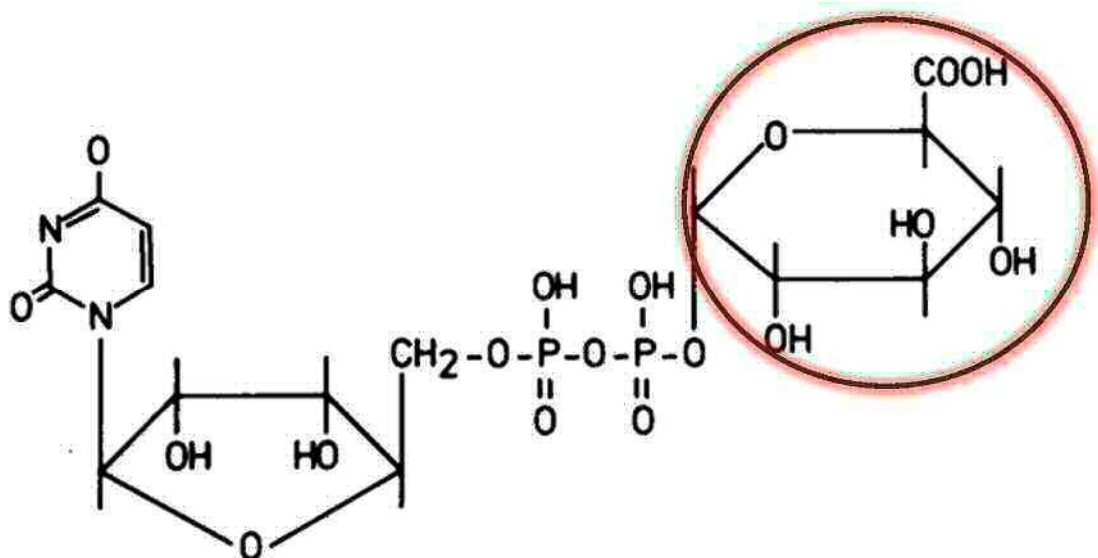
La glucuronidation est une voie métabolique majeure pour un grand nombre de médicaments et autres molécules chimiques. Elle permet l'élimination de xénobiotiques et autres composés endogènes (Miners & Mackenzie, 1991). C'est la voie majoritaire du métabolisme du paracétamol puisqu'elle compte pour 50 à 70% du métabolisme à dose



**Figure 41 :** Réaction de synthèse de l'adénosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate (PAPS ou 'sulfate activé') et de sulfatation du paracétamol.

La synthèse du PAPS est une réaction couplée en deux étapes nécessitant deux molécules d'ATP. La sulfotransférase permet d'adduire le groupement sulfate uniquement à la molécule de paracétamol. 1) ATP sulfurylase ; 2) APS kinase

D'après: Klaassen & Boles, 1997



**Figure 42 :** Structure de l'acide UDP-glucuronique (UDPGA).

L'acide glucuronique entouré en rouge est le groupement qui sera transféré sur le paracétamol lors de la sulfatation.

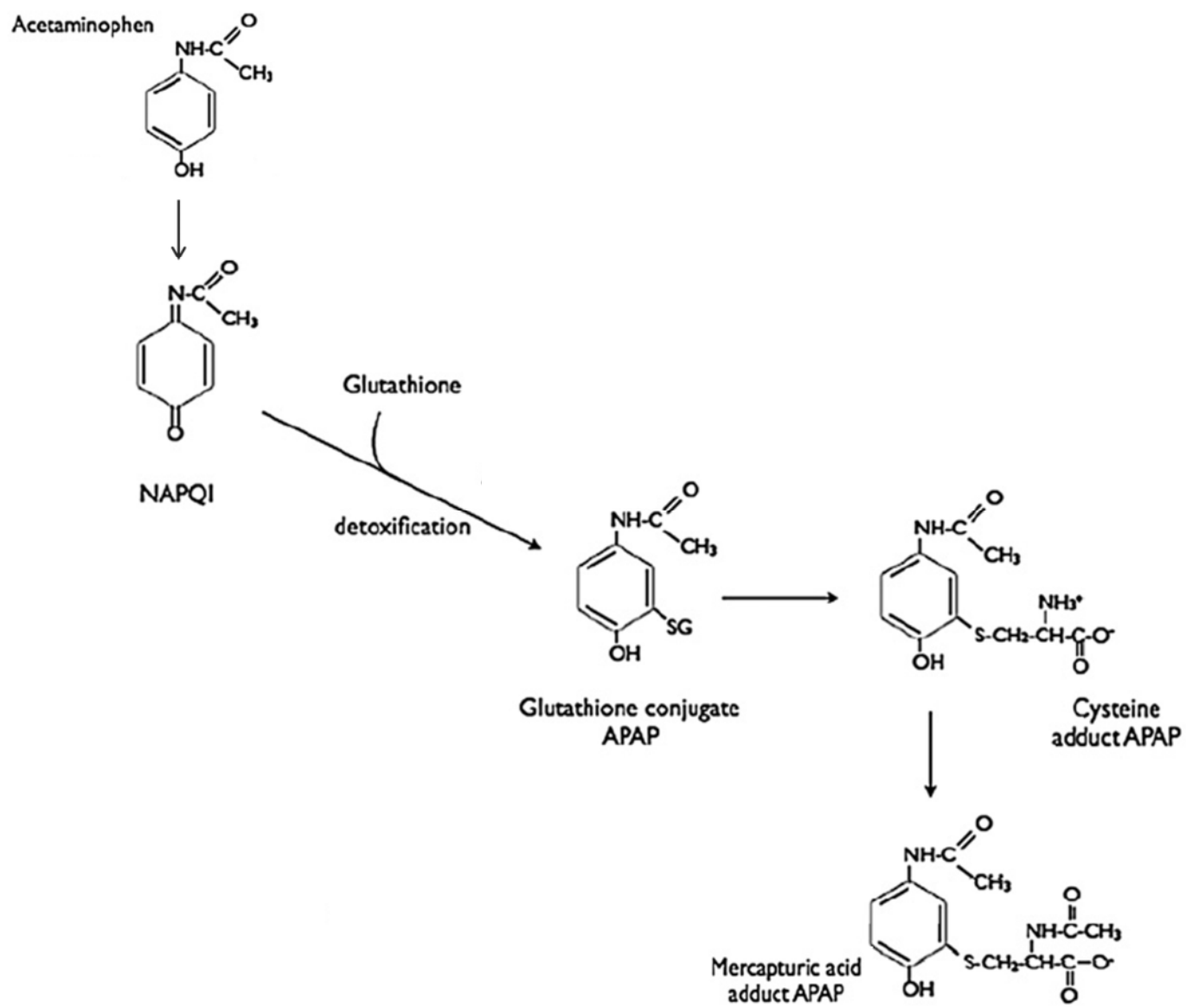
Adapté de: Mulder, 1990.

thérapeutique. Cette réaction est catalysée par la superfamille des UDP-glucuronosyltransferases (UGT). Ces enzymes utilisent comme co-facteur l'acide UDP-glucuronique (UDPGA) (Miners & Mackenzie, 1991) afin de transférer l'acide glucuronique (**Figure 42**) sur le substrat. L'UDPGA est hautement soluble et rend ainsi les composés plus solubles et leur élimination rapide dans les urines. Dix-neuf enzymes, présentant des spécificités de substrat différentes, ont été caractérisées chez l'homme. Elles ont été classées en 3 sous familles (1A, 2A et 2B), basées sur leurs séquences en acides aminés (Mackenzie *et al.*, 2005; Kaivosaaari *et al.*, 2011). Les UGT 1A1, 1A6, 1A9 et 2B15 seraient les enzymes responsables de la détoxification du paracétamol via la voie glucuronide (Mutlib *et al.*, 2006; Miners *et al.*, 2011; McGill & Jaeschke, 2013). De plus, il s'agit de 4 des 11 isoformes les plus exprimées dans le foie (Nakamura *et al.*, 2008 ; *pour revue voir* Kaivosaaari *et al.*, 2011).

L'UGT1A6 est très conservée entre les espèces, dont l'homme et le rat (Mackenzie *et al.*, 2005), et les 1A1 et 1A6 et 1A9 joueraient le plus grand rôle. La glucuronidation, à l'inverse de la sulfatation, est une réaction de faible affinité et forte capacité. Ainsi, à faible dose la sulfatation est dominante, alors qu'à haute dose, la glucuronidation est majoritaire. Ce basculement est dû à deux phénomènes : la déplétion du PAPS et du sulfate inorganique, précurseurs indispensables à la sulfatation, ainsi qu'à la différence de Km sulfatation-glucuronidation (Mulder, 1990). Lorsque la sulfatation est saturée, ce sont à la fois les voies de glucuronidation et du cytochrome P450 qui vont prendre le relais, et augmenter proportionnellement avec l'augmentation de la dose.

### iii. METABOLISME VIA LE CYTOCHROME P450

Les cytochromes P450 (CYP) sont issus d'une famille multigénique et sont responsables d'environ 75% du métabolisme hépatique de phase I. Cette métabolisation concerne un large panel de produits chimiques et constituants alimentaires, ainsi que de composés endogènes. Les CYP sont divisés en trois groupes majeurs : les CYP1-3 responsables d'environ 80% du métabolisme des médicaments via la phase I, les CYP4 qui ont un rôle principalement dans le métabolisme des acides gras et les CYP5-51 qui interviennent principalement pour les substances endogènes (Ingelman-Sundberg, 2004). Dans le cas du paracétamol, c'est principalement le CYP2E1 qui va l'oxyder, ainsi que minoritairement les CYP1A2, 3A4 et 2A6 (Bertolini *et al.*, 2006; McGill & Jaeschke, 2013). Cette voie métabolique conduit à la formation d'un intermédiaire hautement réactif : le N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) (Corcoran *et al.*, 1980). Cet intermédiaire toxique est rapidement conjugué à la cystéine du glutathion (GSH), pour partie spontanément et pour



**Figure 43** : Voie de détoxification du paracétamol conduisant à la formation du N-acétyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) puis d'acide mercapturique.

D'après: Hodgman & Garrard, 2012



partie enzymatiquement, par le biais des Glutathione-S-Transférases (GST) (Coles *et al.*, 1988; Sheweita, 2000). Il est ainsi converti en conjugués cystéine et mercapturates non toxiques, par la suite éliminés dans les urines (**Figure 43**). Il existe plusieurs GST, dans le cas du paracétamol la GST-Pi serait la forme majoritairement impliquée (Coles *et al.*, 1988). Cette glutathionylation est une réaction dite de phase II, mais dans le cas du paracétamol elle ne se produit qu'après formation du NAPQI, donc après une réaction de phase I.

La voie des CYP450 représente une part minoritaire du métabolisme du paracétamol, à dose thérapeutique elle représente environ 5 à 10% de la dose administrée. Plus la dose augmente, plus la part conduisant au NAPQI augmente en proportion. Lorsque le NAPQI outre passe les défenses en GSH, c'est-à-dire lorsque le pool de GSH est diminué de 70% et plus, le NAPQI en excès se lie aux protéines cellulaires et génère une cascade d'évènements conduisant à l'hépatotoxicité (*voir paragraphe 4 p60*).

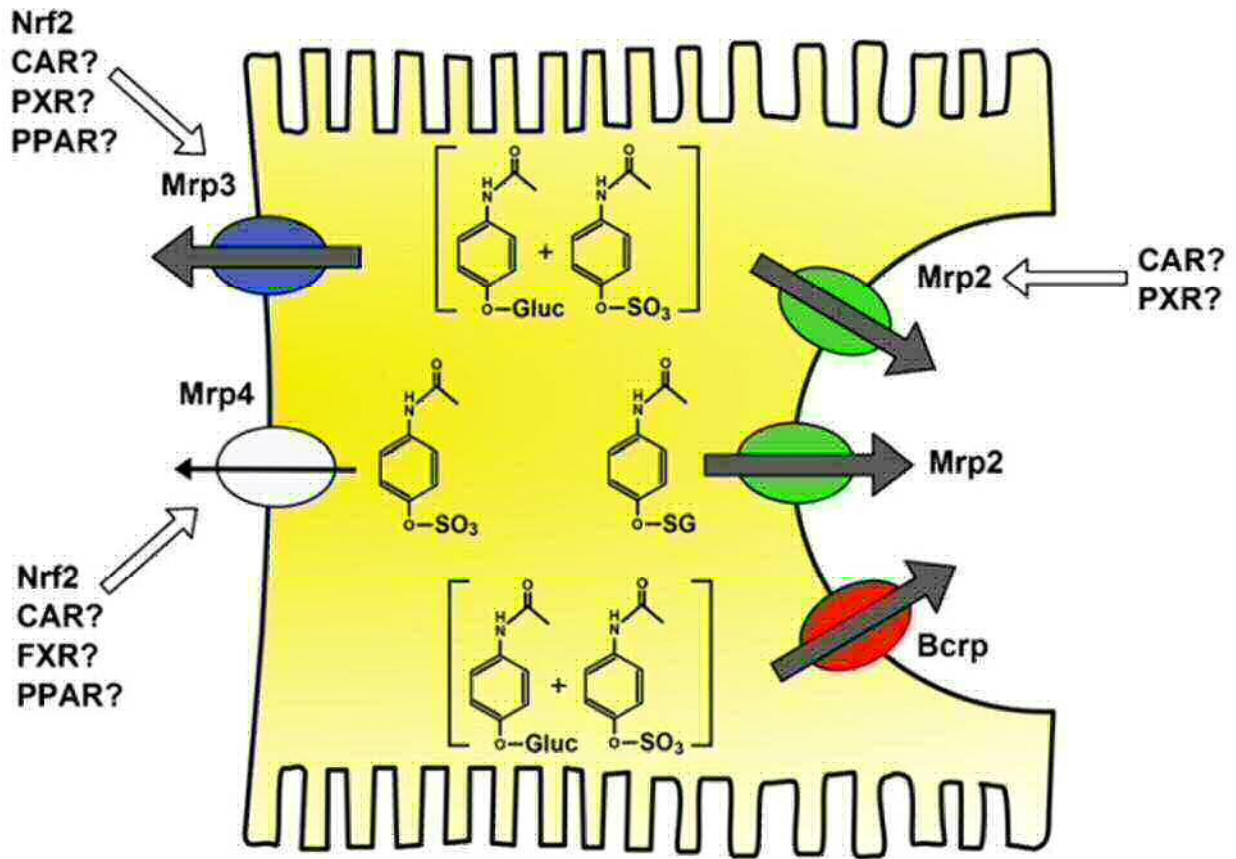
## b. REGULATION DU METABOLISME HEPATIQUE DE DETOXIFICATION

### i. SULFATATION

Comme abordé précédemment, la sulfatation est rapidement saturable ceci étant dû à la faible quantité de PAPS présent dans les hépatocytes. Chez l'homme et le rat, la sulfatation va donc dépendre de la biodisponibilité en PAPS (Kim *et al.*, 1992; Liu & Klaassen, 1996). En effet, le pool hépatique de PAPS peut être consommé à la vitesse de 60%/min (Hjelle & Klaassen, 1984). C'est la concentration de sulfate inorganique qui détermine la synthèse du PAPS, sans sulfate inorganique la sulfatation est presque totalement supprimée. En effet, lorsque le sulfate contenu dans le sérum est déplété, une perfusion de sulfate inorganique permet de restaurer rapidement le taux de sulfatation (Galinsky & Levy, 1981). *In vitro* comme *in vivo*, les précurseurs du sulfate inorganique sont les acides aminés soufrés (AAS), cystéine (Cys) et méthionine (Met), via leur sulfoxydation (Glazenburg *et al.*, 1984; Klaassen & Boles, 1997). Ainsi, la sulfatation du paracétamol requière un apport en sulfate (Kim *et al.*, 1995) qui sera fourni majoritairement par le métabolisme des AAS (Stipanuk, 1986; Saito *et al.*, 2010). Le maintien de la sulfatation nécessite donc un apport constant en AAS (*voir chapitre II paragraphe 5b. p45*).

### ii. GLUCURONIDATION

L'UDPGA est un composé stable formé en 2 étapes depuis le glucose-1-phosphate. La première étape conduit à la formation de l'UDP-glucose qui est ensuite oxydé en UDPGA. La glucuronidation peut être modifiée par divers facteurs tels que l'âge, le tabagisme, certaines



**Figure 44** : Les différents transporteurs des conjugués du paracétamol.

Les transporteurs Mrp3 & 4 de la membrane baso-latérale sont impliqués dans l'excrétion vers le sang alors que Mrp2 et Bcrp de la membrane canaliculaire sont impliqués dans l'excrétion biliaire. Les facteurs de transcription et récepteurs nucléaires potentiellement impliqués dans leur expression paracétamol-dépendante sont indiqués avec un « ? ».

Bcrp :Breast cancer resistance protein ; CAR: androxoane receptor; FXR: farnesoid X receptor; LXR: liver X receptor; Mrp : Multidrug resistance associated protein; PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor alpha; PXR: pregnane X receptor; RXR $\alpha$ : retinoid receptor alpha

D'après: McGill & Jaeschke, 2013

maladies ou encore l'alimentation (Miners & Mackenzie, 1991). Le jeûne va lui aussi affecter la glucuronidation, dans cette situation un traitement au paracétamol peut provoquer une baisse de cette voie métabolique d'environ 40% (Price *et al.*, 1987).

Cette diminution conduit à une augmentation de la proportion détoxifiée par les CYP450. Un apport en glucose ou en substrats néoglucogéniques ne permet pas de restaurer le taux de glucuronidation. Ceci suggère que l'effet du jeûne serait dû à un effet au niveau de la synthèse de l'UDPGA lui-même et non au manque de glucose (Price & Jollow, 1989). La baisse de la glucuronidation, associée à la baisse du GSH hépatique liée au jeûne, concourent à une augmentation de la toxicité (Price & Jollow, 1988; Miners & Mackenzie, 1991). Cependant en état nourri et à dose thérapeutique, la voie glucuronide n'est pas saturée. Les travaux de Hjelle & Klaassen ont montré que le pool d'UDPGA serait consommé à la vitesse de 45-50%/min pour des doses 3 à 4 fois supérieures à celles de la saturation de la sulfatation et qui correspondent à des doses au-delà du seuil de toxicité (Hjelle & Klaassen, 1984).

#### c. METABOLISME DE DETOXIFICATION EXTRA-HEPATIQUE

Le paracétamol est très largement métabolisé par voie hépatique comme décrit précédemment cependant une très faible partie est métabolisée au niveau intestinal (6%, (Goon & Klaassen, 1990). Contrairement au métabolisme hépatique, c'est la glucuronidation qui est prédominante et sera rapidement saturée avec l'augmentation de la dose, avec par conséquent, une augmentation proportionnelle de la sulfatation (Goon & Klaassen, 1990).

Seules certaines isoformes des UGTs sont fortement exprimées dans l'intestin, dont l'UGT2B15 (Ohno & Nakajin, 2009), ceci expliquant la possible glucuronidation du paracétamol ici. L'intestin est dépourvu des enzymes de phase I et peut donc uniquement glucuronider et sulfater.

#### d. TRANSPORT ET ELIMINATION RENALE

Le paracétamol peut diffuser seul au niveau périphérique, en revanche, ses métabolites requièrent des transporteurs transmembranaires. Chaque type de métabolite requiert un type de transporteur particulier, qui est induit par l'administration de paracétamol (**Figure 44**). Ces transporteurs permettent l'excrétion des différents métabolites dans le sang et la bile (McGill & Jaeschke, 2013). Les conjugués glucuronide et sulfate sont ensuite éliminés dans les urines. En revanche, le paracetamol-GSH est excrété dans la bile et dans le sang où il est dégradé dans d'autres organes dont les reins (Fischer *et al.*, 1985; Newton *et al.*, 1986). Le

paracétamol-GSH excrété dans la bile est réabsorbé au niveau intestinal et dégradé en mercapturate et paracétamol-cystéine qui sont éliminés dans les urines (Wong *et al.*, 1981). Ainsi, après conjugaison et transport, les différents métabolites ainsi que le paracétamol non modifié vont être présents dans la circulation puis captés par les reins et totalement éliminés par voie urinaire.

*Le métabolisme de détoxification du paracétamol à dose thérapeutique est donc très largement effectué au niveau hépatique. Il conduit majoritairement à la formation de paracétamol-glucuronide ainsi que de paracétamol-sulfate. Dans une faible proportion, il passe par la formation de NAPQI, rendu inoffensif par conjugaison au GSH. Ainsi, à dose thérapeutique l'élimination du paracétamol se fait par utilisation de l'UDP-glucose, du sulfate et du GSH présents au niveau hépatique.*

#### 4. TOXICITÉ & AUTRES EFFETS DU PARACÉTAMOL

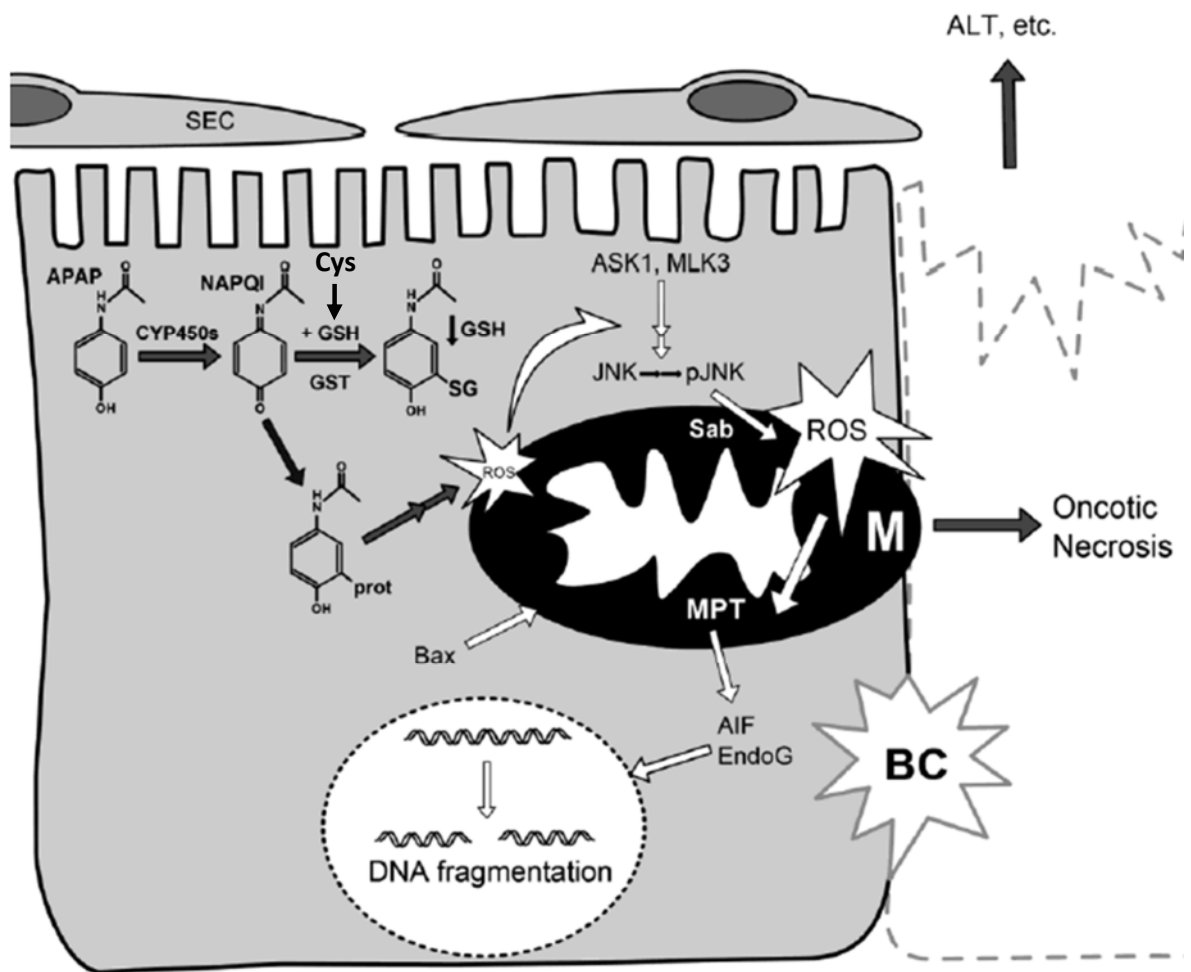
##### a. DOSE TOXIQUE

A partir de 7,5g chez l'adulte la dose est considérée comme toxique (Rumack *et al.*, 1981; Prescott, 1983; Bertolini *et al.*, 2006; James *et al.*, 2009; Hodgman & Garrard, 2012). A cette dose est associé un risque d'insuffisance et de lésions hépatiques, mais à priori le risque de conséquences sévères est faible en dessous de 10g. En cas d'overdose et sans prise en charge médicale, l'insuffisance hépatique conduit à une insuffisance d'organes généralisée conduisant au décès.

##### b. MECANISMES DE LA TOXICITE

###### i. TOXICITE HEPATIQUE

Les mécanismes conduisant à la toxicité hépatique sont connus aujourd'hui et reposent sur la formation, via réaction de phase I, du métabolite toxique NAPQI. Le NAPQI est un composé hautement réactif pouvant se lier aux résidus cystéine des protéines (Hoffmann *et al.*, 1985). Après une overdose, le GSH hépatique est déplété par plusieurs mécanismes. Le taux et la quantité de NAPQI produit provoquent une perte nette de GSH qui, une fois conjugué, est éliminé et donc perdu. De même, la sulfatation va fortement dépléter le pool de PAPS, conduisant là aussi à une perte nette de sulfate, et donc indirectement de Cys, par voie urinaire. Ainsi, la Cys est mobilisée pour la synthèse à la fois du GSH et du PAPS. Cependant



**Figure 45** : Mécanismes conduisant à l'hépatotoxicité liée au paracétamol.

AIF : Apoptosis-Inducing Factor ; ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 ; EndoG: Endonuclease G; JNK : c-Jun N-terminal Kinase ; MLK3 : Mixed Lineage Kinase 3 ; MPT : mitochondrial membrane permeability transition ; ROS : Reactive Oxygen Species

Une dose toxique de paracétamol conduit à la formation d'adduits protéiques générant la perte du potentiel de membrane mitochondriale (MPT). Le stress oxydant serait le facteur déclenchant de cette MPT, de même il rend actifs ASK1 et MLK3. Ces deux kinases vont permettre la phosphorylation de JNK, la rendant ainsi active. JNK va alors entrer dans la mitochondrie et amplifier le stress oxydant. La translocation de Bax concomitante à la MPT conduit à la libération des facteurs apoptotiques (AIF et EndoG) responsables de la fragmentation de l'ADN.

Adapté de: McGill, 2013

la déplétion du GSH va bloquer en partie la synthèse du sulfate dont une part nécessite le GSH (voir chapitre II paragraphe 5.b p45). Ainsi, le manque de GSH bloque cette synthèse au thiosulfate, la Cys utilisée ne pourra ni donner le sulfate ni le GSH. Le pool de Cys est donc diminué et la part restante est mobilisée pour compenser les pertes de GSH. Cependant ceci sera insuffisant pour compenser les pertes. L'ensemble de ces mécanismes conduisent à la déplétion du GSH cellulaire. A partir d'environ 70% de déplétion, les défenses anti-oxydantes sont insuffisantes. Le NAPQI génère alors des dommages cellulaires conduisant à une insuffisance hépatique par lyse des cellules pouvant être fatale (Jaeschke *et al.*, 2012).

Les mécanismes fins de la toxicité cellulaire du paracétamol reposent sur deux évènements clefs : la formation d'adduits protéiques et l'apparition de dommages mitochondriaux. Lorsque le GSH est insuffisant, le NAPQI se lie aux protéines, en particulier les protéines mitochondriales. Il génère ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène (EROs). Par une cascade réactionnelle ces EROs activent la voie des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et conduisent à la lyse des mitochondries. Les protéines mitochondriales sont relarguées et les endonucléases transloquées au niveau nucléaire, conduisent à la fragmentation de l'ADN. L'ensemble de cette cascade conduit à la nécrose des hépatocytes et à l'hépatotoxicité (**Figure 45** pour revue voir McGill & Jaeschke, 2013).

## ii. TOXICITE RENALE

Le deuxième organe le plus touché par la toxicité liée au paracétamol est le rein. En effet, des dysfonctions rénales sont observées dans 25% des cas de toxicité hépatique et 50% des cas d'insuffisance hépatique. Ces effets toxiques seraient liés à une formation locale de NAPQI, ce métabolite étant très réactif, il n'est en effet pas transporté tel quel depuis le foie puisqu'il s'adduit très rapidement aux protéines environnantes (voir section suivante). Le NAPQI serait bien formé *in-situ* au niveau rénal (Breen *et al.*, 1982; Bertolini *et al.*, 2006) lors de surdoage de paracétamol, alors que physiologiquement, les reins ne participent pas au métabolisme du paracétamol. Ceci est confirmé par la présence de certaines CYP, en particulier la CYP2E1 au niveau rénal (Nishimura *et al.*, 2003; Renaud *et al.*, 2011). Deux études de cas ont montré une association entre la prise chronique de paracétamol et le risque de survenue d'insuffisance rénale (Perneger *et al.*, 1994; Forel *et al.*, 2001). Ce sont les seules études qui montrent un effet d'un traitement chronique au paracétamol sur les reins. Cependant, les auteurs reconnaissent un possible biais induit par des prédispositions dans la population étudiée, étant donné qu'il s'agit d'études sur des populations présentant des pathologies rénales. Une étude d'Evans *et al.* (2009) montre l'absence d'aggravation de la

fonction rénale avec le paracétamol chez des patients atteints de maladie rénale. Il est cependant reconnu que le paracétamol présente une éventuelle toxicité rénale, moindre que les autres antalgiques de type Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien (AINS) (Graham *et al.*, 2013).

### c. MARQUEURS DE TOXICITE

#### i. TRANSAMINASES

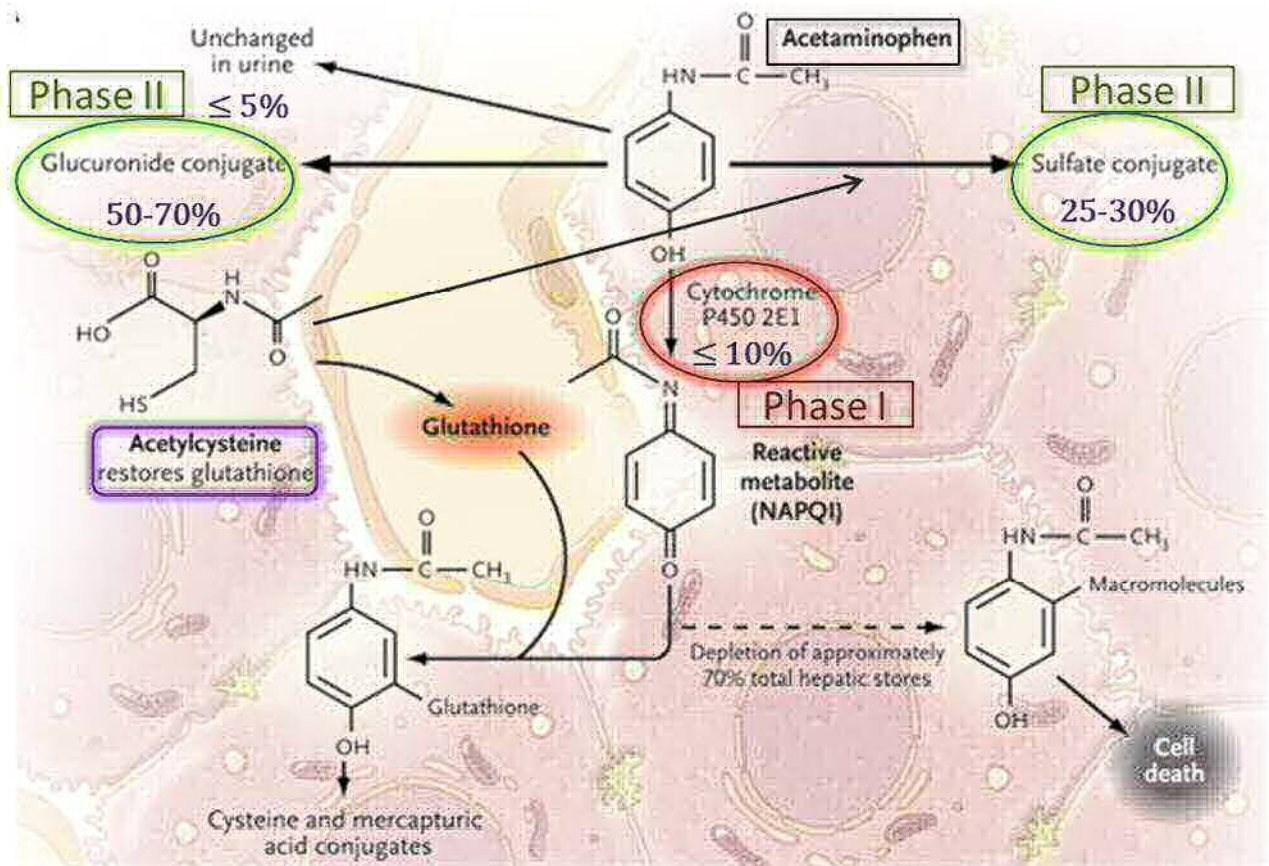
Les marqueurs de toxicité hépatique les plus couramment utilisés sont les transaminases hépatiques : aspartate aminotransférase (AST) et alanine aminotransférase (ALT). Ces enzymes se trouvent dans le cytosol des hépatocytes et sont libérées dans la circulation sanguine lors de la lyse des cellules hépatiques induite par la toxicité. L'élévation de ces enzymes est un marqueur de toxicité hépatique, quelle qu'en soit la source (Giannini, 2005). Toutefois des élévations asymptomatiques sont possibles et la toxicité n'est considérée que lorsque le seuil de trois fois la valeur contrôle est atteint (Temple, 2006).

#### ii. ADDUITS PROTEIQUES

Il existe un marqueur spécifique de la toxicité induite par le paracétamol : les adduits protéiques. Ils sont formés par la liaison du NAPQI aux groupements cystéine des protéines hépatiques, sous forme d'adduits 3-(cystein-S-yl)-APAP (Streeter *et al.*, 1984; Hoffmann *et al.*, 1985). Les premiers travaux ont montré qu'une déplétion d'environ 70% du GSH hépatique était nécessaire pour que les adduits se forment, donc uniquement à dose toxique (Mitchell *et al.*, 1973). Ces adduits ont été découverts dans le foie (Roberts *et al.*, 1987), puis Pumford *et al.* (1990) les ont mesurés au niveau plasmatique après hépatotoxicité. Leur élévation étant très bien corrélée à celle des transaminases (Muldrew *et al.*, 2002), il a longtemps été considéré qu'ils n'étaient libérés dans la circulation que lors de la nécrose des hépatocytes, comme les transaminases.

Les adduits ont alors été proposés comme des marqueurs d'une overdose au paracétamol (Davern *et al.*, 2006). La demi-vie des adduits au niveau plasmatique est de l'ordre de 1 à 2 jours après une overdose (James *et al.*, 2009), ce qui permet de les doser bien après élimination du paracétamol. Cependant, des travaux récents utilisant des techniques plus sensibles, ont montré que des concentrations faibles de ces adduits pouvaient être détectées chez l'homme dans le plasma, suite à des doses thérapeutiques de paracétamol, sans élévation des transaminases (Heard *et al.*, 2011). Des travaux sur culture de cellules humaines ont montré une production d'adduits avant déplétion du GSH (McGill *et al.*, 2011). Les adduits





**Figure 46 :** Rôle de la N-acétylcystéine dans la prévention de l'hépatotoxicité due à une overdose de paracétamol.

En cas d'overdose au paracétamol, le GSH est déplété, si l'ampleur de la déplétion dépasse  $\sim 70\%$ , une cascade réactionnelle conduisant à la mort cellulaire par nécrose se met en place. La N-Acétylcystéine permet de prévenir les adduits et la mort cellulaire en augmentant la biodisponibilité de la cystéine pour la synthèse du GSH et du sulfate pour la sulfatation.

Adapté de: Heard, 2008

seraient formés et libérés à des doses thérapeutiques, donc en absence de nécrose, ceci sous-entend qu'il s'agirait d'adduits formés sur des protéines exportées par le foie.

Des travaux récents de McGill *et al.* (2013) ont comparé la production d'adduits en culture cellulaire, dans les cellules et dans le milieu, en présence ou absence de sérum dans le milieu. Les résultats montrent qu'en l'absence de sérum, la quantité d'adduits dans le milieu de culture est inférieure à celle en présence de sérum. En revanche, dans les cellules, la quantité d'adduits est diminuée en présence de sérum. La présence d'adduits dans le milieu en l'absence de sérum montre une sécrétion des adduits. La baisse de la quantité intracellulaire d'adduits associée à une augmentation extracellulaire en présence de sérum, sous-entend une possible diffusion du NAPQI qui se lierait directement aux protéines circulantes (McGill *et al.*, 2013). Ces deux hypothèses seraient en accord avec des données ayant montré la présence d'adduits sur les érythrocytes (Axworthy *et al.*, 1988) et sur l'albumine (Switzar *et al.*, 2013).

Ainsi, afin d'utiliser les adduits comme marqueur de toxicité, il est nécessaire de prendre en compte l'élévation associée des transaminases et d'établir une courbe dose-réponse ainsi qu'un seuil de toxicité. James *et al.* (2009) ont proposé un seuil d'adduits  $\geq 1,1$  nmol/ml sérum combiné à un taux d'AST  $\geq 1000$  U/L. Les travaux de Heard et McGill confirment cette proposition (Heard *et al.*, 2011; McGill *et al.*, 2013; McGill & Jaeschke, 2013).

#### d. ANTIDOTE

En cas d'intoxication au paracétamol, l'antidote reconnu et utilisé depuis longtemps est la *N*-Acétylcystéine (NAC). La NAC permet de réduire la toxicité hépatique liée au NAPQI grâce à sa capacité à servir de précurseur du GSH et ainsi à restaurer et maintenir le pool de GSH hépatique (Lauterburg *et al.*, 1983; Hodgman & Garrard, 2012) ainsi qu'à augmenter la sulfatation (Slattery *et al.*, 1987; Hodgman & Garrard, 2012; *pour revue voir Bertolini et al.*, 2006). L'action de la NAC est due à sa fourniture rapide de Cys pour le foie (**Figure 46**). Une étude réalisée chez l'homme a montré que, donnée lors d'un traitement à dose thérapeutique (3g), la NAC permet d'augmenter la sulfatation ainsi que la glutathionylation (Slattery *et al.*, 1987). Ceci sous-entend une déplétion, déjà en place à cette dose, des pools de GSH et PAPS hépatiques. Des réserves sont cependant à émettre concernant ces résultats. En effet, les 3g sont donnés en une seule prise après un jeûne de 12h, ce qui est relativement éloigné de la prise thérapeutique consistant à ne pas dépasser 1g toutes les 4h, de préférence près d'un repas. L'effet du jeûne est connu pour augmenter la toxicité du paracétamol. De nombreuses suppléments, autres que la NAC ont été testées, dont la plupart à base de dérivés de cystéine, mais aucune ne s'est révélée plus efficace que la NAC.

#### e. EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DU PARACETAMOL

Le paracétamol est reconnu comme n'ayant pas d'effets anti-inflammatoires, ceci étant entre autres démontré dans le cas de l'arthrite rhumatoïde (Boardman & Hart, 1967; Ring *et al.*, 1974). Cependant, des travaux suggèrent que le paracétamol pourrait avoir un effet sur l'inflammation à bas bruit, *via* son action inhibitrice sur la synthèse des prostaglandines (*pour revue voir* Graham *et al.*, 2013). Cette action serait médiée par la voie des COX et ne serait possible qu'en présence d'un faible niveau d'acide arachidonique et/ou de peroxydes (*voir paragraphe 2.a.i p55*). Il est à noter que Merryl & Goldberg ont publié des travaux sur les propriétés anti-oxydantes et cardio-protectrices du paracétamol, suite à l'ischémie cardiaque induite sur organe isolé (Merrill & Goldberg, 2001). Cependant, les concentrations de paracétamol utilisées sont de 50 µg/ml plasmatique, ce qui est bien supérieur à la valeur observée après la prise d'une dose thérapeutique (1g) qui est de l'ordre de 20µg/ml (*voir paragraphe 3. p57*).

Ainsi, les éventuels effets anti-inflammatoires observés ne sont pas transposables en thérapeutique car l'utilisation d'une dose supra-thérapeutique risque de générer un stress oxydant au niveau hépatique qui annulera et/ou outrepassera les bénéfices cardiaques. De plus, le paracétamol ayant un métabolisme central et hépatique ainsi qu'une action centrale et périphérique, tous ces aspects ne sont pas pris en compte dans ce modèle, il est donc difficile de conclure sur la pertinence biologique de ces travaux.

### 5. PARACETAMOL & VIEILLISSEMENT

Le paracétamol est reconnu comme étant sûr à tous les stades de la vie et est prescrit aussi bien chez les enfants, que les adultes et les personnes âgées. La population cible du travail de cette thèse étant la personne âgée, le choix a donc été fait de développer principalement les particularités et les travaux portant sur cette population.

Le traitement des douleurs chroniques chez la personne âgée est de première importance. En effet, leur non prise en charge peut avoir des répercussions en termes de santé et bien-être avec un risque accru de dépression, une activité physique et un sommeil altérés, une augmentation des chutes et de la malnutrition et donc une qualité de vie diminuée (Perrot, 2006; Ayres *et al.*, 2012).

#### a. PREVALENCE & CHRONICITE DES DOULEURS

Les personnes âgées, institutionnalisées ou non, sont une classe de population présentant une forte prévalence de douleurs, dont des douleurs chroniques. En regroupant les

**Tableau 4 :** Prévalence des douleurs chroniques chez les personnes âgées (France, Europe, USA)

First author	Year	Country	Study design	Methods	Population studied	Sample/response	Age group	Type of pain	Prevalence
Brochet	1998	France	Cross-sectional	Face-to face interview by psychologist using closed qnr	COM Random sample from electoral register of elderly. Third year follow-up of subgroup. Sample was representative of area	741	65+ Mean 74.2	Pain in last year (pain anywhere during the previous year) Persistent pain (daily pain for >6 months)	71.5% had pain in last year M: 66.8, F: 74.7. Main sites: limb joints—44.5%, back—29.6%, non-joint leg—17.3% 32.9% had persistent pain M: 23.7, F: 40.1. Main sites: limb joints—19.4%, back—12.0%, non-joint leg—10.4% 65–74: M-19.7, F-33.3 75–84: M-25.4, F-42.8 85+: M-34.5, F-48.4 There was a higher age-adjusted prevalence of MS pain in women (63.5%) compared with men (51.6%). There was a marked difference in the proportions with widespread pain (M: 5.0%, F: 15.2%). There were similar proportions reported regional pain (M:29.3%, F:28.6%) and multi-site pain that did not meet criteria for widespread Pain (M: 17.1%, F: 19.9%) The overall prevalence of CWP was 8.3%, 95% CI 7.5–9.3%. Prevalence was broadly similar across the four decades of study increasing slightly from 40 to 49 years (7.4%) to 50–59 years (9.6%) and then decreasing at 60–69 years (8.5%) and 70 years and over (7.8%) 74.6% reported any pain. More women than men reported any pain (79.1 versus 70.3). The prevalence of chronic pain was 52.0% (58.9% in women and 39.7% in men). Common pain locations were legs/feet: 44.8%, back: 39.8% and neck/shoulders: 31.2%. Prevalence of chronic pain did not vary significantly by age Prevalence of all chronic pain combined increased with age. Developed countries: 18–35: M-20.9, F-30.4 36–50: M-31.5, F-42.6 51–65: M-42.5, F-55.0 66+: M-47.2, F-63.1 Developing countries: 18–35: M-22.0, F-35.2 36–50: M-30.8, F-47.2 51–65: M-43.8, F-59.4 66+: M-59.8, F-73.3 More females than males had chronic pain in all ages
Leveille	2005	USA	Cross-sectional	Interview and exam	COM Secondary analysis of data from the 22nd exam of the Framingham heart study (a population-based cohort study of heart disease)	1,166 left in study from original 5,209, 104 had no pain data so <i>n</i> = 1,062	72–99	MS joint pain (pain, aching or stiffness in any joints on most days)	
Macfarlane	2008	Europe	Cross-sectional	Postal qnr	COM Population based prospective study of 8 European countries. Analysis of baseline qnr	3,963/8,416 (48.7%)	40–79	CWP (pain in the past month which has lasted for one day or more and has been present >3 months)	
McCarthy	2009	USA	Cross-sectional	Telephone interview administered qnr	COM Data from the Einstein Aging Study a representative community sample from electoral roll	840	70–101 Average 80	Any pain and chronic pain	
Tsang	2008	Various	Cross-sectional	Face-to-face interviews	COM 18 surveys in 17 countries across Americas, Europe, Middle East, Asia and New Zealand. All surveys were based on multi-stage, clustered area probability household samples	85,052 adults Average response rate of 71%	16–21+	Chronic pain in joint, neck, back or head	

Extrait de: Abdulla *et al.*, 2013

données de différents pays, la prévalence de la douleur serait de 25-40% chez les personnes âgées à domicile, et 28-93% chez celles institutionnalisées (**Tableau 4**, Abdulla *et al.*, 2013). Des études réalisées aux Etats-Unis ont montré qu'au moins 50% des personnes âgées vivant à domicile connaissent des douleurs chroniques, définies par des douleurs quasi quotidiennes durant au moins 3 mois consécutifs (Cavalieri, 2005; Ferrell *et al.*, 2009). Chez les personnes institutionnalisées, cette prévalence est accrue s'élevant à 49-84% en moyenne (Won *et al.*, 2004; Cavalieri, 2005; Maxwell *et al.*, 2008). Malgré l'importance de cette prévalence, la douleur chronique resterait encore sous-évaluée et sous traitée (Ayles *et al.*, 2012).

Les zones corporelles les plus associées aux douleurs dans cette population sont le dos, les jambes et les genoux (Abdulla *et al.*, 2013). Ceci s'explique par le fait que l'une des causes les plus communes de douleurs chroniques, chez les personnes âgées, est l'arthrite dont la prévalence est de 35 à 57% chez les plus de 65 ans (Lawrence *et al.*, 1998; Helmick *et al.*, 2008) ainsi que les lombalgies qui lui sont associées présentant une prévalence de 49% dans cette même population ((Lawrence *et al.*, 1998; Leveille *et al.*, 2002). Cependant, malgré une dégradation des qualités de l'os et du muscle avec l'avancée en âge, les fibres nerveuses sensibles qui les innervent sont très bien préservées. Les personnes âgées ont donc une même transduction de la douleur que les adultes (Jimenez-Andrade *et al.*, 2012) et leurs douleurs chroniques sont dues aux altérations musculo-squelettiques et non à une hypersensibilisation. Les douleurs musculo-squelettiques contribuent à la perte de mobilité, l'altération du statut fonctionnel et de la qualité de vie globale et ainsi à l'augmentation de la mortalité et de la morbidité (Woolf & Pfleger, 2003; Brooks, 2006).

## b. RECOMMANDATIONS POUR LA PRISE EN CHARGE DE LA DOULEUR

### i. RECOMMANDATIONS

Les douleurs musculo-squelettiques chroniques des personnes âgées sont majoritairement de type légères à modérées. La première recommandation pour leur prise en charge est la médication. Parmi les différents types de médication, le paracétamol est l'antalgique recommandé en première intention chez les personnes âgées (Bertin *et al.*, 2004; Cavalieri, 2005; Perrot, 2006; Fine, 2012). Ces recommandations sont données par les grands organismes référents tels que l'OMS, la FDA ou encore l'American Geriatrics Society (Ferrell *et al.*, 2009; Fine, 2012), l'OsteoArthritis Research Society International (Zhang *et al.*, 2008), l'European League Against Rheumatism (Jordan *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005), et le National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE, 2014) (*pour revue voir Abdulla et al.*, 2013).

Etant donné la forte prévalence de ces types de douleurs chroniques chez les personnes âgées, le nombre d'individu prenant quotidiennement du paracétamol représente une part non négligeable de cette population.

#### *ii. PREVALENCE DES TRAITEMENTS AU PARACETAMOL*

Diverses études montrent que le paracétamol est bien l'analgésique le plus prescrit/consommé par les personnes âgées aussi bien à domicile, qu'institutionnalisées (Won *et al.*, 2004). En institut, il représente à lui seul 37-39% des analgésiques consommés (Won *et al.*, 2004; Maxwell *et al.*, 2008).

#### *iii. ETUDES SUR LES CONSEQUENCES DU PARACETAMOL CHEZ LE SUJET AGE*

Peu d'études ont été réalisées sur l'administration chronique de paracétamol chez l'homme. La plupart des études réalisées portent sur le suivi de l'absence d'hépatotoxicité ou l'efficacité de l'effet analgésique (pour exemples Temple *et al.*, 2006; Altman *et al.*, 2007) et ne prennent pas en considération l'aspect besoin nutritionnel et/ou maintien de la masse musculaire.

Une étude a été réalisée au laboratoire portant sur la prise de 1g de paracétamol trois fois par jour pendant 14j consécutifs chez des personnes âgées à domicile (Pujos-Guillot *et al.*, 2012). Cette étude a montré une augmentation de la consommation de protéines, donc de l'apport en AAS, à la fin des 14j, laissant supposer une augmentation du besoin en AAS chez les personnes traitées chroniquement au paracétamol. Quelques travaux chez l'animal ont porté sur l'effet du paracétamol sur les AAS et sur le muscle, ces points sont traités dans les paragraphes suivants.

## 6. PARACETAMOL & MASSE MUSCULAIRE

Trappe *et al.* ont réalisé des travaux chez l'homme portant sur les effets de la prise répétée de paracétamol associée à l'exercice sur le volume et la force musculaire développés (Trappe *et al.*, 2002, 2011, 2013). Les mesures ont été effectuées chez l'adulte, après une séance unique d'exercice, au moment de laquelle débutait la prise de 4g/j de paracétamol. Les résultats montrent que l'exercice induit une augmentation du taux de synthèse fractionnaire (FSR) musculaire, ainsi que des PG (E2 et F2 $\alpha$ ), dans les 24h post-exercice (Trappe *et al.*, 2002). La prise de paracétamol dès le début de l'exercice, induit une suppression de ces effets de l'exercice. Les auteurs ont effectué une expérience similaire chez des personnes âgées qui ont effectué 3 séances d'exercice par semaine pendant 12 semaines avec prise de 4 g/j de



paracétamol (Trappe *et al.*, 2011). Le FSR n'a cette fois pas été mesuré, mais les résultats montrent une potentialisation du gain de volume musculaire induit par l'exercice, ainsi que de la force associée pour les muscles exercés. Ces résultats vont dans le sens d'une amélioration de l'effet de l'exercice au niveau volume et fonctionnalité musculaire avec la prise quotidienne de paracétamol. Ces résultats sont surprenants et vont à l'encontre des attentes et des 1<sup>ers</sup> résultats des auteurs, ainsi qu'à des travaux montrant l'effet négatif des inhibiteurs de la COX-2 sur l'hypertrophie musculaire (Novak *et al.*, 2009). Une explication possible aux deux effets contradictoires obtenus est que lors de la 1<sup>ère</sup> expérience les sujets ont reçu uniquement une alimentation préparée sur place et calibrée en apports protéiques. En revanche, lors de la seconde étude, l'apport alimentaire n'a pas été contrôlé hormis le jour avant la biopsie. Or, l'étude réalisée au laboratoire a montré que le paracétamol, administré de façon répétée chez des personnes âgées à domicile, conduisait à une augmentation spontanée des apports protéiques chez ces personnes (Pujos-Guillot *et al.*, 2012).

Il est donc possible que le même phénomène se soit produit ici, l'apport protéique influençant fortement le gain de masse musculaire (*voir chapitre 1 paragraphe 3. p20*) il est possible que l'effet positif de la prise de paracétamol sur la masse musculaire observé par Trappe *et al.* (2011) soit en fait lié à une modification de l'alimentation. Ceci expliquerait pourquoi cet effet n'est pas observé sur les muscles non exercés, pour lesquels la synthèse protéique est moins stimulée. De plus l'effet observé n'est observé que pour le muscle exercé, il s'agit d'un effet combiné exercice-paracétamol.

Peu d'études portent sur l'impact du paracétamol sur le muscle. Les travaux de Wu *et al.* (2009, 2010) ont été réalisés chez le rat très âgé (33 mois), traité en chronique pendant 6 mois. Ces travaux portent sur des doses très faibles (30 mg/j) bien en dessous des doses nécessaires à l'effet antalgique, le seuil minimal d'inhibition de la douleur chez le rat étant aux alentours de 200 mg/j (Muth-Selbach *et al.*, 1999; Choi *et al.*, 2001). Les auteurs observent une amélioration du statut glycémique et du signaling protéique musculaire grâce au paracétamol (Wu *et al.*, 2009, 2010). L'hypothèse des auteurs est que le paracétamol générerait un effet antioxydant, les voies MAPK/Glut4 étudiées par ces auteurs étant régulées par les EROs.

Les études chez l'animal avec des administrations chroniques de paracétamol, à des doses thérapeutiques ou supra-thérapeutique, concernent essentiellement les aspects de sa toxicité (Sun *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Polaniak *et al.*, 2011). Peu de travaux se sont intéressés à l'effet sur la masse musculaire, ou à l'interaction avec l'apport en protéines et AAS alimentaires Une série d'études a porté sur l'impact d'un traitement chronique à dose



thérapeutique sur la croissance, mettant en lien le métabolisme du paracétamol avec le besoin en AAS élevé durant la croissance (Reicks & Hathcock, 1989; Mclean *et al.*, 1989). Il s'agit des premiers travaux ayant suggéré une compétition entre détoxification du paracétamol et besoin de l'organisme en AAS.

## 7. PARACETAMOL & ACIDES AMINES SOUFRES

Le lien entre métabolisme des AAS et métabolisme du paracétamol a été mis en évidence chez la souris et le rat en croissance. Les travaux de Reicks & Hathcock et de McLean ont montré qu'une administration chronique de paracétamol à hauteur de 1% du régime conduit à une inhibition de la croissance (Reicks & Hathcock, 1989; Mclean *et al.*, 1989). Cette inhibition est restaurée par ajout de Cys ou Met à hauteur de 0,5% du régime, suggérant une compétition entre la détoxification du paracétamol et la croissance pour l'utilisation des AAS, au dépend de la croissance. Ces travaux mettent en évidence une diminution de la synthèse des protéines hépatiques accompagnée d'une baisse du GSH hépatique suite à la prise de paracétamol (Reicks & Hathcock 1989). Le lien direct entre métabolisme du paracétamol et AAS a été mis en évidence au niveau hépatique par les travaux de Lauterburg & Mitchell, (1987) qui montrent une augmentation du turn-over de la Cys et du GSH suite à l'administration de doses thérapeutiques. Dans les travaux chez le rongeur, la dose de 1% du régime est considérée comme un équivalent thérapeutique puisque chez l'homme, l'ingéré total en matière sèche est de l'ordre de 400 g/j. Ainsi, les 4 g/j de paracétamol en représentent 1% (Mclean *et al.*, 1989).

Price & Jollow (1989) ont montré qu'un régime carencé en AAS chez le rat conduisait à une baisse du niveau de sulfate inorganique. Ces animaux ont une sulfatation du paracétamol diminuée associée à une augmentation de la voie NAPQI, se traduisant par une toxicité augmentée. Des travaux réalisés chez l'adulte ont montré une oxydation du GSH plasmatique suite à l'administration de paracétamol avec un régime dépourvu d'AAS en comparaison à son administration avec AAS (Mannery *et al.*, 2010). D'autres études réalisées chez l'animal ont mis en évidence des perturbations du métabolisme des AAS suite à la prise de paracétamol et particulièrement chez l'âgé. Les travaux de Chen *et al.* (1990), ont montré que les souris âgées ont une concentration en GSH hépatique plus faible que les jeunes et les adultes. Chez ces souris, l'administration de paracétamol génère une déplétion du GSH hépatique qui n'est pas récupéré 24h après traitement, contrairement aux jeunes et aux adultes qui ont récupérés 94% et 66% de leur GSH hépatique, respectivement. La diminution du GSH hépatique conduit à une diminution de la formation de PAPS (Huang *et al.*, 1998) conduisant

à une moindre sulfatation (Gregus *et al.*, 1988), qui se traduit par une augmentation de la voie NAPQI qui va entretenir et aggraver la déplétion du GSH hépatique. De plus chez le rat âgé, la réabsorption rénale du sulfate est diminuée ce qui contribue à une perte augmentée du sulfate dans les urines et donc une moindre disponibilité du sulfate pour la synthèse du PAPS (Klaassen & Boles, 1997). De plus, l'administration de paracétamol conduit à une diminution du sulfate non seulement hépatique (lieu de conjugaison du paracétamol au sulfate) mais aussi rénal et plasmatique (Kim *et al.*, 1992).

*Au regard de ces différents travaux il est donc évident que le paracétamol génère des perturbations du métabolisme des AAS et en particulier du GSH et ce, même à dose thérapeutique. Le métabolisme des AAS étant perturbé chez les sujets âgés et en particulier le statut en GSH, la population âgée pourrait s'avérer plus sensible aux perturbations liées à la prise chronique de paracétamol. De plus, une part non négligeable de cette population est chroniquement soumise à la prise de paracétamol.*

*Cependant, les données actuelles sur le lien entre paracétamol et masse musculaire sont peu nombreuses et vont plutôt en faveur d'une amélioration de la masse musculaire avec le traitement. Il est cependant d'importance de noter que ces effets ne sont observés qu'avec prise d'une dose infra-thérapeutique, donc sans action antalgique, ou associée à de l'exercice physique trois fois par semaine. Or, la première cause de prescription du paracétamol chez les personnes âgées est le soulagement des douleurs musculo-squelettiques, ce qui n'est pas compatible avec des doses infra-thérapeutiques ni avec un entraînement physique 3 fois par semaine, et il doit être pris sur le long terme. Il reste donc aujourd'hui un manque de données reliant le métabolisme du paracétamol à celui des AAS en lien avec le métabolisme musculaire. De plus, il serait important d'étudier l'effet de doses thérapeutiques sur la masse musculaire, sans intervention sportive, en tenant compte de l'apport protéique afin d'appréhender les conséquences du paracétamol seul.*

## Conclusion générale

---

L'analyse bibliographique montre qu'avec le vieillissement de nombreuses voies physiologiques sont modifiées. Ces modifications génèrent, entre autre, une augmentation du stress oxydant, l'apparition d'une inflammation à bas bruit et une moindre sensibilité musculaire aux signaux anaboliques. Ces perturbations conduisent à une altération de la masse, de la quantité de protéines, de la force et de la fonctionnalité musculaire : la sarcopénie. La sarcopénie est un phénomène complexe et multifactoriel, cependant il apparait que l'apport protéique est un des facteurs clefs impliqué dans sa pathogénèse. Le stress oxydant à lui aussi un rôle important par les potentielles pertes qu'il génère, pertes qui ne sont que peu ou pas récupérées chez le sujet âgé conduisant à une aggravation de la sarcopénie d'après le « catabolic crisis model ».

Les acides aminés soufrés ont un rôle essentiel dans la défense anti-oxydante principalement *via* la synthèse du glutathion dont la cystéine est le précurseur direct. Or, le stress oxydant et l'inflammation à bas bruit présents au cours du vieillissement contribuent à augmenter l'utilisation de la cystéine et diminuer le niveau de glutathion. De plus, la cystéine présente un rôle important au niveau hépatique, dans les mécanismes de détoxification des xénobiotiques, comme de nombreux médicaments, dont le paracétamol.

La médication est fortement présente chez les personnes âgées, en particulier pour soulager les douleurs chroniques dont la prévalence atteint jusqu'à 93% des personnes institutionnalisées. Le paracétamol est le médicament le plus recommandé pour le soulagement de ces douleurs, et il est depuis plusieurs années l'antalgique le plus vendu et consommé en France. L'élimination du paracétamol à dose thérapeutique passe par sa conjugaison au sulfate et au glutathion, engendrant une perte indirecte de cystéine dans les urines. Des travaux réalisés chez l'animal montrent des altérations de la croissance, de l'homéostasie du sulfate et du glutathion, suite à la prise de paracétamol à dose thérapeutique. Ces travaux montrent que chez l'animal âgé, la baisse du glutathion consécutive à la prise de paracétamol n'est pas restaurée 24h après la prise. Ainsi, le paracétamol génère à la fois une diminution du statut en glutathion et une perte indirecte de cystéine par les urines. Pris sur le long terme, le paracétamol pourrait donc générer une carence en acides aminés soufrés couplée à une élévation du stress oxydant, susceptibles d'aggraver la sarcopénie.

Il apparait donc nécessaire d'étudier les potentiels effets du paracétamol chez le sujet âgé traité de façon répétée au paracétamol, en particulier sur la masse musculaire notamment si les apports protéiques sont diminués.

**OBJECTIF ET STRATEGIE**  
**EXPERIMENTALE DE LA THESE**

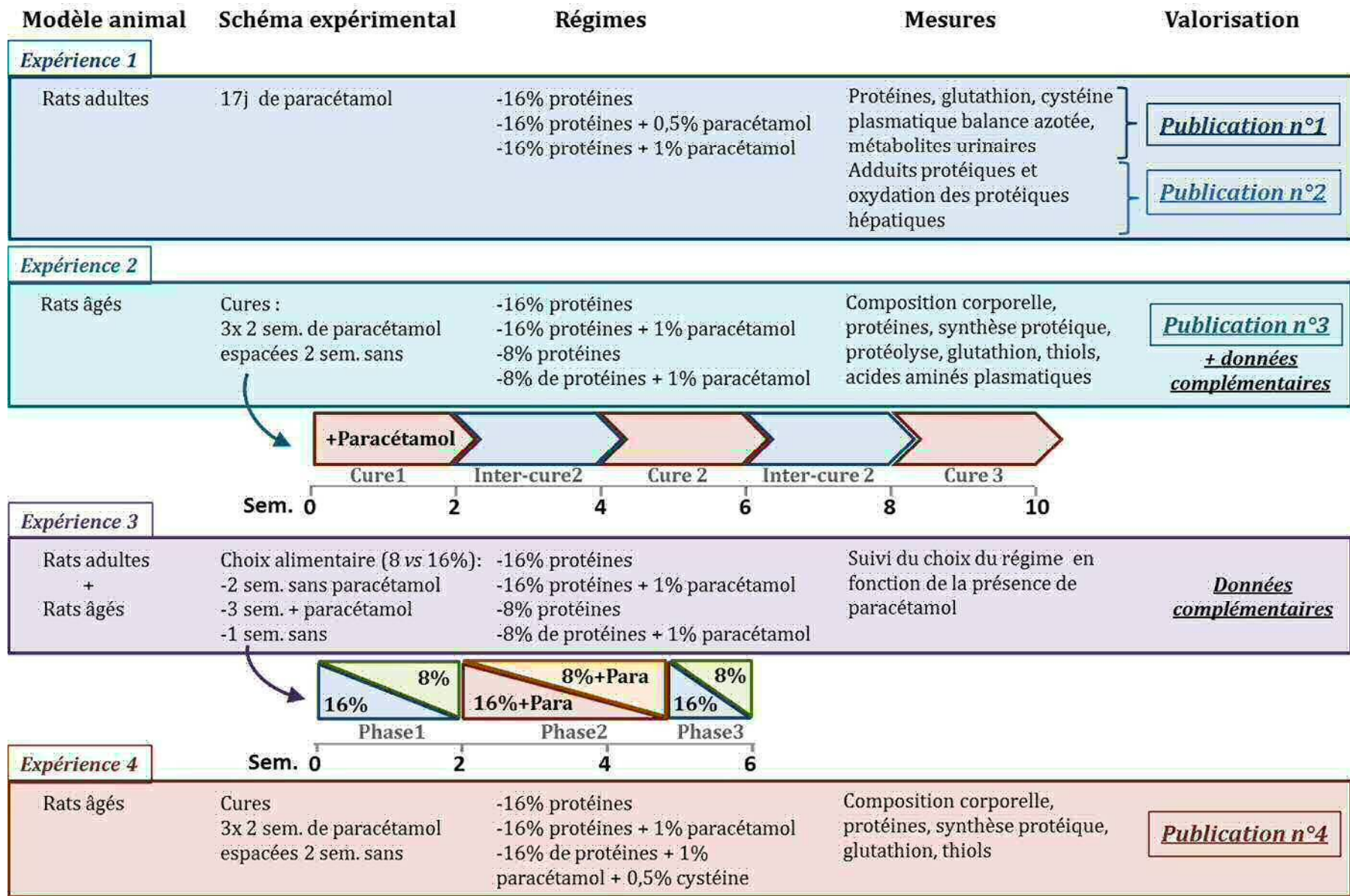


Figure 47 : Schéma récapitulatif des expériences de la thèse

**L'objectif du travail de cette thèse est d'étudier les conséquences d'un traitement chronique au paracétamol sur la masse musculaire du sujet âgé et la mise en évidence du lien entre sarcopénie et utilisation hépatique des acides aminés soufrés pour la détoxification du paracétamol.**

Pour répondre à cet objectif, la première étape a été de mettre au point un modèle animal permettant d'étudier les altérations musculaires et le métabolisme du paracétamol. Le modèle animal choisi a été le rat, déjà validé comme modèle permettant de reproduire une perte musculaire similaire à celle observée chez l'homme lors du vieillissement (Mosoni *et al.*, 1995, 2004; Rieu *et al.*, 2003).

La première expérience (**Figure 47**) réalisée chez le rat adulte a permis de mettre au point la dose et le mode d'administration du paracétamol. Cette étude a aussi permis d'étudier sa détoxification hépatique de façon dose-dépendante. Les données obtenues nous ont permis de mettre en relation la détoxification hépatique du paracétamol avec l'homéostasie du glutathion et la masse musculaire, en fonction de la dose administrée (**Publication n°1**). Une méthode de spectrométrie de masse a été développée afin d'étudier la survenue d'altérations des protéines hépatiques suite au traitement chronique au paracétamol et la relation dose-effet (**Publication n°2, soumise**).

Cette première étude a donc permis de valider l'administration de 1% de paracétamol par supplémentation dans le régime. Le paracétamol a été administré directement dans la nourriture afin de se rapprocher de la situation chez l'homme, où le médicament est en majorité pris par voie orale. La dose de 1% du régime est un équivalent de la dose maximale thérapeutique administrée chez l'homme (4g/j). En effet, lorsqu'elle est rapportée à la quantité de matière sèche ingérée, qui est d'environ 400 g/j chez l'homme (Dubuisson *et al.*, 2010), 4 g/j en représentent 1%. En ce qui concerne la détoxification, les profils urinaires des métabolites du paracétamol sont en adéquation avec ceux retrouvés chez l'homme.

Le modèle animal et le mode d'administration du paracétamol ayant été validés, le lien entre paracétamol et muscle a été mis en évidence, les travaux ont été poursuivis chez un modèle âgé afin de répondre à la question de l'impact du paracétamol sur la sarcopénie. Pour cette seconde expérimentation, le modèle a été modifié afin de reproduire la prise chronique et récurrente de paracétamol chez la personne âgée (**Figure 47**). Les animaux ont donc reçu le paracétamol sous forme de cures, c'est-à-dire qu'ils ont reçu le paracétamol durant 2 semaines suivies de 2 semaines sans paracétamol. Ce schéma a été répété deux fois puis les animaux ont été sacrifiés au terme de la 3<sup>ème</sup> cure. L'objectif de cette expérimentation était double, 1)



étudier l'impact de la prise chronique de paracétamol sur la masse musculaire chez l'âgé, 2) étudier ces effets en fonction de l'apport protéique alimentaire. Pour ce faire, quatre lots d'animaux ont été mis en place. Deux lots ont reçu un régime à taux protéique normal (16%), dont un recevant le paracétamol par cures. Deux autres lots ont suivi le même schéma expérimental mais ont reçu des régimes à faible taux protéique (8%). Un 5<sup>ème</sup> lot a été utilisé comme T0 de l'expérience. Les résultats de cette étude nous ont permis de mettre en évidence un lien entre prises répétées de paracétamol chez l'animal âgé et sarcopénie. Ces travaux ont permis d'approfondir l'effet du traitement sur les métabolismes protéiques hépatique et musculaire et de les mettre en relation avec les acides aminés soufrés et leur métabolisme (**Publication n°3, en préparation**). En revanche, cette étude n'a pas permis d'étudier ces effets en fonction de l'apport protéique. En effet, un apport protéique faible couplé au paracétamol a engendré un refus important du régime. Ce point constitue une des limites de notre modèle expérimental (**Données complémentaires**).

Suite au comportement de refus des rats âgés devant le régime à 8% supplémenté à 1% de paracétamol, nous avons souhaité étudier plus en détails cet effet du paracétamol dépendant du taux protéique du régime. Le but de cette 3<sup>ème</sup> étude a donc été d'étudier l'adaptation de l'apport protéique par les rats adultes et âgés en fonction de la présence de paracétamol (**Figure 47**). Cette expérience s'est déroulée en trois phases durant lesquelles les animaux ont toujours eu le choix entre les deux taux protéiques (8% et 16%). Lors de la première phase les régimes étaient dépourvu de paracétamol afin d'étudier le choix des animaux face au régime à 8% en absence de paracétamol. Dans la seconde phase, les animaux ont reçu les régimes supplémentés en paracétamol, afin d'étudier l'évolution de leur comportement alimentaire suite à l'ajout du paracétamol. Enfin, dans la troisième phase, les animaux ont à nouveau reçu les régimes sans paracétamol afin d'étudier l'évolution post traitement de leur comportement alimentaire (**Données complémentaires**). Cette expérience a permis de mettre en évidence un changement de comportement alimentaire spécifique à la présence de paracétamol dans le régime.

L'ensemble des résultats obtenus au terme de ces trois expériences allait dans le sens de notre hypothèse de départ, et des données de la littérature, mettant en évidence un lien entre paracétamol et métabolisme des acides aminés soufrés. Suite à ces résultats, la 4<sup>ème</sup> et dernière expérience de cette thèse a eu pour objectif d'étudier l'intérêt de la nutrition dans la prévention des altérations induites par l'administration répétée de paracétamol. L'hypothèse de départ étant que le paracétamol pouvait induire une perte de masse musculaire à cause de la perte nette de cystéine et de glutathion qu'il générerait, c'est une supplémentation en cystéine



qui a été choisie. La dose de cette supplémentation a été calculée pour couvrir uniquement le besoin supplémentaire généré par le traitement. Le schéma expérimental utilisé a été exactement le même que lors de la deuxième expérimentation (**Figure 47**), uniquement avec un régime à 16% de protéines. Trois lots d'animaux ont été mis en place, un lot a reçu le paracétamol seul, un lot a reçu le régime avec paracétamol et cystéine et un lot témoin qui a reçu le même régime sans paracétamol ni cystéine (**Publication n°4, en préparation**).



## **RESULTATS EXPERIMENTAUX**

### **IMPACT D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE AU PARACETAMOL CHEZ LE RAT ADULTE EN FONCTION DE LA DOSE.**

- **PUBLICATION N°1: Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol (acetaminophen) when glutathione-dependent detoxification is highly activated.**

C. Mast, C. Joly, I. Savary-Auzeloux, D. Rémond, D. Dardevet, I. Papet

*Journal of Physiology and Pharmacology* (October 2014, Vol. 65, No 5)

- **PUBLICATION N°2: Assessment of protein alterations in liver of rats under chronic treatment with paracetamol (acetaminophen) using two complementary mass spectrometry-based metabolomic approaches**

C. Mast, B. Lyan, C. Joly, D. Centeno, F. Giacomoni, J-F. Martin, L. Mosoni, D. Dardevet, E. Pujos-Guillot, I. Papet

*En préparation pour soumission à Journal of Proteomics*

## PUBLICATION N°1

**Objectif :** Le but de cette étude était de voir si la détoxification du paracétamol sur le long terme interférait avec le métabolisme des acides aminés soufrés au niveau corporel et quelles en étaient les conséquences chez l'adulte. La cible était le tissu musculaire et les perturbations induites sur la masse musculaire ainsi que l'homéostasie du GSH, en lien avec la perte urinaire de cystéine générée par le métabolisme de détoxification hépatique du paracétamol.

**Méthodes :** La stratégie a été d'administrer le paracétamol directement dans le régime afin de se rapprocher de la situation chez l'homme, où le médicament est généralement pris par voie orale, proche des repas. Deux doses de paracétamol ont été testées, une (0,5%) où l'utilisation du GSH pour la détoxification du paracétamol est quasi nulle. Une plus élevée (1%) où elle intervient, afin d'étudier les répercussions musculaires de l'impact du métabolisme hépatique de détoxification dans les potentiels effets. De plus, la dose de 1% est considérée comme équivalente des 4g/j chez l'homme. Les animaux ont reçu le traitement pendant 17 jours afin de mimer un traitement long et ont été placés dans des cages métaboliques les 6 derniers jours afin de quantifier les pertes soufrées urinaires dues à l'élimination du paracétamol, ainsi que le bilan azoté.

**Principaux résultats :** Les proportions respectives des différents métabolites urinaires montrent que la dose de 1% de paracétamol est, comme attendue, proche de ce qui a pu être observé chez l'homme. En comparaison aux animaux témoins, le régime à 1% de paracétamol induit une baisse du GSH total hépatique (63%), intestinal (19%) et musculaire (26%). Il induit aussi une baisse de la quantité de protéines musculaire (7%) et de la masse du gastrocnemius (8%), de l'EDL (13%) et de la somme des 4 muscles étudiés (8%).

**Conclusion:** Le traitement chronique correspondant à la dose thérapeutique maximale chez l'homme entraîne une altération du statut en GSH corporel ainsi qu'une baisse de la masse musculaire. Cette perte de masse peut être consécutive à la baisse du GSH qui induit un stress oxydant connu pour altérer le renouvellement protéique. La biodisponibilité en cystéine est aussi réduite par la baisse du GSH pouvant être utilisé par le muscle comme source de cystéine. Il apparaît donc important d'étudier l'ampleur de ces phénomènes chez un modèle âgé dont l'altération des défenses anti-oxydantes et de la masse musculaire auraient d'importantes conséquences dont l'aggravation de la sarcopénie.

C. MAST<sup>1,2</sup>, C. JOLY<sup>3</sup>, I. SAVARY-AUZELOUX<sup>1,2</sup>, D. REMOND<sup>1,2</sup>, D. DARDEVET<sup>1,2</sup>, I. PAPET<sup>1,2</sup>

## SKELETAL MUSCLE WASTING OCCURS IN ADULT RATS UNDER CHRONIC TREATMENT WITH PARACETAMOL WHEN GLUTATHIONE-DEPENDENT DETOXIFICATION IS HIGHLY ACTIVATED

<sup>1</sup>Clermont Universite, Universite d'Auvergne, Unite de Nutrition Humaine, Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France; <sup>3</sup>Plateforme d'Exploration du Metabolisme, INRA, Centre Clermont-Ferrand - Theix, UMR 1019 Nutrition Humaine, Saint-Genes-Champanelle, France

The use of glutathione (GSH) and sulfate for the detoxification of paracetamol (acetaminophen, APAP) could occur at the expense of the physiological uses of cysteine (Cys). Indeed GSH and sulfate both originate from Cys. Significant APAP-induced Cys loss could generate alterations in GSH and protein metabolisms leading to muscle wasting. The study aimed to investigate the effects of chronic treatment with APAP on whole-body and tissue homeostasis (mass, GSH, proteins, and nitrogen balance) in relation to sulfur losses through APAP-detoxification pathways. Adult male Wistar rats were fed 0% APAP, 0.5% APAP or 1% APAP diets for 17 days. APAP doses were respectively around and largely above the threshold of sulfation saturation for rats. During the last days, the rats were placed in metabolic cages in order to quantify N balance and urinary APAP metabolites. *Gastrocnemius* muscle mass, protein and GSH contents, N balance and plasma free cyst(e)ine were 8% (P=0.02), 7% (P=0.03), 26% (P=0.01), 37% (P=0.01), and 33% (P=0.003) lower in the 1% APAP group than in the 0% APAP group, respectively. There was no significant difference in these parameters between the 0.5% APAP group and the 0% APAP group. Muscle wasting occurred when the detoxification of APAP through the GSH-dependent pathway was highly activated. Muscle protein synthesis could have been reduced due to a shortage in Cys and/or an increase in protein degradation in response to intra-muscular oxidative stress. Hence, without dietary sulfur amino acid increase, peripheral bioavailability of Cys and muscle GSH are potential players in the control of muscle mass under chronic treatment with APAP, an analgesic medication of widespread use, especially in the elderly.

**Key words:** *cysteine, glutathione, proteins, nitrogen balance, exercise, analgesia, detoxification, urinary metabolites*

### INTRODUCTION

The function of skeletal muscle is to ensure posture and locomotion, and this tissue is the main reservoir of body proteins. This reservoir is mobilized in case of disease, providing amino acids to tissues involved in the physiological defense necessary for recovery (1, 2). Muscle wasting is known to occur in a wide range of conditions like chronic and inflammatory diseases, renal failure, cachexia or cancer as well as physical inactivity or old age. When advanced, muscle loss potentiates morbidity and increases mortality (3-6). Consequently, preserving and maintaining muscle mass is an important challenge, especially when ensuring optimal defense in case of disease.

Diseases are often associated with acute or chronic pain and fever and the first-line treatment recommended for pain management is paracetamol (acetaminophen, APAP) (7, 8). APAP is therefore the analgesic and antipyretic drug the most commonly used in Europe/USA (9-11) and is considered as safe (7). APAP metabolism in the liver consists mainly in phase II detoxification (up to 90%) by direct sulfate or glucuronide conjugation of APAP. In phase I metabolism (up to 10%) APAP

is converted by cytochrome P450 in the highly reactive compound *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) which is readily detoxified by conjugation with glutathione (GSH) then converted to cysteine (Cys) and mercapturate conjugates (12, 13). Cys loss is therefore expected to increase with APAP consumption as its metabolism is associated with irreversible utilization of Cys. Cys is a sulfur amino acid (SAA) which can be synthesized from methionine and serine. Cys is mainly used for proteins and GSH synthesis and is also the precursor of taurine and sulfate (14). Up to 40% of APAP intake can be metabolized as sulfur containing compounds at therapeutic dosage (13).

Physiological disruptions due to APAP have been shown in growing rats or mice (15-17). In the liver, where APAP detoxification mainly occurs, reductions of hepatic protein synthesis and GSH concentration have been observed in growing mice fed a 0.6% APAP diet (w/w)(16). These data support the idea that competition occurs in the liver between the use of Cys for detoxification of chronic administration of APAP and the other uses of Cys. Splanchnic or gastrointestinal first-pass extractions of dietary Cys represent 40–60% of the dietary intake (18, 19). Hepatic Cys use for APAP detoxification would increase the already important splanchnic first-pass extraction

and lead to a decrease in peripheral Cys availability for muscle protein synthesis. Liver GSH is known to be exported and is considered as a significant supplier of GSH and Cys to other tissues (20–22). Therefore, indirectly, APAP-induced depletion of hepatic GSH would worsen the decrease in peripheral Cys availability.

Effects of chronic treatment with APAP at whole body level have been shown in growing rats or mice fed APAP-containing diets for 2–3 weeks. Studies using diets supplemented with 0.8% or 1% of APAP showed that rodents failed to grow (15, 16). Furthermore, a decrease in the nutritional utilization of dietary proteins has been reported in growing rats submitted to long-term APAP treatment (17). It was hypothesized that in the presence of APAP, Cys became conditionally indispensable in young growing rats for which the Cys requirement for tissue growth was elevated.

However, it is questionable as to whether such negative effects of chronic treatment with APAP would also occur in adults who exhibit milder needs for protein metabolism than growing rodents. The aim of the study was to provide an integrative view of the relation between the quantitative irreversible loss of sulfur for APAP detoxification and APAP-induced alterations regarding protein and GSH contents in various organs and tissues in adults. We hypothesized that increasing APAP in the diet of adult rats would decrease Cys availability in peripheral tissues inducing muscle loss. In this study, in addition to muscle mass, GSH and protein contents were quantified in skeletal muscle, liver and small intestine being quantitatively important tissues in terms of GSH and protein metabolisms. In order to analyze how these expected alterations could be related to the irreversible loss of sulfur, urinary APAP metabolites were quantified. Arterial plasma Cys concentration was measured as an index of peripheral Cys bioavailability. Finally, dietary intake along with feces and urine collections allowed for N balance, a complementary assessment of protein homeostasis, to be calculated.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and experimental design*

This study was conducted in 2010 in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council on the Protection of Animals used for Scientific Purposes. The experimental protocol conformed to the 3R (replacement, reduction, refinement) rule.

Since APAP-induced metabolic alterations were expected to be dependent on dosage, two doses were chosen: 0.5% and 1% w/w of APAP in the diet. These doses were designed to be respectively around and largely above the saturation of APAP sulfation (23, 24). Therefore the contribution of the GSH-dependent detoxification pathway to total APAP detoxification was expected to be higher with the 1% APAP diet than with the 0.5% APAP diet (24, 25). This would allow to assess if APAP-induced metabolic alterations were quantitatively linked to sulfur losses for APAP detoxification purposes. Of note, as the maximum therapeutic daily dose is 4 g/d for humans and the mean dry food intake is 430 g/d in the French population (26), the maximum human dose of APAP corresponds to 0.9% of the dry food intake. Consistently, the 1% APAP diet has already been considered as corresponding to the maximum therapeutic dose for humans (15).

Before APAP treatment, male 4-month-old Wistar rats (Janvier Labs, Saint Berthevin, France), were acclimatized for 2 weeks in individual cages in standard conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 h light/dark cycle) with free access to water and standard

laboratory powder food (A04 from SAFE Scientific Animal Food and Engineering, Villemoisson-sur-orger, France). The composition of the diet was 16% proteins, 3% fat, 60% carbohydrates, 12% water, 4% fiber, 5% vitamins and minerals. The dietary methionine content was 25.5  $\mu\text{mol/g}$  and Cys 21.6  $\mu\text{mol/g}$ . During the treatment period, APAP (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) was mixed with the powdered A04 diet at 0, 0.5 and 1% on a weight basis.

Rats were randomly divided into three groups, housed in individual cages, and received 0% APAP ( $n = 6$ ; body weight  $465 \pm 10$  g), 0.5% APAP ( $n = 7$ ; body weight  $440 \pm 8$  g) or 1% APAP ( $n = 7$ ; body weight  $452 \pm 12$  g) diets. Body weights were not significantly different between groups. All groups were allowed free access to water and food during the 17-day treatment period. Similar treatment lengths had already been used in growing rats (15, 16). Body weight and food consumption were recorded 2 to 3 times a week. During the last 6 days of treatment (D12 to D17) the rats were moved into individual metabolic cages (E5MCENS906, Charles River, L'Arbresle, France) to allow for separation of feces from urine. Daily urine and feces recovered in respective collecting tubes on D15, D16 and D17 were pooled, weighed and stored at  $-80^\circ\text{C}$  before analysis. Prior to urine collection, 5 ml of 1 M hydrochloric acid were put into the collecting tube each morning. At the end of the experiment, all animals were euthanized under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, intraperitoneal injection) by aortic blood sampling. An aliquot of blood was frozen in liquid nitrogen. Plasma was separated by centrifugation at  $2000 \cdot g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  and immediately frozen in liquid nitrogen. Liver and small intestine (SI) were immediately removed, saline washed, weighed, and frozen in liquid nitrogen. Skeletal muscles: *gastrocnemius* (GM), *tibialis anterior* (TA), *soleus* (SOL) and *extensor digitorum longus* (EDL) were carefully dissected from the left posterior leg, weighed, and then GM was frozen in liquid nitrogen. All the samples frozen in liquid nitrogen were subsequently kept at  $-80^\circ\text{C}$  before analysis. The remains of each rat (*i.e.* carcass) were frozen and kept at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Frozen tissues were finely pulverized in liquid nitrogen using a ball mill (Danguoumeau, Prolabo, Paris, France) prior to analysis.

### *Nitrogen balance*

Nitrogen (N) was quantified in thawed urine and freeze-dried feces collected from D15 to D17 and powdered diets using the Kjeldahl method (Kjeldatherm block digestion system and Vapodest distillation system, Gerhardt, Les Essarts le Roi, France). N balance was calculated as: ingested N - (urinary N + fecal N) and expressed as mg per 3 days (mg/3d).

### *Glutathione content*

Total GSH (reduced plus oxidized) was quantified with a spectrophotometer using a standard enzymatic recycling procedure and 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (Ellman reagent) as oxidant as previously described (27). Total GSH was expressed as  $\mu\text{mol}$  per organ or muscle.

### *Protein content*

Protein concentration was quantified after NaOH digestion of powdered tissue using a bicinchoninic acid assay reagent kit, as previously described (28). Bovine serum albumin was used as standard. Total proteins were expressed as g or mg per organ or muscle. Total whole body proteins were calculated as the product of body weight and protein concentration of rat remains and expressed in g.



### Plasma biochemical analyses

Aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) activities were quantified in plasma using an ABX Pentra 400 analyzer (Horiba, Montpellier, France) and test kits A11A01629 and A11A01627 (Horiba), respectively.

Total non-protein cyst(e)ine (Cys plus cystine plus Cys bound to proteins and to small molecules through disulfide bridges) was measured with a colorimeter in plasma treated with dithiothreitol before deproteinization (29, 30). Free cyst(e)ine (Cys plus cystine plus Cys bound to small molecules) was quantified with the same method however dithiothreitol treatment was performed after protein precipitation. Then the ratio of free cyst(e)ine to total non-protein cyst(e)ine was calculated and expressed in percent.

### Quantification of urinary APAP metabolites

APAP and its metabolites were quantified in 3-day urine samples using an Agilent 1100 HPLC liquid chromatography system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to an API 2000 triple-quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA), as previously described (31). Quantification was performed using calibration curves with external standards. APAP and its sulfate conjugate (APAP-S) were obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France), APAP glucuronide (APAP-G) from Chemos GmBH (Regenstauf, Germany), N-acetylcysteine-paracetamol (APAP-NAC) and cysteine-paracetamol (APAP-Cys) from Toronto Research Chemical (Brisbane Road, Toronto, Canada). Absolute

quantities of urinary APAP and its metabolites were calculated as the product of their concentrations and the 3-day urine volume for each rat. They were expressed as  $\mu\text{mole}$  or  $\text{mmole}$  per 3 days ( $\mu\text{mol}/3\text{d}$  or  $\text{mmol}/3\text{d}$ , respectively).

### Statistical analysis

Results are presented as medians with standard errors of the median (S.E.) or as box plots. The Mann-Whitney U test was used to analyze differences between two groups. This non-parametric test was used since variances were not homogeneous for some of the variables ( $F$ -test,  $P > 0.05$ ) and the number of rats per group was 6 to 7. Statistical analyses were performed using the software R 3.0.2.  $P$  values  $< 0.05$  were considered significant. The Hodges Lehman estimator related to the Mann-Whitney U test (which estimates the difference between the medians of the two groups to be compared) was used to express all the percentages of increase or decrease in one group with respect to another (100 times the Hodges Lehman estimate divided by the median of the relative group (32)).

## RESULTS

### Food and APAP intakes

There were no significant differences in daily food intakes between the 0% APAP and 0.5% APAP groups throughout the treatment (Table 1). On D1-D2, food intake was 33% lower in the 1% APAP group than the 0% APAP group ( $P = 0.003$ ). This effect was transient since there were never any significant

Table 1. Dose response to chronic treatment with APAP on daily food intake (g/d) in adult rats.

APAP	0%		0.5%		1%	
	Median	S.E.	Median	S.E.	Median	S.E.
D1-D2	24.5	0.8	23.0	1.6	16.5* <sup>††</sup>	1.3
D3-D4	21.5	0.5	22.5	3.2	19.0	2.1
D5-D7	24.0	1.0	24.3	1.2	22.0 <sup>†</sup>	1.6
D8-D11	27.4	1.3	24.8	1.6	23.5	1.9
D12 <sup>‡</sup> -D14	25.2	1.4	24.7	0.8	23.3	2.4
D15-D17 <sup>§</sup>	24.5	1.4	23.7	0.8	24.3	1.5

\*  $P = 0.003$  vs. 0% APAP group, Mann-Whitney U test;

<sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>††</sup>  $P = 0.003$  vs. 0.5% APAP group, Mann-Whitney U test;

<sup>‡</sup> the rats were housed into metabolic cages from D12 to D17 to allow for separation of feces from urine;

<sup>§</sup> period of feces and urine collections.

Table 2. Dose responses to chronic treatment with APAP on body weight, organ, and skeletal muscle masses (g) in adult rats.

APAP	0%		0.5%		1%	
	Median	S.E.	Median	S.E.	Median	S.E.
Body weight	482	16	456*	14	419*	16
Liver	15.0	0.4	14.9	0.4	14.3	0.9
SI <sup>‡</sup>	8.29	0.18	7.37	0.48	7.40**	0.41
GM	3.04	0.07	2.89	0.10	2.70*	0.06
TA	0.833	0.060	0.785	0.037	0.790	0.064
EDL	0.228	0.014	0.209	0.012	0.203*	0.006
SOL	0.217	0.016	0.215	0.021	0.200	0.016
$\Sigma$ Muscles	4.30	0.16	4.04	0.17	3.88*	0.13

<sup>‡</sup> EDL, *extensor digitorum longus* muscle; GM, *gastrocnemius* muscle; TA, *tibialis anterior* muscle; SI, small intestine; SOL, *soleus* muscle;  $\Sigma$  muscles, sum of GM, TA, EDL and SOL masses.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.005$  vs. 0% APAP group, Mann-Whitney U test.

differences in food intakes between the 0% APAP and the 1% APAP groups from D3 to D17. During the N balance period (d15-d17), there were no significant differences in food intakes between the 3 groups. Total ingested APAP during the 17-day treatment was  $0, 2.0 \pm 0.1$  and  $3.7 \pm 0.3$  g in the 0% APAP, 0.5% APAP and 1% APAP groups, respectively.

#### Body weight, organs and skeletal muscles masses

Final body weights of the 0.5% APAP and 1% APAP groups were respectively 6% ( $P = 0.04$ ) and 12% ( $P=0.01$ ) lower than the 0% APAP group (Table 2). There was no significant difference in any of the organs and skeletal muscles studied between the 0% APAP and 0.5% APAP groups, neither between the 0.5% APAP and 1% APAP groups (Table 2). SI, GM, EDL masses and the sum of the four muscles studied were 13% ( $P=0.004$ ), 8% ( $P=0.02$ ), 13% ( $P=0.02$ ), and 8% ( $P<0.05$ ) lower in the 1% APAP group than the 0% APAP group.

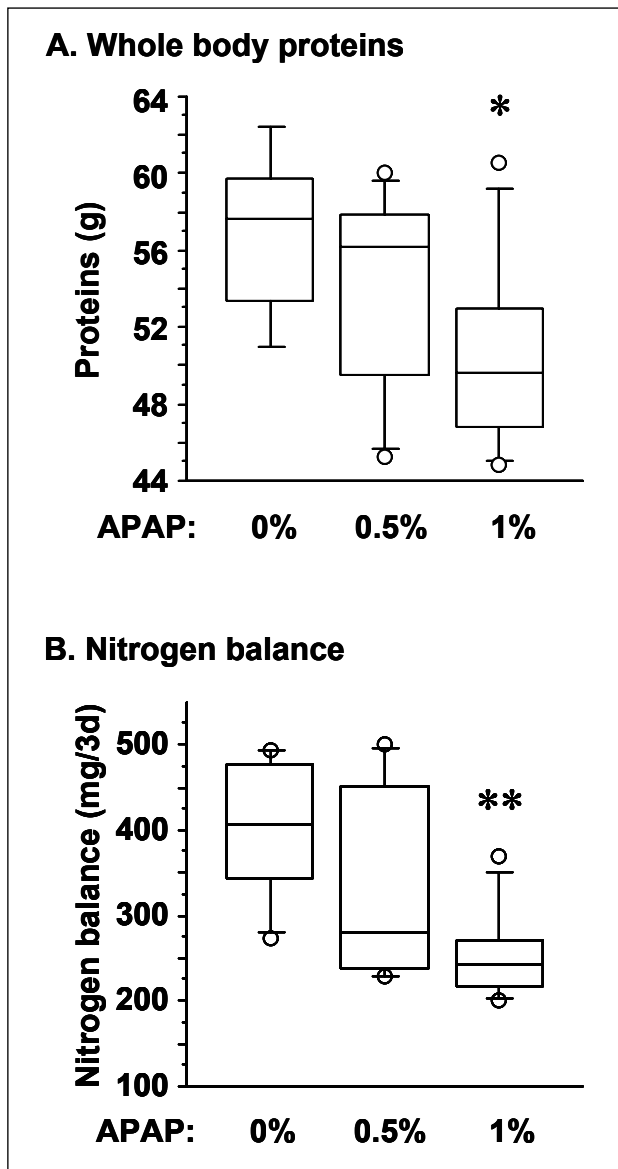


Fig. 1. Dose response to chronic treatment with APAP on the whole body proteins (A) and nitrogen balance (B) in adult rats. \*  $P=0.04$ , \*\*  $P=0.01$  vs. 0% APAP group, Mann-Whitney U test.

#### Body proteins and N balance

There was no significant difference in whole body proteins and N balance between the 0% APAP and 0.5% APAP groups (Fig. 1A and B). Whole body proteins and N balance were respectively 12% ( $P=0.04$ ) and 37% ( $P=0.01$ ) lower in the 1% APAP group than the 0% APAP group. During the 3-day N balance period rats ingested  $0, 2.35 \pm 0.07$  and  $4.83 \pm 0.30$  mmol of APAP in the 0% APAP, 0.5% APAP and 1% APAP groups, respectively. There was no significant difference in the amount of SAA ingested over the 3-day N balance period between the three groups ( $3.47 \pm 0.02$ ,  $3.35 \pm 0.11$ ,  $3.44 \pm 0.21$  mmol of SAA/3d in 0% APAP, 0.5% APAP and 1% APAP, respectively).

#### Total glutathione and protein contents in organs and muscles

There was no significant difference in the blood concentration of total GSH between the 0% APAP group ( $711 \pm 69$   $\mu$ M) and the 0.5% APAP group ( $747 \pm 75$   $\mu$ M). Blood GSH reached  $1169 \pm 95$   $\mu$ M in the 1% APAP group, being 71% ( $P=0.003$ ) and 59% ( $P=0.004$ ) higher than in the 0% APAP and 0.5% APAP groups, respectively. There was no significant difference in the total GSH and protein contents in liver, SI and GM between the 0% APAP and 0.5% APAP groups (Fig. 2). Liver, SI and GM GSH contents were 63% ( $P=0.003$ ), 19% ( $P=0.003$ ) and 26% ( $P=0.010$ ) lower in the 1% APAP group than the 0% APAP group, respectively. They were also 65% ( $P=0.002$ ), 12% ( $P=0.01$ ) and 12% ( $P=0.02$ ) lower in the 1% APAP group than the 0.5% APAP group, respectively. There was no significant difference in the liver, SI and GM proteins between the 0% APAP and 0.5% APAP groups (Fig. 2). SI and GM protein contents were 7% ( $P<0.05$  and  $P=0.03$ , respectively) lower in the 1% APAP group than the 0% APAP group. Liver protein content was 13% ( $P=0.01$ ) lower in the 1% APAP group than the 0.5% APAP group.

#### Urinary APAP metabolites

As expected neither APAP nor APAP metabolites were detected in the urine from the 0% APAP group. There was no significant difference in the urinary APAP-S amount between the 0.5% APAP and 1% APAP groups (Fig. 3). Urinary unmodified APAP, APAP-G, APAP-NAC and APAP-Cys were 158, 4404, 351 and 136% higher in the 1% APAP group than the 0.5% APAP group ( $P=0.002$ ). Total urinary recovery of APAP was  $2.27 \pm 0.13$  and  $4.38 \pm 0.45$  mmol/3d in the 0.5% APAP and 1% APAP groups, respectively. These recoveries represented  $98 \pm 7\%$  and  $92 \pm 2\%$  of the amount ingested in the 0.5% APAP and 1% APAP groups (see above), respectively. Percentages of APAP excreted as unmodified APAP, APAP-G, APAP-S and through the GSH-dependent pathway were 3, 2, 91 and 5 in the 0.5% APAP group and 6, 41, 43 and 11% in the 1% APAP group, respectively. There was no significant difference in the total urinary sulfur-containing APAP metabolites between the two groups ( $2.05 \pm 0.20$  and  $2.31 \pm 0.21$  mmol/3d in the 0.5% APAP and 1% APAP groups, respectively). The contribution of the GSH-dependent APAP metabolites (APAP-NAC plus APAP-Cys) to the total sulfur-containing APAP metabolites increased from  $5 \pm 1$  in the 0.5% APAP group to  $21 \pm 1\%$  in the 1% APAP group.

#### Plasma transaminase activities and cyst(e)ine concentration

There was no significant difference in the AST and ALT activities between the three groups, except that ALT was slightly higher in the 0.5% APAP group than the 0% APAP group ( $+31\%$ ;  $P=0.02$ , Table 3).

Total cyst(e)ine and free cyst(e)ine were 16% ( $P=0.01$ ) higher in the 0.5% APAP group than the 0% APAP group as the

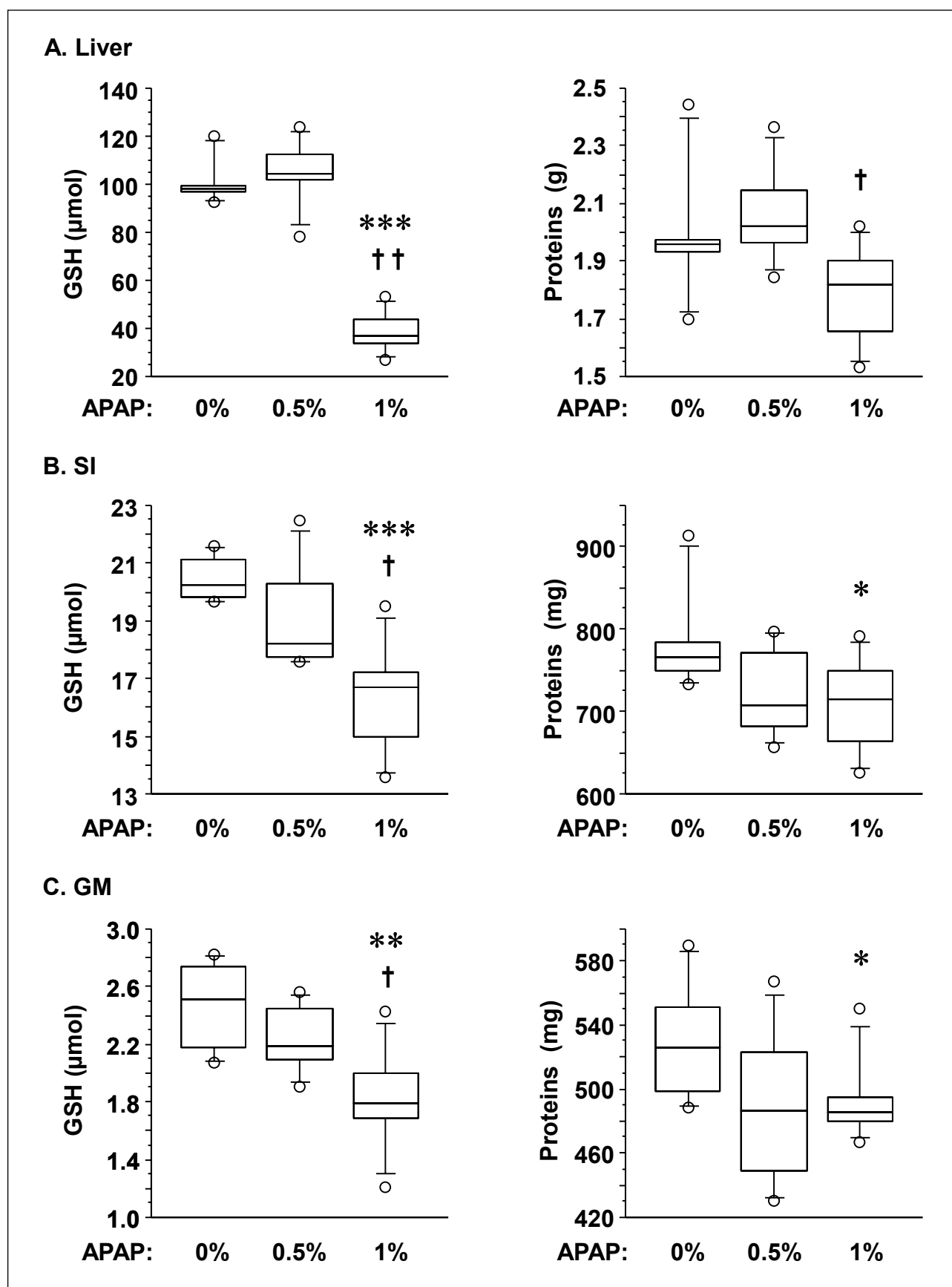


Fig. 2. Dose response to chronic treatment with APAP on total GSH and protein contents in liver (A), SI (B) and GM (C) from adult rats. SI, small intestine; GM, *gastrocnemius* muscle.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P = 0.01$ , \*\*\*  $P = 0.003$  vs. 0% APAP group, Mann-Whitney U test.

†  $P < 0.02$ , ††  $P = 0.002$  vs. 0.5% APAP group, Mann-Whitney U test.

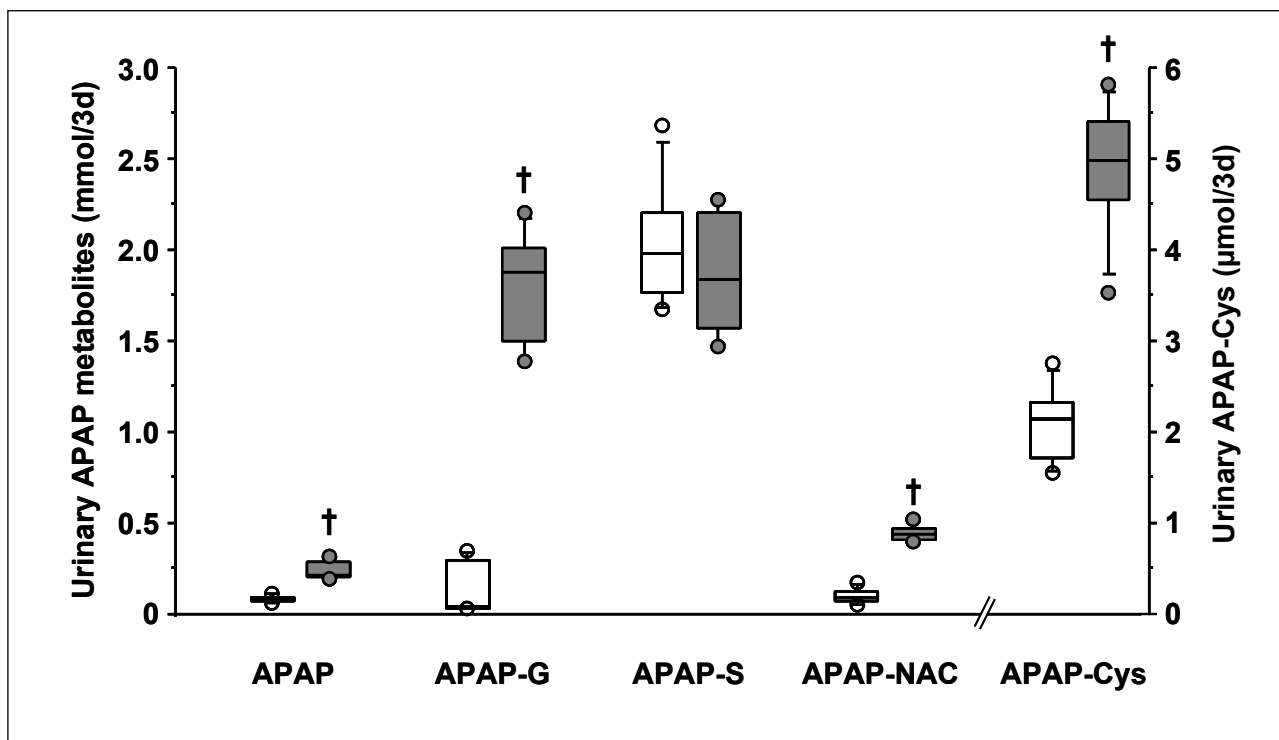


Fig. 3. Dose response to chronic treatment with APAP on 3-day urinary recovery of APAP and its metabolites in adult rats (□ 0.5% APAP, ■ 1% APAP). APAP, APAP-S, APAP-G and APAP-NAC are expressed in mmol/3d (left axis). APAP-Cys is expressed in µmol/3d (right axis). APAP-G, paracetamol-glucuronide; APAP-S, paracetamol-sulfate; APAP-NAC, paracetamol-N-acetyl-cysteine APAP-Cys, paracetamol-cysteine.

† P=0.002 vs. 0.5% APAP group, Mann-Whitney U test.

Table 3. Dose response to chronic treatment with APAP on transaminase activities and cyst(e)ine concentrations in plasma of adult rats.

APAP	0%		0.5%		1%	
	Median	S.E.	Median	S.E.	Median	S.E.
ALT <sup>‡</sup> (IU/L)	44	7	59*	3	49	5
AST (IU/L)	69	17	85	13	70	10
Total cyst(e)ine (µM)	155	4	182*	7	145 <sup>††</sup>	12
Free cyst(e)ine (µM)	98	3	113*	2	74 <sup>**††</sup>	4
Free cyst(e)ine (%)	62	5	63	3	49 <sup>*†</sup>	4

<sup>‡</sup> ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; IU, international unit;

\* P<0.03, \*\* P=0.003 vs. 0% APAP group, Mann-Whitney U test;

† P<0.04, †† P<0.01 vs. 0.5% APAP group, Mann-Whitney U test.

percentage of free cyst(e)ine was unchanged (Table 3). Absolute and percent of free cyst(e)ine were respectively 33% (P=0.003) and 27% (P=0.02) lower in the 1% APAP than the 0% APAP group. Total cyst(e)ine, absolute and percent of free cyst(e)ine were 21% (P=0.007), 37% (P=0.003) and 25% (P=0.03) lower in the 1% APAP group than the 0.5% APAP group, respectively.

## DISCUSSION

This study provides new data regarding the effect of APAP treatment on peripheral tissues, especially skeletal muscle. Alterations in tissue protein and GSH contents were analyzed

in regards to the quantitative irreversible loss of Cys induced by chronic treatment with APAP in adult rats. The main result is that the highest studied dose, *i.e.* 1% APAP in the diet, which is indeed above the saturation of APAP sulfation (see below), induced muscle wasting. To our knowledge, no such effect has been previously quantified in any physiological state. In adult rats, muscle wasting was ascertained by decreases in skeletal muscle mass and protein content, and N balance in the 1% APAP group compared to the 0% APAP group. Muscle wasting occurred in the absence of hepatotoxicity as the low increase in ALT is definitively below the threshold levels usually considered for hepatotoxicity, *i.e.* 3 · control values of AST and ALT (33).

It is clear that muscle wasting induced by 1% APAP treatment did not result from an increase in total urinary excretion of sulfur-containing APAP metabolites, but was concomitant with the activation of the GSH-dependent detoxification pathway in the liver. It is important to stress that the origin of the urinary sulfur loss differed between the two APAP groups. APAP sulfation, which is a high affinity low-capacity reaction (34) known to be maximum at the dose of 1–2 mmol of APAP/kg of body weight (23, 24), was already the maximum in the 0.5% APAP group. Indeed, APAP-S did not differ between the two groups as the daily intake was 1.7 and 3.4 mmol of APAP/kg of body weight in the 0.5% APAP and 1% APAP groups, respectively. In the 1% APAP group, sulfation saturation induced a large increase, not only in APAP-G, but also in APAP-NAC and APAP-Cys, the two endproducts of the GSH-dependent detoxification pathway. A therapeutic dose of APAP has been shown to stimulate the turnover of hepatic GSH *in vivo* (35). Along the same lines, the activity of  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase, the limiting step in the GSH synthesis pathway, increased in liver-derived cells exposed to APAP (36). In the 1% APAP group, the use of Cys for GSH synthesis (then irreversibly lost in urine) probably increased and occurred at the expense of the synthesis of liver proteins. Such an effect has already been reported in the liver of APAP-treated mice (16). Therefore, a decrease in liver protein synthesis was probably the major mechanism by which the liver protein content decreased in the 1% APAP group. The decrease in the liver GSH content, a well-known effect of APAP (12), resulted from the fact that liver synthesis of GSH, in spite of its probable increase, was not sufficient to compensate for its total uses.

Liver GSH plays an important role in the inter-organ homeostasis of GSH and cyst(e)ine (21). About half of the SAA taken up by the liver is used for synthesis of GSH for export into plasma in rats (37). This continuous release of hepatic GSH into plasma and its extrahepatic hydrolysis (interorgan  $\gamma$ -glutamyl cycle) is an important mechanism for maintaining steady Cys availability in peripheral tissues (21, 38, 39). The large decrease in liver GSH observed in the 1% APAP group would have compromised its export and therefore the Cys availability for peripheral tissues. Concomitantly, the decrease in plasma free cyst(e)ine concentration, consecutive to its enhanced utilization in the liver from detoxification purposes, would have worsened peripheral Cys availability. Peripheral shortage of Cys would have limited both GSH and protein synthesis leading to the low muscle GSH and protein contents observed in muscle from the 1% APAP group.

Erythrocytes exhibit a much higher GSH concentration than plasma and seem to lack any cystine and GSH transport mechanism taking up only Cys (reduced form) for their needs (21). The mechanism by which blood GSH increased in the 1% APAP group could be an activation of either Cys (reduced form) uptake or intracellular GSH synthesis. Whatever the mechanism, a similar increase in blood GSH, along with a decrease in liver GSH, have been reported in rats fed a SAA-deficient diet (40). Blood GSH increase would therefore reinforce SAA deficiency for peripheral tissues.

At whole body level Cys is a conditional indispensable amino acid, *i.e.* it has to be present in the diet when its endogenous synthesis from methionine and serine cannot cover the metabolic demand. Cys may be indispensable for tissues exhibiting low or null activities for enzymes required for the synthesis of Cys from homocysteine, namely cystathionine synthase and cystathionase (41). To date mRNA of these enzymes were not detected in rat or human skeletal muscle (42–44) and the activity of cystathionase appeared dramatically low in rat muscle (44). Endogenous synthesis of Cys would be null or negligible in muscle. In this study, where SAA intake was not

significantly modified during APAP treatment, the increased utilization of Cys for APAP detoxification in the liver decreased the availability of Cys for peripheral tissues, as discussed above. Considering simultaneous availabilities of all the amino acids needed for protein synthesis, Cys deficiency may have limited protein synthesis in muscle, leading to an increase in the oxidation of the other amino acids, and therefore worsening of the N balance. The relevance of such a mechanism could be tested by supplementing the 1% APAP diet with Cys.

Other mechanisms could also have been involved in APAP-induced muscle wasting. Muscle homeostasis is known to depend on the equilibrium between protein synthesis and proteolysis and the equilibrium between regeneration and apoptosis. These processes are highly regulated through various signalling pathways (45, 46). Some of these pathways are sensitive to oxidative stress (47–50). Decreases in muscle GSH, the major intra-cellular anti-oxidant, and plasma free cyst(e)ine in the 1% APAP group are in favour of a pro-oxidative environment. Therefore, it is conceivable that part of the APAP-induced muscle wasting resulted from oxidative stress-driven alterations in protein turnover and/or muscle fibre renewal. The relevance of an oxidative stress-mediated mechanism for APAP-induced muscle wasting could be tested with any dietary supplementation aimed reducing oxidative stress. Indeed polyphenols, exhibiting anti-oxidants properties, have already been shown to decrease APAP-induced hepatotoxicity (51–53). In addition to anti-oxidants, new hepato-protective compounds, such as the pentadecapeptide BPC 157 (54), could also be tested.

The effect of the 1% APAP diet on body weight is consistent with the work performed in young growing rats fed with a diet containing 1% of APAP (15). The fact that a chronic treatment with APAP did not affect body weight in a more recent study (55) could be due to experimental differences with respect to age of rats, APAP dosage and length of study. Moreover, in that study APAP was administered by gavage, leading to absorption of APAP only at a specific time of the day and not spread throughout the day as in this study.

As usual, extrapolation of rat results to humans should be carried out with caution. Firstly, the 1% APAP diet is close to the maximum dose used daily in humans (4 g/d) and has already been considered as corresponding to the maximum therapeutic dose for humans (see Material and Methods). Nevertheless, interspecies comparisons of doses should take into account body surface area using adequate formulas (56, 57). According to these conversion formulas, the APAP dose consumed by the 1% APAP group was 1.5- to 1.7-fold the maximum dose used daily in humans. Secondly, recent works evaluated the influence of acute or chronic treatment with APAP on exercised skeletal muscle. In the acute study, the 24 h-postexercise-induced increase in the fractional rate of protein synthesis of exercised muscle was blunted by APAP treatment (4 g/d) in young adults (58). The authors suggested that APAP inhibited the anabolic effect of exercise. The chronic study was performed in overweight older adults subjected to resistance exercise (3 times a week) and treated with APAP (4 g/d) for 12 weeks, a significantly longer period than this study. Unexpectedly, APAP treatment potentiated the exercise-induced increase in the volume of exercised muscle (*quadriceps femoris* muscle) and maintained muscle protein concentration (*vastus lateralis* muscle) (59). This anabolic effect of APAP, mediated through prostaglandin-dependent mechanisms related to protein synthesis and protein degradation (60), was limited to exercised muscle since non-exercised muscles (*semimembranosus*, *semitendinosus*, and *biceps femoris* muscles) were unaffected by APAP treatment (59). The occurrence of APAP-induced anabolic effect in exercised muscle suggests that all amino acids were available for muscle. Unfortunately the dietary intake of these

older adults was not reported. It has already been shown that older adults increased their protein intake when under chronic treatment with APAP (61). As already discussed in that paper, APAP-treated persons at high risk of muscle wasting are likely to be those exhibiting a low protein intake.

In conclusion, in adult rats, sulfur loss through urinary APAP metabolites was independent of the treatment dose, however, the contribution of the GSH-dependent detoxification pathway to this sulfur loss dramatically increased with the 1% APAP treatment (21 vs. 5%). The extra-utilization of Cys induced by chronic treatment with 1% APAP affected protein and GSH contents in the studied tissues. This dose induced muscle wasting. Several mechanisms could contribute to the APAP-induced muscle wasting. The major one could be insufficient bioavailability of Cys for muscle maintenance due to APAP detoxification in the liver. Decrease of muscle GSH could also generate a pro-oxidative environment, a factor known to potentially contribute to muscle wasting. It would be worthwhile to test whether muscle wasting and the other metabolic alterations observed with the 1% APAP diet could be reversed by increasing dietary SAA. This study suggests that peripheral bioavailability of Cys and muscle GSH are potential important players in the control of muscle mass in chronic treatment with APAP, an analgesic medication of widespread use, especially in the elderly.

*Abbreviations:* APAP, paracetamol (acetaminophen, N-acetyl-para-aminophenol, 4-hydroxy-acetanilide); APAP-S, APAP-sulfate; APAP-G, APAP-glucuronide; APAP-NAC, APAP-N-acetylcysteine; APAP-Cys, APAP-cysteine; Cys, cysteine; EDL, *extensor digitorum longus*; GM, *gastrocnemius*; GSH, glutathione; N, nitrogen; NAPQI: N-acetyl-p-benzoquinone imine, SAA: sulfur amino acid; SI, small intestine; SOL, *soleus*; TA, *tibialis anterior*.

*Acknowledgments:* The authors would like to acknowledge Philippe Lhoste and Philippe Denis from the Installation Experimentale de Nutrition for animal care, Françoise Glomot and Fabienne Rambourdin for the biochemical analyses and Melanie Petera for her help in the statistical analyses. This work was supported by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France.

Conflicts of interest: None declared.

## REFERENCES

- Obled C, Papet I, Breuille D. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 189-197.
- Wolfe RR. Optimal nutrition, exercise, and hormonal therapy promote muscle anabolism in the elderly. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 176-180.
- Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 889-896.
- Evans WJ, Paolisso G, Abbatecola AM, et al. Frailty and muscle metabolism dysregulation in the elderly. *Biogerontology* 2010; 11: 527-36.
- Fearon K, Evans WJ, Anker SD. Myopenia-a new universal term for muscle wasting. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2011; 2: 1-3.
- Englesbe MJ, Patel SP, He K, et al. Sarcopenia and mortality after liver transplantation. *J Am Coll Surg* 2010; 211: 271-278.
- Klotz U. Paracetamol (acetaminophen) - a popular and widely used nonopioid analgesic. *Arzneimittelforschung* 2012; 62: 355-359.
- Abdulla A, Adams N, Bone M, et al. Guidance on the management of pain in older people. *Age Ageing* 2013; 42 (Suppl. 1): I1-I57.
- Analyse des ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France 1999-2009. Rapport d'Expertise de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) 2011.
- Analyse des ventes de médicaments en France en 2011. Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM). 2012.
- Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States - The Slone survey. *JAMA* 2002; 287: 337-344.
- Forrest JAH, Clements JA, Prescott LF. Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clin Pharmacokinet* 1982; 7: 93-107.
- Hodgman MJ, Garrard AR. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin* 2012; 28: 499-516.
- Courtney-Martin G, Ball RO, Pencharz PB. Sulfur amino acid metabolism and requirements. *Nutr Rev* 2012; 70: 170-175.
- McLean AE, Armstrong GR, Beales D. Effect of D-methionine or L-methionine and cysteine on the growth inhibitory effects of feeding 1-percent paracetamol to rats. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 347-352.
- Reicks M, Hathcock JN. Prolonged acetaminophen ingestion in mice - effects on the availability of methionine for metabolic functions. *J Nutr* 1989; 119: 1042-1049.
- Varela-Moreiras G, Ruiz-Roso B, Varela G. Effects of long-term administration of acetaminophen on the nutritional utilization of dietary protein. *Ann Nutr Metab* 1991; 35: 303-308.
- Remond D, Buffiere C, Pouyet C, et al. Cysteine fluxes across the portal-drained viscera of enterally fed minipigs: effect of an acute intestinal inflammation. *Amino Acids* 2011; 40: 543-552.
- Bauchart-Thevret C, Cottrell J, Stoll B, Burrin DG. First-pass splanchnic metabolism of dietary cysteine in weanling pigs. *J Anim Sci* 2011; 89: 4093-4099.
- Cho ES, Johnson N, Snider BC. Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during cystine depletion in growing rats. *J Nutr* 1984; 114: 1853-1862.
- Ookhtens M, Kaplowitz N. Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* 1998; 18: 313-329.
- Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 42-59.
- Liu L, Klaassen CD. Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 139: 128-134.
- Klaassen CD, Boles JW. Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J* 1997; 11: 404-418.
- Ben-Shachar R, Chen Y, Luo S, Hartman C, Reed M, Nijhout HF. The biochemistry of acetaminophen hepatotoxicity and rescue: a mathematical model. *Theor Biol Med Model* 2012; 9: 55. doi: 10.1186/742-4682-9-55.
- Dubuisson C, Lioret S, Touvier M, et al. Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys. *Br J Nutr* 2010; 103: 1035-1048.
- Malmezat T, Breuille D, Pouyet C, Mirand PP, Obléd C. Metabolism of cysteine is modified during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr* 1998; 128: 97-105.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76-85.

29. Gaitonde MK. A spectrometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem J* 1967; 104: 627-633.
30. Malloy MH, Rassin DK, Gaull GE. A method for measurement of free and bound plasma cyst(e)ine. *Anal Biochem* 1981; 113: 407-415.
31. Pickering G, Schneider E, Papet I, et al. Acetaminophen metabolism after major surgery: a greater challenge with increasing age. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90: 707-711.
32. Hodges JL, Lehmann EL. Estimation of location based on ranks. *Ann Math Statist* 1963; 34: 598-611.
33. Temple R. Hy's law: predicting serious hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2006; 15: 241-243.
34. Moldeus P. Paracetamol metabolism and toxicity in isolated hepatocytes from rat and mice. *Biochem Pharmacol* 1978; 27: 2859-2863.
35. Lauterburg BH, Mitchell JR. Therapeutic doses of acetaminophen stimulate the turnover of cysteine and glutathione in man. *J Hepatol* 1987; 4: 206-211.
36. Geenen S, du Preez FB, Snoep JL, et al. Glutathione metabolism modeling: a mechanism for liver drug-robustness and a new biomarker strategy. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 4943-4959.
37. Garcia RA, Stipanuk MH. The splanchnic organs, liver and kidney have unique roles in the metabolism of sulfur amino acids and their metabolites in rats. *J Nutr* 1992; 122: 1693-1701.
38. Griffith OW, Meister A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5606-5610.
39. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 922-935.
40. Richie JP, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N, Zimmerman JA. Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J* 1994; 8: 1302-1307.
41. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1: 228-237.
42. Chasse JF, Paly E, Paris D, et al. Genomic organization of the human cystathionine beta-synthase gene: evidence for various cDNAs. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 211: 826-832.
43. Bao LM, Vlcek C, Paces V, Kraus JP. Identification and tissue distribution of human cystathionine beta-synthase mRNA isoforms. *Arch Biochem Biophys* 1998; 350: 95-103.
44. Ishii I, Akahoshi N, Yu XN, et al. Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J* 2004; 381: 113-123.
45. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2014; 49: 59-68.
46. Sanchez AM, Candau RB, Bernardi H. FoxO transcription factors: their roles in the maintenance of skeletal muscle homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2014; 71: 1657-1671.
47. Bonetto A, Penna F, Muscaritoli M, et al. Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 906-916.
48. Musaro A, Fulle S, Fano G. Oxidative stress and muscle homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 236-242.
49. Circu ML, Aw TY. Glutathione and modulation of cell apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1823: 1767-1777.
50. Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 1509-1526.
51. Kupeli E, Orhan DD, Yesilada E. Effect of *Cistus laurifolius* L. leaf extracts and flavonoids on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Ethnopharmacol* 2006; 103: 455-460.
52. Lee CH, Kuo CY, Wang CJ, et al. A polyphenol extract of *Hibiscus sabdariffa* L. ameliorates acetaminophen-induced hepatic steatosis by attenuating the mitochondrial dysfunction in vivo and in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76: 646-651.
53. Ji L, Jiang P, Lu B, Sheng Y, Wang X, Wang Z. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 1911-1919.
54. Ilic S, Drmic D, Zarkovic K, et al. High hepatotoxic dose of paracetamol produces generalized convulsions and brain damage in rats. A counteraction with the stable gastric pentadecapeptide BPC 157 (PL 14736). *J Physiol Pharmacol* 2010; 61: 241-250.
55. Carroll CC, Whitt JA, Peterson A, Gump BS, Tedeschi J, Broderick TL. Influence of acetaminophen consumption and exercise on Achilles tendon structural properties in male Wistar rats. *Am J Physiol* 2012; 302: R990-R995.
56. Shin JW, Seol IC. Interpretation of animal dose and human equivalent dose for drug development. *J Korean Orient Med* 2010; 31: 1-7.
57. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research CDER, 2005. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf>
58. Trappe TA, White F, Lambert CP, Cesar D, Hellerstein M, Evans WJ. Effect of ibuprofen and acetaminophen on postexercise muscle protein synthesis. *Am J Physiol* 2002; 282: E551-E556.
59. Trappe TA, Carroll CC, Dickinson JM, et al. Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol* 2011; 300: R655-R662.
60. Trappe TA, Liu SZ. Effects of prostaglandins and COX-inhibiting drugs on skeletal muscle adaptations to exercise. *J Appl Physiol* 2013; 115: 909-919.
61. Pujos-Guillot E, Pickering G, Lyan B, et al. Therapeutic paracetamol treatment in older persons induces dietary and metabolic adaptations related to sulfur amino acids. *Age* 2012; 34: 181-193.

Received: March 19, 2014  
Accepted: August 18, 2014

Author's address: Dr. Isabelle Papet, Unite de Nutrition Humaine, INRA Theix, 63122 Saint-Genes-Champanelle, France.  
E-mail: Isabelle.Papet@clermont.inra.fr.



## PUBLICATION N°2

**Introduction & objectif :** La formation d'adduits protéiques de paracétamol suite à une dose toxique a été bien décrite dans la littérature. Ces adduits se forment lorsque le NAPQI, produit par la phase I de détoxification du paracétamol, se lie au groupement thiol d'un résidu Cys d'une protéine, plutôt qu'à celui du GSH. Peu de travaux se sont portés sur la détection de ces adduits à dose thérapeutique. Ils ont cependant permis de les mettre en évidence en faible proportion suite à une dose unique. Des résidus protéiques oxydés peuvent être également détectés à dose thérapeutique en prise aigue. La présente étude a été réalisée sur des rats adultes traités à 0,5% ou 1% de paracétamol dans le régime (*Expérience 1*) durant 17 jours. L'objectif était de quantifier la formation des adduits et l'apparition d'oxydation des protéines suite à une prise chronique de paracétamol. Le but était de disposer d'un outil permettant d'évaluer les altérations des protéines hépatiques, ceci permettant par la suite de mettre en lien l'apparition de ces altérations avec l'altération de la masse musculaire.

**Méthodes :** Les travaux ont été réalisés sur les foies des rats adultes traités (*expérience 1*) et les témoins. La préparation des échantillons est basée sur la technique préalablement publiée par Muldrew et al., (2002) avec quelques modifications. La validation de la méthode est présentée. Deux types d'approche ont été utilisés : une approche de métabolomique ciblée afin de quantifier les adduits du paracétamol aux protéines et une approche ouverte visant à identifier les molécules discriminantes, en particulier les acides aminés soufrés oxydés, supposés être plus sensibles au stress oxydant induit par le paracétamol.

**Principaux résultats :** Les deux méthodes utilisées ont été validées et ont permis de détecter de faibles niveaux d'adduits et d'oxydation protéique. Les adduits paracétamol sont détectés dès la plus faible dose (0,5% du régime, soit un équivalent de 2g/j chez l'homme) alors que le GSH hépatique n'est pas déplété. La quantité d'adduits augmente avec la plus forte dose qui engendre une déplétion du GSH hépatique. La métabolomique ouverte montre une baisse des molécules soufrées fixées sur les protéines et une hausse des résidus oxydés comme l'hydroxy-tryptophane, avec la dose à 1%.

**Conclusion** : Bien que le traitement chronique n'ait conduit à aucune hépatotoxicité (mesure des transaminases hépatiques), quelle que soit la dose, les adduits paracétamol ont été détectés. En revanche, les autres modifications des protéines hépatiques surviennent principalement à la dose de 1%. Ces résultats montrent que même une dose faible, équivalente à 2 g/j chez l'homme conduit à des modifications des protéines au niveau hépatique. Sur le long terme, ces modifications pourraient avoir des répercussions sur le métabolisme protéique hépatique.

**Assessment of protein modifications in liver of rats under chronic treatment with paracetamol (acetaminophen) using two complementary mass spectrometry-based metabolomic approaches**

*Carole Mast<sup>a,b</sup>, Bernard Lyan<sup>c</sup>, Charlotte Joly<sup>c</sup>, Delphine Centeno<sup>c</sup>, Franck Giacomoni<sup>c</sup>, Jean-François Martin<sup>c</sup>, Laurent Mosoni<sup>a,b</sup>, Dominique Dardevet<sup>a,b</sup>, Estelle Pujos-Guillof, Isabelle Papet<sup>a,b,\*</sup>*

*<sup>a</sup>Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-Clermont-Ferrand, France*

*<sup>b</sup>INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

*<sup>c</sup>Plateforme d'Exploration du Métabolisme, INRA, Centre Clermont-Ferrand - Theix, UMR 1019 Nutrition Humaine, Saint-Genès-Champanelle, France*

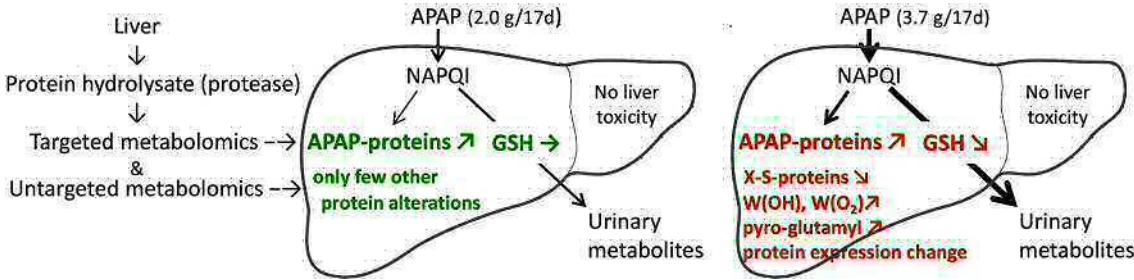
\*Corresponding author: I Papet, Unité de Nutrition Humaine, INRA Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France. Telephone +33 4 73 62 42 01. Fax +33 4 73 62 47 55 email:

[Isabelle.Papet@clermont.inra.fr](mailto:Isabelle.Papet@clermont.inra.fr).

## **Highlights**

- APAP-protein adducts were quantified by a targeted metabolomics method
- Untargeted metabolomics can be used to assess a wide range of protein modifications
- APAP-protein adducts occurred without glutathione depletion and hepatotoxicity
- Many other post-translational modifications occurred when glutathione was very low

Graphical abstract



## ABSTRACT

Liver protein can be altered under paracetamol (APAP) treatment. APAP-protein adducts and other protein modifications (oxidation/nitration, expression) play a role in hepatotoxicity induced by acute overdoses, but it is unknown whether liver protein modifications occur during long term treatment with non-toxic doses of APAP. We quantified APAP-protein adducts and assessed other protein modifications in the liver from rats under chronic (17d) treatment with two APAP doses (0.5% or 1% of APAP in the diet w/w). A targeted metabolomic method was validated and used to quantify APAP-protein adducts as APAP-cysteine adducts following proteolytic hydrolysis. Its limit of detection was found to be 7 ng APAP-cysteine/mL hydrolysate i.e. an APAP-Cys to tyrosine ratio of 0.016 %. Other protein modifications were assessed on the same protein hydrolysate by untargeted metabolomics including a new strategy to process the data and identify discriminant molecules. These two complementary mass spectrometry (MS)-based metabolic approaches allowed assessing a wide range of protein modifications induced by chronic treatment with APAP.

### **Biological significance**

APAP-protein adducts were detected even in the absence of glutathione depletion and hepatotoxicity, i.e. in the 0.5% APAP group, and increased by 218 % in the 1% APAP group compared to the 0.5% APAP group. At the same time, the untargeted metabolomics method revealed a decrease in the binding of cysteine, cysteinyl-glycine and GSH to thiol groups of protein cysteine residues, an increase in the oxidation of tryptophan and proline residues and a modification in protein expression. This wide range of modifications in liver proteins occurred in rats under chronic treatment with APAP that did not induce hepatotoxicity.

**Keywords** Chronic treatment · mass spectrometry · metabolomics · paracetamol · post-translational modification · oxidized residue

## 1. Introduction

Paracetamol also called acetaminophen or 4-hydroxy-acetanilide or N-acetyl-para-aminophenol (APAP) is the most widely used drug for treating low to moderate pain around the world [1]. APAP is eliminated progressively from the body with an half-life of 2 h [2], and its metabolism occurs within the liver to generate molecular forms that are excreted in the urine (for a review see [3]). Briefly, APAP metabolism consists mainly in phase II detoxification (up to 90%) by direct conjugation with sulfate (sulfation pathway) or glucuronide. In phase I, APAP is converted by cytochrome P450 into the strong oxidizer *N*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI), the toxic APAP's metabolite. NAPQI formation dramatically increases when the sulfation pathway is saturated. NAPQI binds to thiol group of cysteine (Cys) residues from glutathione (GSH) or from proteins, forming APAP-GSH and APAP-protein adducts [4,5]. APAP-GSH is rapidly converted to Cys and mercapturate conjugates and excreted into urine[6]. Thus, NAPQI formation leads to decreased hepatic GSH [7] and protein thiols [8]. The extent of these alterations should depend on APAP dose and treatment length. Significant decrease in liver GSH content leads to oxidative stress [9]. The loss of protein thiols has been reported to be much higher than the loss expected from covalent binding of APAP to liver proteins, at least in one study [8]; suggesting an additional oxidation of Cys residue. Moreover, the formation of mitochondrial APAP-protein adducts has been related to the development of acute hepatotoxicity. Indeed, these adducts induce mitochondrial peroxynitrite formation and mitochondrial permeability transition[10][10][10][10][10] [10], which amplifies the oxidative stress [11,12]. In an ultimate state, the APAP-induced oxidative stress will conduct to nitration of tyrosine [13-16] and tryptophan [17] residues of liver proteins, and leads eventually to necrotic cell death [12,18,19]. However, the physiological relevance of these adverse effects of APAP



metabolism in chronic therapeutic treatments remains to be evaluated as most of the literature concerning APAP-induced protein alterations is based from single administrations of hepatotoxic doses of APAP (for reviews see [20,21]). APAP-protein adducts could accumulate over time since they are more persistent than APAP metabolites. APAP-protein adduct half-life was evaluated at 1-2 days in human plasma after acute overdoses of APAP [22,23] but is still unknown in liver. To our knowledge, APAP-protein adducts and other protein modifications have never been deeply investigated in the liver after chronic treatments with non-toxic doses of APAP.

The aim of the present study was to quantify APAP-protein adducts in the liver from rats under chronic treatment with APAP and to analyze a wide range of the other APAP-inducible protein modifications. Two complementary mass spectrometry (MS)-based metabolomic analyses were performed on the same protein hydrolysate obtained by enzymatic digestion. The first metabolomic method consisted in a targeted quantification of APAP-Cys using liquid chromatography (LC) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer. The second untargeted metabolomic analysis was performed with an Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) coupled to a high resolution mass spectrometer aimed to assess a wide range of protein alterations. The originality of this untargeted method resides in the strategy used to process the data and identify the discriminant molecules among modified amino acids and peptides contained in protein hydrolysates. An *in silico* database was built up with all theoretical possible di- and tri-peptides including all oxidized forms of methionine and Cys. Indeed, these residues are known to be particularly sensitive to oxidative stress [24-26] and thiol proteins were expected to be affected by chronic treatment with APAP [8].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Methanol, acetonitrile and L-tyrosine were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), ultrapure water (18.2 MΩ) from Millipore (Molsheim, France) and formic acid from Fluka (Saint Quentin Fallavier, France). The chemicals used were of analytical grade. APAP-Cys (3-(cystein-S-yl)acetaminophen) was purchased from Toronto Research Chemical (Brisbane Road, Toronto, Canada).

Leucine-enkephaline (Sigma-Aldrich) was used as reference for mass measurements.

Standard quality control (SQC) samples for untargeted metabolomics were prepared at a concentration of 10 µg/mL in water/acetonitrile (50/50, v/v) containing 0.1% formic acid. They are a mixture of L-tryptophan, L-phenylalanine, creatinine, colchicine, 2-aminoanthracene (96%) (Sigma-Aldrich).

### 2.2. Animal experiment

Animal experiment was conducted in agreement with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals used for Scientific Purposes. The protocol complied with the 3R (Replacement, Reduction, Refinement) rule and has already been described in Mast et al. (2014).

Briefly, male 4-month-old Wistar rats (450 g, Janvier Labs, Saint Berthevin, France) were randomly divided into three groups and housed in individual cages with standard conditions (22 ± 1°C, 12h light/dark cycle). The control group (0% APAP, n = 6) received a powdered

standard laboratory food (A04 from SAFE, Villemoisson-sur-Orge, France) and two groups received APAP at the dose of either 0.5% w/w (0.5% APAP group, n = 7) or 1% w/w (1% APAP, n=7) in the standard diet during 17 days. At the end of the experiment, all animals were euthanized under pentobarbital anaesthesia (50 mg/kg, injected intra peritoneally) by aortic blood withdrawal. Liver was immediately removed, washed with saline, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analyses.

The two selected APAP doses (0.5% and 1%) were designed to be non-hepatotoxic, and respectively around or largely above the saturation threshold of APAP sulfation [27,28]. The cumulative APAP ingestion of  $2.0 \pm 0.1$  and  $3.7 \pm 0.3$  g/17 d in 0.5% APAP group and 1% APAP group respectively was not hepatotoxic according to plasma transaminase activities [29]. As expected, the GSH-dependent detoxication pathway was highly activated in 1% APAP group and liver GSH content was strongly depleted in the 1% APAP group but unchanged in the 0.5% APAP group compared to the control group. Liver samples from this study were suitable to study APAP-induced protein alterations in the liver under chronic treatment that was not hepatotoxic.

### 2.3. Biological sample preparation for metabolomic analysis

#### *2.3.1. Sample preparation*

Frozen liver were powdered in liquid nitrogen in a ball mill (Danguomeau, Prolabo, Paris, France). Aliquots of frozen liver powders (150 mg) were homogenized in 1.2 ml of 10 mM sodium acetate, pH 6.5, and then sonicated for 10 s. Liver homogenates were centrifuged 10 min at 16 000 x g and the resulting supernatants were dialyzed (3,500 kDa molecular mass cut-off, Slide-A-Lyzer Dialysis cassette, Thermo Scientific, Courtaboeuf, France) against 4 L

of 10 mM sodium acetate buffer, pH 6.5, in order to eliminate APAP-Cys, amino acids and peptides. Dialysis buffer was replaced at 8 and 20 h and dialysis ended at 30 h.

### 2.3.2. Protease digestion

Protease digestion was performed according to Muldrew et al. [30] with modifications.

Briefly, a solution of protease (8 U/ml, protease type XIV from *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich) was dialyzed as described above to remove contaminating amino acids. Dialyzed proteins samples and dialyzed protease were mixed (1V/1V) then incubated at 50°C for 18 h. After protease digestion, the samples were ultra-filtered through Amicon bioseparation Centrikon filter tubes (MWCO 3 000 kDa, Millipore) for 2 h at 6 000 x g. Ultra-filtrates were submitted to targeted and untargeted metabolomics approaches. A pooled quality control sample (PQC) was prepared by mixing 10 µL from each of the experimental hydrolysates.

### 2.4. Targeted metabolomic approach

APAP-Cys and tyrosine were quantified using a liquid chromatography (LC) Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (MS) API 2000 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Foster City, CA, USA), equipped with an electrospray ionization source interface operating in the positive mode. MS parameters were optimized by direct infusion of standard solutions of APAP-Cys and tyrosine at 10 µmol/mL in water. Optimum analytical conditions were as follows: the capillary voltage at 5000V, the source temperature at 450 °C, and GS1 and GS2 at 40 and 60, respectively. Each standard was optimized one by one to choose the product ions providing the best sensitivity.

Chromatographic separation was performed on an 150 x 2.1 mm Atlantis dC18 column (Waters, Saint Quentin en Yvelines, France), with particle size of 5  $\mu\text{m}$  at a flow rate of : 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  from 0 to 5 min; 300 $\mu\text{L}/\text{min}$  from 5 to 15 min; 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  from 15 to 23 min. Samples were eluted from the LC column using the following gradient: 0 to 5 min: 90% A; 5 to 15 min: 10 to 100% B, 15 to 23 min: 90 % A. Solvent A was water containing 10 mM ammonium formate, and solvent B was methanol containing 10 mM ammonium formate. Ultra-filtrates were 20-fold diluted in mobile phase A with 0.24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of 4-4 amido phenyl aminothiazole as internal standard. Injection volume was set at 10  $\mu\text{L}$  and samples were injected in triplicates.

Quantification was achieved by measuring product ions (multiple reaction monitoring (MRM)) from the fragmentation of the protonated  $[\text{M} + \text{H}]^+$  molecules. The collision energy potential and the collision exit potential were then adjusted to optimize the signal for the most abundant product (daughter) ions ( $m/z$  271>140 for the APAP-Cys  $m/z$  234>192 for the internal standard,  $m/z$  182>136 for the tyrosine) using nitrogen as the collision gas at a pressure of  $10^{-3}$  mbar. Quantification was performed using calibration curves with external standards of APAP-Cys and tyrosine in blank matrix (supplemental Table). Kuskal & Wallis test was performed on tyrosine data to analyze the effect of the main factor (0%, 0.5% and 1% APAP dose) and Mann-Whitney-Wilcoxon tests were performed on APAP-Cys and APAP-Cys/tyrosine data to analyze differences between 0.5% APAP and 1%APAP groups using the software R (version 3.1.0). False discovery rate was applied for both tests and  $P$  value < 0.05 was considered as significant.

## 2.5. Untargeted metabolomic approach

### 2.5.1. *Liquid chromatography*

The samples were analyzed on a Waters Acquity UPLC module (Saint Quentin en Yvelines, France) used for chromatographic separations. Separations were carried out at 30°C using a 2.1 x 50 mm Acquity UPLC HSS T3 column (Waters), with a particle size of 1.8 µm at a flow rate of 0.4 mL/min. Samples were eluted from the LC column using the following gradient: 0 to 2 min: 100% A; 2 to 15 min: 0 to 100% B; 15 to 22 min: 100% B. Solvent A was water and solvent B was acetonitrile, both solvents containing 0.1% formic acid. Injection volume was set to 6 µL.

### 2.5.2. *Mass spectrometry*

MS experiments were carried out on a Quadrupole - Time of Flight (QToF) mass spectrometer (QToFmicro from Waters, Saint Quentin en Yvelines, France), equipped with an electrospray ionization (ESI) source. Capillary voltage was set to 3 kV and cone voltage was optimized at 30 V. The scan time and the dwell time were fixed at 1 and 0.1 s, respectively. ESI needle and drying gas temperatures were set at 120 and 330°C, respectively. The drying and nebulizing gas flows (nitrogen) were set to 40 and 650 L/h, respectively. Data were acquired in positive ion mode, with a scan range from 70 to 1,000 m/z.

All analyses were acquired by using the lockspray with a frequency of 5 s to ensure accuracy. Leucine-enkephalin was used as a lock mass compound. To avoid possible differences between sample batches, a Latin square [31] was carried out to obtain randomized analytical sequences. Each day, the repeatability of the injection was monitored using SQC

samples injected three times at the beginning of the sequence and after three blank injections. The stability of the analytical system was monitored using PQC samples injected one time after the SQC samples and then after each set of ten samples.

### *2.5.3. Data extraction and analysis*

All LC–MS data were processed using XCMS [32] to yield a data matrix containing retention times, accurate masses and normalized peak intensities. Raw data files were converted to NetCDF format using the Waters DataBridge software.

Kruskal & Wallis tests were performed on all extracted ions to assess the effect of the main factor (APAP dose) as described above.

Multivariate analyses were further carried out using SIMCA-P v11 software (Umetrics, Umeå, Sweden). Principal Component Analysis (PCA) was performed with the NIPALS algorithm on the log transformed data with Pareto scaling. Partial least square-based discriminant analysis (PLS-DA) was also performed on the log transformed data with Pareto scaling. The overall quality of the models was assessed by the cumulative  $R^2$  ( $R^2Y_{cum}$ ) criterion, the fraction of the sum of squares explained by all the components, and by the cumulative  $Q^2$  ( $Q^2_{cum}$ ) criterion, the fraction of the total variance of the matrix that can be predicted by all the components, as estimated by cross-validation. Predictive discrimination ability by cumulative  $Q^2$  ( $Q^2_{cum}$ ) extracted was obtained according to the 7 fold cross-validation default method of SIMCA-P software.  $Q^2_{cum}$  is a ratio of predicted residual sum of square (PRESS) vs residual sum of square (RSS). To verify that PLS components could not lead to classifications by chance, a permutation test was carried out ( $n = 100$ ). For each test, samples were randomly assigned to each group. A PLS model was carried out and  $R^2Y$  and  $Q^2_{cum}$  were computed. Results of this test are displayed on validation plots. These plots show



on the X axis the correlation coefficient with the original non permuted sample (value 1) and  $R^2Y$  and  $Q^2_{cum}$  values on the Y axis. Logically, permuted samples must lead to poor predictive models with low  $Q^2_{cum}$  values and therefore the regression line of  $Q^2_{cum}$  values must have a negative intercept. Variable importance on projection (VIP) values were obtained as indicators of importance of each ion in the PLS-DA model.

#### 2.5.4. Metabolite identification

Mass spectra were annotated for each discriminant ion ( $P < 0.05$  and  $VIP > 1.5$ ) to identify the parent ion, adducts and isotopes, as well as the in-source fragments likely to provide structural information.

To obtain accurate masses and molecular formulae, a small number of samples were analyzed using an ultra-high resolution Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos hybrid mass spectrometer operating in full scan mode ( $m/z$  70–1,000) at 30,000 resolving power. Several online chemical databases were queried by molecular formula or accurate mass to search for hypotheses of chemical structures: KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), the Human Metabolome Database (HMDB; [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)). In addition, a customized in-house database on peptides was built. It comprised all peptides reported in HMDB and in BIOPEP database (BIOPEP [33] [www.uwm.edu.pl/biochemia](http://www.uwm.edu.pl/biochemia)), as well as all possible di- and tri-peptides. Furthermore, the most likely forms of peptides oxidized on Cys and methionine residues were predicted *in silico* and their monoisotopic masses were included in the in-house database by adding 15.994915 Da for Cys sulfenic acid (Cys-SOH or C(SOH)) and methionine sulfoxide (Met-SO), 31.98983 Da for Cys sulfinic acid (Cys-SO<sub>2</sub>H) and methionine sulfone (Met-SO<sub>2</sub>), and 47.984745 Da for Cys sulfonic acid (Cys-SO<sub>3</sub>H) to monoisotopic masses of all peptides containing Cys or methionine residues.

## 2.6. Method validations

### *2.6.1. Targeted metabolomics approach*

The validation of the quantitative targeted method was performed by the evaluation of inter-day calibrations, linearity of the calibration curve, limits of detection and quantification, and accuracy.

The calibration curves were obtained by plotting the peak area against concentration using a linear regression model. For APAP-Cys and tyrosine, a series of 5-7 different concentration levels were prepared (as described in Supplemental Table 1) and each solution was injected 3 times, and repeated 3 days, to determine precision and accuracy. Integration of the LC-MS/MS SRM peaks was performed using the AB-Sciex Analyst processing software (Applied Biosystems/MDS Sciex, Framingham, MA).

The achieved limits of detection and quantification were respectively calculated as the amount of analyte able to produce a signal three- and ten-times higher than the noise of the baseline in a chromatogram of a blank matrix sample after estimating the original amount in a given matrix.

### *2.6.2. Untargeted metabolomics approach*

In untargeted metabolomics, there is often a large variability in the samples due to sample collection, storage and pretreatment, and intra/inter-individual variations [34], compared to the changes of interest induced by the experimental intervention. So, it is very important to

quantify the analytical variability. This validation is focused on the study on the instrument stability in terms of retention times, masses and peak intensities.

## 2.7. Glutathione quantification

Frozen liver was finely pulverized in liquid nitrogen using a ball mill (Danguomeau, Prolabo, Paris, France). Total GSH (reduced plus oxidized) was quantified with a spectrometer using a standard enzymatic recycling procedure and 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (Ellman's reagent) as oxidant as previously described [35]. Kruskal & Wallis test was performed to assess the effect of the main factor (APAP dose) as described for ions extracted from the untargeted metabolomics analysis (see above).

## 3. Results

### 3.1. Liver APAP-protein adducts quantified by targeted metabolomic

#### *3.1.1. Methodological aspects*

Linear calibration curves were obtained by plotting the peak area ratios of the tyrosine or APAP-Cys and the internal standard, against the corresponding analyte concentrations. MRM transitions, linear ranges, limits of quantitation and detection are shown in Table 1. Analytical inter-assay variability of quality controls was lower than 20% and bias lower than 10% for both tyrosine and APAP-Cys (Table 1 and supplemental Table). Calculation of APAP-Cys to tyrosine molar ratio has the advantage to avoid the quantification of the quantity of protein

submitted to hydrolysis for standardization. The limit of quantification of 7 ng APAP-Cys/ml of hydrolysate corresponded to an APAP-Cys to tyrosine ratio of 0.016 ‰. The individual ratio ranged from 0.17 to 5.35 ‰ in present rat liver protein hydrolysates. Six h after a single injection of a toxic dose of APAP (1 g/kg body weight) in overnight-fasted 8-12-week-old rats, APAP-protein adducts were 0.4 nmol/mg of liver proteins [36] with a method derived from Muldrew et al. [30]. Assuming a tyrosine content of 200 µmol/g of protein [37], such a value of 0.4 nmol/mg would translate into an APAP-Cys to tyrosine ratio of 2 ‰, a value being within the range presently obtained. Thus, the present targeted method gave precise data that were consistent with previously reported values of APAP-protein adducts in rat liver.

### *3.1.2. Dose response to chronic treatment with APAP on APAP-protein adducts in rat liver*

This is the first report of APAP-protein adducts in liver of rats under chronic treatment with APAP. Liver APAP-protein adducts already formed in the 0.5% APAP group. It further increased by 218 % in the 1% APAP group compared to the 0.5% APAP group (Table 2).

## 3.2. Screening of proteins alterations by untargeted metabolomics approach

### *3.2.1. Methodological aspects*

As usual, criteria used for validation was the reproducibility of i) retention times and accurate masses, essential for data alignment ii) peak intensities, essential to detect variations in post-translational modifications in amino acid residues apart from the amino acid composition of proteins that is not expected to change.

For the compounds in SQC samples, retention time variability was found to be very low, with all coefficients of variation (CV) values lower than 0.88%. CVs for masses were below 0.003% during the full batch analysis.

The evaluation of the variability of peak intensities in PQC samples throughout the 4 d are presented in Figure 1A. Low intensity ions showed the greatest variability. These results indicate that repeatability was related to signal intensity, as observed in previous studies [38], because of analytical reasons but also of problems in peak picking during data processing.

Figure 1B represents PCA (normalized pareto scaled) of 60 injected samples (20 in triplicates) and 7 injected PQC, in positive ion mode, carried out on all extracted ions. This figure illustrates that the variability between the individual biological samples was higher than the variability of PQC samples. The main source of variability can be attributed to biological variation and not variations in the analytical system, which demonstrated the suitability of the developed method.

In addition, the fact that tyrosine, quantified in hydrolysates by the targeted method, was not significantly different between the three experimental groups (Table 2), eliminated the need to normalize the untargeted metabolomics results.

### *3.2.2. Metabolic profiles of liver protein hydrolysate*

In positive ESI, a total of 961 ions were extracted. PLS-DA (Figure 2) was able to clearly discriminate APAP doses with a good quality of the model ( $R^2Y=0.987$ ,  $Q^2cum=0.785$ ). These results support that the amounts of some compounds were highly modified by the chronic treatment with both 0.5% and 1% APAP diets. Ions significantly affected by APAP dose were subjected to identification.

### 3.2.3. Identification of markers of protein alterations induced in liver by APAP treatment

Out of the 69 significant ions ( $P < 0.05$ , VIP value  $> 1.5$ ) including redundant information (i.e. isotopes, adducts, and in-source fragmentation), parent ions were filtered in order to be used in databases for queries. Fifteen metabolites were successfully identified or annotated using high resolution MS analyses (exact masses and mass spectra) and 2 putative molecules were characterized among the significant features (Table 3), following the MSI (Metabolomics Standards Initiative) recommendations [39].

The molecule with the highest VIP value, *i.e.* APAP-Cys, was the sole molecule detected only in protein hydrolysates from APAP-treated groups (not present in the 0% APAP group, Table 3). Four VIP compounds were metabolically related to Cys: cystinyl-glycine; cysteinyl-glutathione disulfide ; cystine resulting respectively from the binding of cysteinyl-glycine, GSH and Cys (small thiol molecules) to the thiol group of Cys residues of liver proteins ; and lastly a tri-peptide including one Cys sulfenic acid residue (EC(SOH)C). These VIP compounds were not significantly affected in the 0.5% APAP group but strongly decreased in the 1% APAP group compared to the two other groups. The irreversible oxidation of tryptophan (W) residues of liver proteins was affected by APAP treatment since a peptide containing an oxidized tryptophan residue (W(O<sub>2</sub>)) and free hydroxy-tryptophan were higher in the 1% APAP group than in the two other groups. W(O<sub>2</sub>) could be either the N-formylkynurenine or dioxindolylalanine residues, which have already been described as oxidized tryptophan residues in peptides or proteins [40,41]. Pyro-glutamyl-glutamine was also found higher in the 1% APAP group than in the two other groups. Pyro-glutamyl is also called oxo-proline since it is an oxidized form of proline residue of proteins [42,43]. Pyro-glutamyl is produced during one of the common post-translational modifications, and may be formed naturally by an enzymatic synthesis from N-terminal glutamine under mild acid

conditions or as an artifact from N-terminal glutamic acid under very acid conditions in proteins or peptides (Zheng 2011). Taking into account our experimental conditions, pyroglutamyl would not be an artifact but most likely result from proline oxidation. Finally, several peptides differed between the three groups, especially between the 1% APAP group and the other two groups (Table 3).

#### **4. Discussion**

This is the first report of liver protein alterations induced by chronic treatment with APAP using an original approach based on two complementary MS-based metabolomics methods run on the same protease hydrolysates. The targeted metabolomics approach allowed reliable quantification of APAP-protein adducts, whereas the untargeted metabolomics approach provided a wide (semi-quantitative) view of protein alterations including APAP-protein adduct formation and changes in i) post-translational modifications of cysteine residues, ii) oxidation of other residues, iii) protein expression. Two major results were obtained. APAP-protein adducts formed even in the absence of GSH depletion. Post-translational modification of cysteine residues, oxidation of tryptophan and proline residues, and protein expression were markedly altered when GSH was strongly depleted with the highest studied dose (1% APAP in the diet), although no hepatotoxicity was observed (see graphical summary).

The fact that liver APAP-protein adducts occurred in the absence of hepatotoxicity reinforces recent observations that APAP-protein adducts were present in serum from patients who received the maximal daily therapeutic dose of APAP for human, 4 g/d, for 10 d [44] and in liver 1 h after a single injection of a very low dose of APAP (15 mg/kg) in overnight fasted mice [45]. In that human study as well as in the present rat study there was no significant relationship between serum or liver APAP-protein adducts and transaminase activities.

APAP-protein adducts were observed without depletion in GSH ruling out the paradigm of APAP metabolism, which is that APAP-protein adduct occurs when GSH depletion reached about 70% [46]. This paradigm has recently been questioned [21]. Actually, NAPQI bound simultaneously to proteins and to GSH. Binding of NAPQI to GSH in the liver can be assessed by the quantitative daily excretion of the corresponding end-products i.e. Cys- and mercapturate-APAP conjugates in the urines. The urinary excretion of these end-products increased by 346% in the 1% APAP group compared to the 0.5% APAP group due to saturation of the sulfation pathway [29]. The magnitude of this increase (corresponding to the increase in daily NAPQI binding to GSH) was higher than the increase in APAP-protein adducts measured in liver after 17 d of treatment (218%). So, NAPQI binds preferentially to GSH rather than to protein thiols. Actually, GSH is the most efficient intra-cellular anti-oxidant compound, despite the fact that protein thiols are more abundant than GSH in tissues (for review see [47]).

As expected, the first VIP revealed by the untargeted metabolomics analyses was APAP-Cys that strongly increased with APAP dose. Unfortunately, the magnitude of this increase could not objectively be compared to the variation calculated from quantitative measurements, since untargeted metabolomics provides only semi quantitative levels. Untargeted metabolomics did not reveal any APAP adducts with amino acids other than Cys, ruling out that, under chronic treatment with non-hepatotoxic APAP doses, APAP-protein adducts form on amino acid residues other than Cys [48], in particular on lysine residues of specific proteins [49]. Major other post-translational modifications sensitive to APAP dose were various cysteine disulfides and Cys sulfenic acid residues. Their levels decreased with the increase in APAP-protein adducts suggesting that the extensive NAPQI binding to protein Cys residues reduced the availability of protein thiols for binding of small thiol molecules and for mild oxidation to sulfenic acid. The formation of APAP-protein adducts was likely



favoured over physiological disulfide formation because NAPQI is a highly reactive alkylating molecule. The decrease in physiological protein disulfides observed in the 1% APAP group could also result from a decrease in the concentration of small thiol molecules. Indeed, the strong decrease in liver GSH observed in the 1% APAP group (Table 2) could contribute to the decreased glutathionylation in that group compared to the two other groups. Present alteration in glutathionylation was consistent with the already reported role of such modification in hepatotoxicity in mice [50]. But, knowing that present chronic 1% APAP treatment did not induce any hepatotoxicity, metabolic consequences, if any, of glutathionylation alterations in the 1% APAP group are unknown. A decrease in cysteinyl-glycine was expected in the 1% APAP group since it is the direct catabolite of GSH and could explain that cystinyl-glycine almost disappeared in the 1% APAP group. The peptide EC(SOH)C decreased in the 1% APAP group despite an increase in the oxidation of some amino acid residues of proteins other than sulfur amino acid residues (see below). Protein sulfenic acids are widespread physiologically relevant reversible post-translational oxidative modifications that can be detected at basal levels in healthy tissue [51]. The possible metabolic consequences of decreased EC(SOH)C needs to be further studied. No form of oxidized methionine residues discriminated the three groups suggesting that the activity of the methionine sulfoxide reductase was high enough to maintain the physiological level of methionine sulfoxide [52] and that the oxidative stress was not strong enough to generate the irreversible methionine sulfonic residue in liver proteins under our experimental conditions .

Post-translational oxidative modifications of tryptophan such as hydroxyl-tryptophan, N-formylkynurenine and dioxindolylalanine increased with APAP dose but not nitrated tryptophan. Nitration of tryptophan residues in liver proteins has already been reported after hepatotoxic acute administration of APAP in mice [17]. Nitration of tryptophan and tyrosine play a role in APAP-induced necrotic cell death [12]. Consistently with the absence of

hepatotoxicity in the 1% APAP group, none of the discriminating compounds was nitrated in the present study.

Post-translational oxidation of proline seemed also increased with APAP dose. Rats fed with 1% APAP in a 15% casein diet for 10 days exhibited oxoprolinuria due to alterations in the glutathione metabolic cycle, and this was reversed by adding 0.5% of methionine in the 1% APAP diet [53]. Whether the oxidation of proline residues of liver proteins induced by the 1% APAP diet can significantly contribute to the reported oxoprolinuria would deserve further investigation.

In addition to discriminating post-translational modifications, the untargeted metabolomics method also revealed changes in the composition of liver proteins likely due to differential protein expression. Indeed, peptides were present in protein hydrolysates despite the extensive degradation by the protease type XIV from *Streptomyces griseus* resulting from the mixture of at least three caseinolytic activities and one aminopeptidase activity (Sigma-Aldrich). Discriminating peptides revealed modifications in the composition of liver proteins likely resulting from the cellular response to 1% APAP treatment, notably to the strong depletion of GSH. This is supported by the fact that a large number of liver proteins were already described as differentially expressed in mice after acute administration of APAP, even at subtoxic dose [54]. Few changes have also been reported in the rat serum proteome in the absence of liver injury after acute subtoxic dose of APAP [55].

The diet containing 1% of APAP has previously been considered as an equivalent of the dose of 4 g/d for human [56], which is the maximum prescribed therapeutic dose, at least in Europe. Interspecies comparison of present APAP doses has already been discussed, APAP dose of the 1% APAP group would correspond to 1.5 to 1.7 fold the maximum therapeutic human dose [29]. However, rats fed the 1% APAP diet did not show any sign of hepatotoxicity and the pattern of metabolites excreted in the urine from these rats were close

to APAP metabolites excretion in human [29]. So, it is reasonable to think that present results are relevant for human under long term treatment with non-hepatotoxic dose of APAP.

## **5. Conclusion**

The two complementary MS-based metabolomic approaches allowed the description of APAP-induced modifications in liver proteins using the same hydrolysate. The comparison of two chronic treatments with non-hepatotoxic doses clearly showed that APAP-protein adducts can be formed even in the absence of significant GSH depletion and hepatotoxicity. The highest APAP dose studied, which strongly decreased liver GSH, increased APAP-protein adducts, oxidized tryptophan and proline residues, decreased the physiological binding of small thiol molecules (GSH, Cys and cysteinyl-glycine), and also modified protein expression. GSH and at a lower extent protein thiols exerted a protective effect against NAPQI toxicity. Moreover, differential protein expression revealed that liver set up an adaptive response to the chronic treatment with the highest APAP dose studied. Knowing the potential deleterious effect of post-translational modifications on protein functions, it would be interesting to set up nutritional interventions to prevent such modifications.

## **Acknowledgments**

This work was supported by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), France. The authors would like to acknowledge Philippe Lhoste and Philippe Denis from the Installation Expérimentale de Nutrition for animal care.

## **Conflict of interest**

All authors declare that they have no conflict of interest.

## **Compliance with Ethical Requirements**

Animal experiment was conducted in agreement with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals used for Scientific Purposes. The protocol complied with the 3R (Replacement, Reduction, Refinement) rule.

## REFERENCES

- [1] Prescott L. Oral or intravenous N-acetylcysteine for acetaminophen poisoning? *Ann Emerg Med.* 2005;45(4):409-13.
- [2] Nelson E, Morioka T. Kinetics of the metabolism of acetaminophen by humans. *J Pharm Sci.* 1963;52:864-8.
- [3] Prescott LF. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol.* 1980;10:S291-S8.
- [4] Jollow DJ, Mitchell JR, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. II. Role of covalent binding in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973;187(1):195-202.
- [5] Streeter AJ, Dahlin DC, Nelson SD, Baillie TA. The covalent binding of acetaminophen to protein. Evidence for cysteine residues as major sites of arylation in vitro. *Chem Biol Interact.* 1984;48(3):349-66.
- [6] Jagenburg R, Nagy A, Rodjer S. Separation of p-acetamidophenol metabolites by gel filtration on Sephadex G 10. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968;22(1):11-6.
- [7] Buttar HS, Chow AYK, Downie RH. Glutathione alterations in rat-liver after acute and subacute oral-administration of paracetamol. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1977;4(1):1-6.

- [8] Tirmenstein MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols - Contribution of impaired thiol-metabolizing enzymes and the breakdown of adenine-nucleotides. *J Biol Chem.* 1990;265(6):3059-65.
- [9] Wu GY, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr.* 2004;134(3):489-92.
- [10] Tirmenstein MA, Nelson SD. Subcellular binding and effects on calcium homeostasis produced by acetaminophen and a nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide, in mouse liver. *J Biol Chem.* 1989;264(17):9814-9.
- [11] Reid AB, Kurten RC, McCullough SS, Brock RW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial permeability transition in freshly isolated mouse hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;312(2):509-16.
- [12] Jaeschke H, McGill MR, Williams CD, Ramachandran A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity--a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Sci.* 2011;88(17-18):737-45.
- [13] Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR. Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol.* 1998;11(6):604-7.
- [14] Hinson JA, Michael SL, Ault SG, Pumford NR. Western blot analysis for nitrotyrosine protein adducts in livers of saline-treated and acetaminophen-treated mice. *Toxicol Sci.* 2000;53(2):467-73.
- [15] Cover C, Mansouri A, Knight TR, Bajt ML, Lemasters JJ, Pessayre D, et al. Peroxynitrite-induced mitochondrial and endonuclease-mediated nuclear DNA damage in acetaminophen hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;315(2):879-87.

- [16] Ishii Y, Iijima M, Umemura T, Nishikawa A, Iwasaki Y, Ito R, et al. Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(4):1325-31.
- [17] Ishii Y, Ogara A, Katsumata T, Umemura T, Nishikawa A, Iwasaki Y, et al. Quantification of nitrated tryptophan in proteins and tissues by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2007;44(1):150-9.
- [18] Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002;65(2):166-76.
- [19] James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab and Dispos.* 2003;31(12):1499-506.
- [20] Bond GR. Acetaminophen protein adducts: a review. *Clin Toxicol.* 2009;47(1):2-7.
- [21] McGill MR, Jaeschke H. Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharm Res.* 2013;30(9):2174-87.
- [22] Davern TJ, 2nd, James LP, Hinson JA, Polson J, Larson AM, Fontana RJ, et al. Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure. *Gastroenterology.* 2006;130(3):687-94.
- [23] James LP, Letzig L, Simpson PM, Capparelli E, Roberts DW, Hinson JA, et al. Pharmacokinetics of Acetaminophen-Protein Adducts in Adults with Acetaminophen Overdose and Acute Liver Failure. *Drug Metab and Dispos.* 2009;37(8):1779-84.
- [24] Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:797-821.
- [25] Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(26):15036-40.

- [26] Wojdyla K, Williamson J, Roepstorff P, Rogowska-Wrzesinska A. The SNO/SOH TMT strategy for combinatorial analysis of reversible cysteine oxidations. *J Proteomics*. 2015;113(0):415-34.
- [27] Liu L, Klaassen CD. Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996;139(1):128-34.
- [28] Klaassen CD, Boles JW. Sulfation and sulfotransferases .5. The importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J*. 1997;11(6):404-18.
- [29] Mast C, Joly C, Savary-Auzloux I, Remond D, Dardevet D, Papet I. Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol when glutathione-dependent detoxification is highly activated. *J Physiol Pharmacol*. 2014;65(5):623-31.
- [30] Muldrew KL, James LP, Coop L, McCullough SS, Hendrickson HP, Hinson JA, et al. Determination of acetaminophen-protein adducts in mouse liver and serum and human serum after hepatotoxic doses of acetaminophen using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Drug Metab and Dispos*. 2002;30(4):446-51.
- [31] Williams E. Experimental Designs Balanced for the Estimation of Residual Effects of Treatments. *Aust J Chem*. 1949;2(2):149-68.
- [32] Smith CA, Want EJ, O'Maille G, Abagyan R, Siuzdak G. XCMS: Processing mass spectrometry data for metabolite profiling using Nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal Chem*. 2006;78(3):779-87.
- [33] Minkiewicz P, Dziuba J, Iwaniak A, Dziuba M, Darewicz M. BIOPEP database and other programs for processing bioactive peptide sequences. *J AOAC Int*. 2008;91(4):965-80.

- [34] Scalbert A, Brennan L, Fiehn O, Hankemeier T, Kristal BS, van Ommen B, et al. Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics*. 2009;5(4):435-58.
- [35] Malmezat T, Breuille D, Pouyet C, Mirand PP, Obled C. Metabolism of cysteine is modified during the acute phase of sepsis in rats. *J Nutr*. 1998;128(1):97-105.
- [36] McGill MR, Williams CD, Xie Y, Ramachandran A, Jaeschke H. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;264(3):387-94.
- [37] Obled C, Arnal M. Age-related changes in whole-body amino acid kinetics and protein turnover in rats. *J Nutr*. 1991;121(12):1990-8.
- [38] Gika HG, Theodoridis GA, Wilson ID. Liquid chromatography and ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry fingerprinting of human urine: sample stability under different handling and storage conditions for metabolomics studies. *J Chromatogr A*. 2008;1189(1-2):314-22.
- [39] Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics*. 2007;3(3):211-21.
- [40] Simat TJ, Steinhart H. Oxidation of Free Tryptophan and Tryptophan Residues in Peptides and Proteins. *J Agric Food Chem*. 1998;46(2):490-8.
- [41] Todorovski T, Fedorova M, Hoffmann R. Mass spectrometric characterization of peptides containing different oxidized tryptophan residues. *J Mass Spectrom*. 2011;46(10):1030-8.
- [42] Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):207-18.



- [43] Xu G, Chance MR. Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chem Rev.* 2007;107(8):3514-43.
- [44] Heard KJ, Green JL, James LP, Judge BS, Zolot L, Rhyee S, et al. Acetaminophen-cysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. *BMC Gastroenterol.* 2011;11.
- [45] McGill MR, Lebofsky M, Norris HRK, Slawson MH, Bajt ML, Xie YC, et al. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: Dose-response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;269(3):240-9.
- [46] Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973;187(1):211-7.
- [47] Di Simplicio P, Franconi F, Frosali S, Di Giuseppe D. Thiolation and nitrosation of cysteines in biological fluids and cells. *Amino Acids.* 2003;25(3-4):323-39.
- [48] Matthews AM, Roberts DW, Hinson JA, Pumford NR. Acetaminophen-induced hepatotoxicity - Analysis of total covalent binding vs specific binding to cysteine. *Drug Metab and Dispos.* 1996;24(11):1192-6.
- [49] Zhou LX, McKenzie BA, Eccleston ED, Srivastava SP, Chen NQ, Erickson RR, et al. The covalent binding of [C-14]acetaminophen to mouse hepatic microsomal proteins: The specific binding to calreticulin and the two forms of the thiol:protein disulfide oxidoreductases. *Chem Res Toxicol.* 1996;9(7):1176-82.
- [50] Yang X, Greenhaw J, Ali A, Shi Q, Roberts DW, Hinson JA, et al. Changes in Mouse Liver Protein Glutathionylation after Acetaminophen Exposure. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;340(2):360-8.

- [51] Saurin AT, Neubert H, Brennan JP, Eaton P. Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(52):17982-7.
- [52] Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1844(8):1367-82.
- [53] Ghauri FYK, McLean AEM, Beales D, Wilson ID, Nicholson JK. Induction of 5-oxoprolinuria in the rat following chronic feeding with N-acetyl 4-aminophenol (paracetamol). *Biochem Pharmacol*. 1993;46(5):953-7.
- [54] Ruepp SU, Tonge RP, Shaw J, Wallis N, Pognan F. Genomics and proteomics analysis of acetaminophen toxicity in mouse liver. *Toxicol Sci*. 2002;65(1):135-50.
- [55] Merrick BA, Bruno ME, Madenspacher JH, Wetmore BA, Foley J, Pieper R, et al. Alterations in the rat serum proteome during liver injury from acetaminophen exposure. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318(2):792-802.
- [56] McLean AEM, Armstrong GR, Beales D. Effect of D-methionine or L-methionine and cysteine on the growth inhibitory effects of feeding 1-percent paracetamol to rats. *Biochem Pharmacol*. 1989;38(2):347-52.

## Figure legends

### Fig. 1 Validation of the untargeted method

**A** Distribution of variability with respect to peak intensities, **B** PCA (normalized pareto scaled) of 60 injected samples (20 in triplicates) and 7 injected PQC (pool quality control sample), in positive ion mode, carried out on all extracted ions.

### Fig. 2 Partial least squares discriminant analysis on all extracted ions

**A** Scores plot showing the dose effect ( $R^2Y=0.987$ ,  $Q^2cum=0.785$ ), **B** Graphical result of 100 permutation test:  $R^2$  and  $Q^2$  values with respect to the correlation coefficient between original and permuted data.

**Table 1** Development and validation of the targeted method to quantify tyrosine and APAP-Cys in liver protein hydrolysate

	Retention time (min)	MRM	Linear range [ng/mL]	Correlation coefficient $R^2$	LLOQ [ng/mL]	LLOD [ng/mL]	CV range (%)	Bias range (%)
Tyrosine	5.0	182-> 136	1,900 – 13,100	0.946	1,400	430	8 – 20	-10 – 4
APAP-Cys	9.4	271 -> 140	8.6 – 183.1	0.998	7.1	2.1	5 – 17	-5 – 8
Internal standard 4-4 amido phenyl aminothiazole	18.5	234 -> 192						

CV: Coefficient of variation

LLOQ: Lower limit of quantitation (injected on column)

LLOD: Lower limit of detection (injected on column)

MRM: Multiple reaction monitoring

Bias: difference between mean concentration found and level added in %

**Table 2** Dose responses to chronic treatment with APAP on liver protein content, glutathione concentration, and APAP-protein adducts

Diet APAP	0%	0.5%	1%	<i>P</i> value
GSH ( $\mu\text{mol/g}$ )	$6.63 \pm 0.07^a$	$6.77 \pm 0.26^a$	$2.70 \pm 0.19^b$	0.003
Tyrosine ( $\mu\text{g/mL}$ hydrolysate)	$272 \pm 12$	$287 \pm 8$	$297 \pm 12$	NS
APAP-Cys ( $\mu\text{g/mL}$ hydrolysate)	nd	$0.60 \pm 0.12^a$	$1.97 \pm 0.19^b$	0.001
APAP-Cys/tyrosine ( $\text{‰}$ (mol/mol))	-	$1.39 \pm 0.27^a$	$4.43 \pm 0.35^b$	0.001

Mean  $\pm$  SE of the mean

GSH: glutathione

nd: not detectable

*P* value for Kruskal & Wallis test (comparison of the three groups) or Mann-Whitney-Wilcoxon test (comparison of the two APAP groups)

<sup>a,b</sup> Within a row values not sharing a common upper letter are significantly different ( $P < 0.05$ )

**Table 3** Identification of markers of APAP-induced alterations in proteins from rat livers

Measured mass m/z	RT (min)	Identification	Formula	VIP	0% APAP	0.5% APAP	1% APAP	<i>P</i> value
271.07478	4.7	APAP-Cys *	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	7.4	1 <sup>a</sup>	574 <sup>b</sup>	1147 <sup>c</sup>	0.003
298.0265	1.3	cystinyl-glycine <sup>§</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	5.9	2045 <sup>a</sup>	1475 <sup>a</sup>	20 <sup>b</sup>	0.004
370.07379	1.2	EC(SOH)C <sup>§</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	3.8	1119 <sup>a</sup>	735 <sup>a</sup>	104 <sup>b</sup>	0.003
427.09578	1.4	cysteinyl-glutathione disulfide <sup>§</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	3.4	2175 <sup>a</sup>	1683 <sup>a</sup>	359 <sup>b</sup>	0.004
241.03073	1.2	cystine *	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	2.7	1339 <sup>a</sup>	899 <sup>a</sup>	324 <sup>b</sup>	0.003
430.22913	4.3	KDAP or DAKP <sup>§</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> O <sub>7</sub> N <sub>5</sub>	2.4	1331 <sup>a</sup>	2369 <sup>b</sup>	3805 <sup>c</sup>	0.003
548.27173	6.8	IW(O <sub>2</sub> )VD, LW(O <sub>2</sub> )VD, IW(O <sub>2</sub> )DV or LW(O <sub>2</sub> )DV <sup>£</sup>	C <sub>26</sub> H <sub>36</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	2.4	364 <sup>a</sup>	530 <sup>b</sup>	1050 <sup>c</sup>	0.003
361.18305	2.8	RGE <sup>§</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> O <sub>6</sub> N <sub>6</sub>	2.2	426 <sup>ab</sup>	309 <sup>a</sup>	508 <sup>b</sup>	0.009
455.189	3.0	SPDH, SDPH or SDHP <sup>§</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O <sub>8</sub> N <sub>6</sub>	2.1	553 <sup>ab</sup>	396 <sup>a</sup>	651 <sup>b</sup>	0.015
258.10876	1.0	pyroglutamyl-glutamine <sup>§</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> O <sub>5</sub> N <sub>3</sub>	2.1	835 <sup>a</sup>	757 <sup>a</sup>	1468 <sup>b</sup>	0.006
312.19177	5.6	PVP, PPV or VPP <sup>§</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2.0	295 <sup>ab</sup>	215 <sup>a</sup>	379 <sup>b</sup>	0.029
245.11322	5.3	EP or PE <sup>§</sup>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.9	1146 <sup>a</sup>	1288 <sup>a</sup>	736 <sup>b</sup>	0.014

415.21878	5.3	IGEP <sup>§</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>	1.8	379 <sup>a</sup>	463 <sup>a</sup>	275 <sup>a</sup>	0.039
360.14032	5.2	DPE <sup>§</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	1.8	763 <sup>ab</sup>	891 <sup>a</sup>	572 <sup>b</sup>	0.017
295.12888	5.6	EF <sup>§</sup>	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	1.8	302 <sup>a</sup>	198 <sup>a</sup>	173 <sup>b</sup>	0.009
434.15213	1.4	DDAN or DADN <sup>§</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>23</sub> O <sub>10</sub> N <sub>5</sub>	1.7	1050 <sup>a</sup>	1100 <sup>a</sup>	724 <sup>b</sup>	0.008
373.2084	5.1	IGPS, LGPS, IGPS or LGPS <sup>£</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	1.5	338 <sup>ab</sup>	419 <sup>a</sup>	327 <sup>b</sup>	0.022
221.09198	4.8	hydroxy-tryptophane <sup>§</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	1.5	336 <sup>a</sup>	365 <sup>a</sup>	503 <sup>b</sup>	0.004

---

Mean of peak intensities

RT: Retention time

VIP: Variable importance in projection

EC(SOH)C: tri-peptide containing a cysteine sulfenic acid residue, C(SOH)

IW(O<sub>2</sub>)VD: tetra-peptide containing an oxidized tryptophan residue, N-formylkynurenine or dioxindolylalanine

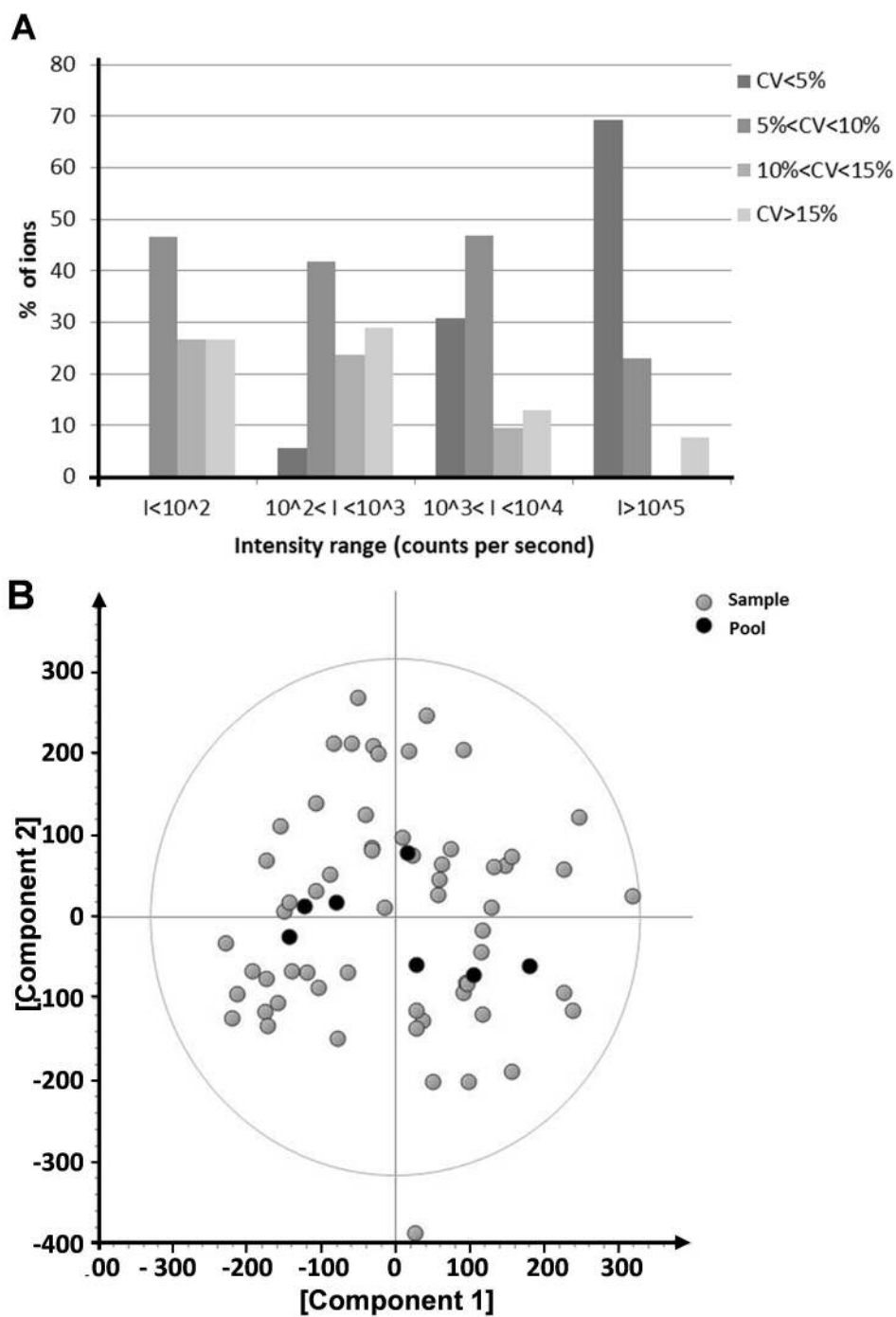
\* Identified compounds (identification with chemical reference standards)

<sup>§</sup> Putatively annotated compounds (e.g. without chemical reference standards, based upon exact masses, mass fragmentation spectra and/or spectral similarities with public and home-mode spectral databases)

<sup>£</sup> Putatively characterized compound classes (e.g. based upon characteristic physicochemical properties of a chemical class of compounds, or by spectral similarity to known compounds of a chemical class)

*P* value for Kruskal & Wallis test

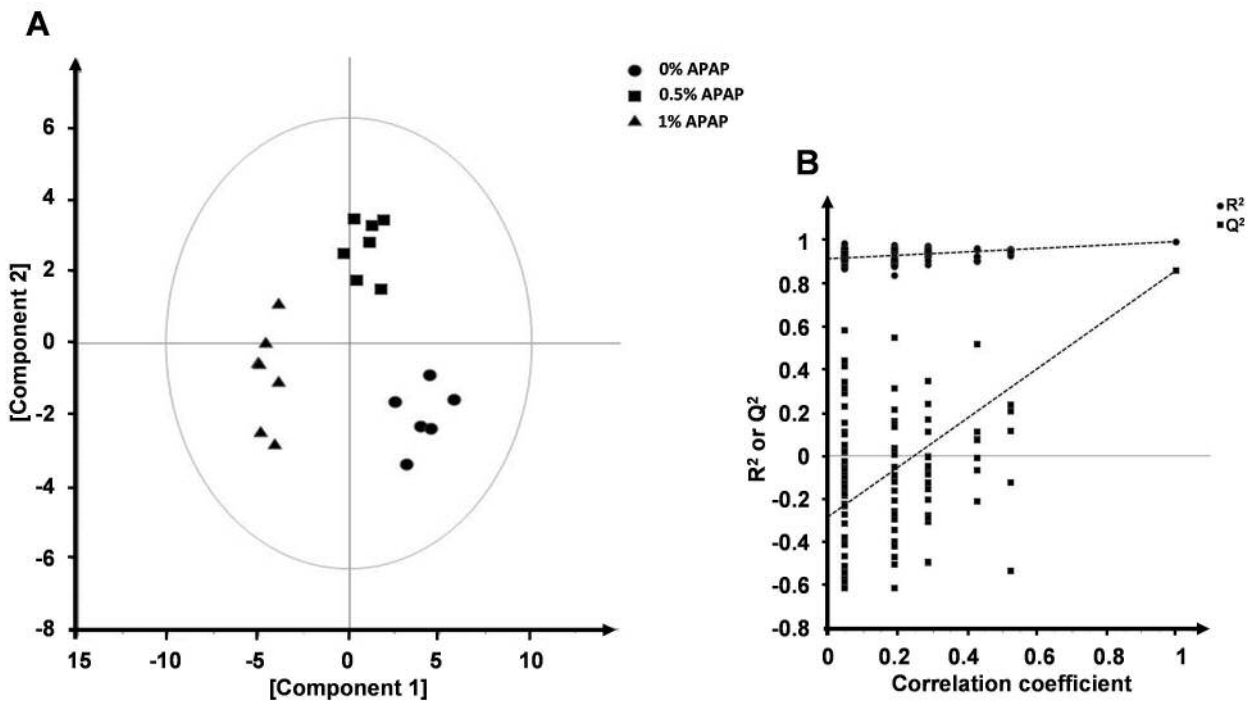
<sup>a,b</sup> Within a row values not sharing a common upper letter are significantly different ( $P < 0.05$ )



**Fig. 1** Validation of the untargeted method

**A** Distribution of variability with respect to peak intensities, **B** PCA (normalized pareto scaled) of 60 injected samples (20 in triplicates) and 7 injected PQC (pool quality control sample), in positive ion mode, carried out on all extracted ions.





**Fig. 2** Partial least squares discriminant analysis on all extracted ions

**A** Scores plot showing the dose effect ( $R^2Y=0.987$ ,  $Q^2cum=0.785$ ), **B** Graphical result of 100 permutation test:  $R^2$  and  $Q^2$  values with respect to the correlation coefficient between original and permuted data.

**Supplemental Tables** Detailed measurements of inter-assay accuracy and precision

**Table A** APAP-Cys

APAP-Cys	Added (ng/mL)	Found mean (ng/mL)	CV (%)	Bias (%)
L1	8.6	9.0	16.5	4.8
L2	17.3	18.6	15.8	7.6
L3	29.4	27.6	10.5	-6.2
L4	43.2	42.1	15.4	-2.6
L5	86.4	81.8	6.3	-5.3
L6	135.6	139.7	6.6	3.0
L7	183.1	185.9	5.1	1.5

**Table B** Tyrosine

Tyrosine	Added (ng/mL)	Found mean (ng/mL)	CV (%)	Bias (%)
L1	4.7	4.22	20.2	-9.9
L2	6.4	5.83	9.3	-8.5
L3	6.9	7.19	6.6	3.8
L4	9.4	9.38	8.3	0.2
L5	13.1	12.63	7.6	-3.6

CV: coefficient of variation

Bias: difference between mean concentration found and level added in %

## *Expérience 2 :*

---

### **IMPACT DU TAUX PROTEIQUE DU REGIME SUR LE TISSU MUSCULAIRE ET LE GLUTATHION CHEZ LE RAT AGE TRAITÉ PAR CURES AU PARACETAMOL.**

**- PUBLICATION N°3: Loss of muscle mass and decreased protein synthesis in long-term therapeutic paracetamol (acetaminophen) treatment in old rats.**

C. Mast, I. Savary-Auzeloux, D. Rémond, C. Pouyet, D. Centeno, G. Voyard, L. Combaret, D. Dardevet, I. Papet

*En préparation pour soumission à Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences*

**- DONNEES COMPLEMENTAIRES: Impact du taux protéique du régime sur la réponse à un traitement chronique au paracétamol.**

## DONNEES PRELIMINAIRES

### **INTRODUCTION & OBJECTIF :**

Les résultats de l'expérience précédente ayant montré une perte de masse musculaire chez le rat adulte traité sur le long terme au paracétamol (Mast *et al.*, 2014), la question de l'impact potentiel du paracétamol sur le développement ou l'aggravation de la sarcopénie au cours du vieillissement est apparue évidente. La perte de masse musculaire, sarcopénie, est aujourd'hui bien reconnue chez les personnes âgées (Janssen, 2011) ainsi que l'importance de la nutrition, en particulier protéique, dans sa mise en place/son aggravation (Dardevet *et al.*, 2003, 2012; Paddon-Jones *et al.*, 2006; Wolfe, 2012; Volpi *et al.*, 2013; Bauer *et al.*, 2013; Deutz *et al.*, 2014). Dans cette expérience, deux taux protéiques ont été choisis afin de reproduire deux situations nutritionnelles de la personne âgée : 1) des apports protéiques suffisants (16%) et au-dessus du besoin 2) une situation d'apports protéiques faibles (8%), à la limite du besoin. En effet, la population âgée est caractérisée par une grande hétérogénéité qui se retrouve aussi dans le statut nutritionnel (Calvani *et al.*, 2013). Le choix a été fait d'administrer le paracétamol incorporé aux croquettes et de le donner, sous forme de cures répétées. Le système de cures a été choisi afin de mimer le traitement des douleurs chroniques des personnes âgées qui conduit à la prise répétée de paracétamol. Ces douleurs chroniques, ont été définies par l'American Geriatric Society comme des douleurs quotidiennes présentes durant au moins 3 mois consécutifs (Ferrell *et al.*, 2009). Cette durée a été réduite à deux semaines chez le rat afin de l'adapter à leur durée de vie. L'objectif de cette expérience était double : d'une part d'étudier l'impact du paracétamol administré en chronique sur le muscle squelettique chez l'âgé, et d'autre part d'analyser cet effet en fonction du taux protéique du régime. Dans cette partie sont présentés dans un premier temps, le comportement alimentaire de tous les lots, puis les résultats concernant les lots à 16% de protéines sont détaillés et discutés dans la publication n°3. Les résultats des lots à 8% de protéines sont présentés et discutés en données complémentaires.

### **METHODES :**

Le détail des méthodes utilisées est fourni dans la publication n°3. Brièvement, les rats âgés de 22 mois ont été répartis en 5 groupes. Un lot témoin a été euthanasié au temps T0 de

**Tableau 1.** Composition des régimes expérimentaux.

	16%-diet	16%-APAP-diet	8%-diet	8%-APAP-diet
<b>Ingredients</b>				
Fish meal	211	211	105.5	105.5
APAP	-	10	-	10
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5
Sunflower oil	31	31	31	31
Fish oil	-	-	14	14
Cellulose	50	50	50	50
Sucrose	100	100	100	100
Mineral mixture AIN93	20	20	33	33
Vitamin mixture AIN93	10	10	10	10
Starch	575.5	565.5	654	644

Les quantités sont exprimées en g.kg<sup>-1</sup> de matière sèche. APAP: paracétamol

**Tableau 2:** Régime (g.j<sup>-1</sup>) et paracétamol (mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>) consommés. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM par périodes.

	T0	C1	IC1	C2	IC2	C3	<b>ANOVA à mesure répétée (2 facteurs)</b>
<i>Régime ingéré (g.j<sup>-1</sup>)</i>							
<b>CT</b>	25,1 ± 0,7	-	-	-	-	-	-Temps : <i>P</i> < 0,001 -Lot : <i>P</i> = 0,059 -Temps x lot : <i>P</i> < 0,001
<b>APAP-16%</b>	24,7 ± 0,8	16,6 ± 1,3	22,5 <sup>x</sup> ± 0,7	19,1 <sup>x</sup> ± 0,7	19,7 <sup>x</sup> ± 0,2	16,7 <sup>x</sup> ± 0,9	
<b>PF-16%</b>	24,2 ± 0,6	17,0 ± 0,4	21,2 <sup>x</sup> ± 0,8	18,8 <sup>x</sup> ± 0,4	19,1 <sup>x</sup> ± 0,4	17,1 <sup>x</sup> ± 0,2	
<b>APAP-8%</b>	25,7 ± 0,9	14,0 ± 2,1	28,5 <sup>y</sup> ± 1,4	11,9 <sup>y</sup> ± 1,9	22,1 <sup>y</sup> ± 0,5	9,1 <sup>y</sup> ± 1,1	
<b>PF-8%</b>	24,8 ± 0,7	12,9 ± 1,1	24,1 <sup>x</sup> ± 0,6	11,9 <sup>y</sup> ± 1,0	22,2 <sup>y</sup> ± 0,3	9,5 <sup>y</sup> ± 0,7	
<b>Effet temps</b>	a	b	a	b	c	d	
<i>APAP ingéré (mg.kg<sup>-1</sup>.j<sup>-1</sup>)</i>							
<b>APAP-16%</b>	-	257 ± 54	-	299 ± 31	-	267 ± 42	
<b>APAP-8%</b>	-	211 ± 74	-	191* ± 74	-	161** ± 51	

APAP: paracetamol; C: Cure; CT: contrôle; IC: Inter-Cure; PF: Paif-Fed.

a, b, c, d les valeurs ne partageant pas de lettre en commun sont significativement différentes (*P* ≤ 0,05). <sup>x</sup>, <sup>y</sup> pour un temps donné, les valeurs ne partageant pas de lettre en commun sont significativement différentes (*P* ≤ 0,05 ANOVA suivie du test PLSD de Fisher)

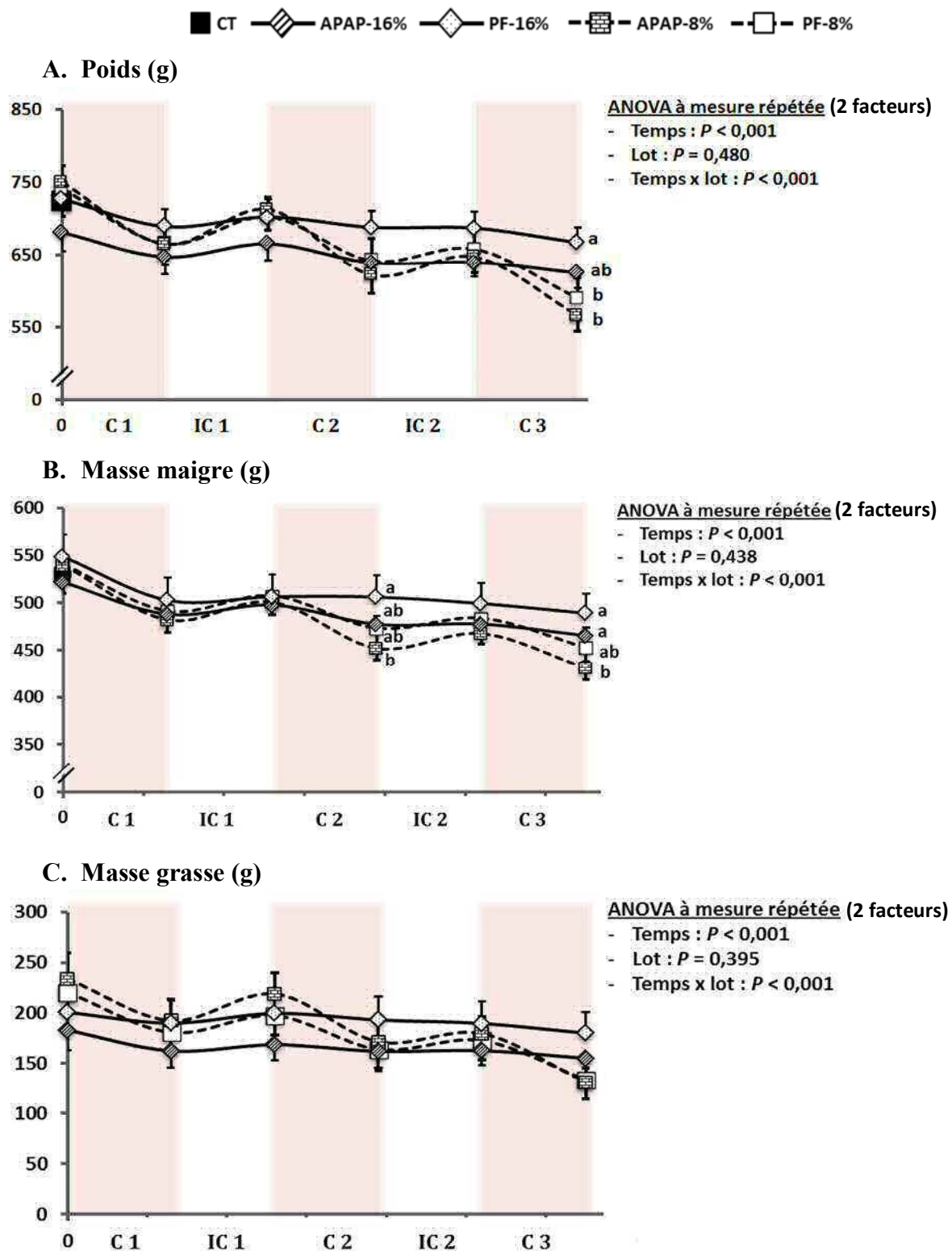
\* *P* ≤ 0,01; \*\* *P* ≤ 0,001; APAP-8% vs. APAP-16%, test *t* de Student.

l'expérience (22 mois) afin d'évaluer l'évolution du statut musculaire entre 22 et 24 mois. Le lot APAP-16% a reçu un régime à 16% de protéines supplémenté à 1% de paracétamol (16%-APAP-diet, **tableau 1**). Le lot PF-16% a reçu le même régime non supplémenté en paracétamol (16%-diet) en quantité identique à celle ingérée par le lot APAP-16% (pair-feeding). Le même schéma a été appliqué aux lots à 8% de protéines (APAP-8% et PF-8%). Les lots APAP ont reçu le paracétamol par cures de deux semaines (C1, C2 & C3), espacées de deux semaines sans paracétamol (inter-cures, IC1 & IC2). Les lots APAP et PF ont été sacrifiés au terme de la 3<sup>ème</sup> cure. Les régimes à 8% ont été supplémentés en huile de poisson et en mélange minéral afin de les ajuster aux quantités apportées par les protéines de poisson supplémentaires des régimes à 16%. Les régimes ont été rendus isocaloriques par ajout d'amidon. Les animaux, ainsi que leurs ingérés, ont été pesés quotidiennement et leur composition corporelle a été analysée (Echo MRI) à chaque début et fin de cure. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA à mesures répétées suivies du test PLSD de Fisher pour les données concernant le poids, l'ingéré et la composition corporelle des animaux. Les données obtenues à l'euthanasie ont été analysées par ANOVA à une voie suivie du test *t* de Student. Les différences entre lots ont été considérées significatives pour  $P \leq 0,05$ .

## **EFFET DU TAUX PROTEIQUE DU REGIME SUR LA PRISE ALIMENTAIRE**

Les résultats des lots ayant consommés le régime à 16% de protéines sont présentés en détail dans l'article n°3. Ils ont été repris ici afin de les comparer aux lots à 8% de protéines.

*Ingéré.* Le lot APAP-16% a significativement diminué son ingéré de 33% en C1 et C3 et de 19% en C2 par rapport au T0 (**Tableau 2**). Le lot APAP-8% a significativement baissé son ingéré de 45% dès la 1<sup>ère</sup> cure (C1) ( $P \leq 0,001$  vs. T0), sans différence significative avec le lot APAP-16%. En revanche, en C2 la baisse d'ingérée s'est aggravée (54%,  $P \leq 0,001$  vs. T0) et l'ingéré moyen ainsi que la quantité de paracétamol reçue sont significativement inférieurs par rapport au lot APAP-16%. En C3 le lot APAP-8% a baissé d'avantage son ingéré à 65% du T0 ( $P \leq 0,001$  vs. T0,  $P \leq 0,01$  vs. C1 et  $P \leq 0,05$  vs. C2). Ceci a conduit à une quantité de paracétamol ingérée par le lot APAP-8% significativement inférieure de 40% ( $P \leq 0,001$ ) en C3, par rapport au lot APAP-16% (**Tableau 2**). Il est à noter qu'en IC1, le lot APAP-8% a fortement augmenté son ingéré, ce qui a conduit à un décrochage du lot pair-fed dont l'ingéré est significativement inférieure de 15% sur cette période ( $P \leq 0,01$ ). De ce fait, lors de l'IC2,



**Figure 1.** Évolution du poids (A), de la masse maigre (B) et de la masse grasse (C) (g). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM

APAP: paracétamol; C: Cure; CT: contrôle; IC: Inter-Cure; PF: Pair-Fed.

a, b, les valeurs ne partageant pas de lettre en commune sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$  ANOVA à mesure répétée suivie du test PLSD de Fischer).

le lot APAP-8% a été restreint afin qu'il n'y ait pas de différence d'ingéré significative entre ce lot et son PF. Cet effet ne s'est pas produit pour les lots à 16%.

*Poids, masses maigre et grasse.* La composition corporelle ainsi que le poids des rats sont significativement modifiés suivant les variations d'ingéré (**Figure 1**, ANOVA à mesure répétée, effet temps  $P \leq 0.001$ ). Aucun effet lot n'a été mis en évidence pour ces paramètres, mais une interaction entre le temps et le lot est à noter (**Figure 1**, ANOVA à mesure répétée, interaction  $P \leq 0.001$ ). Au terme de la 3<sup>ème</sup> cure, les lots PF et APAP présentent un poids respectivement 12% ( $P \leq 0,05$ ) et 15% ( $P \leq 0,01$ ) inférieur au PF-16% (**Figure 1**). En ce qui concerne la masse maigre, à l'issue de la C2 et C3, la masse maigre du lot APAP-8% est inférieure de 11% ( $P \leq 0,01$ ) et 12% ( $P \leq 0,01$ ), respectivement par rapport au PF-16%. La masse grasse n'est jamais significativement différente entre les lots.

La présence du paracétamol dans le régime à faible taux protéique (8%) a conduit à un refus important du régime par les rats. L'ingéré est significativement plus faible pour le lot APAP-8% de 37% et 45% en C2 et C3 respectivement, par rapport au lot APAP-16%. Cette diminution a conduit à une ingestion plus faible de paracétamol (même supplémentation). De ce fait, cette étude ne permet pas de conclure sur l'effet spécifique d'un faible apport protéique avec un traitement chronique au paracétamol. Pour cette raison, les lots à 16% de protéines ayant maintenu un ingéré correct, ont été analysés séparément afin d'étudier l'impact du paracétamol en chronique sur la masse musculaire chez l'âgé (Publication n°3). L'analyse des lots à 8% de protéines est présentée par la suite sous forme de données complémentaires.



### PUBLICATION N°3

**Objectif:** Le but de cette étude était de déterminer si les effets observés chez l'adulte, traité à 1% de paracétamol, sur la perte de masse musculaire étaient présents chez l'âgé et si un traitement chronique conduisait à une aggravation/induction de la sarcopénie.

**Méthode:** Le modèle utilisé est celui mis au point dans l'expérience 1 soit 1% de paracétamol administré dans un régime à 16% de protéines couvrant et étant supérieur au besoin. Dans cette expérience, le paracétamol a été administré par cures afin de mimer la prise récurrente de paracétamol chez les personnes âgées souffrant de douleurs chroniques. Les animaux ont donc reçu 3 cures de 2 semaines, chacune espacée de 2 semaines sans paracétamol et sacrifiés au terme de la 3<sup>ème</sup> cure. Durant les périodes inter-cure les animaux ont reçu le même régime qu'en cure, non supplémenté en paracétamol. Avant euthanasie les animaux ont reçu une large dose de valine <sup>13</sup>C afin de mesurer la synthèse protéique musculaire et hépatique.

**Principaux résultats:** Le traitement au paracétamol par cures a généré une perte de masse musculaire généralisée. Cette perte est associée à une diminution de la synthèse protéique musculaire ainsi qu'à une diminution du glutathion aussi bien musculaire que plasmatique et hépatique.

**Conclusion:** Chez le sujet âgé, le traitement chronique sur le long terme génère une aggravation de la sarcopénie malgré des apports alimentaires couvrant et dépassant le besoin de l'organisme hors traitement. Les baisses du glutathion au niveau tissulaire et plasmatique et la diminution de la Cys libre circulante semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle le paracétamol engendrerait un besoin supplémentaire au niveau hépatique qui ne pourrait pas être couvert par des apports alimentaires couvrant le besoin hors traitement.

**Muscle mass and protein synthesis decreased in long-term therapeutic paracetamol (acetaminophen) treatment in old rats**

**Carole Mast<sup>1</sup>, Isabelle Savary-Auzeloux<sup>1</sup>, Didier Rémond<sup>1</sup>, Corinne Pouyet<sup>2</sup>, Delphine Centeno<sup>2</sup>, Guillaume Voyard<sup>3</sup>, Lydie Combaret<sup>1</sup>, Dominique Dardevet<sup>1</sup> and Isabelle Papet<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> *INRA, Centre Clermont-Ferrand – Theix, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France, Univ Clermont 1, UFR Médecine, UMR1019, Unité Nutrition Humaine, F-63001 Clermont-Ferrand, France.*

<sup>2</sup> *Plateforme d'Exploration du Métabolisme, INRA, Centre Clermont-Ferrand - Theix, UMR 1019 Nutrition Humaine, Saint-Genès-Champanelle, F-63122, France.*

<sup>3</sup> *Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, équipe photochimie, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.*

Corresponding author: Isabelle Papet, Unité de Nutrition Humaine, INRA Theix, 63122 Saint-Genès-Champanelle, France. Telephone +33 4 73 62 42 01. Fax +33 4 73 62 47 55 email : [Isabelle.Papet@clermont.inra.fr](mailto:Isabelle.Papet@clermont.inra.fr).

Keywords: sarcopenia, protein metabolism, acetaminophen, glutathione, sulfur amino acids

Headline : Paracetamol decreased muscle mass in rat

## INTRODUCTION

Sarcopenia is the age-related involuntary loss of muscle mass and strength associated with normal ageing (1). Sarcopenia is a multifactorial event affected by intrinsic (e.g. age, hormonal change) and extrinsic (e.g. disease, nutrition) factors (2–4). When advanced, muscle loss is linked to morbidity and increased mortality (5, 6) and sarcopenia is a highly predictive factor of frailty (2, 5, 7–9). Medication is a common factor contributing to frailty (10–12) as it impacts nutritional status, weight loss and functional ability in elderly (13,14). Chronic pain is experienced by 25-76% of home dwelling elderly and 83-96% of home care residents (15).

The recommended first intention medicine for pain management in elderly is paracetamol (APAP) (15–17) as APAP is considered to be a safe drug with a good benefit/risk ratio. Nevertheless our previous work in adult rats fed *ad libitum* a 1% APAP diet (i.e. an equivalent of the therapeutic human dosage of 4g.d<sup>-1</sup>) for 17 days showed a 37% decrease in nitrogen balance associated with a 8% reduction in muscle mass (18). This chronic treatment decreased protein and GSH contents in all studied tissues (i.e liver, small intestine and gastrocnemius). As 43% of APAP was conjugated to sulphate and 11% to GSH (18) for detoxification purposes, this represented a significant additional utilization of cysteine (Cys). The elimination of APAP conjugates in urines led to an irreversible loss of Cys in urine. GSH and proteins represents the two storage forms of Cys (19) and their decreases associated with APAP intake leads to a potential decrease of Cys availability for protein synthesis. This decreased of Cys availability was supposed to be the main cause of the decline of muscle mass.

Considering that, even in healthy well-nourished adults, chronic therapeutic APAP can alter GSH, protein anabolism and muscle mass, it remains to be evaluated if a chronically intake of APAP in the elderly population is safe regarding sarcopenia and frailty. Furthermore, with ageing, GSH concentration and synthesis, and the activities of antioxidant enzymes are already known to be altered (20, 21). In addition, it has been shown that APAP leads to a hepatic GSH decrease in old mouse that is not recovered after 24h (22) suggesting that chronic APAP treatment could lead to a severe GSH decrease if the GSH pool is not replenished between APAP administrations. With the potential additional decrease of GSH with the APAP intake, the resulting oxidative stress could indirectly cause a loss of muscle strength and functionality (23, 24). In oxidative stress situations, Cys is considered as a conditionally indispensable amino acid as its increased requirement could not be covered by its endogenous synthesis from methionine especially when protein intake remained low (25–27). Cys requirement is then not covered and physiological priorities are probably not in favor

of muscle protein synthesis as it is not a vital organ. Taken all together, it may be hypothesized that chronic therapeutic treatments with APAP could be an additional risk factor for sarcopenia in elderly. Surprisingly, no study has been performed yet to objectively assess the impact of APAP on GSH status and Cys requirements and its potential risk in sarcopenia development. The aim of our study is then to provide an integrative view of the impact of APAP treatment on hepatic sulfur amino acid metabolism (GSH and aminothiols status and availability) and its consequences on muscle protein content and synthesis in old rats.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals and experimental design*

This study was performed in accordance with current legislation on animal care and experimentation in France and received the approval (CE 02-12) of the local Ethical Committee, CEMEEA (Comité d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale Auvergne). Twenty-month-old male Wistar rats (Janvier Labs, Saint Berthevin, France), were acclimatized 8 weeks in individual cages under standard conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12 h light/dark cycle) and free access to water and food (A04 from SAFE (Scientific Animal Food and Engineering), Villemoisson-sur-orge, France). They were adapted for 5 days to the experimental control diet (i.e 16% protein diet without APAP). At the end of this adaptation period, rats were randomly divided into three groups based on body weight, food consumption and body composition (i.e. lean and fat masses). Ten rats were euthanized as control reference before the experimental period (CT,  $745 \pm 32$  g), 15 rats (APAP,  $710 \pm 30$  g) were submitted to 3 cure periods (C1, C2 and C3) of 2 weeks of APAP treatment (1% w/w of diet), spaced by 2 weeks of intercure (IC1 and IC2) periods without APAP. Eleven rats (PF,  $721 \pm 33$  g) were fed the control diet adjusted on APAP rats’ consumption along the experimental period. Body weight and food consumption were recorded daily. Body composition was assessed using magnetic resonance imaging (Echo MRI international, Houston, TX, USA) at the beginning and the end of every APAP cure. At the end of the experiment, APAP and PF rats were euthanized under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, intra peritoneal) by aortic blood withdraw. Plasma was separated by centrifugation at  $2000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$  and immediately frozen in liquid nitrogen. Liver, small intestine (SI), spleen and kidneys were immediately removed washed with saline and weighed. Skeletal muscles: *gastrocnemius* (GM), *tibialis anterior* (TA), *soleus* (SOL) and *extensor digitorum longus* (EDL) were carefully dissected from the left posterior leg and weighed. Immediately after being weighed GM, liver and SI were frozen in liquid nitrogen. All frozen samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$

before analyses. Frozen tissues were finely pulverized in liquid nitrogen using a ball mill (Danguomeau, Prolabo, Paris, France) prior to analyses.

#### *Paracetamol administration*

Powder APAP was mixed with all ingredients during preparation of the diet. The dose of 1% of diet was chosen as an equivalent of human 4 g/d reported to the amount of dry matter ingested in humans about 400 g/d as previously described (18). The cure model was chosen to reproduced treatment of chronic pain in human that is defined as daily pain lasting for at least 3 months (28). The length of treatment was adapted here to rat lifespan.

#### *Measurement of in-vivo protein synthesis*

Protein synthesis rates were measured using the flooding dose method as previously described (29). Briefly, each rat received an intravenous injection of [1- <sup>13</sup>C] valine (Cambridge Isotope Laboratories) (80%, 150 μmoles/100g body) 25 min before euthanasia to flood the precursor pool with [1- <sup>13</sup>C] valine. GM muscle was chosen for protein synthesis assay because of its fiber type composition (mixed) and its size allowing multiple assays once milled. Free and protein-bound valine enrichments were determined as previously described (30).

#### *Calculations*

Absolute synthesis rate (ASR) was calculated as the product of protein fractional synthesis rate (FSR) and total protein content of the tissue and expressed in mg/d. Briefly, FSR (in %/d) was calculated from the formula:  $FSR = 100 \times (Eb - En)/(Ea(t_{1/2}) \times t)$ , where  $t$  is the time interval between the end of the bolus injection and the killing of rats (incorporation period expressed in day);  $En$  is the natural enrichment of protein-bound valine, measured on rats not submitted to [1- <sup>13</sup>C] valine injection;  $Eb$  is the enrichment of protein-bound valine at the end of the incorporation period; and  $Ea(t_{1/2})$  is the <sup>13</sup>C enrichment of free valine calculated at a time half-way between injection and killing, to take into account the decline in  $Ea$  during measurement. In plasma, an initial  $Ea(0)$  level was assumed to be 80% and  $Ea(t)$  was measured. The change in tissue  $Ea$  was assumed equivalent to plasma  $Ea$  change. Tissue  $Ea(t_{1/2})$  was then calculated by adding half of the difference between final and initial plasma  $Ea$  to the final tissue  $Ea$ .

#### *Measurement of proteolysis activities*

The proteolytic activities were measured as previously described (31) with some modifications. Samples of powdered GM were homogenized in 10 vol of an ice-cold buffer (pH 7.5, 50 mM Tris-Cl, 250 mM sucrose, 10 mM ATP, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT and 0.2 mM PMSF). Proteasomes were isolated by three sequential centrifugations as described in (32). Briefly, homogenates were centrifuged at 10,000 x g for 20 min at 4°C. Supernatants

were then centrifuged at 151,500 x g for 30 min at 4°C. The resulting supernatants were finally centrifuged at 151,500 x g for 2h30 at 4°C. The resulting protein pellets were resuspended in 150 µl of a 20% glycerol buffer (pH 7.5, 50 mM Tris-Cl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, (buffer B)). Protein concentration was determined on these resuspended pellets using the Bio-Rad protein assay kit. The proteasome chymotrypsin- and trypsin-like activities were determined by measuring the hydrolysis of the fluorogenic substrates succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin (LLVY-AMC), (Enzo Life Sciences), succinyl-Leu-Arg-Arg-AMC (LRR-AMC), (Pep Institute), respectively. Six microliters (~15 µg proteins) of the resuspended pellets from GM were diluted in 9 µl of buffer B and added to 60 µl of a reaction buffer (pH 7.5, 50 mM Tris-Cl, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM DTT, and 0.012 U apyrase) containing either 300 µM LLVY-AMC or 800 µM LRR-AMC to measure the proteasome chymotrypsin- and trypsin-like activities, respectively. Experiments were realized with and without inhibitors of the chymotrypsin-like (40 µM MG132; Enzo Life Sciences) and the trypsin-like (100 µM MG132). Activities were determined by measuring the accumulation of the fluorogenic cleavage product (AMC) using a luminescence spectrometer (FLX800, Biotek, Winooski, VT, USA) for 60 min at 380 nm excitation wavelength and 440 nm emission wavelength. Then, the activities were determined by calculating the difference between arbitrary fluorescence units recorded with or without MG132 in the reaction medium. The time course for the accumulation of AMC after hydrolysis of the substrate was analyzed by linear regression to calculate activities, i.e., the slopes of best fit of accumulation AMC vs. time. The final data were corrected by the amount of protein. Chymotrypsin- and trypsin-like activities are expressed in relative fluorescent unit (RFU).µg<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>.

#### *Tissue Protein content*

Total protein content was quantified after digestion of powdered tissue in 8 vol of 0.3 N NaOH at 37°C during 2h using a Bicinchoninic acid (BCA) assay reagent kit, as previously described (33). Bovine serum albumin (BSA) was used as standard. Total proteins were expressed as g or mg per organ.

#### *Tissue GSH content*

Total GSH (reduced plus oxidized) was quantified with an automated analyzer (ABX Pentra 400, Horiba, Montpellier, France) using a standard enzymatic recycling procedure and 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (Ellman reagent) as oxidant (34). Total GSH was expressed as µmol per organ or muscle.

#### *Plasma amino acid measurement*

Plasma amino acids were purified, i.e. 500 µl of plasma was added to 125 µl of sulfosalicylic

acid solution (1 mol/L in ethanol with 0.5 mol/L thiodiglycol) previously completely evaporated. Norleucine (100  $\mu$ l) was added as an internal standard. Amino acid concentrations were determined using an automated amino acid analyzer with BTC 2410 resin (Biotronic LC 3000, Roucaire, Velizy, France). Amino acids concentrations were expressed in  $\mu$ mol/L.

#### *Plasma total aminothiols measurement*

Plasma total cysteine, homocysteine, cysteine-glycine and glutathione (aminothiols) were quantified by reversed-phase HPLC conditions and fluorescence detection (35). Briefly, aminothiols were reduced via incubation with tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride, followed by protein precipitation with trichloroacetic acid and derivatization with ammonium-7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonic acid. An Alliance HPLC system (Waters, Guyancourt, France) was equipped with a hypersil gold column (4.6 x 150 mm, 3  $\mu$ , Thermo Scientific, Illkirch, France). The two mobile phases consisted of A: 0.1M acetate buffer (pH 4.5)–methanol 97:3 (v/v) and B: A: 0.1M acetate buffer (pH 4.5)–methanol 78:22 (v/v). Aminothiols were separated over 2 min with 100 % A at a flow rate of 1 ml/min, followed by 100 % B (changed linearly over 1 min) at a flow rate of 1.0 ml/min for 7 min, and 5 min of column re-equilibration for a total run time of 16 min. Free aminothiols (i.e. reduced forms plus homo- and hetero-disulfide forms not bound to proteins) were quantified in plasma samples after removal of proteins, followed by reduction of di-sulfide bounds using the same analytical method. Plasma aminothiols bound to proteins through disulfide bridges were calculated as differences between total and free concentrations. Aminothiol concentrations were expressed in  $\mu$ mol/L.

#### *Hepatotoxicity marker measurements*

Hepatotoxicity was assessed by measurement of plasma aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels by photometric method using an automated analyzer (ABX Pentra 400, Horiba, Montpellier, France) and test kits A11A01629 and A11A01627 (Horiba), respectively. Data were expressed in IU.l<sup>-1</sup>.

#### *Statistical analysis*

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Body weight, lean and fat masses were analyzed using analysis of variance (ANOVA) for repeated measures with time as the within-rat factor and group as the second variable followed by Fischer's PLSD test when significant differences were obtained by ANOVA for repeated measure. Other results were analyzed using a one-way ANOVA followed by Student's *t* test for unpaired data when significant differences were obtained for ANOVA. Significance was set at  $P \leq 0.05$  and trend at  $P \leq 0.10$ .



Analyses were performed using XLSTAT for Windows, version 2013.1.01 software (Addinsoft, SARL, USA).

## RESULTS

### *Daily food intake*

During the adaptation period, food intake was not significantly different between all groups (**Table 1**). During experimental period, APAP consumption led to a decrease of food intake, which was partially restored during the intercure periods (**Table 1**). Food intake was adjusted for the PF group and matched well that of the APAP group as there was no group effect or interaction with time effect (ANOVA for repeated measure).

*Body weight and composition.* There was no significant difference in the initial body weights, lean and fat masses of rats between all experimental groups (**Fig. 1**). In both APAP and PF groups, body weights, fat and lean mass decreased along the decrease of food intake during the 3 cures (time effect  $P<0.001$ , ANOVA for repeated measures). However, APAP treatment had no further effect on these parameters as there were no group effects or interactions.

### *Skeletal muscles and organs masses*

*Skeletal muscles masses.* Results are presented in **Fig.2(A)**. Sum of hindlimb muscle masses of PF group tended to decreased by 13% at the end of the experimental period compared to the CT group ( $P=0.087$ ). APAP treatment lead to a significant decrease of the sum of muscle masses by 11% and 23% when compared to the PF ( $P<0.05$ ) and the CT group ( $P<0.001$ ), respectively. When individual hindlimb muscles were considered, a similar decrease was observed. EDL mass decreased by 11% and 19% when compared to the PF ( $P\leq 0.05$ ) and CT group ( $P\leq 0.001$ ). APAP treatment also lead to a significant decreased in the GM (25%,  $P\leq 0.001$ ) and TA (20%,  $P\leq 0.05$ ) muscle masses when compared to the CT group. Compared to PF group APAP tended to decreased GM mass by 11% ( $P=0.074$ ).

*Organ masses.* Contrarily to skeletal muscle, small intestine and liver masses (**Fig.2(B)**) in the PF group were significantly decreased when compared to CT by 21% ( $P\leq 0.001$ ) and 29% ( $P\leq 0.001$ ), respectively. APAP treatment did not further decrease SI mass when compared to PF (21%  $P<0.001$  vs CT). By contrast, APAP treatment did not result in a significant decrease of liver mass when compared to CT (+12%,  $P=0.075$ ) and was significantly increased by 24% ( $P<0.01$ ) than in the PF.

### *Skeletal muscle and liver protein synthesis and protein content*

When compared to the CT group, skeletal muscle total protein content (**Fig.3(A)**) decreased by 18% ( $P\leq 0.05$ ) and 30% ( $P<0.001$ ) in the PF and APAP groups, respectively. The



difference in muscle protein content between the PF and APAP groups tended ( $P=0.064$ ) to decrease. Skeletal muscle protein synthesis (**Fig.3(B)**) was not significantly different from the CT in the PF whereas a significant decrease was observed in the APAP (16% ( $P\leq 0.05$ ) and 27% ( $P\leq 0.001$ ) vs. PF and CT, respectively). Liver total protein content (**Fig.3(A)**) decreased by 20% ( $P\leq 0.001$ ) and 15% ( $P<0.05$ ) in the PF and APAP groups, respectively compared to the CT group. Compared to PF, APAP treatment had no further significant effect on liver total protein content. Liver protein synthesis (**Fig.3(B)**) decreased by 21% from the CT ( $P\leq 0.05$ ) in the PF group whereas there was no significant difference with APAP treatment. At the contrary compared to PF group, liver protein synthesis was significantly increased by 20% ( $P\leq 0.05$ ) in the APAP group.

#### ***Skeletal muscle proteasome activities.***

We have measured the step of protein degradation by the 26S proteasome, chymotrypsin- and the trypsin-like activities of the proteasome were not significantly difference between the 3 groups (data not shown).

#### ***GSH content in blood, small intestine, skeletal muscle and liver.***

Blood GSH (**Fig.4(A)**) was not significantly different from the CT in the PF group whereas a significant increase by 74% was observed in the APAP group ( $P\leq 0.001$ ). The same extent was observed compared to the CT group ( $P\leq 0.001$ ) without modification of the hematocrit between all groups (data not shown). At the opposite plasma total GSH was not different from the CT in the PF group whereas a significant decreased occurred in APAP by 25% ( $P\leq 0.01$ ) and 20% ( $P\leq 0.05$ ) compared to CT and PF, respectively. When compared to the CT group, liver total GSH (**Fig.4(B)**) was decreased by 37% ( $P\leq 0.001$ ) and 69% ( $P\leq 0.001$ ) in PF and APAP group, respectively. APAP led to a further decrease by 51% compared to PF group ( $P\leq 0.001$ ). At the contrary in small intestine total GSH was decreased by 20% in PF compared to CT group ( $P\leq 0.001$ ) and no further depletion was observed with APAP. In skeletal muscle, compared to CT, PF total GSH content tended to decrease ( $P=0.085$ ) whereas APAP led to a further decreased by 39% ( $P\leq 0.001$ ) and 27% ( $P\leq 0.001$ ) compared to CT and PF group, respectively.

#### ***Plasma amino acids concentrations.***

Indispensable amino acids (IAA, (**Table 2**)) were decreased in PF and APAP group by 27% ( $P\leq 0.01$ ) and 15% ( $P\leq 0.05$ ), respectively when compared to CT. When treated with APAP, the concentration of IAA tended to increase ( $P=0.059$ ) by 16% compared to PF. Regarding the sulphur amino acids, PF presented also significant decrease of methionine (-51%,  $P\leq 0.001$ ), cystine (-50%,  $P\leq 0.001$ ) and taurine (-39%,  $P\leq 0.001$ ) in comparison to the CT

group. When rats were treated with APAP, plasma methionine and taurine concentrations were significantly increased +65%, ( $P \leq 0.001$ ) and +29% ( $P \leq 0.05$ ), respectively when compared to the PF group and tended to decrease when compared to the CT group (-20%  $P = 0.091$  and -21%,  $P = 0.060$ , respectively).

### ***Plasma aminothiols concentrations***

*Free forms.* GSH concentration was unaffected in the PF group compared to CT, whereas the APAP treatment decreased GSH concentration by 29% ( $P \leq 0.001$ ) and 27% ( $P \leq 0.01$ ) when compared to the CT and PF groups, respectively (**Table 2**). Cysteine+cystine (Cyst(e)ine) concentration slightly increased in the PF (+13%,  $P \leq 0.05$ ) when compared to the CT group, whereas the APAP group exhibited a decreased Cyst(e)ine concentration compared to the PF (-28%,  $P \leq 0.001$ ) and the CT group (-20%, ( $P \leq 0.01$ ), respectively. Homocysteine followed the inverse pattern with a significant decrease (-26%,  $P \leq 0.05$ ) in the PF group compared to the CT whereas no more significant difference with the CT group was observed when rats were treated with APAP (**Table 2**). Compared with PF, homocysteine was significantly increased by 41% ( $P \leq 0.01$ ) with APAP treatment.

*Protein-bound forms.* The concentration of Cys bound to plasma proteins was similar between the 3 experimental groups (**Table 2**). The protein bound forms of GSH and homocysteine decreased significantly with the pair-feeding (-41%  $P \leq 0.001$  and -32%,  $P \leq 0.05$  respectively) whereas the APAP treatment increased back their concentrations to be no more significantly different from the CT group (GSH) or even increased when compared to the CT groups with the protein bound homocysteine forms (+28% and +117% vs CT and PF groups, respectively). Finally, plasma protein bound dipeptide Cys-Gly was only increased when rats were treated with APAP (+21%  $P \leq 0.05$  and 32%  $P \leq 0.05$  compared to CT and PF groups, respectively).

## **DISCUSSION**

Aging is associated with a gradually decline in skeletal muscle mass and functionality named sarcopenia. This loss of muscle mass is associated with physical impairment, increased dependence, frailty and mortality. Pathophysiology of sarcopenia is complex and multifactorial. Among the leading factors, increased oxidative stress and inadequate protein intake are common feature with advancing age (36–38). Indeed, older persons have been shown to exhibit a decreased GSH status and an increased protein requirement to maintain skeletal muscle protein anabolism. Muscle mass loss occurring during ageing can also be worsened by incomplete recoveries after acute catabolic events occurring throughout the life.

This was described by (39) as the “catabolic crisis model”. To illustrate that concept, various results from our group have shown that after a catabolic event induced by glucocorticoids (Dardevet *et al.*, 1995), starvation (Mosoni *et al.*, 1999) or immobilization (Magne *et al.*, 2011), the muscle mass recovery after the catabolic event was not total in old rats, whereas it was entirely recovered in adults. The data from the present work are entirely in line with this concept as we have shown for the first time that repeated therapeutic APAP treatment could aggravate sarcopenia even with adequate protein intakes. Indeed, APAP repeated cures led to a 23% loss of muscle mass (*vs* CT) and 11% was specifically due to APAP (i.e. compared to PF). So long term repeated APAP treatment could be a non-negligible factor in secondary sarcopenia. We have recently shown that a similar impact of APAP treatment on muscle mass occurred in adults (18).

Muscle mass is determined by the balance between anabolic and proteolytic pathways. As summarized recently by Dardevet *et al* (2012), the muscle anabolic response depends both on the availability of amino acids to stimulate protein synthesis and on the ability of the muscle to respond to the stimuli. Concerning this latter aspect, it is already known that aging is marked by a muscle protein metabolism resistance to anabolic stimuli such as insulin and amino acids (40–45). This is observed with adequate protein intakes and exacerbated with low protein supply (46, 47). The occurrence of an increased oxidative status with APAP treatment is probable as we have shown a decreased GSH level at the tissues levels, (muscle and liver) and in plasma. Indeed, the decreased muscle GSH content is known to stimulate the oxidative stress in aging muscle (22, 48, 49). Oxidative stress is one of the factors able to induce muscle anabolic resistance and, as such, is considered to be a contributing factor to sarcopenia (50). In the present study, the increased oxidative stress is generalized as, compared to PF, the protein-bound forms of aminothiols (GSH, Hcy and Cys-Gly) increased with APAP whereas free forms mainly decreased (GSH and cyst(e)ine). Consequently, in the present study, an inhibition of the muscle response to anabolic factors in the APAP treated animals due to an increased oxidative stress can contribute to decreased protein synthesis.

The second possibility explaining the decreased muscle anabolism is the decreased availability of AA (considered as limiting AA and as signal). First, we have shown that repeated APAP cures significantly decreased muscle ASR compared to PF whereas no effect was observed on proteasome activities. Consequently, the hypothesis of a decreased availability of one or several AA to synthesize overall muscle protein synthesis deserves thorough discussion. It is common knowledge that if an indispensable amino acid is missing or its metabolic need is increased (e.g. Cys in sepsis and acute inflammation) this leads to

decreased protein synthesis, particularly in muscle (51). In this context, our results show that APAP lead to a decreased in plasma Cys and a generalised decreased GSH status. In muscle, GSH decreased by 27% in comparison with PF; previous work having shown that GSH could be catabolised by muscle as source of Cys in case of Cys restriction (52, 53). Those data concur to show important requirements of Cys at the muscle level which; if Cys is not supplied sufficiently, this amino acid could become limiting for protein synthesis and ultimately lead to muscle mass loss. Usually, Cys is not a strictly indispensable AA but conditionally become indispensable when its endogenous synthesis from methionine and serine cannot be sufficient to cover the metabolic need (51). Our results shown that plasma methionine is increased in treated rats compared to PF but skeletal muscle cannot synthesize Cys from methionine as muscle lacks the necessary enzymes (54, 55). Skeletal muscle is hence dependent on Cys furniture by food intake, protein and GSH degradation and its endogenous synthesis mainly occurring in liver. As liver GSH was strongly decreased and plasma Cys was also decreased, we can hypothesized that liver endogenous Cys synthesis will be prioritise for its own needs.

Conversely, protein liver mass and ASR increased with APAP repeated cures, compared to PF. This stimulated protein metabolism at the splanchnic level also fits with the concept of limiting AA for muscle protein synthesis. Indeed, splanchnic organs are known to have priority for use of circulating AA as the splanchnic extraction of amino acids has been shown to be increased with ageing (56). The decreased plasma free Cys with APAP treatment could then be the result of a higher splanchnic, and more precisely hepatic Cys extraction, due to the higher hepatic protein synthesis, and the increased Cys turnover for GSH synthesis as previously shown with therapeutic APAP doses (57). This higher hepatic utilization could limit the Cys supply to skeletal muscle. Another hepatic metabolic pathway capable to use Cys extensively is GSH synthesis. APAP detoxification takes place at the hepatic level (i.e. where the GSH decreased occurred at the largest extent). As we have previously shown (18), 43% of APAP was conjugated to sulphate and 11% to GSH. Cys is the main source of sulphate and the limiting AA in GSH synthesis, and APAP represents a subsequent utilization of Cys to replenish GSH and sulphate stores. Liver is hence recognized to be a significant supplier of plasma GSH (58–60) and this mechanism is important for maintenance of peripheral GSH status and Cys availability. In accordance with our previous results the hepatic GSH decrease could be responsible for the peripheral (plasma and muscle) decreased in GSH stores.

In conclusion our results enlighten the fact that repeated APAP treatment lead to a decreased muscle protein synthesis and mass associated with decreased GSH status and Cys availability. Recent works have shown that protein need of elderly to maintain muscle mass could be higher than the standard recommendation of 0.8 g/kg/d (61–66). Our data reinforce the idea that it could be of importance to consider and record more carefully dietary protein intake of elderly people, particularly when they are subjected to chronic APAP treatment. This is even more important considering that medication is known to be a factor responsible to altered nutritional intake (13, 14) and considering that APAP is the first prescribed pain reliever in elderly populations. Consequently, interactions between chronic APAP treatment in elderly and protein intakes should require further investigations, including evaluation of the potential beneficial effect of Cys supplementation in elderly population chronically treated with APAP.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Medhi Djelloul-Mazouz, Philippe Lhoste, Arlette Cissoire and Philippe Denis from the Installation Expérimentale en Nutrition (INRA Clermont-Ferrand-Theix, France) for their excellent assistance with animal care. This work was supported by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, France).

## Authors Contributions

Conceived and designed the experiments: CM and IP. Performed/contributed to the experiment: CM, LC, CP, IP. Analyzed the data: CM, IP. Edited and revised the manuscript: ISA, DR, DD, LC. Wrote the paper: CM, IP.

## REFERENCES

1. Cruz-Jentoft,A.J., Baeyens,J.P., Bauer,J.M., Boirie,Y., Cederholm,T., Landi,F., Martin,F.C., Michel,J.-P., Rolland,Y., Schneider,S.M., *et al.* (2010) Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, **39**, 412–423.
2. Harris,T. (1997) Muscle Mass and Strength: Relation to Function in Population Studies. *J. Nutr.*, **127**, 1004S–1006S.
3. Walrand,S., Guillet,C., Salles,J., Cano,N. and Boirie,Y. (2011) Physiopathological Mechanism of Sarcopenia. *Clin. Geriatr. Med.*, **27**, 365–385.
4. Sakuma,K., Aoi,W. and Yamaguchi,A. (2014) Current understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.*, 10.1007/s00424-014-1527-x.

5. Evans,W.J., Paolisso,G., Abbatecola,A.M., Corsonello,A., Bustacchini,S., Strollo,F. and Lattanzio,F. (2010) Frailty and muscle metabolism dysregulation in the elderly. *Biogerontology*, **11**, 527–536.
6. Fearon,K., Evans,W.J. and Anker,S.D. (2011) Myopenia—a new universal term for muscle wasting. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, **2**, 1–3.
7. Rolland,Y., Benetos,A., Gentic,A., Ankri,J., Blanchard,F., Bonnefoy,M., De Decker,L., Ferry,M., Gonthier,R., Hanon,O., *et al.* (2011) La fragilité de la personne âgée : un consensus bref de la Société française de gériatrie et gérontologie. *Geriatr. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil.*, **9**, 387–90.
8. Cooper,C., Dere,W., Evans,W., Kanis,J.A., Rizzoli,R., Sayer,A.A., Sieber,C.C., Kaufman,J.-M., Abellan van Kan,G., Boonen,S., *et al.* (2012) Frailty and sarcopenia: definitions and outcome parameters. *Osteoporos. Int.*, **23**, 1839–1848.
9. Cesari,M., Landi,F., Vellas,B., Bernabei,R. and Marzetti,E. (2014) Sarcopenia and physical frailty: two sides of the same coin. *Front. Aging Neurosci.*, **6**, 192.
10. Pickering,G. (2004) Frail elderly, nutritional status and drugs. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **38**, 174–180.
11. Jyrkkä,J., Mursu,J., Enlund,H. and Lönnroos,E. (2012) Polypharmacy and nutritional status in elderly people: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **15**, 1–6.
12. Gnjidic,D. and Hilmer,S.N. (2012) Potential Contribution of Medications to Frailty. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **60**, 401–401.
13. Agostini,J.V., Han,L. and Tinetti,M.E. (2004) The Relationship Between Number of Medications and Weight Loss or Impaired Balance in Older Adults. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **52**, 1719–1723.
14. Jyrkkä,J., Enlund,H., Lavikainen,P., Sulkava,R. and Hartikainen,S. (2011) Association of polypharmacy with nutritional status, functional ability and cognitive capacity over a three-year period in an elderly population. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.*, **20**, 514–522.
15. Abdulla,A., Adams,N., Bone,M., Elliott,A., Gaffin,J., Jones,D., Knaggs,R., Martin,D., Sampson,L. and Schofield,P. (2013) Guidance on the management of pain in older people. *Age Ageing*, **42**, i1–i57.
16. Fine,P.G. (2012) Treatment guidelines for the pharmacological management of pain in older persons. *Pain Med.*, **13**, S57–S66.
17. Klotz,U. (2012) Paracetamol (Acetaminophen) - a Popular and Widely Used Nonopioid Analgesic. *Arzneimittelforschung*, **62**, 355–359.
18. Mast,C., Joly,C., Savary-Auzloux,I., Remond,D., Dardevet,D. and Papet,I. (2014) Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol when glutathione-dependent detoxification is highly activated. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.*, **65**, 623–631.
19. Stipanuk,M.H. (2004) SULFUR AMINO ACID METABOLISM: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. *Annu. Rev. Nutr.*, **24**, 539–577.
20. Arivazhagan,P., Ramanathan,K. and Panneerselvam,C. (2001) Effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem. Biol. Interact.*, **138**, 189–198.
21. Liu,H., Wang,H., Shenvi,S., Hagen,T.M. and Liu,R.-M. (2004) Glutathione Metabolism during Aging and in Alzheimer Disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1019**, 346–349.
22. Chen,T.S., Richie,J.P. and Lang,C.A. (1990) Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.*, **18**, 882–887.
23. Reid,M.B. (2001) Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med. Sci. Sports Exerc.*, **33**, 371–376.



24. Bonetto,A., Penna,F., Muscaritoli,M., Minero,V.G., Fanelli,F.R., Baccino,F.M. and Costelli,P. (2009) Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 906–916.
25. Soeters,P.B., Poll,M.C.G. van de, Gemert,W.G. van and Dejong,C.H.C. (2004) Amino Acid Adequacy in Pathophysiological States. *J. Nutr.*, **134**, 1575S–1582S.
26. Le Floc’h,N., Melchior,D. and Obled,C. (2004) Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livest. Prod. Sci.*, **87**, 37–45.
27. Obled,C., Papet,I. and Breuillé,D. (2004) Sulfur-containing amino acids and glutathione in diseases. In *Metabolic & Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition, Second Edition*. CRC Press, p. 778.
28. Ferrell,B., Argoff,C., Epplin,J., Fine,P., Gloth,F. 3rd, Herr,K., Katz,J., Mehr,D., Reid,M. and Reisner,L. (2009) American Geriatrics Society Panel on the Pharmacological management of Persistent Pain in Older Persons. Pharmacological management of persistent pain in older persons. *Pain Med.*, **10**, 1062–83.
29. Garlick,P.J., McNURLAN,M.A. and Preedy,V.R. (1980) A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H] phenylalanine. *Biochem J*, **192**, 719–723.
30. Savary-Auzeloux,I., Magne,H., Migné,C., Oberli,M., Breuillé,D., Faure,M., Vidal,K., Perrot,M., Rémond,D., Combaret,L., *et al.* (2013) A Dietary Supplementation with Leucine and Antioxidants Is Capable to Accelerate Muscle Mass Recovery after Immobilization in Adult Rats. *PLoS ONE*, **8**, e81495.
31. Slimani,L., Micol,D., Amat,J., Delcros,G., Meunier,B., Taillandier,D., Polge,C., Bechet,D., Dardevet,D., Picard,B., *et al.* (2012) The worsening of tibialis anterior muscle atrophy during recovery post-immobilization correlates with enhanced connective tissue area, proteolysis, and apoptosis. *AJP Endocrinol. Metab.*, **303**, E1335–E1347.
32. Fang,C.H., Sun,X., Li,B.G., Fischer,D.R., Pritts,T.A., Penner,G. and Hasselgren,P.O. (2000) Burn injuries in rats upregulate the gene expression of the ubiquitin-conjugating enzyme E2(14k) in skeletal muscle. *J. Burn Care Rehabil.*, **21**, 528–534.
33. Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goetze,N.M., Olson,B.J. and Klenk,D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76–85.
34. Malmezat,T., Breuillé,D., Pouyet,C., Mirand,P.P. and Obled,C. (1998) Metabolism of Cysteine Is Modified During the Acute Phase of Sepsis in Rats. *J. Nutr.*, **128**, 97–105.
35. Nolin,T.D., McMEnamin,M.E. and Himmelfarb,J. (2007) Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: Application to studies of oxidative stress. *J. Chromatogr. B*, **852**, 554–561.
36. Calvani,R., Miccheli,A., Landi,F., Bossola,M., Cesari,M., Leeuwenburgh,C., Sieber,C.C., Bernabei,R. and Marzetti,E. (2013) Current nutritional Recommendations and Novel Dietary Strategies to Manage Sarcopenia. *J. Frailty Aging*, **2**, 38–53.
37. Marzetti,E., Calvani,R., Cesari,M., Buford,T.W., Lorenzi,M., Behnke,B.J. and Leeuwenburgh,C. (2013) Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45**, 2288–2301.
38. Lightfoot,A.P., McCormick,R., Nye,G.A. and McArdle,A. (2014) Mechanisms of skeletal muscle ageing; avenues for therapeutic intervention. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **16**, 116–121.
39. English,K.L. and Paddon-Jones,D. (2010) Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **13**, 34–39.

40. Mosoni,L., Valluy,M.C., Serrurier,B., Prugnaud,J., Obled,C., Guezennec,C.Y. and Mirand,P.P. (1995) Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am. J. Physiol.*, **268**, E328–335.
41. Dardevet,D., Rieu,I., Fafournoux,P., Sornet,C., Combaret,L., Bruhat,A., Mordier,S., Mosoni,L. and Grizard,J. (2003) Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutr. Res. Rev.*, **16**, 61.
42. Dardevet,D., Rémond,D., Peyron,M.-A., Papet,I., Savary-Auzeloux,I. and Mosoni,L. (2012) Muscle Wasting and Resistance of Muscle Anabolism: The ‘Anabolic Threshold Concept’ for Adapted Nutritional Strategies during Sarcopenia. *Sci. World J.*, **2012**, 1–6.
43. Guillet,C., Zangarelli,A., Gachon,P., Morio,B., Giraudet,C., Rousset,P. and Boirie,Y. (2004) Whole Body Protein Breakdown Is Less Inhibited by Insulin, But Still Responsive to Amino Acid, in Nondiabetic Elderly Subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**, 6017–6024.
44. Cuthbertson,D., Smith,K., Babraj,J., Leese,G., Waddell,T., Atherton,P., Wackerhage,H., Taylor,P.M. and Rennie,M.J. (2004) Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J.*, 10.1096/fj.04-2640fje.
45. Fujita,S., Glynn,E.L., Timmerman,K.L., Rasmussen,B.B. and Volpi,E. (2009) Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism. *Diabetologia*, **52**, 1889–1898.
46. Katsanos,C.S., Kobayashi,H., Sheffield-Moore,M., Aarsland,A. and Wolfe,R.R. (2005) Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.*, **82**, 1065–1073.
47. Katsanos,C.S., Kobayashi,H., Sheffield-Moore, Aarsland,A. and Wolfe,R.R. (2006) A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *AJP Endocrinol. Metab.*, **291**, E381–E387.
48. Ji,L.L., Leeuwenburgh,C., Leichtweis,S., Gore,M., Fiebig,R., Hollander,J. and Bejma,J. (1998) Oxidative Stress and Aging: Role of Exercise and Its Influences on Antioxidant Systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **854**, 102–117.
49. Capel,F., Buffière,C., Patureau Mirand,P. and Mosoni,L. (2004) Differential variation of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release during aging in oxidative and glycolytic muscles in rats. *Mech. Ageing Dev.*, **125**, 367–373.
50. Derbré,F., Gratas-Delamarche,A., Gómez-Cabrera,M.C. and Viña,J. (2014) Inactivity-induced oxidative stress: A central role in age-related sarcopenia? *Eur. J. Sport Sci.*, **14**, S98–S108.
51. Obled,C., Papet,I. and Breuillé,D. (2002) Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **5**, 189–197.
52. Cho,E.S., Sahyoun,N. and Stegink,L.D. (1981) Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during fasting and refeeding of rats. *J. Nutr.*, **111**, 914–922.
53. Cho,E.S., Johnson,N. and Snider,B.C. (1984) Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during cystine depletion in growing rats. *J. Nutr.*, **114**, 1853–1862.
54. Ishii,I., Akahoshi,N., Yu,X.-N., Kobayashi,Y., Namekata,K., Komaki,G. and Kimura,H. (2004) Murine cystathionine gamma-lyase: complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem. J.*, **381**, 113–123.
55. Stipanuk,M.H. and Ueki,I. (2011) Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **34**, 17–32.



56. Boirie, Y., Gachon, P. and Beaufrère, B. (1997) Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**, 489–495.
57. Lauterburg, B.H. and Mitchell, J.R. (1987) Therapeutic doses of acetaminophen stimulate the turnover of cysteine and glutathione in man. *J. Hepatol.*, **4**, 206–211.
58. Griffith, O.W. and Meister, A. (1979) Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **76**, 5606–5610.
59. Ookhtens, M. and Kaplowitz, N. (1998) Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin. Liver Dis.*, **18**, 313–329.
60. Griffith, O.W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.*, **27**, 922–935.
61. Morais, J., Chevalier, S. and Gougeon, R. (2006) Protein turnover and requirement in the healthy and frail elderly. *J. Nutr. Health Aging*, **10**, 272–83.
62. Wolfe, R., Miller, S. and Miller, K. (2008) Optimal protein intake in the elderly. *Clin. Nutr.*, **27**, 675–684.
63. Gaffney-Stomberg, E., Insogna, K.L., Rodriguez, N.R. and Kerstetter, J.E. (2009) Increasing Dietary Protein Requirements in Elderly People for Optimal Muscle and Bone Health: DIETARY PROTEIN AND MUSCLE AND BONE HEALTH. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **57**, 1073–1079.
64. Morley, J.E., Argiles, J.M., Evans, W.J., Bhasin, S., Cella, D., Deutz, N.E.P., Doehner, W., Fearon, K.C.H., Ferrucci, L., Hellerstein, M.K., *et al.* (2010) Nutritional Recommendations for the Management of Sarcopenia. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, **11**, 391–396.
65. Bauer, J., Biolo, G., Cederholm, T., Cesari, M., Cruz-Jentoft, A.J., Morley, J.E., Phillips, S., Sieber, C., Stehle, P., Teta, D., *et al.* (2013) Evidence-Based Recommendations for Optimal Dietary Protein Intake in Older People: A Position Paper From the PROT-AGE Study Group. *J. Am. Med. Dir. Assoc.*, **14**, 542–559.
66. Deutz, N.E.P., Bauer, J.M., Barazzoni, R., Biolo, G., Boirie, Y., Bosy-Westphal, A., Cederholm, T., Cruz-Jentoft, A., Krznarić, Z., Nair, K.S., *et al.* (2014) Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin. Nutr.*, 10.1016/j.clnu.2014.04.007.

**FIGURES:**

**Table 1.** Food intake of rats, means by periods (g.day<sup>-1</sup>). Values are means ± SEM.

	<b>Adaptation</b>	<b>C1</b>	<b>IC1</b>	<b>C2</b>	<b>IC2</b>	<b>C3</b>	<u><b>ANOVA for repeated measure</b></u>
<b>CT</b>	25.1 ± 0.7	-	-	-	-	-	-Time : <i>P</i> < 0,001 -Group : <i>P</i> = 0,174 -Time*group : <i>P</i> = 0,756
<b>PF</b>	25.4 ± 1.0	17.0 ± 0.4	21.2 ± 0.8	18.8 ± 0.4	19.1 ± 0.4	17.1 ± 0.2	
<b>APAP</b>	24.2 ± 0.6	16.8 ± 1.2	22.4 ± 0.6	19.0 ± 0.7	19.6 ± 0.2	16.7 ± 0.8	
<b>Time effect</b>	a	b	b	d	d	b	

APAP: paracetamol group ; C: Cure; CT: control group IC: Inter-cure; PF: Pair-Fed group  
a,b,c,d significantly different (*P*<0.05) between each time point

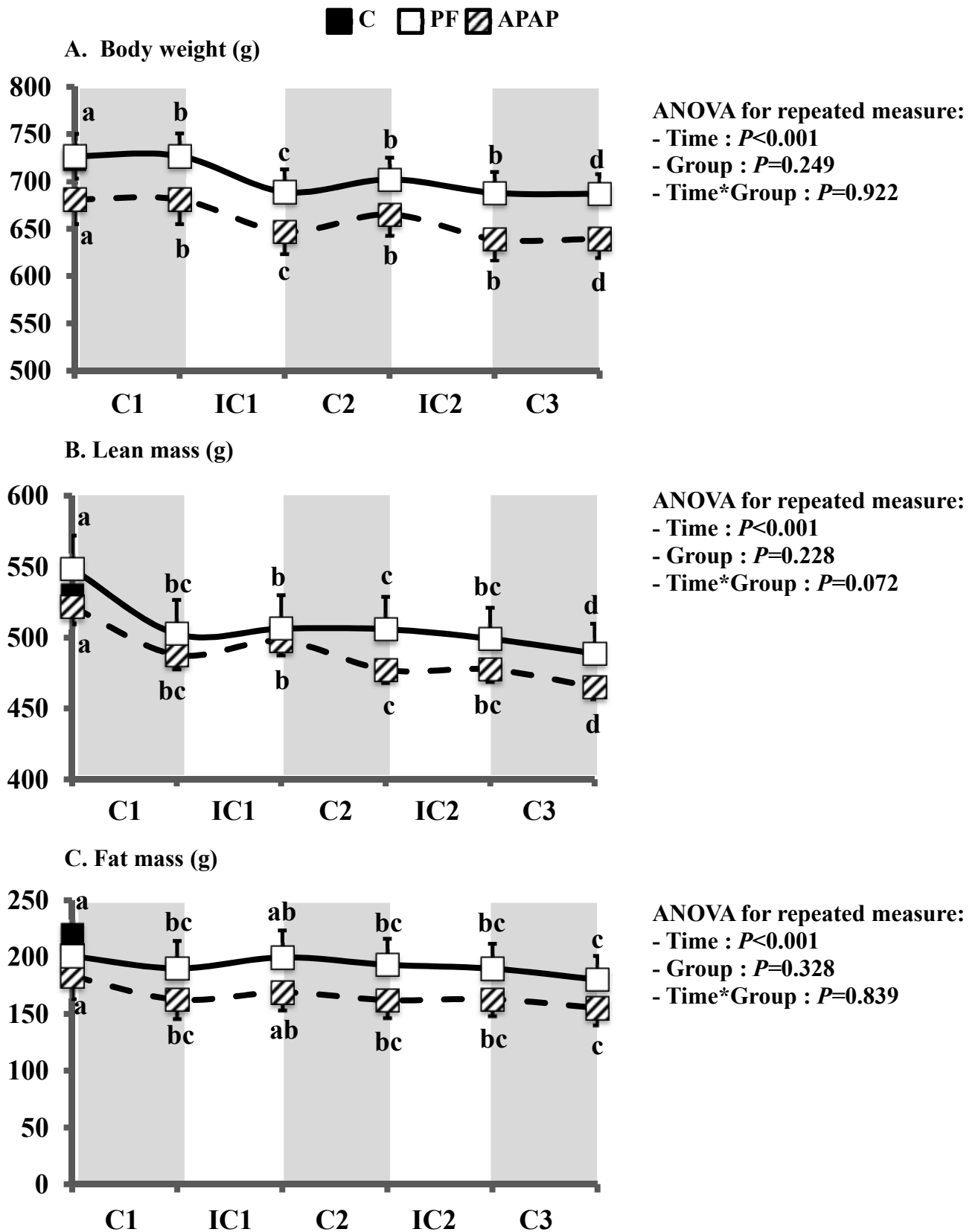
**Table 2.** Effect of APAP on free and bound plasma thiol and amino acids ( $\mu\text{mol/l}$ ). Values are means  $\pm$  SEM.

	<i>Free forms</i>				<i>Protein-bound forms</i>				<i>Amino acids</i>			
	GSH	Cyst(e)ine	Hcy	Cys-Gly	GSH	Cyst(e)ine	Hcy	Cys-Gly	IAA <sup>a</sup>	Met	CySS	Tau
CT	25.3 $\pm$ 0.8	116 $\pm$ 4	1.86 $\pm$ 0.20	0.93 $\pm$ 0.12	4.00 $\pm$ 0.32	79.4 $\pm$ 5.1	2.67 $\pm$ 0.22	1.16 $\pm$ 0.05	1238 $\pm$ 98	34.7 $\pm$ 3.0	42.4 $\pm$ 3.6	194 $\pm$ 18
PF	24.8 $\pm$ 1.1	131* $\pm$ 4	1.39* $\pm$ 0.11	0.76 $\pm$ 0.06	2.72* $\pm$ 0.34	76.0 $\pm$ 3.2	1.58*** $\pm$ 0.10	1.06 $\pm$ 0.08	901** $\pm$ 66	16.9*** $\pm$ 2.0	21.0*** $\pm$ 3.1	118*** $\pm$ 7
APAP	18.0***†† $\pm$ 1.4	94***††† $\pm$ 5	1.95†† $\pm$ 0.16	0.66 $\pm$ 0.06	4.06† $\pm$ 0.44	84.6 $\pm$ 3.9	3.43*†† $\pm$ 0.24	1.40*†† $\pm$ 0.09	1047*‡ $\pm$ 40	27.8§†† $\pm$ 2.5	26.7** $\pm$ 3.4	152§† $\pm$ 12

<sup>a</sup> : Indispensable Amino Acids without valine because of the flooding dose.

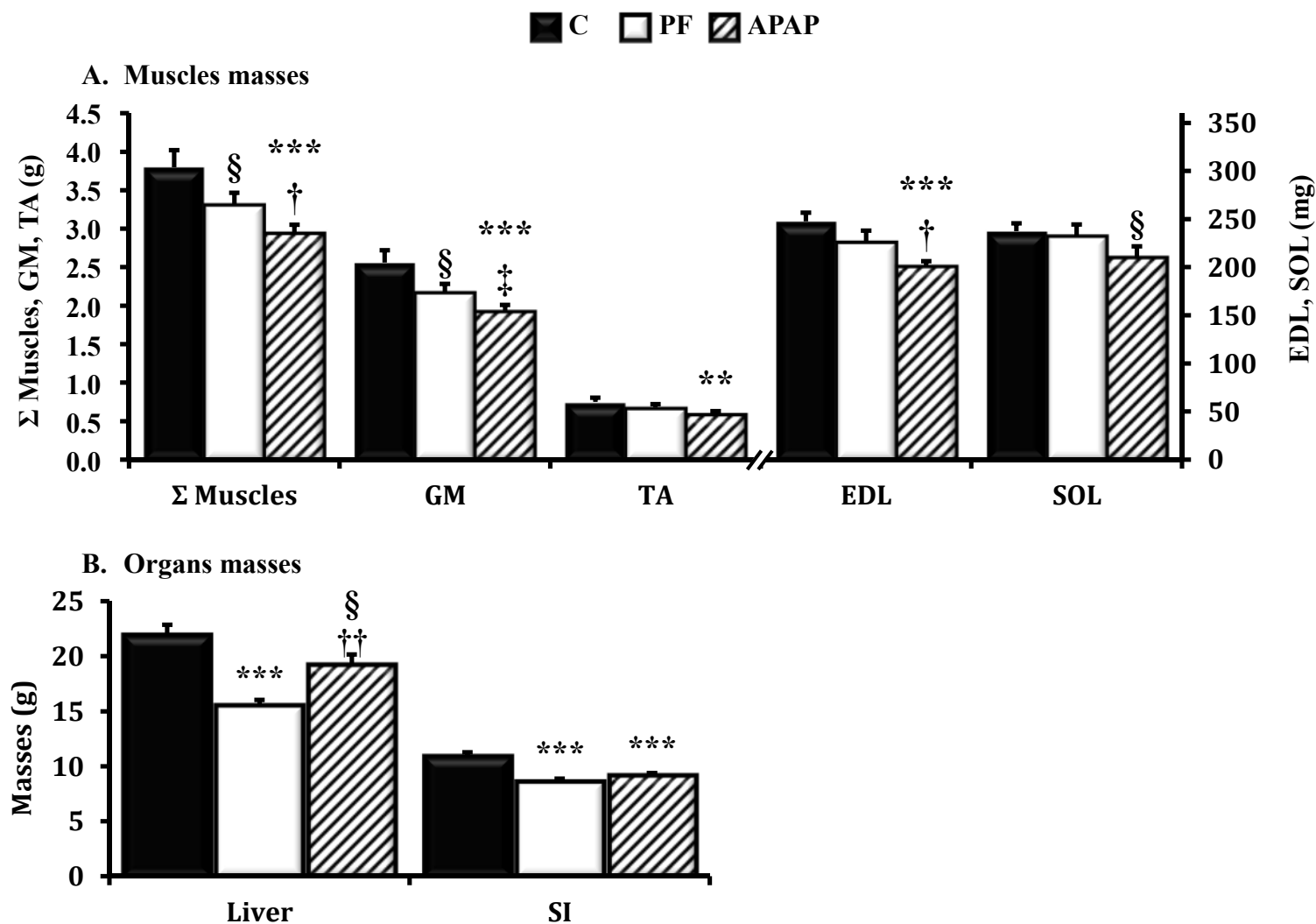
Cys : cysteine ; Hcy : homocysteine ; Cys-Gly : cysteinylglycine ; GSH : glutathione

§  $P \leq 0.10$ , \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , vs CT, ‡  $P \leq 0.10$ , †  $P \leq 0.05$ , ††  $P \leq 0.01$ , †††  $P \leq 0.001$  vs PF, unpaired Student's *t* test.



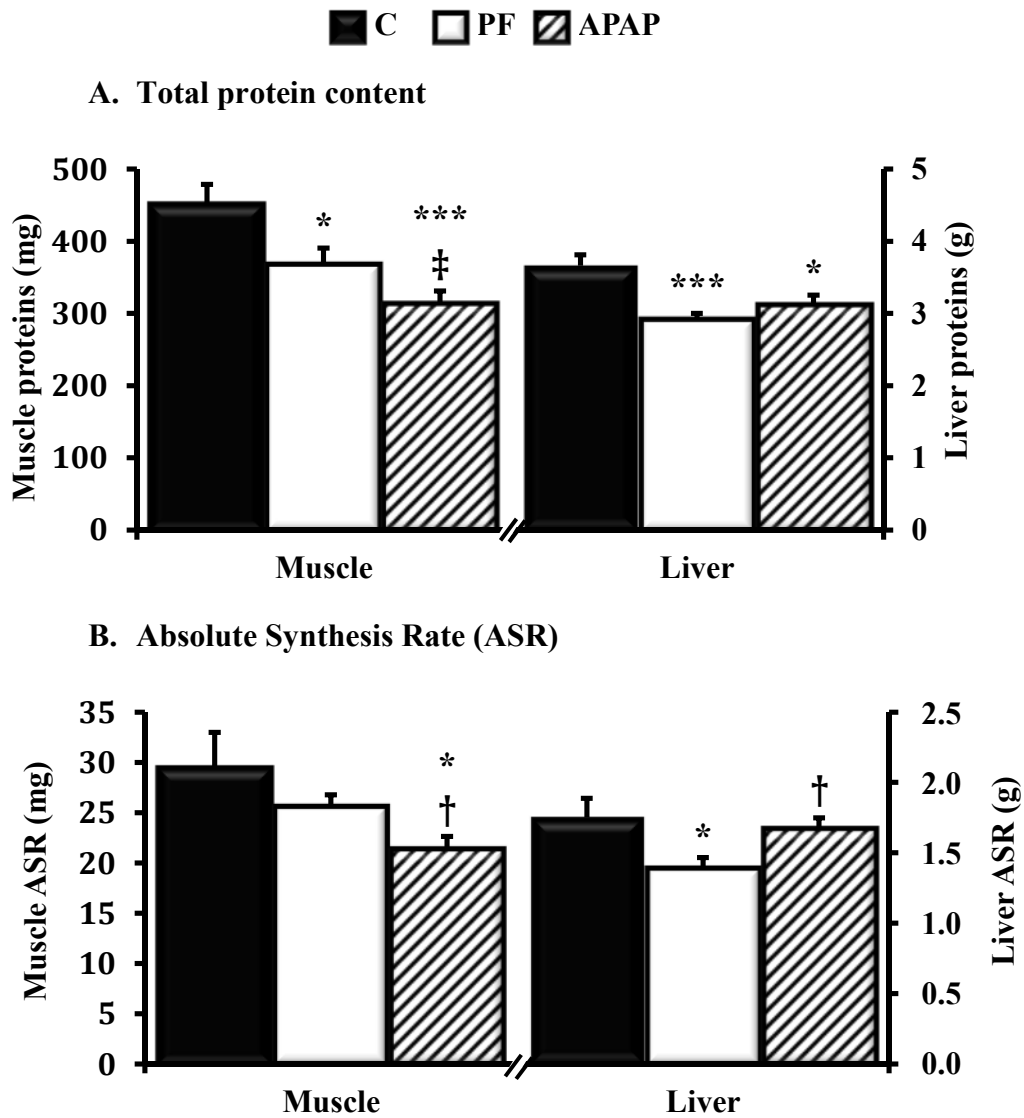
**Figure 1.** Effect of APAP on body weight (A), lean mass (B) and fat mass (C). Values are means  $\pm$  SEM.

APAP: paracetamol group; C: Cure; CT: control group IC: Inter-cure; PF: Pair-Fed group  
 Data not sharing a common letter are significantly different (ANOVA for repeated measurement, followed by Fisher's PLSD test).



**Figure 2.** Effect of APAP on muscles (A) and organs (B) masses (g). Values are means  $\pm$  SEM. APAP: paracetamol group; CT: control group; PF: Pair-Fed group. (A)  $\Sigma$  Muscles, GM and TA are expressed in g (left axis), EDL and SOL are expressed in mg (right axis).  $\Sigma$  muscles: sum of the 4 muscles studied, GM: gastrocnemius, EDL: Extensor Digitorum Lungus. TA: tibialis anterior, SOL: soleus. (B) SI: small intestine.

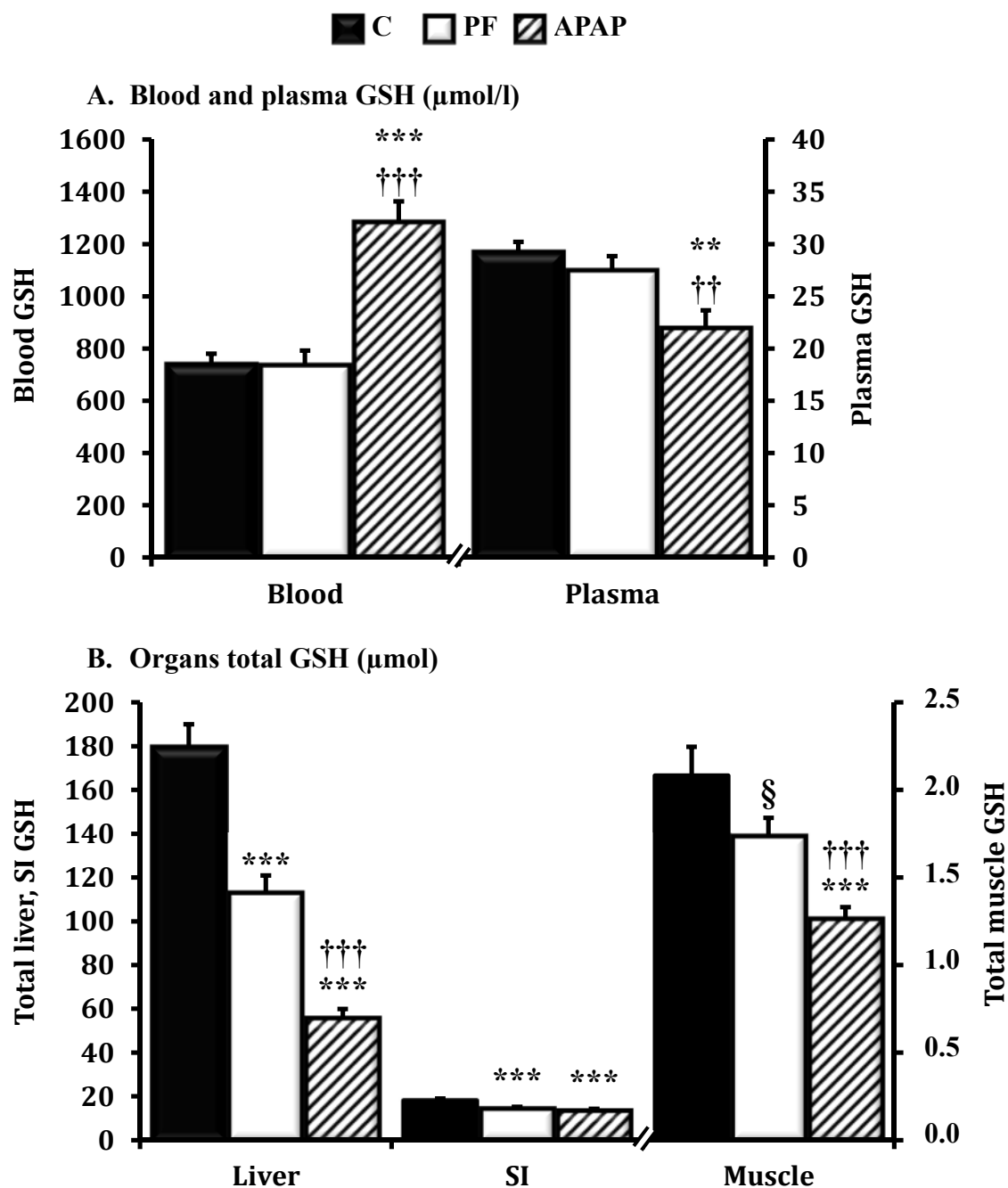
§  $P \leq 0.10$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$  vs CT, ‡  $P \leq 0.10$ , †  $P \leq 0.05$ , ††  $P \leq 0.01$  vs PF, ANOVA followed by unpaired Student's t test.



**Figure 3.** Effect of APAP on liver and gastroc protein content (A) and Absolute Synthesis Rate (B, mg proteins synthesized/day). Values are means  $\pm$  SEM.

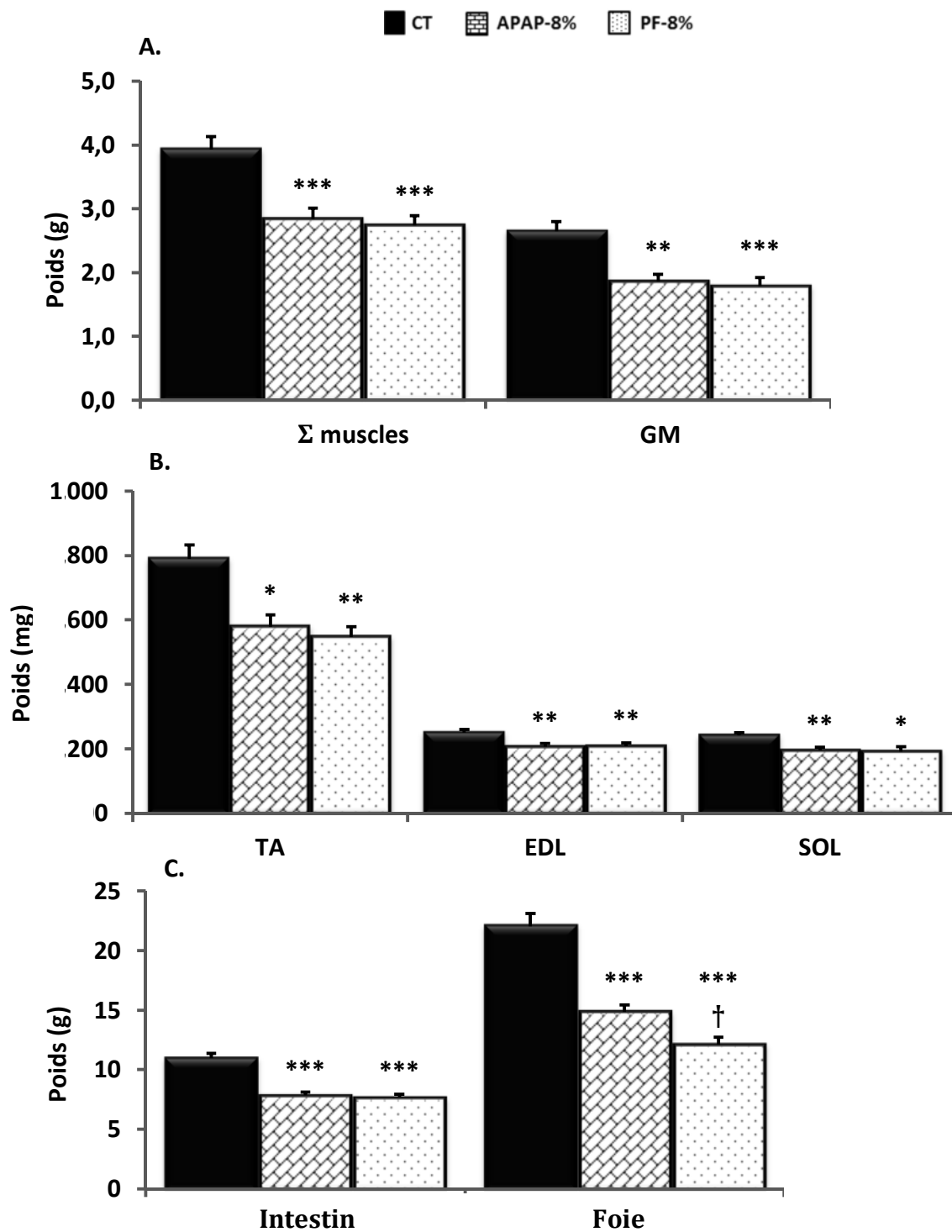
APAP: paracetamol group; CT: control group; PF: Pair-Fed group

\*  $P \leq 0.05$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$  vs CT, ‡  $P \leq 0.10$ , †  $P \leq 0.05$  vs PF, ANOVA followed by unpaired Student's t test.



**Figure 4.** Impact of APAP on blood, plasma (A), and organs (B) GSH. Values are means  $\pm$  SEM.

APAP: paracetamol group; CT: control group; PF: Pair-Fed group, SI: small intestine  
 $\S$   $P \leq 0.10$ ,  $** P \leq 0.01$ ,  $*** P \leq 0.001$  vs CT,  $\dagger\dagger P \leq 0.01$ ,  $\dagger\dagger\dagger P \leq 0.001$  vs PF, ANOVA followed by unpaired Student's t test.



**Figure 2.** Effets du paracétamol sur la masse de la  $\Sigma$  des muscles, le GM (A), le TA, le SOL et l'EDL (B), l'intestin et le foie (C). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM

APAP: paracétamol; CT: contrôle; EDL: *extensor digitorum lungus*, GM: *Gastrocnemius*, PF: Pair-Fed; SOL: *Soleus*, TA: *tibialis anterior*.

\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  vs CT, †  $P \leq 0,05$  vs PF, ANOVA suivie du test *t* de Student



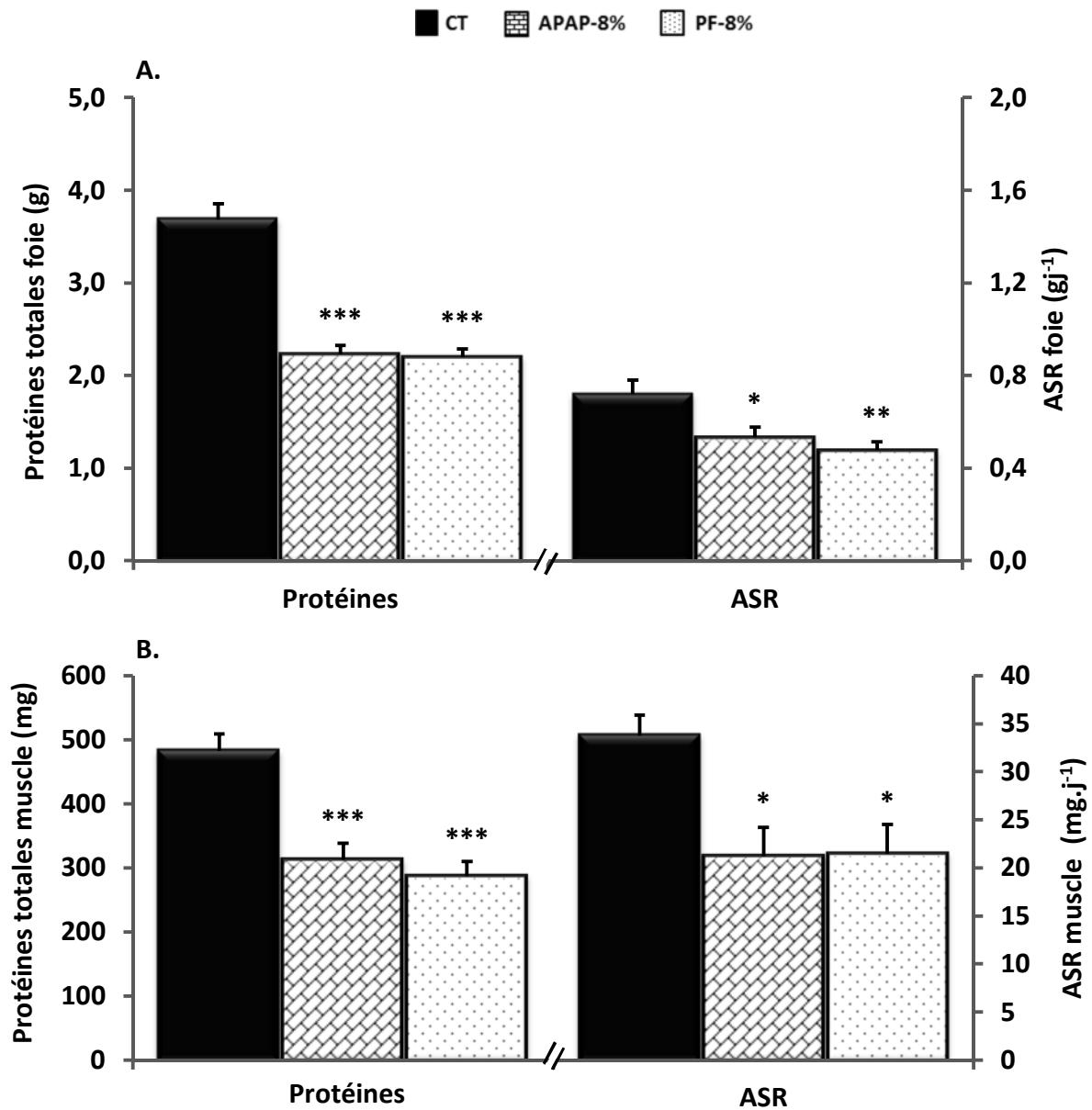
## DONNEES COMPLEMENTAIRES CONCERNANT LES LOTS A 8% DE PROTEINES

### RESULTATS :

*Poids des tissus et organes.* Par rapport au lot contrôle de départ (CT), le lot APAP-8% présente une réduction de la somme de la masse des muscles étudiés de 28% ( $P \leq 0,001$ ), du *gastrocnemius* (GM) de 32% ( $P \leq 0,001$ ) (**Figure 2.A**), du *tibialis* (TA) de 31% ( $P \leq 0,01$ ), de l'*EDL* de 17% ( $P \leq 0,01$ ) et du *soleus* (SOL) de 20% ( $P \leq 0,01$ ) (**Figure 2.B**). En revanche, aucune différence n'est détectée par rapport au lot PF-8%. Il est à noter qu'aucune des masses musculaires mesurées n'est significativement différente entre le lot APAP-16% et APAP-8%. Ceci montre que malgré un ingéré protéino-énergétique plus élevé dans le lot APAP-16%, la plus forte ingestion de paracétamol a conduit à perte de masse musculaire équivalente à un lot présentant une dénutrition protéino-énergétique. La masse de l'intestin est significativement diminuée de 27% par rapport au CT ( $P \leq 0,001$ ), sans différence avec le PF-8% (**Figure 2.C**). En revanche, la masse du foie des APAP-8% est diminuée de 33% ( $P \leq 0,001$ ) par rapport au CT mais augmenté de 23% ( $P \leq 0,01$ ) par rapport au PF-8% (**Figure 2.C**). Cette augmentation de la masse hépatique par rapport au PF est du même ordre de grandeur que celle entre le lot APAP-16% et PF-16% (24%,  $P \leq 0,001$ ). Cependant les masses intestinales et hépatiques sont significativement plus faibles chez le lot APAP-8% en comparaison au lot APAP-16%.

*Protéines et synthèse protéique.* Au niveau hépatique, les protéines totales et le taux de synthèse absolue (ASR) du lot APAP-8% sont diminués de 41% ( $P \leq 0,001$ ) et 33% ( $P \leq 0,01$ ), respectivement par rapport au CT, sans différence avec le lot PF-8% (**Figure 3**). Il est à noter que les protéines et l'ASR sont significativement diminués chez le lot APAP-8% par rapport au lot APAP-16%. Au niveau musculaire, les protéines totales et l'ASR sont diminués de 35% ( $P \leq 0,01$ ) et 37% ( $P \leq 0,05$ ), respectivement par rapport au CT, sans différence avec le lot PF-8%. Aucune différence n'est mise en évidence entre le lot APAP-8% et APAP-16%.

*Glutathion.* Au niveau hépatique, le glutathion (GSH) total est très fortement diminué chez le lot APAP-8%, de 85% ( $P \leq 0,001$ ) par rapport au CT. En comparaison au PF-8% il est diminué de 39% ( $P \leq 0,01$ ) (**Figure 4**). Le GSH total est aussi significativement diminué par rapport au lot APAP-16%, dont la déplétion par rapport au PF-16% est légèrement supérieure (50%). Au niveau intestinal, le GSH total est déplété de 43% ( $P \leq 0,001$ ) par rapport au CT,



**Figure 3.** Effet du paracétamol sur les protéines et la synthèse absolue (ASR) hépatique (A) et musculaire (B). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM

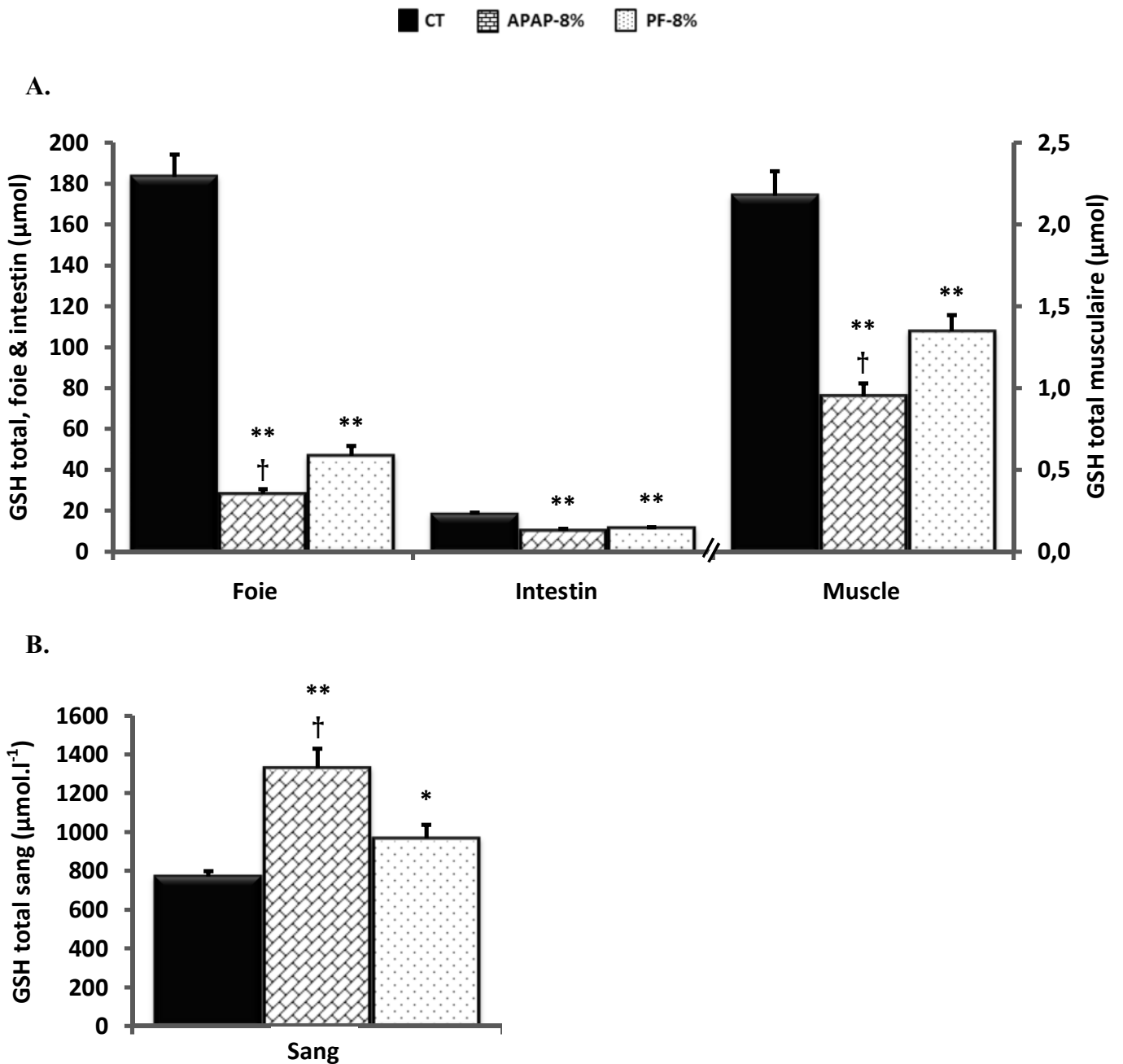
\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$  vs CT, ANOVA suivie du test  $t$  de Student. ASR: absolute synthesis rate

sans différence par rapport au PF-8%. Le lot APAP-8% est significativement inférieur au lot APAP-16% qui n'est pas différent de son PF-16%. Au niveau musculaire, le GSH total du lot APAP-8% est diminué de 56% ( $P \leq 0,001$ ) par rapport au CT et 30% par rapport au PF-8% ( $P \leq 0,01$ ). Le GSH total musculaire du lot APAP-8% est significativement inférieur au lot APAP-16% et les différences par rapport à leurs PF respectifs sont de la même ampleur, 27%-30%. Au niveau sanguin, la variation est inverse, le GSH total des deux lots APAP est significativement plus élevé de 74% ( $P \leq 0,001$ ) pour le 16% et 73% ( $P \leq 0,001$ ) pour le 8%, par rapport au CT. Les deux lots PF ne sont pas significativement différents du lot CT.

## **DISCUSSION :**

La consommation significativement plus faible de paracétamol du lot APAP-8%, comparé au lot 16% (36 et 40% en C2 et C3 respectivement); ne permet pas de conclure sur l'effet d'un faible apport protéique conjugué avec un traitement au paracétamol. Cependant, malgré une quantité de paracétamol plus faible, les baisses de GSH sont du même ordre grandeur quel que soit le tissu et l'élévation du GSH sanguin est la même. La comparaison des PF 16 et 8% montre que le statut en GSH des lots 8% est diminué au niveau hépatique et musculaire du fait de la restriction protéino-énergétique. Dans ce contexte, l'ingestion d'une dose 36-40% plus faible de paracétamol (APAP-8% vs APAP-16%) génère une déplétion du GSH de la même ampleur que la dose supérieure administrée dans un régime au-dessus du besoin protéino-énergétique (16% de protéines). Il en est de même pour l'élévation du GSH sanguin. Au niveau musculaire, le lot APAP-8% ne présente pas de différence significative avec son PF quel que soit le muscle étudié. Il en est de même pour les protéines totales et la synthèse absolue musculaires (APAP-8% vs PF-8%). En revanche, le lot APAP-8% n'est pas significativement différent du lot APAP-16% pour tous ces paramètres. Ceci met en lumière que la prise de paracétamol à hauteur de 1% dans un régime couvrant les apports protéiques (16%) conduit à une altération de la masse, des protéines totales et de la synthèse protéique équivalente à celle générée par une carence protéino-énergétique.

D'après l'ensemble de ces résultats, il apparaît primordial de prendre en compte le statut protéino-énergétique lors de la prescription de paracétamol en chronique chez le sujet âgé. D'une part, parce que la prescription de paracétamol, même à faible dose, lors d'apports protéino-énergétiques faibles risque de conduire à une baisse de l'ingéré liée aux fortes perturbations métaboliques engendrées, en particulier au niveau hépatique. D'autre part, la prise de paracétamol à la dose thérapeutique maximale avec des apports protéino-énergétiques



**Figure 4.** Effet du paracétamol sur le GSH total hépatique, intestinale et musculaire (A) et sanguin (B). Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM.

\*  $P \leq 0,05$  ; \*\*  $P \leq 0,001$  vs CT, †  $P \leq 0,01$  vs PF, ANOVA suivie du test *t* de Student

couvrant le besoin physiologique basal génère un besoin supplémentaire qui n'est alors pas couvert par les apports. Au niveau de l'organisme, le besoin supplémentaire généré par la détoxification semble prioritaire sur l'homéostasie GSH et protéique corporelle puisqu'il en découle une mobilisation des réserves protéiques corporelles conduisant à une baisse généralisée de la masse musculaire. Cette hypothèse est supportée par les données préalablement obtenues dans la littérature montrant une altération de l'utilisation métabolique des protéines (Varela-Moreiras *et al.*, 1991), une baisse du bilan azoté (Mast *et al.*, 2014) ainsi qu'un arrêt de la croissance, (Reicks *et al.*, 1988; Mclean *et al.*, 1989) suite à la prise chronique de paracétamol.

## RÉFÉRENCES:

- Bauer J, Biolo G, Cederholm T, Cesari M, Cruz-Jentoft AJ, Morley JE, Phillips S, Sieber C, Stehle P, Teta D, Visvanathan R, Volpi E & Boirie Y (2013). Evidence-Based Recommendations for Optimal Dietary Protein Intake in Older People: A Position Paper From the PROT-AGE Study Group. *J Am Med Dir Assoc* **14**, 542–559.
- Calvani R, Miccheli A, Landi F, Bossola M, Cesari M, Leeuwenburgh C, Sieber CC, Bernabei R & Marzetti E (2013). Current nutritional Recommendations and Novel Dietary Strategies to Manage Sarcopenia. *J Frailty Aging* **2**, 38–53.
- Dardevet D, Rémond D, Peyron M-A, Papet I, Savary-Auzeloux I & Mosoni L (2012). Muscle Wasting and Resistance of Muscle Anabolism: The “Anabolic Threshold Concept” for Adapted Nutritional Strategies during Sarcopenia. *Sci World J* **2012**, 1–6.
- Dardevet D, Rieu I, Fafournoux P, Sornet C, Combaret L, Bruhat A, Mordier S, Mosoni L & Grizard J (2003). Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutr Res Rev* **16**, 61.
- Deutz NEP, Bauer JM, Barazzoni R, Biolo G, Boirie Y, Bosy-Westphal A, Cederholm T, Cruz-Jentoft A, Krznarić Z, Nair KS, Singer P, Teta D, Tipton K & Calder PC (2014). Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin Nutr*; DOI: 10.1016/j.clnu.2014.04.007.
- Ferrell B, Argoff C, Epplin J, Fine P, Gloth F 3rd, Herr K, Katz J, Mehr D, Reid M & Reisner L (2009). American Geriatrics Society Panel on the Pharmacological management of Persistent Pain in Older Persons. Pharmacological management of persistent pain in older persons. *Pain Med* **10**, 1062–1083.
- Janssen I (2011). The Epidemiology of Sarcopenia. *Clin Geriatr Med* **27**, 355–363.
- Mast,C., Joly,C., Savary-Auzeloux,I., Remond,D., Dardevet,D. and Papet,I. (2014) Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol when glutathione-dependent detoxification is highly activated. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.*, **65**, 623–631.
- Mclean AEM, Armstrong GR & Beales D (1989). Effect of d- or l-methionine and cysteine on the growth inhibitory effects of feeding 1% paracetamol to rats. *Biochem Pharmacol* **38**, 347–352.

- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Katsanos CS, Zhang X-J & Wolfe RR (2006). Differential stimulation of muscle protein synthesis in elderly humans following isocaloric ingestion of amino acids or whey protein. *Exp Gerontol* **41**, 215–219.
- Reicks M, Calvert RJ & Hathcock JN (1988). Effects of prolonged acetaminophen ingestion and dietary methionine on mouse liver glutathione. *Drug Nutr Interact* **5**, 351–363.
- Varela-Moreiras G, Ruiz-Roso B & Varela G (1991). Effects of long-term administration of acetaminophen on the nutritional utilization of dietary protein. *Ann Nutr Metab* **35**, 303–308.
- Volpi E, Campbell WW, Dwyer JT, Johnson MA, Jensen GL, Morley JE & Wolfe RR (2013). Is the Optimal Level of Protein Intake for Older Adults Greater Than the Recommended Dietary Allowance? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**, 677–681.
- Wolfe RR (2012). The role of dietary protein in optimizing muscle mass, function and health outcomes in older individuals. *Br J Nutr* **108**, S88–S93.

## *Expérience 3:*

---

**EFFET DU TRAITEMENT AU PARACETAMOL SUR LA CONSOMMATION ALIMENTAIRE EN PROTEINES CHEZ LE RAT ADULTE ET AGE.**

**- DONNEES COMPLEMENTAIRES.** Augmentation de l'apport protéique induite par l'ajout de paracétamol dans le régime.

## INTRODUCTION & OBJECTIF :

L'expérience précédente ( $n^{\circ}2$ ) a mis en évidence une forte réduction de l'ingéré lorsque le paracétamol est administré à hauteur de 1% dans un régime faible en protéine (8%) en comparaison à un régime riche en protéines (16%). D'autre part, une augmentation spontanée de la consommation en protéines, notamment d'origine animale riches en AAS, a été décrite chez des personnes âgées traitées au paracétamol durant 2 semaines (Pujos-Guillot *et al.*, 2012). L'ajustement du taux protéique du régime semblait donc être un paramètre important de l'adaptation nutritionnelle des individus soumis à un traitement au paracétamol.

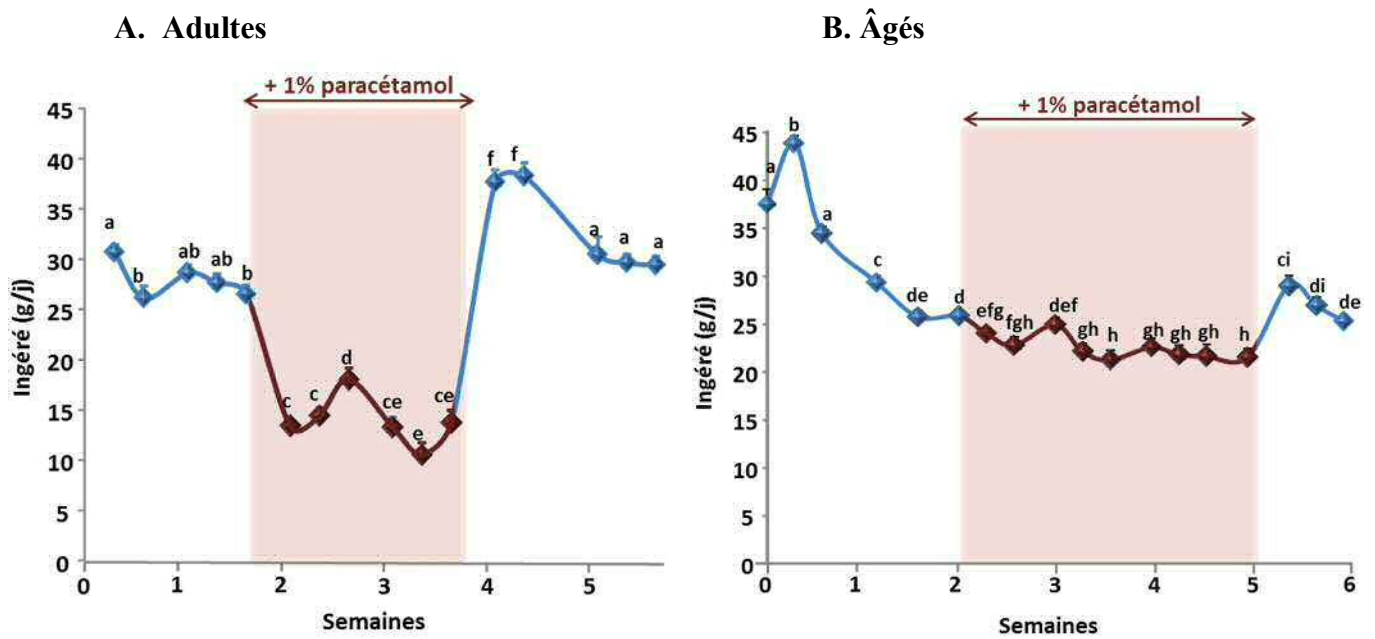
Le but de cette étude était d'analyser si le rat, adulte ou âgé, était capable d'adapter son apport protéique en réponse à la présence de paracétamol dans le régime et si cette éventuelle adaptation conduisait à un maintien de l'apport alimentaire et du poids corporel.

## METHODE :

Durant la période pré-expérimentale, les rats adultes (11 mois,  $n=25$ ) et âgés (22 mois,  $n=35$ ) ont été adaptés aux cages individuelles avec eau et régime standard (SAFE, A04) *ad libitum* durant 4 semaines. La période expérimentale s'est déroulée en trois phases distinctes durant lesquelles le poids des rats et leurs ingérés ont été contrôlés 3 fois par semaine. Les régimes expérimentaux utilisés étaient les mêmes que ceux de l'expérience précédente (**Tableau 1**, *expérience 2*). Les animaux ont été placés en cage individuelle durant l'intégralité du protocole. Lors de la première phase, les animaux ont eu à disposition les deux régimes expérimentaux sans paracétamol (8%- et 16%-diet, **tableau 1**) afin de les habituer aux régimes expérimentaux et d'étudier leur choix protéique avant traitement. Durant la seconde phase, les rats ont eu à disposition les deux régimes contenant 1% de paracétamol (8%-APAP et 16%-APAP-diet, **tableau 1**). La dernière phase a permis d'étudier la durée de l'effet induit par le paracétamol et de voir si les animaux retrouvaient un comportement similaire à celui avant traitement (phase 1). Durant cette 3<sup>ème</sup> phase les animaux ont à nouveau eu le choix entre les deux régimes sans paracétamol. L'expérience a été réalisée dans un premier temps chez les rats adultes, qui ont reçu 2 semaines de paracétamol (voir partie résultats), cette phase a été allongée à 3 semaines chez les rats âgés dont les capacités d'adaptation sont plus faibles. De même, les rats adultes ayant montré une stabilisation rapide durant la 3<sup>ème</sup> phase (voir partie résultats), elle a été écourtée à 1 semaine chez les rats âgés.

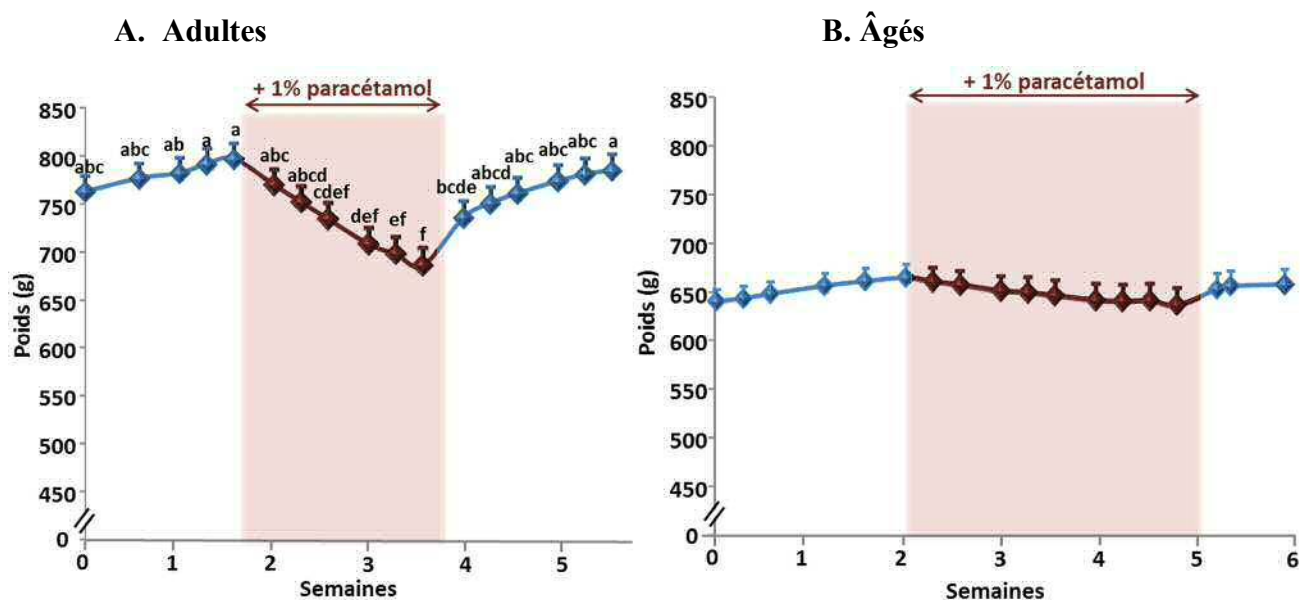
Les données sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM, elles ont été analysées par ANOVA à mesures répétées suivie du test PLSD Fisher. Les différences ont été considérées significatives pour  $P \leq 0,05$ .





**Figure 1.** Effet du paracétamol sur l'ingéré (g/j) des rats adultes (A) et âgés (B). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM

Les valeurs n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ) ANOVA à mesure répétée (1 facteur) suivie du test PLSD de Fisher.



**Figure 2.** Effet du paracétamol sur le poids des rats (g) adultes (A) et âgés (B). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM.

Les valeurs n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ) ANOVA à mesure répétée (1 facteur) suivie du test PLSD de Fisher.

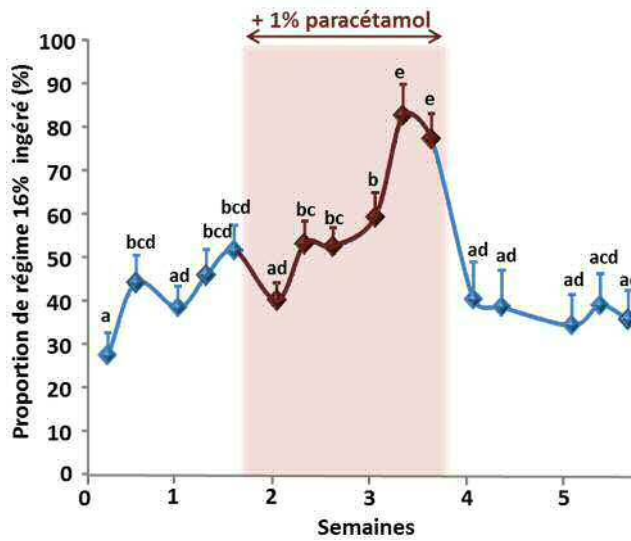
## RESULTATS :

*Phase 1.* La première phase a permis une adaptation des animaux au régime qui stabilisent leur ingéré à  $26,5 \pm 1,0$  g/j et  $25,7 \pm 0,6$  g/j (**Figure 1**), pour les adultes et les âgés respectivement (valeur considérée comme ingéré initial pour la suite). Le poids des animaux n'a pas subi de variation significative durant cette période (**Figure 2**). La proportion de régime à 16% de protéines consommé fluctue la première semaine et se stabilise les derniers jours à  $51 \pm 6\%$  pour les adultes et  $47 \pm 3\%$  pour les âgés (**Figure 3**).

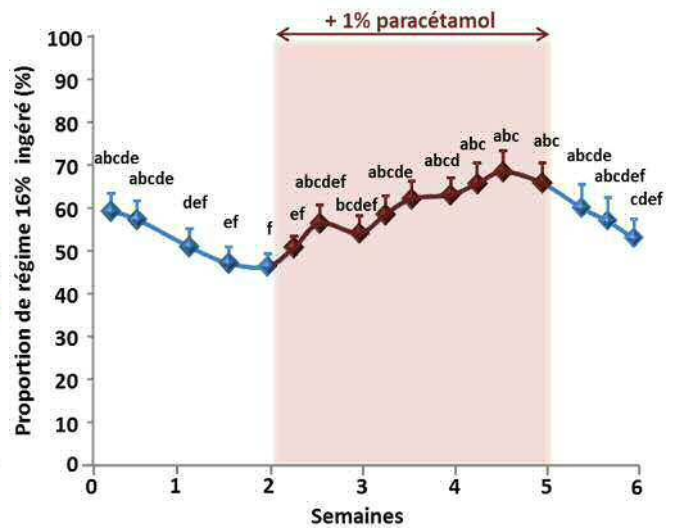
*Phase 2.* L'ajout de paracétamol conduit à une baisse significative de l'ingéré des rats le premier jour (**Figure 1**), de 49 % ( $P \leq 0,001$ ) chez les adultes, et 7% ( $P \leq 0,05$ ), chez les âgés. L'ingéré des rats âgés reste ensuite stable durant toute la période de traitement, excepté un jour en milieu de la semaine 3 et en fin de semaine 4 où l'ingéré diminue significativement de 18% ( $P \leq 0,001$ ) et 16% ( $P \leq 0,001$ ), respectivement par rapport à l'ingéré initial. Chez les rats adultes, l'ingéré est plus fortement diminué, (ANOVA, effet âge  $P \leq 0,001$ ). A la fin de la 2<sup>ème</sup> semaine il remonte significativement à -32% ( $P \leq 0,001$ ) de l'ingéré initial puis rechute à -50% ( $P \leq 0,001$ ) (**Figure 1**). Les rats âgés augmentent progressivement leur consommation de régime à 16% de protéine dès le début du traitement, cette augmentation atteint 21% et est significative ( $P \leq 0,05$ ) dès le début de la 2<sup>ème</sup> semaine avec paracétamol (**Figure 3**). Cette augmentation reste significative comparée au jour avant traitement, jusqu'à la fin de la phase 2. Elle atteint son maximum les deux derniers jours, +32% ( $P \leq 0,001$ ), soit  $69 \pm 5\%$  de régime à 16% de protéines consommé. Ceci se traduit par un maintien de la quantité de protéines consommées (**Figure 4**) et une augmentation progressive du ratio protéines/paracétamol ingéré (**Figure 5**). Cette élévation du ratio devient significative (+5%,  $P \leq 0,05$ ) dès le début de la 2<sup>ème</sup> semaine (comparaison au 1<sup>er</sup> jour de la phase 2). Ce ratio reste significativement plus élevé jusqu'au terme de la phase 2, avec un maximum de  $13,5 \pm 0,4$  g/g soit 11% d'augmentation par rapport au 1<sup>er</sup> jour ( $P \leq 0,001$ ). Les rats adultes suivent la même cinétique et augmentent leur proportion de régime APAP-16% consommé ( $P \leq 0,001$ ) à la fin de la 2<sup>ème</sup> semaine de traitement (**Figure 4**), par rapport à l'ingéré initial. La proportion de régime 16% consommé atteint un maximum de +60% soit 81%. Ceci se traduit par une augmentation du ratio protéines/paracétamol ingéré (**Figure 5**) qui augmente progressivement dès le 2<sup>ème</sup> relevé (+10%,  $P \leq 0,05$ ). Ce ratio se stabilise avant de ré-augmenter en fin de phase avec un maximum de  $14,5 \pm 0,6$  g/g (+32%,  $P \leq 0,001$ ).

Le poids des rats âgés n'est pas affecté significativement par le traitement (**Figure 2**). En revanche les rats adultes, réduisant plus fortement leur ingéré, subissent une perte de poids

### A. Adultes



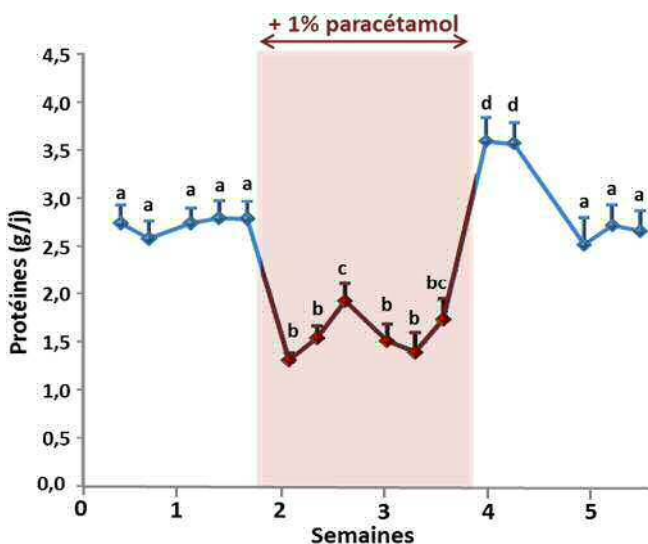
### B. Âgé



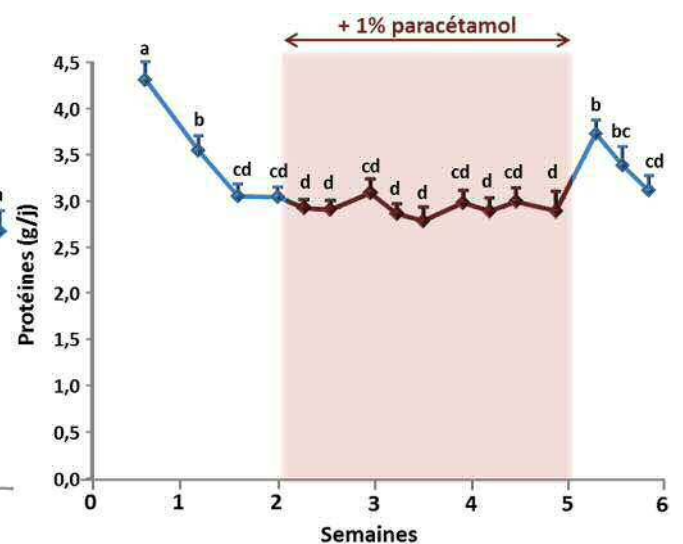
**Figure 3.** Effet du paracétamol sur la proportion de régime à 16% de protéines consommé (%/d) par les rats adultes (A) et âgés (B). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM

Les valeurs n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ) ANOVA à mesure répétée (1 facteur) suivie du test PLSD de Fisher.

### A. Adultes



### B. Âgés



**Figure 4.** Effet du paracétamol sur la quantité de protéines consommées (g/j) par les rats adultes (A) et âgés (B). Les valeurs sont exprimées en moyennes ± SEM

Les valeurs n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ) ANOVA à mesure répétée (1 facteur) suivie du test PLSD de Fisher.

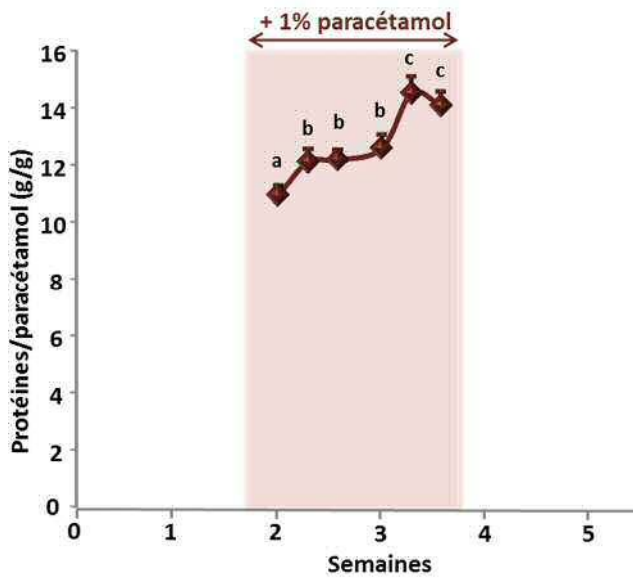
significative ( $P \leq 0,01$ ) dès la fin de la 1<sup>ère</sup> semaine de traitement. La perte de poids est maximale au dernier jour de la phase 2, 12% ( $P \leq 0,001$ ).

*Phase 3.* Le poids des rats âgés ne subit pas de variation significative durant cette phase (**Figure 2**). En revanche les rats adultes reprennent du poids dès le premier relevé, +6% ( $P \leq 0,05$ ). Dès le second relevé, leur poids n'est plus significativement différent de la fin de la phase 1 (avant traitement). Ceci s'explique par la très forte augmentation, + 175%, de l'ingéré observée dès le premier relevé ( $P \leq 0,001$ ), s'élevant à  $37,6 \pm 1,2$  g/j. L'ingéré est maintenu à cette hauteur la première semaine puis diminue et se stabilise à la valeur initiale (phase 1). Cette forte augmentation de l'ingéré est accompagnée d'une chute importante de la quantité de protéines ingérées. Dès le premier relevé le taux de 16% consommé diminue de 48% (par rapport au dernier relevé de phase 2,  $P \leq 0,001$ ) soit  $40 \pm 8\%$ . Ce taux se maintient durant la 3<sup>ème</sup> phase. Les rats âgés augmentent aussi leur ingéré dès le début de la phase 3, (+35%,  $P \leq 0,001$ ) s'élevant à  $28,8 \pm 1,1$  g/j, valeur supérieure de 12% à l'ingéré initial.

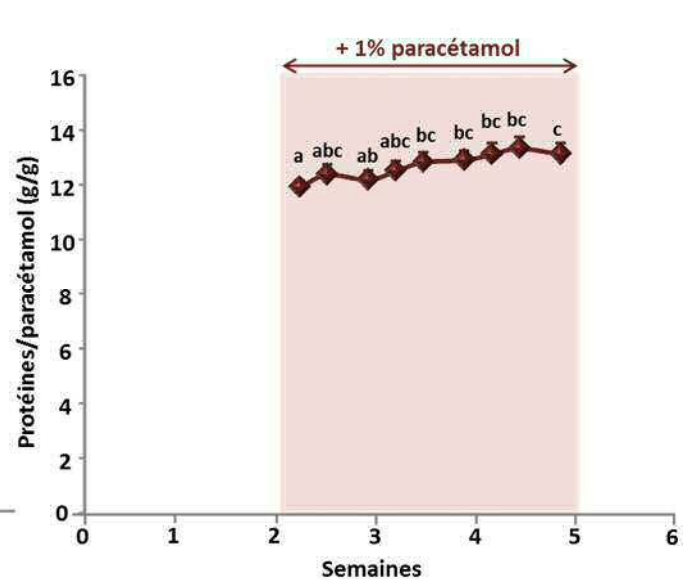
## DISCUSSION:

Ces résultats montrent que quel que soit l'âge, l'administration de paracétamol conduit à une augmentation du ratio protéines/paracétamol ingéré, ce qui suggère que la prise chronique de paracétamol accroît le besoin protéique. Il apparaît que chez l'âgé, le maintien de l'apport protéique permet de maintenir l'ingéré et le poids corporel. Bien qu'il n'y ait pas de différence significative entre les poids relevés, il y a un effet significatif du temps sur l'évolution du poids corporel (ANOVA à mesure répétée,  $P \leq 0,001$ ). Chez l'adulte en revanche, du fait de la plus forte réduction de l'ingéré, le poids est significativement diminué durant la phase de traitement. En revanche, il est immédiatement récupéré dès l'arrêt du traitement. Dans l'expérience précédente (Mast et al., *publication n°3*), les rats âgés ont réduit leur ingéré durant les cures, ceci conduisant à une perte de poids significative qui n'a jamais été totalement récupérée, contrairement aux adultes ici. Les rats adultes semblent posséder une plus grande plasticité qui leur permet de se remettre plus rapidement et totalement des variations de poids induites par le traitement. En effet, cette plus grande plasticité des adultes par rapport aux âgés a été montrée dans le cas du GSH, après administration de paracétamol les adultes récupèrent plus et plus rapidement que les âgés (Chen *et al.*, 1990). Ceci a aussi été montré dans différentes situations de perte musculaire ou les âgés ont un manque de récupération de masse musculaire (Dardevet *et al.*, 1995; Mosoni *et al.*, 1999; Magne *et al.*, 2011). Cette absence de récupération chez l'âgé est connue comme le « crisis catabolic model » de la sarcopénie proposé par English & Paddon-Jones (2010). Le maintien de

### A. Adultes



### B. Âgés



**Figure 5.** Evolution du ratio protéines/paracétamol (g/g) ingéré par les rats adultes (**A**) et âgés (**B**). Les valeurs sont exprimées en moyennes  $\pm$  SEM

Les valeurs n'ayant aucune lettre en commun sont significativement différentes ( $P \leq 0,05$ ) ANOVA à mesure répétée (1 facteur) suivie du test PLSD de Fisher.

l'apport protéique apparaît donc être un enjeu plus important chez les âgés étant donné leur difficulté de récupération.

Que ce soit pour les adultes ou pour les âgés, les résultats de cette étude permettent de mettre en évidence un besoin protéique spécifiquement induit par le traitement au paracétamol. En effet, l'augmentation de la proportion du régime à 16% consommée a lieu spécifiquement pendant la phase de traitement et s'estompe dès l'arrêt de celui-ci. Ceci explique probablement le refus du régime 8%-APAP dans l'expérience précédente (*n*<sup>o</sup>2, *données complémentaires*). Les animaux n'ayant pas eu le choix, ont perçu le régime comme carencé. En effet, le régime à 8% de protéines n'étant vraisemblablement pas suffisant pour couvrir le besoin supplémentaire en Cys généré par le paracétamol, ils ont alors refusé de le consommer. De nombreux travaux ont mis en évidence que le rat développe une rapide et forte aversion alimentaire pour les régimes carencés en acides aminés indispensables (AAI, pour revue voir Gietzen *et al.*, 2007). De même, les travaux montrent que lorsque le régime n'est plus carencé, le rat augmente très rapidement son ingéré par phénomène de compensation (Rogers & Leung, 1973). Le paracétamol générant une perte urinaire de cystéine, il est probable que les rats considèrent le régime à 8% comme carencé en méthionine/cystéine du fait de leur utilisation augmentée par le métabolisme hépatique de détoxification du paracétamol.

Ainsi, alors que le régime à 8% n'est carencé en aucun AAI, ceci confirmé par la bonne consommation du régime seul dans l'expérience précédente, l'ajout de paracétamol génère un besoin supplémentaire. L'animal perçoit alors le régime comme s'il était carencé et le refuse. En revanche, s'il a le choix avec un apport protéique supérieur (16%), l'animal âgé s'adapte en augmentant son apport protéique et ne développe pas de réaction d'aversion envers le régime. Il est à noter que dans cette expérience, les rats adultes ont réduits notablement leur ingéré durant toute la phase de traitement. Ceci peut être expliqué par leur faible consommation du régime 16% les premiers jours de phase 2, qui a probablement engendré la baisse d'ingéré. Les animaux adultes ont alors probablement été en insuffisance d'apports protéiques dès le départ qu'il était impossible de compenser à cause de la présence de paracétamol dans les deux régimes.

En conclusion, ces données montrent que le paracétamol génère bien un besoin supplémentaire en protéines et que lorsqu'il a le choix, l'animal va adapter son apport alimentaire pour couvrir au mieux ce besoin. Cependant, les données de l'expérience précédente montrent qu'en absence de choix, l'animal préfère refuser le régime dû à la carence induite par le besoin supplémentaire généré par le traitement. Ces données sont en

accord avec les travaux précédents réalisés chez la personne âgée traitée chroniquement au paracétamol, dont l'ingéré protéique a été spontanément augmenté en réponse au traitement (Pujos-Guillot *et al.*, 2012).

Les résultats de l'expérience précédente (Mast *et al.*, *publication n°3*) montrent que malgré un taux protéique élevé (16%), les animaux perdent significativement de la masse musculaire en comparaison au pair-fed. Ainsi, un fort apport protéique permet de ne pas générer d'aversion alimentaire et de maintenir un poids et un ingéré peu diminués, l'animal ne reconnaît alors pas le régime comme carencé en Cys. Cependant, ceci n'est pas suffisant pour permettre un maintien de la masse musculaire, que ce soit à l'âge adulte (Mast *et al.*, 2014) ou au cours du vieillissement (Mast *et al.*, *publication n°3*).

## REFERENCES

- Chen TS, Richie JP & Lang CA (1990). Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **18**, 882–887.
- 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.
- English KL & Paddon-Jones D (2010). Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**, 34–39.
- Gietzen DW, Hao S & Anthony TG (2007). Mechanisms of Food Intake Repression in Indispensable Amino Acid Deficiency. *Annu Rev Nutr* **27**, 63–78.
- Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, Claustre A, Attaix D, Anne L, Veronique S-L, Philippe G, Dardevet D & Combaret L (2011). Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways. *J Physiol* **589**, 511–524.
- Mast,C., Joly,C., Savary-Auzloux,I., Remond,D., Dardevet,D. and Papet,I. (2014) Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol when glutathione-dependent detoxification is highly activated. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.*, **65**, 623–631.
- Mosoni L, Malmezat T, Valluy MC, Houlier ML, Attaix D & Mirand PP (1999). Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **277**, E608–E616.
- Pujos-Guillot E, Pickering G, Lyan B, Ducheix G, Brandolini-Bunlon M, Glomot F, Dardevet D, Dubray C & Papet I (2012). Therapeutic paracetamol treatment in older persons induces dietary and metabolic modifications related to sulfur amino acids. *AGE* **34**, 181–193.
- Rogers QR & Leung PM (1973). The influence of amino acids on the neuroregulation of food intake. *Fed Proc* **32**, 1709–1719



## *Expérience 4 :*

---

### **EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION NUTRITIONNELLE EN CYSTEINE CHEZ LE RAT AGE TRAITÉ PAR CURES AU PARACETAMOL.**

**- PUBLICATION N°4: Dietary cysteine supplementation prevents glutathione alterations  
and muscle mass loss in old rats treated with repeated paracetamol cures**

C. Mast, C. Pourpe, I. Savary-Auzeloux, D. Rémond, C. Migne, D. G. Voyard,  
Dardevet, I. Papet

*En préparation*



## PUBLICATION N°4

**Introduction & objectif :** Le but de cette étude était de tester l'hypothèse selon laquelle la perte musculaire engendrée par un traitement chronique au paracétamol est due à une utilisation de la Cys augmentée au niveau hépatique, conduisant à une moindre biodisponibilité de la Cys pour le muscle.

**Méthode :** Le design expérimental et les mesures effectuées sont les mêmes que lors de l'expérience précédente sur le rat âgé traité par cures. Un lot traité à 1% de paracétamol dans un régime à 16% de protéines (APAP), et deux lots en pair-feeding de celui-ci : un lot sans traitement (PF) et un lot traité à 1% de paracétamol et supplémenté à 0,5% de Cys. La dose de Cys a été calculée pour couvrir uniquement la perte de Cys générée par la détoxification du paracétamol.

**Principaux résultats :** Le paracétamol seul a généré une perte musculaire plus modérée que lors de l'expérience précédente, sans déplétion du GSH musculaire. La masse de l'EDL et du TIB ont cependant été diminuées. Au niveau hépatique, le GSH a été déplété et la masse ainsi que la synthèse protéique ont été augmentées. La supplémentation en Cys a permis de prévenir tout ou partie des effets induits par le paracétamol seul.

**Conclusion :** Malgré que la perte musculaire ait été moins généralisée que lors de l'expérience précédente, les deux muscles diminués par le traitement ont vu leur masse préservée grâce à la supplémentation en Cys. Cette supplémentation a aussi permis de maintenir le statut en GSH. Ces résultats confirmeraient donc l'hypothèse de départ : les altérations liées à un traitement chronique au paracétamol seraient dues à un manque de Cys induit par la détoxification du paracétamol. Même chez le sujet âgé, une supplémentation en Cys à hauteur de la perte générée par le traitement permet de prévenir les effets délétères induits par le paracétamol sur la masse musculaire et le statut en GSH corporel.

**Dietary cysteine supplementation prevents glutathione alterations and muscle mass loss in old rats treated with repeated paracetamol cures**

**C. Mast<sup>1</sup>, C. Pourpe<sup>1</sup>, I. Savary-Auzeloux<sup>1</sup>, D. Rémond<sup>1</sup>, C. Migne<sup>2</sup>, D. Centeno<sup>2</sup>, G. Voyard<sup>3</sup>, D. Dardevet<sup>1</sup> and Isabelle Papet<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> INRA, Centre Clermont-Ferrand – Theix, UMR 1019 Unité de Nutrition Humaine, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, France, Univ Clermont 1, UFR Médecine, UMR1019, Unité Nutrition Humaine, F-63001 Clermont-Ferrand, France.

<sup>2</sup> Plateforme d'Exploration du Métabolisme, INRA, Centre Clermont-Ferrand - Theix, UMR 1019 Nutrition Humaine, Saint-Genès-Champanelle, F-63122, France.

<sup>3</sup> Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and experimental design*

This study was performed in accordance with current legislation on animal care and experimentation in France and received the approval (CE 08-13) of the local Ethical Committee, CEMEAA (Comité d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale Auvergne). Male 20-21 month old Wistar rats (Janvier Labs, Saint Berthevin, France), were acclimatized 4 weeks before treatment in individual cages with standard conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12h light/dark cycle) with free access to water and the control diet (**Table 1**). At the end of this adaptation period, rats were randomly divided into three groups based on weight, food consumption and body composition (i.e lean and fat masses). Thirty six rats (APAP) were submitted to 3 cures (C1 to C3) of 2 weeks of APAP treatment (1% w/w of diet, APAP-diet, **Table 1**), spaced by 2 weeks of inter-cure (IC) period without APAP (control diet). Thirty six rats (APAP-Cys) received the APAP-Cys-diet following the same scheme. The control group (CT, n=35) received the control-diet all along the experimental period. APAP-Cys and CT groups received a quantity of food adjusted to the real consumption of the APAP group all along the experimental period. Food consumption was recorded daily and body weight twice a week. Body composition was assessed using magnetic resonance imaging (Echo MRI international, Houston, TX, USA) at the beginning and the end of every cure. At the end of the experiment (C3), animals were euthanized under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, intra peritoneal) by aortic blood withdraw. Plasma was separated by centrifugation at  $2000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$  and immediately frozen in liquid nitrogen. Liver was immediately removed washed with saline and weighed. Skeletal muscles: *gastrocnemius* (GM), *tibialis anterior* (TA), *soleus* (SOL) and *extensor digitorum longus* (EDL) were carefully dissected from the left posterior leg and weighed. Immediately after weighted GM, and liver were frozen in liquid nitrogen. All frozen samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  before analyses. Frozen tissues were finely pulverized in liquid nitrogen using a ball mill (Dangoumeau, Prolabo, Paris, France) prior to analyses.

### *Paracetamol and cysteine administration*

Powder APAP was administered as previously described (Mast *et al.*, publication n°1 & 3). APAP and Cys were mixed with all ingredients during preparation of the diet. The dose of 1% of diet was chosen as an equivalent of human  $4 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$  reported to the amount of dry matter ingested in humans about  $400 \text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$  and was considered equivalent in previous work (Mast *et al.*, 2014, publication n°3; Mclean *et al.*, 1989). Moreover the antinociceptive effect of APAP

is optimal and maintained at 300 mg/kg without yielding to serum level toxicity (Pini *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 2001; Bonnefont *et al.*, 2005), making the model more relevant for human comparison. Cys amount was calculated for compensate APAP-induced Cys urinary loss. As 54% of APAP is conjugated with sulphate or GSH (Mast *et al.*, *in revision*), considering molar masses, the diet was supplemented with 0.5% w/w diet.

#### *Measurement of in-vivo protein synthesis*

Protein synthesis rates were measured using the flooding dose method as previously described (Garlick *et al.*, 1980). Briefly, each rat received an intravenous injection of [1-  $^{13}\text{C}$ ] valine (Cambridge Isotope Laboratories) (80%, 150  $\mu\text{moles}/100\text{g}$  body) 25 min before euthanasia to flood the precursor pool with [1-  $^{13}\text{C}$ ] valine. GM muscle was chosen for protein synthesis assay because of its fiber type composition (mixed) and its size allowing multiple assays once milled. Free and protein-bound  $^{13}\text{C}$  valine enrichments were determined as previously described (Mast *et al.*, *publication n°3*).

#### *Calculations*

Protein fractional synthesis rate (FSR) absolute synthesis rate (ASR) were calculated as previously described (Mast *et al.*, *publication n° 3*)

#### *Protein content of organs and muscle.*

Total protein content was quantified after digestion of powdered tissue in 8 vol of 0.3N NaOH at 37°C using a Bicinchoninic acid (BCA) assay reagent kit, as previously described (Smith *et al.*, 1985). Bovine serum albumin (BSA) was used as standard. Total proteins were expressed as g or mg per organ or muscle.

#### *GSH content of organs and muscle.*

Total GSH (reduced plus oxidized) was quantified with an automated analyzer (ABX Pentra 400, Horiba, Montpellier, France) using a standard enzymatic recycling procedure and 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (Ellman reagent) as oxidant as previously described (Malmezat *et al.*, 1998). Total GSH was expressed as mmol per organ or muscle.

#### *Plasma thiols concentration*

Plasma total cysteine, homocysteine, cysteine-glycine and glutathione (aminothiols) were quantified by reversed-phase HPLC and fluorescence detection as previously described (Mast *et al.*, *publication n°3*). Aminothiols concentrations were expressed in  $\mu\text{mol}/\text{l}$ .

#### *Hepatotoxicity markers measurement*

Hepatotoxicity was assessed by measurement of plasma aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels by photometric method using an automated analyzer (ABX

Pentra 400, Horiba, Montpellier, France) and test kits A11A01629 and A11A01627 (Horiba), respectively. Data were expressed in IU/l.

### *Statistical analysis*

Results are expressed as means  $\pm$  SEM. Body weight, lean and fat masses were analyzed using analysis of variance (ANOVA) for repeated measures with time as the within-rat factor and group as the second variable. The significance of differences was further analyzed by Fischer's PLSD test. Other results were analyzed using a one-way ANOVA. Student's *t* test was used when significant differences were obtained by ANOVA. Significance was set at  $P \leq 0.05$  and trend at  $P \leq 0.10$ . Analyses were performed using XLSTAT for Windows, version 2013.1.01 software (Addinsoft, SARL, USA).

## **RESULTS**

### *Daily food intake*

During the pre-experimental period (T0), food intake was not significantly different between groups (**Table 2**). During experimental period intake of the PF groups matched well that of the APAP group as there was no group effect or interaction with time effect (ANOVA for repeated measure,  $P \leq 0.001$ ).

### *Body weight and composition.*

There was no significant difference in the initial body weights, lean and fat masses of rats between all experimental groups (**Fig. 1 (A), (B) and (C)**). In all groups, a decrease of body weights, fat and lean mass was observed along the decrease of food intake during the 3 cures (time effects  $P \leq 0.001$ , ANOVA for repeated measures). There was no significant difference between groups at any time for body weight, lean and fat masses.

### *Skeletal muscles and liver masses*

*Liver mass.* Liver mass (**Fig.2(A)**) significantly increased with repeated APAP cures ( $P \leq 0.001$ ) by 13% vs PF. This increase was prevented by Cys addition during cures as liver mass was 9% smaller in the APAP-Cys compared to APAP group ( $P \leq 0.01$ ) and was not significantly different from PF group.

*Skeletal muscles masses.* Sum of muscles, GM and TA masses were not significantly different between the three groups (**Fig.2(B)**). Compared with PF group, repeated APAP cures significantly decreased EDL ( $P \leq 0.01$ ) and SOL ( $P \leq 0.05$ ) masses by 12% and 11% respectively. This loss was preserved by Cys addition during cures as EDL ( $P \leq 0.01$ ) and

SOL ( $P \leq 0.01$ ) masses were significantly higher by 13% in APAP-Cys compared to APAP group and were not significantly different from PF group.

#### ***Muscle and liver protein content and synthesis***

*Liver protein content and synthesis.* Total protein content of liver was not different between all groups (**Fig.3(A)**). ASR of APAP group tended ( $P=0.068$ ) to increase by 18% compared to PF group and was 25% higher ( $P \leq 0.05$ ) than in APAP-Cys. Cys preserved the elevation induced by repeated APAP cures as liver ASR was not significantly different between APAP-Cys and PF groups.

*Muscle protein content and synthesis.* APAP treatment had no significant effect on GM (**Fig.3(B)**) total protein content and absolute synthesis rate (ASR).

#### ***Muscle and liver GSH concentration.***

*Liver GSH.* Compared to PF, liver GSH concentration (**Fig.4(A)**) decreased with repeated APAP cures ( $P \leq 0.001$ ) by 14% and increased by 13% when Cys is added to the APAP cures ( $P \leq 0.001$ ). Cys addition in repeated APAP cures lead to indecreased liver GSH concentration by 24% compared to APAP group ( $P \leq 0.001$ ).

*Muscle GSH.* There was no significant difference between the three groups for muscle GSH concentration (**Fig.4(B)**).

#### ***Plasma aminothiols concentration***

*Free forms.* Compared to PF, Cyst(e)ine was decreased by 10 % ( $P \leq 0.05$ ) with repeated APAP cures (**Table 3**) and was no further different with addition of Cys to the cures. APAP-Cys was not significantly different from APAP but tended ( $P = 0.094$ ) to increase by 7%. Hcy, Cys-Gly and GSH were not significantly different between the three groups.

*Protein-bound forms.* Compared to PF, Hcy and Cys-Gly were increased with repeated APAP cures by 27 ( $P \leq 0.05$ ), 21% ( $P \leq 0.01$ ) respectively (**Table 3**). With the addition of Cys to the cures there was no further difference for Hcy and only a trend ( $P=0.057$ ) to increase Cys-Gly by 13% between APAP-Cys and PF groups. None of the protein-bound thiols were significantly different between APAP and APAP-Cys. Cyst(e)ine and GSH were not significantly different between the three groups.

#### ***Hepatotoxicity***

Repeated APAP cures increased ALT by 39% ( $P \leq 0.05$  vs PF) and Cys addition prevented this effect ( $P \leq 0.05$  vs APAP) (**Table 4**). ALT was not different between between the three groups. Nevertheless, APAP did not induced toxicity as the elevation is slight and far under 3 times the control values or 1 000 IU/l as known as toxicity threshold (James *et al.*, 2009).

## DISCUSSION

In the present study muscle mass loss was lesser than expected and previously observed in the same model (Mast et al., *publication n°3*). Hepatic GSH decrease was also lesser than previously observed in adult and/or aged rats (Mast et al., 2014; *publication n°3*) where muscle and plasma were also decreased, which is not the case in the present work. The lesser of effect of treatment observed in this study compared to the previous could be explain 1) by the inherent variability due to aging and 2) by the higher food intake in this study compared to the previous (Mast et al., *publication n°3*).

The fact that in the present work plasma and GM muscle GSH were not affected by repeated APAP cure is probably the reason why mass loss was not detected in this muscle. Indeed, we previously suggested that APAP induced generalized GSH decrease leads to an oxidative stress associated with an insufficient Cys supply to muscle that could be responsible of the muscle mass loss. (Mast et al., 2014; *publication n°3*). In fact, it is known that with advancing age muscle GSH is decreased and perturbations in GSH homeostasis lead to a longer recuperation time than adults (Chen *et al.*, 1990). These alterations are supposed to be in part responsible of sarcopenia. By the way, this loss of treatment effect on GM muscle could be the explication of the maintenance of GM mass. In addition, muscular GSH is known as an intra-muscular Cys storage (Cho *et al.*, 1981, 1984) and his maintenance may reflected an adequate Cys content in muscle for achieve protein synthesis as shown by the absence of effect of APAP on muscle ASR in the present study.

Our hypothesis was based on the competition between liver and muscle for the use of Cys as in our previous work, liver mass and ASR were strongly increased (Mast et al., *publication n°3*). In the present work liver mass and ASR were increased in a lesser extent compared to PF. This corroborate our hypothesis as the repeated APAP cures induced a lesser increased metabolic need for liver leading to a lesser competition for substrate and preserving a sufficient amount for maintaining in part muscle mass.

Most importantly, even if APAP-induced alterations were milder than expected, Cys supplementation during the repeated cures was efficient to reverse them. Indeed, EDL and SOL masses were significantly decreased by repeated APAP cures and Cys supplementation allowed a total prevention of this effect. Cys supplementation also preserved and enhanced GSH content in the liver and diminished the increased in whole blood GSH.

The increased of whole blood GSH is recurrent in our study with chronic or repeated APAP treatment (Mast et al., 2014; *publication n°3*). We have hypothesized that this increase

is due to a deficiency induced by APAP as previous work in long term AAS restricted diet produced the same whole blood GSH enhancement (Richie *et al.*, 1994). In the present work Cys supplementation prevent this effect, thus strongly suggest that this increase is related to an AAS deficiency induced by APAP treatment.

Previous works have shown that chronic APAP treatment inhibits growth in rodent and that methionine or Cys supplementation prevents this effect. Unfortunately, in those studies food intake was not reported or strongly decreased in comparison with control, not allowing to distinguish the part due to APAP, Cys or food intake (Reicks *et al.*, 1988; Mclean *et al.*, 1989).

In conclusion, our results enlighten that previously described loss of muscle mass observed with chronic APAP treatment are due to Cys deficiency induced by APAP treatment. Furthermore all these disruptions can be preventing by Cys supplementation in the diet. Those results suggest that chronic APAP treatment can be harmless if Cys supplementation or adequate Cys content in the diet are associated with treatment. This is of importance in regard of the large amount of people, especially elderly, consuming daily APAP treatment and at risk of muscle mass loss and oxidative stress.



## REFERENCES

- Bonnefont J, Chapuy E, Clottes E, Alloui A & Eschalier A (2005). Spinal 5-HT<sub>1A</sub> receptors differentially influence nociceptive processing according to the nature of the noxious stimulus in rats: effect of WAY-100635 on the antinociceptive activities of paracetamol, venlafaxine and 5-HT. *PAINÁ®* **114**, 482–490.
- Chen TS, Richie JP & Lang CA (1990). Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **18**, 882–887.
- Cho ES, Johnson N & Snider BC (1984). Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during cystine depletion in growing rats. *J Nutr* **114**, 1853–1862.
- Cho ES, Sahyoun N & Stegink LD (1981). Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during fasting and refeeding of rats. *J Nutr* **111**, 914–922.
- Choi S-S, Lee J-K & Suh H-W (2001). Antinociceptive profiles of aspirin and acetaminophen in formalin, substance P and glutamate pain models. *Brain Res* **921**, 233–239.
- Garlick PJ, McNURLAN MA & Preedy VR (1980). A rapid and convenient technique for measuring the rate of protein synthesis in tissues by injection of [3H] phenylalanine. *Biochem J* **192**, 719–723.
- James LP, Letzig L, Simpson PM, Capparelli E, Roberts DW, Hinson JA, Davern TJ & Lee WM (2009). Pharmacokinetics of Acetaminophen-Protein Adducts in Adults with Acetaminophen Overdose and Acute Liver Failure. *Drug Metab Dispos* **37**, 1779–1784.
- Malmezat T, Breuillé D, Pouyet C, Mirand PP & Obled C (1998). Metabolism of Cysteine Is Modified During the Acute Phase of Sepsis in Rats. *J Nutr* **128**, 97–105.
- Mast,C., Joly,C., Savary-Auzloux,I., Remond,D., Dardevet,D. and Papet,I. (2014) Skeletal muscle wasting occurs in adult rats under chronic treatment with paracetamol when glutathione-dependent detoxification is highly activated. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.*, **65**, 623–631.
- Mclean AEM, Armstrong GR & Beales D (1989). Effect of d- or l-methionine and cysteine on the growth inhibitory effects of feeding 1% paracetamol to rats. *Biochem Pharmacol* **38**, 347–352.
- Pini LA, Sandrini M & Vitale G (1996). The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur J Pharmacol* **308**, 31–40.
- Reicks M, Calvert RJ & Hathcock JN (1988). Effects of prolonged acetaminophen ingestion and dietary methionine on mouse liver glutathione. *Drug Nutr Interact* **5**, 351–363.
- Richie JP, Leutzinger Y, Parthasarathy S, Malloy V, Orentreich N & Zimmerman JA (1994). Methionine restriction increases blood glutathione and longevity in F344 rats. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **8**, 1302–1307.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ & Klenk DC (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76–85.

**Table 1.** Composition of experimental diets.

	<b>Control-diet</b>	<b>APAP-diet</b>	<b>APAP-Cys diet</b>
<b>Ingredients</b>			
Fish meal	211	211	211
APAP	-	10	10
Alanine	4	4	-
Cysteine	-	-	5
Choline	2.5	2.5	2.5
Sunflower oil	31	31	31
Cellulose	50	50	50
Sucrose	100	100	100
Mineral mixture AIN93	20	20	20
Vitamin mixture AIN93	10	10	10
Starch	571.5	561.5	560.5

Quantities are expressed in g/kg dry matter.

APAP: paracetamol

**Table 2.** Effect of APAP repeated cures on food intake (g/d). Values are means by period  $\pm$  SEM.

	<b>T0</b>	<b>C1</b>	<b>IC1</b>	<b>C2</b>	<b>IC2</b>	<b>C3</b>
<b>PF</b>	21.9 $\pm 0.5$	18.8 $\pm 0.1$	19.5 $\pm 0.2$	19.8 $\pm 0.2$	19.7 $\pm 0.2$	19.9 $\pm 0.2$
<b>APAP</b>	22.7 $\pm 0.5$	19.2 $\pm 0.4$	20.2 $\pm 0.3$	20.4 $\pm 0.3$	19.9 $\pm 0.3$	20.5 $\pm 0.3$
<b>APAP-Cys</b>	21.1 $\pm 0.3$	18.6 $\pm 0.1$	20.1 $\pm 0.2$	19.6 $\pm 0.2$	19.8 $\pm 0.1$	20.1 $\pm 0.2$
<i>Time effect</i>	a	b	cd	cd	c	d

**ANOVA for repeated measure**  
**-Time:  $P < 0.001$**   
**-Group:  $P = 0.124$**   
**-Time\*group:  $P = 0.014$**

APAP: paracetamol; Cys: cysteine; PF: pair-fed.

Values not sharing a common letter are significantly different (ANOVA, followed by Fisher's PLSD test)

**Table 3.** Effect of APAP repeated cures with or without Cys on plasma aminothiols ( $\mu\text{mol/l}$ ). Values are means  $\pm$  SEM.

	<i>Free forms</i>				<i>Protein-bound forms</i>			
	<b>Cyst(e)ine</b>	<b>Hcy</b>	<b>Cys-Gly</b>	<b>GSH</b>	<b>Cyst(e)ine</b>	<b>Hcy</b>	<b>Cys-Gly</b>	<b>GSH</b>
<b>PF</b>	132 <sup>a</sup> $\pm 3$	1.70 $\pm 0.08$	0.56 $\pm 0.03$	23.4 $\pm 0.8$	68.5 $\pm 3.3$	1.76 <sup>a</sup> $\pm 0.09$	0.70 <sup>a</sup> $\pm 0.02$	2.96 $\pm 0.40$
<b>APAP</b>	119 <sup>b</sup> $\pm 4$	1.78 $\pm 0.10$	0.58 $\pm 0.06$	23.4 $\pm 0.9$	78.1 $\pm 3.8$	2.23 <sup>b</sup> $\pm 0.17$	0.84 <sup>b</sup> $\pm 0.04$	4.18 $\pm 0.51$
<b>APAP-Cys</b>	128 <sup>ab</sup> $\pm 3$	1.78 $\pm 0.10$	0.59 $\pm 0.03$	24.0 $\pm 1.1$	76.6 $\pm 3.3$	1.97 <sup>ab</sup> $\pm 0.09$	0.79 <sup>ab</sup> $\pm 0.03$	3.18 $\pm 0.49$

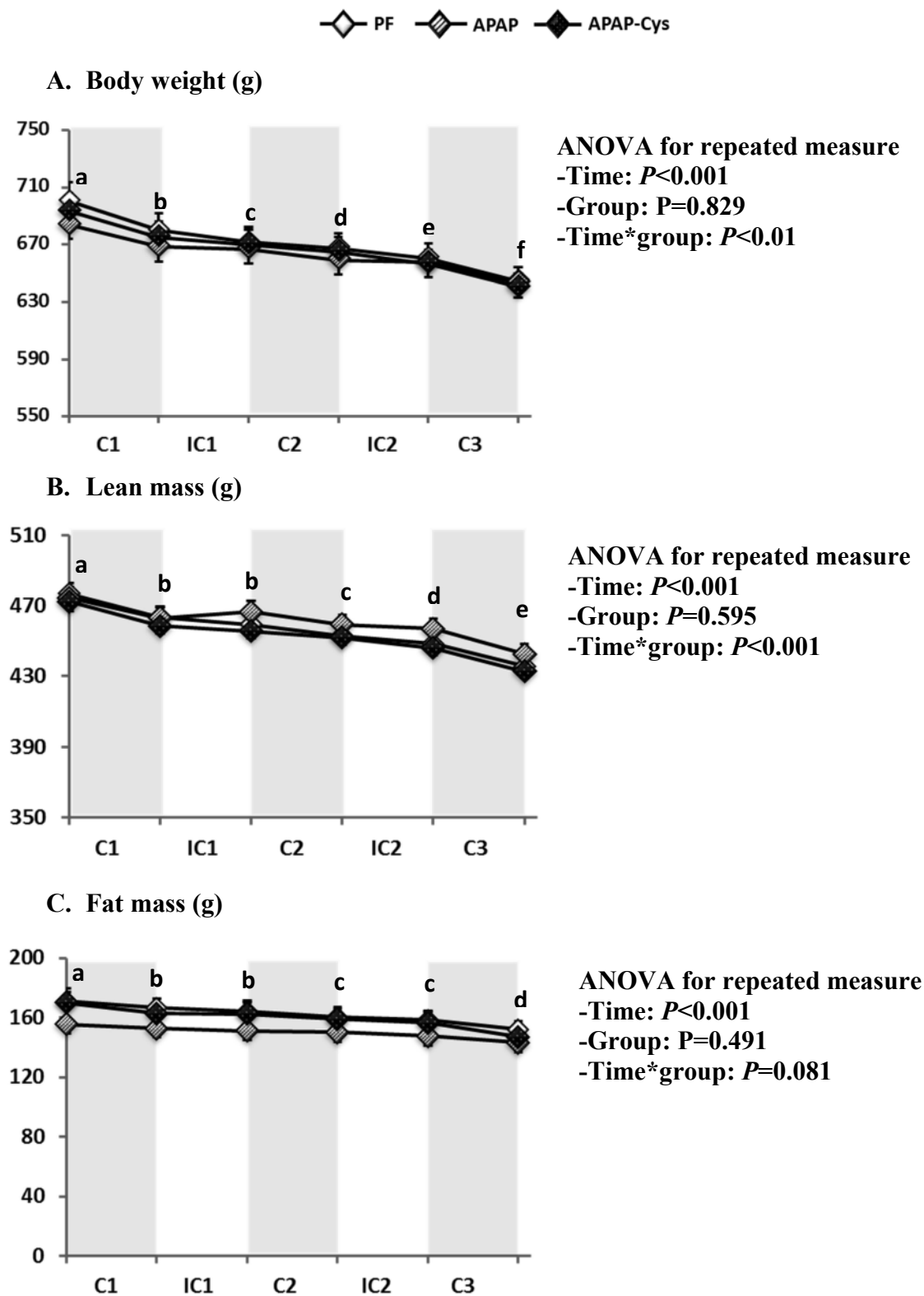
APAP: paracetamol; APAP-Cys: paracetamol+cysteine; Cyst(e)ine: cysteine + cystine; Cys-Gly: cysteinylglycine ; Hcy : homocysteine  
 Values not sharing a common letter are significantly different (ANOVA, followed by Fisher's PLSD test)

**Table 4.** Effect of APAP repeated cures with or without Cys on plasma transaminases activities (IU/l). Values are means  $\pm$  SEM.

	<b>AST</b>	<b>ALT</b>
<b>PF</b>	91,1 $\pm$ 4,7	46,1 <sup>a</sup> $\pm$ 2,5
<b>APAP</b>	99,1 $\pm$ 11,7	63,9 <sup>b</sup> $\pm$ 8,5
<b>APAP-Cys</b>	86,8 $\pm$ 3,2	44,5 <sup>a</sup> $\pm$ 1,6

APAP: paracetamol; APAP-Cys: paracetamol+cysteine; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; PF: pair-fed;

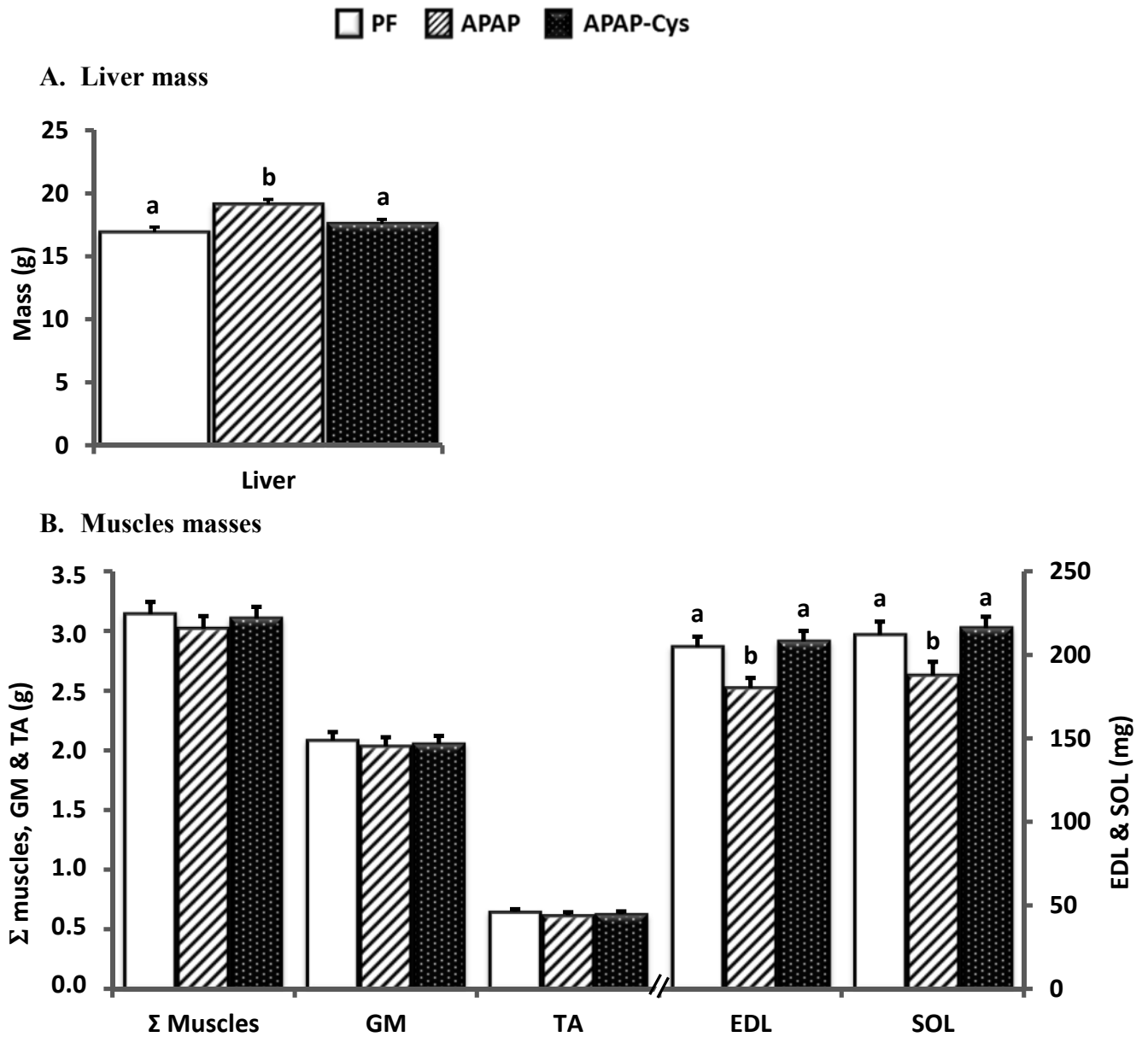
<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, significantly different ( $P < 0.05$ )



**Figure 1.** Effect of APAP repeated cures with or without Cys on body weight (A), lean (B) and fat (C) masses. Values are means  $\pm$  SEM.

APAP: paracetamol; APAP-Cys: paracetamol+cysteine; PF: pair-fed.

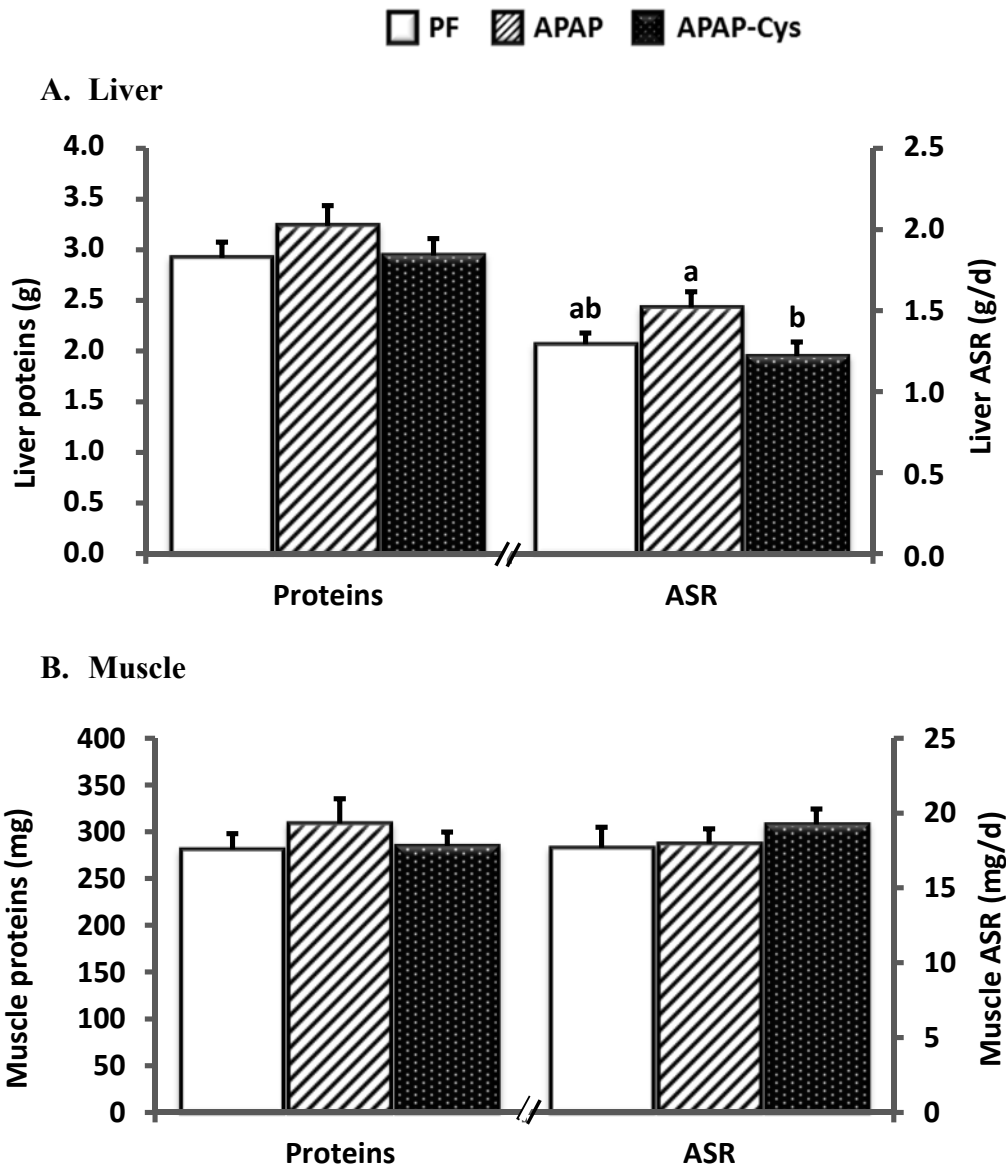
ANOVA for repeated measure. Values not sharing a common letter are significantly different (ANOVA for repeated measurement, followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ )



**Figure 2.** Effect of APAP repeated cures with or without Cys on liver (A) and muscles (B) masses. Values are means  $\pm$  SEM.

APAP: paracetamol; APAP-Cys: paracetamol+cysteine;  $\Sigma$  muscles: sum of the 4 muscles studied, GM: *gastrocnemius*, EDL: *Extensor Digitorum Lungus*. PF: pair-fed, SOL: *soleus*. TA: *tibialis anterior*,

Bars not sharing a common letter are significantly different (ANOVA, followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ )

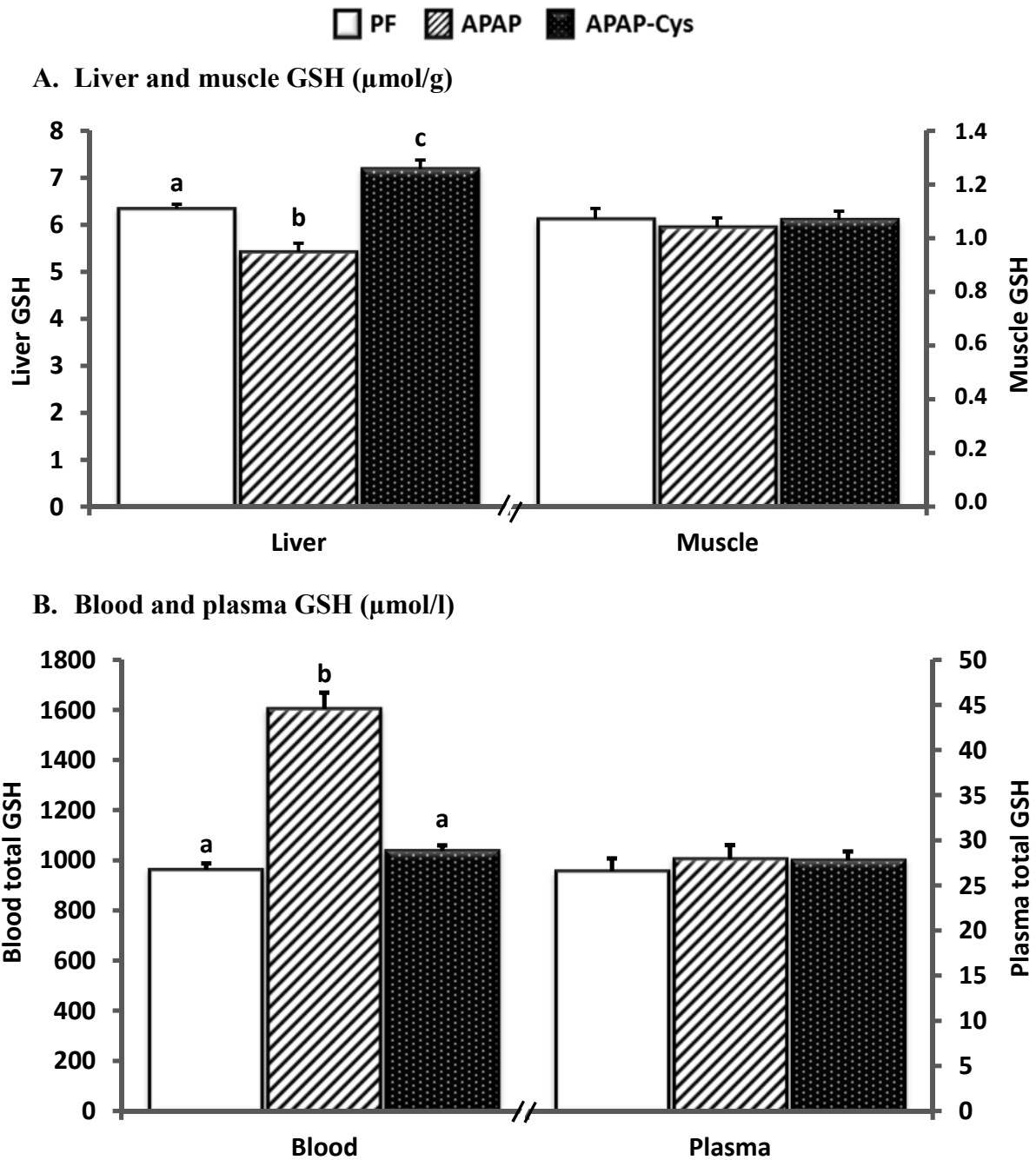


**Figure 3.** Effect of APAP repeated cures with or without Cys on liver (A) and muscle (B) protein content and absolute synthesis rate (ASR). Values are means  $\pm$  SEM.

APAP: paracetamol; APAP-Cys: paracetamol+cysteine; ASR: absolute synthesis rate; PF: pair-fed

Bars not sharing a common letter are significantly different (ANOVA, followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ )





**Figure 4.** Effect of APAP repeated cures with or without Cys on liver and muscle (A), blood and plasma (B) GSH. Values are means  $\pm$  SEM.

APAP: paracetamol; APAP-Cys: paracétamol+cysteine; PF: pair-fed.

Bars not sharing a common letter are significantly different (ANOVA, followed by Fisher's PLSD test,  $P < 0.05$ )

## **DISCUSSION GENERALE**

L'objectif de cette thèse était d'étudier les conséquences d'un traitement chronique au paracétamol sur la masse musculaire du sujet âgé et son lien avec le besoin en Cys. En effet, l'hypothèse de travail était que l'utilisation hépatique de la Cys pour la détoxification du paracétamol pourrait conduire à une réduction de la biodisponibilité de la Cys pour les organes périphériques et donc le muscle. Les données obtenues au cours de cette thèse nous ont permis de répondre à cet objectif en : (1) mettant au point un modèle expérimental représentatif d'un traitement thérapeutique chez l'homme qui nous a permis de mettre en évidence : (2) une fonte musculaire et une aggravation de la sarcopénie chez l'âgé induite spécifiquement par le traitement au paracétamol, (3) que les apports protéiques et en particulier en Cys jouent un rôle primordial dans les effets induits par le traitement.

## 1. ASPECTS METHODOLOGIQUES

### a. ADMINISTRATION DU PARACETAMOL DANS LE REGIME

#### i. CHOIX DU MODE D'ADMINISTRATION

D'après la littérature, le paracétamol peut être administré de différentes façons chez le rongeur. Il peut être injecté en intra-péritonéale, administré dans l'eau de boisson, par gavage ou par ajout dans l'aliment. L'injection sous cutanée conduit à un métabolisme différent du paracétamol qui ne subit alors pas l'extraction effectuée par le foie au premier passage, lorsqu'il est classiquement apporté par voie orale. Cette option a donc été écartée tout comme l'administration dans l'eau de boisson, les quantités administrées étant difficilement quantifiables étant donné le gaspillage possible qui ne peut être mesuré. Le gavage a lui aussi été écarté car c'est une source de stress pour l'animal qui pourrait interférer sur les mesures cibles, d'autant plus sur de longues périodes. Notre choix s'est donc porté sur l'ajout du paracétamol dans l'aliment, qui permet de l'administrer oralement comme classiquement effectué chez l'homme, sans stresser l'animal. De plus, ce mode d'administration a déjà été utilisé chez le rongeur (Reicks & Hathcock, 1989; Mclean *et al.*, 1989)

#### ii. VARIABILITE DU MODELE : EFFET SUR LA PRISE ALIMENTAIRE

Les animaux de la première expérience ayant bien consommé le régime, ce mode d'administration a pu être validé. Nous avons cependant noté une baisse d'ingéré transitoire de 33% les premiers jours de traitement. Ceci nous a conduit par la suite à adapter le modèle en mettant en place un groupe contrôle pair-fed du lot traité et non *ad libitum*.

**Tableau 5** : Bilan des principaux résultats obtenus au cours de la thèse.

N°	Âge fin	Durée	Régime	Ingéré moyen	Masse musculaire	GSH total	Cyst(e)in libre
(1)	4 mois	17 jours	16% protéines-0,5% APAP	Stable (24g)	Aucun effet	Aucun effet	↗ 15% vs T
			16% protéines-1% APAP	↘ J1-2 (33%) puis stable(22g)	Σ muscles: ↘ 8% vs T	Muscle: ↘ 26% vs T Foie: ↘ 63% vs T	↘ 24% vs T
(2)	24 mois	3 cures (2 semaines)	16% protéines-1% APAP	↘ 33% en C1 & 3 (17g) ↘ 19% C2 (19g)	Σ muscles: ↘ 23% vs CT ↘ 12% vs PF	Muscle: ↘ 39% vs CT ↘ 27% vs PF Foie: ↘ 69% vs CT ↘ 51% vs PF Plasma: ↘ 25% vs CT ↘ 20% vs PF	↘ 19% vs CT ↘ 28% vs PF
			8% protéines-1% APAP	↘ 45% en C1 (13g) ↘ 54% en C2 (12g) ↘ 65% en C3 (10g)	Σ muscles: ↘ 30% vs CT NS vs PF-8%	Muscle: ↘ 56% vs CT ↘ 30% vs PF Foie: ↘ 85% vs CT ↘ 39% vs PF	Non mesurée
(3)	13 mois	2 semaines	16% protéines-1% APAP	↘ J1-2 (7%) puis stable (22g)	Non mesuré	Non mesuré	Non mesurée
	24 mois	3 semaines	8% protéines-1% APAP	↘ J1-2 (49%) puis stable à -48%(14g)	Non mesuré	Non mesuré	Non mesurée
(4)	24 mois	3 cures (2 semaines)	16% protéines-1% APAP	↘ 15% en C1 (19g) ↘ 10% en C2 (20g) ↘ 10% en C3 (21g)	Σ muscles: NS EDL-Soleus: ↘ 12% vs PF ↘ 13% vs P-Cys	Muscle: NS vs PF NS vs P-Cys Foie: NS vs PF * ↘ 18% vs P-Cys Plasma: NS vs PF NS vs P-Cys	↘ 10% vs PF NS vs P-Cys
			16% protéines-1% APAP +0,5% Cys (P-Cys)	Pair-feeding	Σ muscles: NS vs PF EDL-Soleus: NS vs PF	Muscle: NS vs PF Foie: ↗ 18% vs PF Plasma: NS vs PF	NS vs PF

APAP: paracétamol, CT: contrôle (euthanasié au t0 de l'expérience), C1, 2 ou3: cures (2 semaines durant lesquelles les rat reçoivent l'APAP, espacées entre elles de 2 semaines du même régime sans APAP), Cys: cystéine, Cys(S): Cys+cystine, NS: non significatif, PF: pair-fed (ajusté à la consommation du lot traité, euthanasié en point final), T: témoin (*ad libitum*, euthanasié en point final). \*Il est à noter que la concentration ↘14% vs PF et 24% vs APAP-Cys, diminution retrouvée dans les expériences 1 (lot 1%) & 2 vs T ou PF, CT respectivement.

L'avantage de l'administration de paracétamol dans le régime est qu'il permet d'avoir un rapport constant entre la quantité de protéines consommées et la quantité de paracétamol ingéré. Toutefois, au fil des expériences nous avons pu constater que l'effet du paracétamol sur la prise alimentaire présentait une certaine variabilité (**Tableau 5**). En effet, lors de la 3<sup>ème</sup> expérience, les rats adultes (13 mois) ont diminué leur ingéré les premiers jours de 49% et cette diminution s'est maintenue durant les 2 semaines de choix alimentaire.

Chez les animaux âgés, au cours de l'expérience 2 (**Tableau 5**), la baisse d'ingéré des lots à 16% de protéines est stable durant chacune des cures (C1, C2, C3), elle est un peu plus importante en C1 et C3 (33%) par rapport à la C2 (23%). Cette moindre diminution lors de la C2 pourrait s'expliquer par un ingéré plus important durant l'inter-cure précédente (IC 1; 22,5 g/j) et par rapport à l'inter-cure précédant la C3 (IC 2; 19,7 g/j). En revanche, bien que l'âge des rats et le protocole expérimental étaient les mêmes dans les expériences 2 et 4, la réduction de prise alimentaire a été moins marquée lors de la 4<sup>ème</sup> expérience. En effet, les rats n'ont diminué leur ingéré que de 15% lors de la première cure puis de 10% les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> cures. De même, lors de l'expérience de choix alimentaire (3<sup>ème</sup> expérience), chez les âgés la baisse initiale a été de 12%, elle s'est ensuite maintenue entre 15% et 17% durant les 3 semaines (**Tableau 5**).

Il ressort de cette comparaison que les différentes cohortes n'ont pas le même comportement face au régime contenant 1% de paracétamol et 16% de protéines. En revanche, il est à noter que lorsque les animaux diminuent peu leur ingéré les premiers jours, ils maintiennent ensuite bien leur ingéré (4<sup>ème</sup> expérience et âgés de la 3<sup>ème</sup> expérience). En revanche, lorsque la diminution est forte dès les 1<sup>ers</sup> jours, seuls les jeunes adultes (expérience 1) augmentent leur ingéré par la suite. Les adultes à 13 mois et les âgés (expérience 2) ne l'augmentent pas.

Cependant, malgré ces variations d'ingéré les lots à 16% de protéines ont maintenu un apport protéique couvrant leur besoin basal, estimé couvert à l'entretien par 15g de régime contenant 5% de protéines consommées (Committee on Animal Nutrition, 1995).

Dans le cas d'un régime à faible teneur en protéines (8%), l'effet du paracétamol sur la prise alimentaire est beaucoup plus fort. La diminution de l'ingéré est de 45% lors de la 1<sup>ère</sup> cure et s'aggrave au fil des cures avec une baisse de 54% et 65% en C2 et C3, respectivement.

Ces observations constituent la principale limite du mode d'administration choisi. En effet, lorsque l'animal refuse le régime contenant 8% de protéines-1% de paracétamol, il reçoit une quantité de paracétamol inférieure à celle escomptée. Ce mode d'administration a



cependant permis de mettre en évidence une augmentation du besoin protéique spécifiquement induite par le traitement (*expériences 2 & 3*). Cet aspect du modèle nous permet aussi de discuter la variabilité de reproductibilité des résultats obtenus dans nos différentes expériences chez le rat âgé (*voir paragraphe 2. p suivante*).

### *iii. AVANTAGES DU MODELE EXPERIMENTAL*

La quantification des métabolites urinaires du paracétamol nous a permis de confronter notre modèle au métabolisme hépatique du paracétamol chez l'homme. Ces profils urinaires ont permis de confirmer que la supplémentation à hauteur de 1% dans le régime était équivalente à l'administration thérapeutique humaine. Nos résultats sont également en accord avec les valeurs préalablement observées chez le rat (Forrest *et al.*, 1982; Hodgman & Garrard, 2012). La dose de 1% a été initialement choisie car elle est proche de l'équivalent thérapeutique maximal (4 g/j) chez l'homme dont la matière sèche ingérée quotidienne est de l'ordre de 400 g (Dubuisson *et al.*, 2010). Le paracétamol en représente alors 1%.

### *b. ANALYSE DES ALTERATIONS PROTEIQUES LIEES AU TRAITEMENT*

Un développement méthodologique a été réalisé afin de quantifier les altérations structurales des protéines hépatiques induites par le paracétamol (*Publication n°2*). Ces altérations sont de deux types : 1) la formation d'adduits paracétamol sur les groupements thiols des résidus Cys libres des protéines, 2) l'oxydation de divers résidus suite à la déplétion du GSH hépatique générée par le traitement.

Cette technique a permis de montrer qu'avec la faible dose de paracétamol (0,5% APAP) ne réduisant pas la concentration du GSH dans le foie (**Tableau 5**), la fixation du NAPQI a lieu simultanément sur les groupements thiols du GSH et sur ceux des protéines. Ceci va à l'encontre de l'idée selon laquelle la fixation du paracétamol sur les protéines n'a lieu qu'après déplétion du GSH. Le traitement à 1% de paracétamol s'accompagne d'une diminution de la fixation des molécules de faible poids moléculaire ayant une fonction thiol (cytéinyl-glycine, GSH, Cys). Ceci résultait d'un phénomène de compétition entre le NAPQI et ces molécules pour la fixation sur les groupements thiols des protéines ou de la réduction de leurs concentrations tissulaires.

En ce qui concerne les autres modifications protéiques, nos résultats indiquent que le traitement chronique à 1% de paracétamol augmente l'oxydation des protéines hépatiques. En

effet, des formes oxydées du tryptophane et le pyro-glutamyl-glutamate augmentent. Toutefois, aucune des variations observées ne révèle la nitrosation des résidus tyrosine ou tryptophane rapportée pour être un élément important dans le mécanisme de toxicité hépatique (Cover et al, 2005 ; Ishii et al, 2006 ; Ishii et al, 2007). Ceci est cohérent avec l'absence d'hépatotoxicité observée dans nos conditions expérimentales.

*Le modèle expérimental développé au cours de cette thèse (i.e. l'administration d'un régime contenant 16 % de protéines et 1% de paracétamol) présente des limites : 1) il n'est pas possible d'étudier l'effet d'un faible apport protéique conjugué à la prise de paracétamol, 2) la prise alimentaire des animaux présente une certaine variabilité. Ce modèle est cependant bien adapté à notre problématique car il permet: 1) de reproduire le mode d'administration par voie orale (le plus classique chez l'homme), 2) la quantité administrée rapportée à l'ingéré en matière sèche est proche de la dose maximale autorisée chez l'homme, 3) les voies métaboliques de détoxification du paracétamol sont équivalentes à celles chez l'homme, 4) il permet de maintenir un rapport constant paracétamol-protéines ingérées.*

## 2. MISE EN EVIDENCE DE LA FONTE MUSCULAIRE ET DE L'AGGRAVATION DE LA SARCOPENIE INDUITE PAR LE PARACETAMOL

### a. PERTE DE MASSE MUSCULAIRE CHEZ LE RAT ADULTE

La 1<sup>ère</sup> expérience réalisée chez le rat adulte a permis de mettre en évidence qu'un traitement de 17 jours conduisait à une perte de masse musculaire généralisée de 8% en comparaison à un lot témoin (**Tableau 5**). Cette perte est associée à une diminution du GSH musculaire et hépatique ainsi qu'à une diminution de la cyst(e)ine libre plasmatique. La comparaison avec le lot traité à 0,5% de paracétamol a permis de mettre en évidence que la perte de masse musculaire et la déplétion du GSH étaient concomitantes à l'augmentation de l'utilisation de la voie GSH pour la détoxification du paracétamol. L'impact du paracétamol sur la masse musculaire en prise chronique chez l'adulte n'est pas documenté. Néanmoins, les travaux de Trappe et al., (2002) ont montré qu'une prise aigue (4 g/j) de paracétamol annule l'augmentation du taux de synthèse fractionnaire musculaire induite par l'exercice. Ces données sont en faveur d'un effet délétère du paracétamol sur le métabolisme musculaire et seraient donc en accord avec la fonte musculaire observée dans notre modèle.

## b. AGGRAVATION DE LA SARCOPENIE CHEZ LE RAT AGE ET MECANISMES EN CAUSE

Comme expliqué précédemment, le paracétamol a été administré par cures répétées chez le sujet âgé afin de mimer sa prise récurrente lors de douleurs chroniques.

Nos travaux ont permis de mettre en évidence que ce traitement, conduisait à une perte de masse musculaire généralisée, de 12% en comparaison à un lot pair-fed et de 23% par rapport au lot contrôle (*Expérience 2*). En revanche, dans l'expérience 4, cette perte est moins généralisée et touche 2 muscles sur les 4 pris en compte.

L'expérience 1 chez l'adulte nous avait conduit à deux hypothèses : 1) la perte de masse musculaire était due au stress oxydant généré par la diminution du GSH, connue pour altérer la synthèse protéique et favoriser la dégradation (Ji *et al.*, 1998; Capel *et al.*, 2004; Derbré *et al.*, 2014) ; 2) cette perte de masse était due à une carence périphérique en Cys générée par l'utilisation augmentée de cet AAS au niveau hépatique, à la fois pour la synthèse du sulfate et du GSH, tous deux perdus dans les urines lors de l'élimination des métabolites du paracétamol. Les données obtenues pour le gastrocnemius des rats âgés recevant les régimes à 16% de protéines (*Expérience 2 & 4*) indiquent que la perte de masse ne survient que lorsque le GSH musculaire, plasmatique et la cyst(e)ine libre diminuent (**Tableau 5**). Cette perte de masse pourraient donc être la résultante de deux phénomènes : 1) le stress oxydant généré par la diminution du GSH, qui est connue pour altérer la synthèse protéique et favoriser la dégradation (Ji *et al.*, 1998; Capel *et al.*, 2004; Derbré *et al.*, 2014). Nos données vont dans le sens de cette hypothèse, l'expérience 2 ayant conduit à une baisse de l'ASR et non l'expérience 4. La dégradation protéique n'est en revanche pas altérée dans notre modèle (expérience 2) cependant nous n'avons mesuré qu'un aspect de la protéolyse, de nombreuses autres étapes pouvant être affectées. 2) La perte de masse musculaire pourrait être due à une carence périphérique en Cys générée par l'utilisation augmentée de cet AAS au niveau hépatique. Nos résultats vont là aussi dans le sens de l'hypothèse puisque dans l'expérience 2, l'ASR hépatique est plus fortement augmenté que lors de l'expérience 4, ce qui pourrait expliquer le maintien de la concentration plasmatique en cyst(e)ine dans la 4<sup>ème</sup> et non dans la 2<sup>ème</sup> expérience. Le muscle n'ayant pas les enzymes nécessaires à la synthèse de la Cys depuis la méthionine, il est dépendant de son apport par la protéolyse, la dégradation du GSH ainsi que l'apport plasmatique. Les sources plasmatiques sont l'apport alimentaire et la synthèse endogène qui est principalement supportée par le foie. D'après la littérature, le foie jouerait aussi un rôle important dans la fourniture de GSH au plasma et par cet intermédiaire, aux organes périphériques.



Ainsi d'après les données obtenues dans cette thèse, la perte de masse musculaire généralisée pourrait s'expliquer par une altération du dialogue métabolique foie- muscle :

- Le paracétamol génère une utilisation hépatique augmentée de la Cys pour assurer la détoxification (sulfate et GSH), elle est indirectement perdue dans les urines
- Cette détoxification génère une utilisation plus importante du GSH et donc de la Cys nécessaire à la synthèse de celui-ci
- La prise du traitement a aussi pour conséquence d'augmenter la synthèse protéique hépatique qui nécessite elle aussi de la Cys
- L'ensemble de ces phénomènes conduit : 1) à une augmentation de l'utilisation de la Cys et donc vraisemblablement de l'extraction hépatique de la Cys issue de l'alimentation, se traduisant par une baisse sa concentration plasmatique ; 2) à une baisse de la quantité de GSH hépatique pouvant être due à l'utilisation augmentée de la Cys pour la détoxification du paracétamol conjuguée à son besoin pour la synthèse qui la rendent insuffisante pour soutenir la synthèse de GSH augmentée
- Tous ces phénomènes conduisent à une moindre disponibilité de la Cys pour le muscle se traduisant par une altération de la synthèse protéique musculaire et une diminution de sa masse

Ce schéma explicatif est cohérent avec l'absence d'effets au niveau du gastrocnemius dans la 4<sup>ème</sup> expérience. En effet, la synthèse protéique hépatique est augmentée dans une moindre proportion et le GSH total hépatique n'est pas diminué. Dans cette configuration, le foie continue à alimenter le pool de GSH plasmatique et la cyst(e)ine bien que diminuée resterait suffisante pour couvrir le besoin musculaire dont le GSH et la synthèse protéique ne sont pas altérés.

Comme discuté dans l'étude bibliographie (*Chapitre III, paragraphe 6. p68*), peu de travaux portent sur le lien entre paracétamol et masse musculaire. Nos travaux montrent un effet opposé à ceux obtenus par Wu *et al.*, (2009, 2010) qui observent une amélioration de la fonction musculaire chez des rats âgés. Cependant, leurs résultats ne peuvent être comparés à nos données ni aux cas de prises thérapeutiques chez l'homme car les doses utilisées sont très faibles et largement sous le seuil analgésique, y compris chez le rat (Choi *et al.*, 2001; Bonnefont *et al.*, 2005).

De même, nos travaux vont à l'inverse des résultats obtenus par Trappe *et al.*, chez l'homme âgé (Trappe *et al.*, 2011, 2013). Leurs résultats montrent une potentialisation du gain de masse induit par l'exercice physique avec le paracétamol. Cependant, comme discuté précédemment, ces résultats ne sont obtenus que sur le muscle exercé et aucun relevé

alimentaire n'est rapporté. Or, une étude précédente a montré une augmentation spontanée de la consommation de protéines et d'AAS suite à la prise chronique de paracétamol chez les personnes âgées à domicile (Pujos-Guillot *et al.*, 2012).

*Nos résultats mettent en évidence une perte de masse musculaire chez l'adulte traité à long terme au paracétamol ainsi que chez l'âge traité par cures répétées. Cette perte est spécifiquement due au paracétamol et vraisemblablement liée à l'utilisation augmentée de la Cys pour assurer la détoxification du paracétamol au niveau hépatique. En effet, la perte généralisée de masse musculaire n'est observée que lorsque le GSH musculaire et plasmatique ainsi que la Cyst(e)ine plasmatiques sont déplétés. Ainsi, le paracétamol génèrerait une compétition inter-organe pour l'utilisation de la Cys, cette compétition foie-muscle ayant lieu au dépend du muscle.*

### 3. IMPORTANCE DE L'APPORT PROTEIQUE ET DE LA CYSTEINE

#### a. IMPORTANCE DE L'APPORT PROTEIQUE

Le refus du régime par les rats âgés disposant uniquement du régime à 8% de protéines supplémentés à 1% de paracétamol (*expérience 2, données complémentaires*) montre le lien entre paracétamol et besoin protéique. En effet, les régimes à 16% de protéines et 1% de paracétamol n'engendrent pas un tel refus (**Tableau 5**). Ce lien entre paracétamol et métabolisme protéique est confirmé par l'expérience de choix alimentaire (*n°3*) qui montre une nette augmentation de la proportion de régime à 16% consommé, uniquement en présence de paracétamol.

L'analyse de l'expérience 2 nous a permis de mettre en évidence que malgré une dose de paracétamol ingérée faible avec le régime APAP-8% (40% inférieure au lot à 16% de protéines), le statut en GSH était altéré. Chez ces rats, la quantité de paracétamol consommée est plus proche de la dose consommée par les rats ayant reçu le régime 0,5% lors de l'expérience 1, que celle consommée par les lots à 16% de protéines. Or, le régime à 0,5% de paracétamol n'a pas induit d'atrophie musculaire et n'a que faiblement activé la voie de détoxification GSH-dépendante. Ainsi, la baisse généralisée du GSH observée avec le lot APAP-8% pourrait résulter de la différence d'apport protéino-énergétique. En effet, le GSH tissulaire et plasmatique et la masse musculaire du lot PF-8% sont déjà fortement diminués en comparaison aux lots CT et 16%. En effet, en comparaison au CT, la perte de masse musculaire du lot PF-8% est de 30% ce qui est supérieur aux résultats obtenus suite à des

stress forts tels que le sepsis (Mayot *et al.*, 2007), le jeûne prolongé (10j, Mosoni *et al.*, 1999) ou encore l'immobilisation (Magne *et al.*, 2012). Ainsi, pour les lots à 8%, le faible apport protéino-énergétique apparaît insuffisant pour couvrir le besoin physiologique minimal de l'organisme. Or, d'après la littérature, en cas d'apports insuffisants en acides aminés soufrés, au niveau hépatique la synthèse protéique et du GSH sont les voies prioritaires d'utilisation de la Cys sur la formation du sulfate (Stipanuk *et al.*, 1992; Bella *et al.*, 1999b, 1999a; Cresenzi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004). De plus, un régime pauvre en protéines ou en AAS est capable d'induire une dégradation de la cystéine dioxygénase, enzyme permettant la formation de sulfate depuis la Cys (Bella *et al.*, 2000; Stipanuk *et al.*, 2004). Il est donc fort probable que dans le lot APAP-8% la concentration hépatique en sulfate soit fortement diminuée. Si la quantité de sulfate est insuffisante, la sulfatation du paracétamol est diminuée avec une augmentation proportionnelle de la voie glucuronide et GSH (Prescott, 1980; Hjelle & Klaassen, 1984). Ceci expliquerait la diminution du GSH hépatique, plasmatique et musculaire chez le lot traité à 8% en comparaison à son PF-8% (*Expérience 2, Tableau 5*), alors que chez les adultes recevant une dose de paracétamol équivalente sans carence protéino-énergétique (*Expérience 1, Tableau 5*) ce phénomène n'est pas observé. Cette hypothèse pourrait être confirmée en utilisant la technique développée au cours de cette thèse (Publication 2) afin de quantifier la présence d'adduits et d'oxydation au niveau hépatique et de les comparer aux lots APAP-16% de protéines. En effet, une moindre détoxification du paracétamol par conjugaison au sulfate s'accompagnerait d'une augmentation de la formation de NAPQI et par conséquent, d'adduits protéiques. Ces derniers, associés à la chute du GSH favoriseraient l'oxydation des protéines selon les mécanismes décrits dans l'analyse bibliographique (McGill & Jaeschke, 2013)

En ce qui concerne le muscle, malgré des déplétions du GSH (APAP *vs* PF) de même ampleur dans les lots à 8% et 16% la réduction de masse musculaire n'est observée qu'avec le lot à 16% (APAP *vs* PF). L'absence d'effet du paracétamol sur la masse musculaire chez le lot APAP-8% pourrait être due à la forte réduction (30%) de masse déjà présente chez le lot PF-8% en comparaison au CT. De plus, ces animaux ont ingéré une quantité plus faible de paracétamol, ceci conduisant à une perte quantitative de Cys pour la détoxification moins importante en comparaison aux lots à 16% de protéines. L'utilisation supplémentaire de Cys chez les traités à 8% (*vs* PF) est donc moins importante du fait de la plus faible quantité de paracétamol ingérée, que l'utilisation supplémentaire pour les lots à 16%.

Ainsi, quantitativement, la détoxification du paracétamol chez le lot APAP-8% ne génère pas une perte de Cys aussi conséquente que celle du lot APAP-16%. Cependant, cette

quantité est suffisante pour générer un stress oxydant, probablement dû à la faible disponibilité en Cys due aux apports alimentaires restreints.

#### b. IMPORTANCE DE LA CYSTEINE

Dans l'expérience 4, la dose de Cys administrée en supplémentation a été calculée pour couvrir uniquement le besoin supplémentaire généré par la détoxification hépatique du paracétamol, sur la base des métabolites quantifiés suite à la 1<sup>ère</sup> expérience.

Cette expérience nous a permis de mettre en évidence que la supplémentation en Cys permettait de prévenir les effets délétères du paracétamol sur la masse musculaire (EDL & Soleus), la masse et l'ASR hépatiques, le GSH tissulaire & sanguin et la Cys libre plasmatique (**Tableau 5**). Les limites d'interprétation de ces résultats sont que le paracétamol n'a pas reproduit une diminution généralisée de la masse musculaire et du GSH telles qu'observées précédemment avec le même protocole (*Expérience 2*).

Malgré cette reproductibilité partielle, la supplémentation en Cys permet de prévenir totalement les effets induits par le traitement au paracétamol (Publication 4). Seul le GSH sanguin n'est pas totalement normalisé mais son augmentation est largement prévenue (8% vs PF contre 67% avec paracétamol seul vs PF). Peu de données permettent de discuter cette augmentation au niveau du sang total. Les érythrocytes ne pourraient pas capter le GSH mais uniquement de la Cys (Cho *et al.*, 1984). Dans leurs travaux, Richie *et al.*, (1994) montrent que la restriction en AAS conduit à une augmentation du GSH sanguin accompagnée d'une baisse du GSH hépatique et de la Cyst(e)ine plasmatique. La prévention de cet effet par la supplémentation en Cys (*Expérience 4*), conduit à l'hypothèse que ce phénomène serait bien lié à la carence en AAS générée par le traitement.

De façon plus générale, nos résultats obtenus avec la supplémentation en Cys sont en accord avec les données de la littérature. En effet, en cas d'overdose au paracétamol, la N-acétylcystéine est donnée comme remède car elle permet de fournir de la Cys pour augmenter la sulfatation ainsi que la synthèse du GSH (Hodgman & Garrard, 2012). Dans notre cas, la supplémentation en Cys seule permet de prévenir les altérations du statut en GSH. Des travaux effectués chez le rongeur en croissance ont montré un arrêt de la croissance induit par 1% de paracétamol dans le régime (Reicks & Hathcock, 1989; Mclean *et al.*, 1989). Ces travaux montrent que la supplémentation du régime en méthionine ou Cys permet de prévenir cet effet. Cependant, dans ces travaux l'ingéré n'est pas reporté ou fortement réduit, il est donc difficile de dissocier l'effet paracétamol de l'effet réduction de prise alimentaire. Nos travaux ont permis de montrer qu'à ingéré égal, la supplémentation en Cys, à dose équivalente

à l'extra-utilisation générée pour la détoxification, permet à elle seule de prévenir les effets délétères du paracétamol sur la masse musculaire, le GSH, ainsi que la masse et l'ASR hépatiques.

*Nos résultats montrent une augmentation du besoin protéique généré par la prise de paracétamol et plus spécifiquement un besoin en Cys. En effet, ces données nous permettent de confirmer que les altérations observées sur la masse musculaire sont liées à une utilisation augmentée de la Cys par le foie pour la détoxification du paracétamol. Les cures répétées de paracétamol à une dose équivalente à la dose maximale thérapeutique chez l'homme génèrent un besoin supplémentaire en Cys qui, s'il n'est pas couvert, conduit à une baisse du GSH hépatique. Lorsque cette baisse de GSH se généralise au plasma et au muscle, le traitement au paracétamol conduit à une perte de masse musculaire.*

*De plus, nos données révèlent qu'en cas d'apports protéino-énergétiques insuffisants, les cures répétées d'une plus faible dose de paracétamol (60% de la prise dans les régimes à 16% de protéines) est suffisante pour conduire à une forte diminution du GSH dans les tissus et le plasma.*

## *Conclusion générale et Perspectives de la thèse*

---

En conclusion, le résultat majeur obtenu au cours de cette thèse est la perte de masse musculaire de 12% induite spécifiquement par le paracétamol lors de sa prise répétée chez le rat âgé. Au regard de l'ensemble des résultats obtenus, cette perte de masse serait expliquée par l'utilisation augmentée de la Cys au niveau hépatique afin de soutenir la détoxification du paracétamol. En effet, la perte généralisée de masse musculaire due au traitement n'est observée que lorsque la synthèse des protéines hépatiques est fortement augmentée et que la déplétion du GSH hépatique se répercute au niveau musculaire. Nos résultats ont permis de confirmer le rôle prépondérant de la carence en Cys générée par le traitement, la supplémentation du régime en Cys permettant de prévenir les effets délétères observés sur le GSH, la synthèse et la masse musculaires. Le paracétamol génère donc une compétition inter-organe, en particulier foie-muscle, pour l'utilisation de la Cys, cette compétition ayant lieu au dépend du muscle.

Au vue de ces résultats, il serait intéressant d'étudier plus en détail la cinétique d'apparition de la perte de masse musculaire suite au traitement par cures. Cette étude permettrait d'analyser les effets de chacune des cures ainsi que l'absence/présence de récupération musculaire au cours des périodes d'inter-cure. Ces données nous permettraient d'évaluer l'importance de la chronicité des cures dans l'ampleur de la perte de masse musculaire, ainsi que l'importance des phases intermédiaires pouvant conduire à une éventuelle récupération musculaire partielle.

La faible consommation du régime à 8% de protéines-1% de paracétamol pourrait permettre d'étudier si une supplémentation uniquement en Cys est suffisante pour prévenir les effets du paracétamol ou si l'augmentation de l'apport protéique global est aussi nécessaire.

L'ensemble de nos observations doit encore être validé chez la personne âgée au cours de périodes de traitement chronique au paracétamol.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdulla A, Adams N, Bone M, Elliott A, Gaffin J, Jones D, Knaggs R, Martin D, Sampson L & Schofield P (2013). Guidance on the management of pain in older people. *Age Ageing* **42**, i1–i57.
- Adams GR, Caiozzo VJ & Baldwin KM (2003). Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* **95**, 2185–2201.
- Adjei AA, Gaedigk A, Simon SD, Weinshilboum RM & Leeder JS (2008). Interindividual variability in acetaminophen sulfation by human fetal liver: implications for pharmacogenetic investigations of drug-induced birth defects. *Birt Defects Res A Clin Mol Teratol* **82**, 155–165.
- Afssaps (2006). Les ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France, chiffres-clés 2005.
- Afssaps (2007). Les ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France, chiffres-clés 2006.
- Afssaps (2008). Les ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France, chiffres-clés 2007.
- Afssaps (2009). Les ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France, chiffres-clés 2008.
- Afssaps (2011). Ventes de médicaments aux officines et aux hôpitaux en France, chiffres-clés 2010.
- Airaksinen O, Brox JI, Cedraschi C, Hildebrandt J, Klüber-Moffett J, Kovacs F, Mannion AF, Reis S, Staal JB, Ursin H & Zanoli G (2006). Chapter 4 European guidelines for the management of chronic nonspecific low back pain. *Eur Spine J* **15**, s192–s300.
- Akerboom TP, Bilzer M & Sies H (1982). The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. *J Biol Chem* **257**, 4248–4252.
- Ali S & Garcia JM (2014). Sarcopenia, Cachexia and Aging: Diagnosis, Mechanisms and Therapeutic Options - A Mini-Review. *Gerontology* **60**, 294–305.
- Allen DL, Roy RR & Edgerton VR (1999). Myonuclear domains in muscle adaptation and disease. *Muscle Nerve* **22**, 1350–1360.
- Alloui A, Chassaing C, Schmidt J, Ardid D, Dubray C, Cloarec A & Eschalier A (2002). Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol* **443**, 71–77.
- Altman RD, Zinsenheim JR, Temple AR & Schweinle JE (2007). Three-month efficacy and safety of acetaminophen extended-release for osteoarthritis pain of the hip or knee: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Osteoarthritis Cartilage* **15**, 454–461.
- Andersen JL (2003). Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand J Med Sci Sports* **13**, 40–47.
- Anderson BJ (2008). Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action. *Pediatr Anesth* **18**, 915–921.
- ANSM (2012). Analyse des ventes de médicaments en France en 2011.
- ANSM (2013). Analyse des ventes de médicaments en France en 2012.
- ANSM (2014). Analyse des ventes de médicaments en France en 2013.
- Anthony JC, Anthony TG, Kimball SR & Jefferson LS (2001). Signaling Pathways Involved in Translational Control of Protein Synthesis in Skeletal Muscle by Leucine. *J Nutr* **131**, 856S–860S.
- Anthony JC, Yoshizawa F, Anthony TG, Vary TC, Jefferson LS & Kimball SR (2000). Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway. *J Nutr* **130**, 2413–2419.



- Arivazhagan P, Ramanathan K & Panneerselvam C (2001). Effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chem Biol Interact* **138**, 189–198.
- Arnal M-A, Mosoni L, Boirie Y, Houlier M-L, Morin L, Verdier E, Ritz P, Antoine J-M, Prugnaud J, Beaufrère B & Mirand PP (1999). Protein pulse feeding improves protein retention in elderly women. *Am J Clin Nutr* **69**, 1202–1208.
- Arnal M-A, Mosoni L, Dardevet D, Ribeyre M-C, Bayle G, Prugnaud J & Mirand PP (2002). Pulse Protein Feeding Pattern Restores Stimulation of Muscle Protein Synthesis during the Feeding Period in Old Rats. *J Nutr* **132**, 1002–1008.
- Attaix D, Combaret L, Kee A, Larbaud D, Rallièrè C, Souweine B, Taillandier D & Tilignac T (1998). Ubiquitin-proteasome-dependent proteolysis. Available at: [http://rnd.edpsciences.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/rnd/pdf/1998/02/RND\\_0926-5287\\_1998\\_38\\_2\\_ART0002.pdf](http://rnd.edpsciences.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/rnd/pdf/1998/02/RND_0926-5287_1998_38_2_ART0002.pdf) [Accessed July 2, 2014].
- Attaix D, Ventadour S, Codran A, Béchet D, Taillandier D & Combaret L (2005). The ubiquitin-proteasome system and skeletal muscle wasting. *Essays Biochem* **41**, 173–186.
- Axworthy DB, Hoffmann KJ, Streeter AJ, Calleman CJ, Pascoe GA & Baillie TA (1988). Covalent binding of acetaminophen to mouse hemoglobin. Identification of major and minor adducts formed in vivo and implications for the nature of the arylating metabolites. *Chem Biol Interact* **68**, 99–116.
- Ayres E, Warmington M & Reid MC (2012). Chronic pain perspectives: Managing chronic pain in older adults: 6 steps to overcoming medication barriers. *J Fam Pract* **61**, S16–21.
- Bachhawat AK, Thakur A, Kaur J & Zulkifli M (2013). Glutathione transporters. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **1830**, 3154–3164.
- Badaloo A, Reid M, Forrester T, Heird WC & Jahoor F (2002). Cysteine supplementation improves the erythrocyte glutathione synthesis rate in children with severe edematous malnutrition. *Am J Clin Nutr* **76**, 646–652.
- Bagley PJ, Hirschberger LL & Stipanuk MH (1995). Evaluation and Modification of an Assay Procedure for Cysteine Dioxygenase Activity: High-Performance Liquid Chromatography Method for Measurement of Cysteine Sulfinic Acid and Demonstration of Physiological Relevance of Cysteine Dioxygenase Activity in Cysteine Catabolism. *Anal Biochem* **227**, 40–48.
- Bagley PJ & Stipanuk MH (1994). The Activities of Rat Hepatic Cysteine Dioxygenase and Cysteinesulfinic Acid Decarboxylase Are Regulated in a Reciprocal Manner in Response to Dietary Casein Level. *J Nutr* **124**, 2410–2421.
- Bagley PJ & Stipanuk MH (1995). Rats Fed a Low Protein Diet Supplemented with Sulfur Amino Acids Have Increased Cysteine Dioxygenase Activity and Increased Taurine Production in Hepatocytes. *J Nutr* **125**, 933–940.
- Baker DH, Becker DE, Norton HW, Jensen AH & Harmon BG (1966). Quantitative Evaluation of the Tryptophan, Methionine and Lysine Needs of Adult Swine for Maintenance. *J Nutr* **89**, 441–447.
- Balage M, Averous J, Rémond D, Bos C, Pujos-Guillot E, Papet I, Mosoni L, Combaret L & Dardevet D (2010). Presence of low-grade inflammation impaired postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats. *J Nutr Biochem* **21**, 325–331.
- Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA & Nair KS (1997). Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **273**, E790–E800.

- Ball RO, Courtney-Martin G & Pencharz PB (2006). The in vivo sparing of methionine by cysteine in sulfur amino acid requirements in animal models and adult humans. *J Nutr* **136**, 1682S–1693S.
- Ballatori N (1994). Glutathione mercaptides as transport forms of metals. *Adv Pharmacol San Diego Calif* **27**, 271–298.
- Ballatori N (2002). Transport of toxic metals by molecular mimicry. *Environ Health Perspect* **110 Suppl 5**, 689–694.
- Ballatori N & Dutczak WJ (1994). Identification and characterization of high and low affinity transport systems for reduced glutathione in liver cell canalicular membranes. *J Biol Chem* **269**, 19731–19737.
- Ballatori N, Jacob R, Barrett C & Boyer JL (1988). Biliary catabolism of glutathione and differential reabsorption of its amino acid constituents. *Am J Physiol* **254**, G1–7.
- Ballatori N, Jacob R & Boyer JL (1986). Intrabiliary glutathione hydrolysis. A source of glutamate in bile. *J Biol Chem* **261**, 7860–7865.
- Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K & Hammond CL (2009). Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* **390**, 191–214.
- Ballatori N & Rebeor J (1998). Roles of MRP2 and oatp1 in Hepatocellular Export of Reduced Glutathione. *Semin Liver Dis* **18**, 377–387.
- Ballatori N, Truong AT, Ma AK & Boyer JL (1989). Determinants of glutathione efflux and biliary GSH/GSSG ratio in perfused rat liver. *Am J Physiol* **256**, G482–490.
- Banerjee R, Evande R, Kabil Ö, Ojha S & Taoka S (2003). Reaction mechanism and regulation of cystathionine  $\beta$ -synthase. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* **1647**, 30–35.
- Bannai S & Tateishi N (1986). Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol* **89**, 1–8.
- Baron AD, Brechtel G, Wallace P & Edelman SV (1988). Rate and tissue of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol* **255**, E769–74.
- Barriere DA, Mallet C, Blomgren A, Simonsen C, Daulhac L, Libert F, Chapuy E, Etienne M, Hogestatt ED, Zygmunt PM & Eschalier A (2013). Fatty Acid Amide Hydrolase-Dependent Generation of Antinociceptive Drug Metabolites Acting on TRPV1 in the Brain. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0070690.
- Basaria S, Coviello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, Jette AM, Eder R, Tennstedt S, Ulloor J, Zhang A, Choong K, Lakshman KM, Mazer NA, Miciek R, Krasnoff J, Elmi A, Knapp PE, Brooks B, Appleman E, Aggarwal S, Bhasin G, Hede-Brierley L, Bhatia A, Collins L, LeBrasseur N, Fiore LD & Bhasin S (2010). Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med* **363**, 109–122.
- Bauer J, Biolo G, Cederholm T, Cesari M, Cruz-Jentoft AJ, Morley JE, Phillips S, Sieber C, Stehle P, Teta D, Visvanathan R, Volpi E & Boirie Y (2013). Evidence-Based Recommendations for Optimal Dietary Protein Intake in Older People: A Position Paper From the PROT-AGE Study Group. *J Am Med Dir Assoc* **14**, 542–559.
- Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ & Lindeman RD (1998). Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* **147**, 755–763.
- Baylis D, Ntani G, Edwards MH, Syddall HE, Bartlett DB, Dennison EM, Martin-Ruiz C, Zglinicki T von, Kuh D, Lord JM, Sayer AA & Cooper C (2014). Inflammation, Telomere Length, and Grip Strength: A 10-year Longitudinal Study. *Calcif Tissue Int* **95**, 54–63.
- Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L & Attaix D (2005). Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 2098–2114.

- Bella DL, Hahn C & Stipanuk MH (1999a). Effects of nonsulfur and sulfur amino acids on the regulation of hepatic enzymes of cysteine metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **277**, E144–E153.
- Bella DL, Hirschberger LL, Hosokawa Y & Stipanuk MH (1999b). Mechanisms involved in the regulation of key enzymes of cysteine metabolism in rat liver in vivo. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **276**, E326–E335.
- Bella DL, Hirschberger LL, Hosokawa Y & Stipanuk MH (1999c). Mechanisms involved in the regulation of key enzymes of cysteine metabolism in rat liver in vivo. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **276**, E326–E335.
- Bella DL, Hirschberger LL, Kwon YH & Stipanuk MH (2002). Cysteine metabolism in periportal and perivenous hepatocytes: Perivenous cells have greater capacity for glutathione production and taurine synthesis but not for cysteine catabolism. *Amino Acids* **23**, 453–458.
- Bella DL, Kwon YH, Hirschberger LL & Stipanuk MH (2000). Post-transcriptional regulation of cysteine dioxygenase in rat liver. *Adv Exp Med Biol* **483**, 71–85.
- Bella DL, Kwon YH & Stipanuk MH (1996). Variations in Dietary Protein but Not in Dietary Fat Plus Cellulose or Carbohydrate Levels Affect Cysteine Metabolism in Rat Isolated Hepatocytes. *J Nutr* **126**, 2179–2187.
- Bella DL & Stipanuk MH (1995). Effects of protein, methionine, or chloride on acid-base balance and on cysteine catabolism. *Am J Physiol* **269**, E910–917.
- Benista MJ-B & Nowak JZ (2014). Parectamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Pol Pharm* **71**, 11–23.
- Bertin P, Keddad K & Jolivet-Landreau I (2004). Acetaminophen as symptomatic treatment of pain from osteoarthritis. *Joint Bone Spine* **71**, 266–274.
- Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R & Leone S (2006). Paracetamol: New Vistas of an Old Drug. *CNS Drug Rev* **12**, 250–275.
- Bianchi G, Brizi M, Rossi B, Ronchi M, Grossi G & Marchesini G (2000). Synthesis of glutathione in response to methionine load in control subjects and in patients with cirrhosis. *Metabolism* **49**, 1434–1439.
- Björkman R, Hallman KM, Hedner J, Hedner T & Henning M (1994). Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain* **57**, 259–264.
- Bloom HJ, Boers GH, van den Elzen JP, Gahl W & Tangerman A (1989). Transamination of methionine in humans. *Clin Sci Lond Engl* **1979** **76**, 43–49.
- Boardman PL & Hart FD (1967). Clinical measurement of the anti-inflammatory effects of salicylates in rheumatoid arthritis. *Br Med J* **4**, 264–268.
- Boirie Y (2013). Fighting Sarcopenia in Older Frail Subjects: Protein Fuel for Strength, Exercise for Mass. *J Am Med Dir Assoc* **14**, 140–143.
- Boirie Y, Gachon P & Beaufrère B (1997). Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* **65**, 489–495.
- Bonetto A, Penna F, Muscaritoli M, Minero VG, Fanelli FR, Baccino FM & Costelli P (2009). Are antioxidants useful for treating skeletal muscle atrophy? *Free Radic Biol Med* **47**, 906–916.
- Bonnefont J, Chapuy E, Clottes E, Alloui A & Eschalier A (2005). Spinal 5-HT<sub>1A</sub> receptors differentially influence nociceptive processing according to the nature of the noxious stimulus in rats: effect of WAY-100635 on the antinociceptive activities of paracetamol, venlafaxine and 5-HT. *PAIN* **114**, 482–490.
- Booth FW (1982). Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J Appl Physiol* **52**, 1113–1118.

- Bos C, Stoll B, Fouillet H, Gaudichon C, Guan X, Grusak MA, Reeds PJ, Burrin DG & Tomé D (2005). Postprandial intestinal and whole body nitrogen kinetics and distribution in piglets fed a single meal. *AJP Endocrinol Metab* **288**, E436–E446.
- Bouillanne O, Curis E, Hamon-Vilcot B, Nicolis I, Chrétien P, Schauer N, Vincent J-P, Cynober L & Aussel C (2013). Impact of protein pulse feeding on lean mass in malnourished and at-risk hospitalized elderly patients: A randomized controlled trial. *Clin Nutr* **32**, 186–192.
- Bourdel-Marchasson I, Helmer C, Fagot-Campagna A, Dehail P & Joseph PA (2007). Disability and quality of life in elderly people with diabetes. *Diabetes Metab* **33**, Supplement 1, S66–S74.
- Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR & Day BJ (2010). Glutathione Transport Is a Unique Function of the ATP-binding Cassette Protein ABCG2. *J Biol Chem* **285**, 16582–16587.
- Breen K, Wandscheer JC, Peignoux M & Pessayre D (1982). In situ formation of the acetaminophen metabolite covalently bound in kidney and lung. Supportive evidence provided by total hepatectomy. *Biochem Pharmacol* **31**, 115–116.
- Breuillé D & Obled C (2000). Cysteine and Glutathione in Catabolic States. In *Nestlé Nutrition Workshop Series: Clinical & Performance Program*, ed. Fürst P & Young V, pp. 173–197. KARGER, Basel. Available at: <http://www.karger.com/Article/Abstract/61807> [Accessed July 29, 2014].
- Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RIR, Perez MJ, Jimenez F, San Martin FG & Marin JJG (2006). OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem* **281**, 30326–30335.
- Brooke MH & Kaiser KK (1970). Three “myosin adenosine triphosphatase” systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *J Histochem Cytochem* **18**, 670–672.
- Brooks PM (2006). The burden of musculoskeletal disease--a global perspective. *Clin Rheumatol* **25**, 778–781.
- Brooks PM & Day RO (1991). Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs — Differences and Similarities. *N Engl J Med* **324**, 1716–1725.
- Brunsgaard H, Andersen-Ranberg K, Hjelmberg J v. ., Pedersen BK & Jeune B (2003). Elevated levels of tumor necrosis factor alpha and mortality in centenarians. *Am J Med* **115**, 278–283.
- Bujalska M (2004). Effect of nitric oxide synthase inhibition on antinociceptive action of different doses of acetaminophen. *Pol J Pharmacol* **56**, 605–610.
- Di Buono M, Wykes LJ, Ball RO & Pencharz PB (2001a). Total sulfur amino acid requirement in young men as determined by indicator amino acid oxidation with L-[1-<sup>13</sup>C] phenylalanine. *Am J Clin Nutr* **74**, 756–760.
- Di Buono M, Wykes LJ, Ball RO & Pencharz PB (2001b). Dietary cysteine reduces the methionine requirement in men. *Am J Clin Nutr* **74**, 761–766.
- Di Buono M, Wykes LJ, Cole DE, Ball RO & Pencharz PB (2003). Regulation of sulfur amino acid metabolism in men in response to changes in sulfur amino acid intakes. *J Nutr* **133**, 733–739.
- Burk RF & Hill KE (1995). Reduced glutathione release into rat plasma by extrahepatic tissues. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **269**, G396–G399.
- Cakatay U, Telci A, Kayali R, Tekeli F, Akçay T & Sivas A (2003). Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle. *Clin Biochem* **36**, 51–55.



- Calvani R, Miccheli A, Landi F, Bossola M, Cesari M, Leeuwenburgh C, Sieber CC, Bernabei R & Marzetti E (2013). Current nutritional Recommendations and Novel Dietary Strategies to Manage Sarcopenia. *J Frailty Aging* **2**, 38–53.
- Capel F, Buffière C, Patureau Mirand P & Mosoni L (2004). Differential variation of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release during aging in oxidative and glycolytic muscles in rats. *Mech Ageing Dev* **125**, 367–373.
- Capel F, Rimbert V, Lioger D, Diot A, Rousset P, Mirand PP, Boirie Y, Morio B & Mosoni L (2005). Due to reverse electron transfer, mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release increases with age in human vastus lateralis muscle although oxidative capacity is preserved. *Mech Ageing Dev* **126**, 505–511.
- Cavalieri TA (2005). Management of pain in older adults. *J Am Osteopath Assoc* **105**, S12–17.
- Chan A & Hepp P (1886). Das Antifebrin, ein neues Fiebermittel. *Cent Klein Med* **7**, 561–564.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS & Simmons DL (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13926–13931.
- Charge SBP & Rudnicki MA (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209–238.
- Chen TS, Richie JP & Lang CA (1989). The effect of aging on glutathione and cysteine levels in different regions of the mouse brain. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N* **190**, 399–402.
- Chen TS, Richie JP & Lang CA (1990). Life span profiles of glutathione and acetaminophen detoxification. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **18**, 882–887.
- Chen TS, Richie Jr. JP, Nagasawa HT & Lang CA (2000). Glutathione monoethyl ester protects against glutathione deficiencies due to aging and acetaminophen in mice. *Mech Ageing Dev* **120**, 127–139.
- Chikhi N, Holic N, Guellaen G & Laperche Y (1999). Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **122**, 367–380.
- Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V & Banerjee R (2009). H<sub>2</sub>S Biogenesis by Human Cystathionine  $\gamma$ -Lyase Leads to the Novel Sulfur Metabolites Lanthionine and Homolanthionine and Is Responsive to the Grade of Hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* **284**, 11601–11612.
- Cho ES, Johnson N & Snider BC (1984). Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during cysteine depletion in growing rats. *J Nutr* **114**, 1853–1862.
- Cho ES, Sahyoun N & Stegink LD (1981). Tissue glutathione as a cyst(e)ine reservoir during fasting and refeeding of rats. *J Nutr* **111**, 914–922.
- Choi S-S, Lee J-K & Suh H-W (2001). Antinociceptive profiles of aspirin and acetaminophen in formalin, substance P and glutamate pain models. *Brain Res* **921**, 233–239.
- Chou JY (2000). Molecular genetics of hepatic methionine adenosyltransferase deficiency. *Pharmacol Ther* **85**, 1–9.
- Chu X-Y, Strauss JR, Mariano MA, Li J, Newton DJ, Cai X, Wang RW, Yabut J, Hartley DP, Evans DC & Evers R (2006). Characterization of mice lacking the multidrug resistance protein MRP2 (ABCC2). *J Pharmacol Exp Ther* **317**, 579–589.
- Chung L & Ng Y-C (2006). Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1762**, 103–109.

- Clamann HP (1993). Motor unit recruitment and the gradation of muscle force. *Phys Ther* **73**, 830–843.
- 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 Metab* **6**, 376–385.
- Close R (1967). Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. *J Physiol* **193**, 45–55.
- Coles B, Wilson I, Wardman P, Hinson JA, Nelson SD & Ketterer B (1988). The spontaneous and enzymatic reaction of N-acetyl-p-benzoquinonimine with glutathione: A stopped-flow kinetic study. *Arch Biochem Biophys* **264**, 253–260.
- Combaret L, Dardevet D, Rieu I, Pouch M-N, Bechet D, Taillandier D, Grizard J & Attaix D (2005). A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol* **569**, 489–499.
- Committee on Animal Nutrition (1995). *Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, 1995*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Cooper C, Dere W, Evans W, Kanis JA, Rizzoli R, Sayer AA, Sieber CC, Kaufman J-M, Abellan van Kan G, Boonen S, Adachi J, Mitlak B, Tsouderos Y, Rolland Y & Reginster J-YL (2012). Frailty and sarcopenia: definitions and outcome parameters. *Osteoporos Int* **23**, 1839–1848.
- Corcoran GB, Mitchell JR, Vaishnav YN & Horning EC (1980). Evidence that acetaminophen and N-hydroxyacetaminophen form a common arylating intermediate, N-acetyl-p-benzoquinoneimine. *Mol Pharmacol* **18**, 536–542.
- Courtney-Martin G, Ball RO & Pencharz PB (2012). Sulfur amino acid metabolism and requirements. *Nutr Rev* **70**, 170–175.
- Cresenzi CL, Lee J-I & Stipanuk MH (2003). Cysteine is the metabolic signal responsible for dietary regulation of hepatic cysteine dioxygenase and glutamate cysteine ligase in intact rats. *J Nutr* **133**, 2697–2702.
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel J-P, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude M & Zamboni M (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* **39**, 412–423.
- Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, Leese G, Waddell T, Atherton P, Wackerhage H, Taylor PM & Rennie MJ (2004). Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J* **19**, 422–4
- D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B & Bottinelli R (2003). The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* **552**, 499–511.
- Dagenais GR, Tancredi RG & Zierler KL (1976). Free fatty acid oxidation by forearm muscle at rest, and evidence for an intramuscular lipid pool in the human forearm. *J Clin Invest* **58**, 421.
- Dai D-F, Chiao YA, Marcinek D, Szeto H & Rabinovitch P (2014). Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longev Heal* DOI: 10.1186/2046-2395-3-6
- Dangin M, Boirie Y, Garcias-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P, Ballèvre O & Beaufrère B (2001). The digestion rate of protein is an independent. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E340–E348.
- Dangin M, Guillet C, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Bouteloup-Demange C, Reiffers-Magnani K, Fauquant J, Balleve O & Beaufrere B (2003). The rate of protein digestion affects protein gain differently during aging in humans. *J Physiol* **549**, 635–644.

- Daniels KM & Stipanuk MH (1982). The Effect of Dietary Cysteine Level on Cysteine Metabolism in Rats. *J Nutr* **112**, 2130–2141.
- Dardevet D, Rémond D, Peyron M-A, Papet I, Savary-Auzeloux I & Mosoni L (2012). Muscle Wasting and Resistance of Muscle Anabolism: The “Anabolic Threshold Concept” for Adapted Nutritional Strategies during Sarcopenia. *Sci World J* **2012**, 1–6.
- Dardevet D, Rieu I, Fafournoux P, Sornet C, Combaret L, Bruhat A, Mordier S, Mosoni L & Grizard J (2003). Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutr Res Rev* **16**, 61.
- Dardevet D, Sornet C, Balage M & Grizard J (2000). Stimulation of In Vitro Rat Muscle Protein Synthesis by Leucine Decreases with Age. *J Nutr* **130**, 2630–2635.
- Dardevet D, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C & Grizard J (2002). Postprandial stimulation of muscle protein synthesis in old rats can be restored by a leucine-supplemented meal. *J Nutr* **132**, 95–100.
- Davern TJ, James LP, Hinson JA, Polson J, Larson AM, Fontana RJ, Lalani E, Munoz S, Shakil AO & Lee WM (2006). Measurement of Serum Acetaminophen–Protein Adducts in Patients With Acute Liver Failure. *Gastroenterology* **130**, 687–694.
- Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson RM & Reville WJ (1976a). A Ca<sup>2+</sup> ion-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry (Mosc)* **15**, 2150–2158.
- Dayton WR, Reville WJ, Goll DE & Stromer MH (1976b). A calcium (2+) ion-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry (Mosc)* **15**, 2159–2167.
- DeLeve LD & Kaplowitz N (1990). Importance and regulation of hepatic glutathione. *Semin Liver Dis* **10**, 251–266.
- Delgado TC (2013). Glutamate and GABA in appetite regulation. *Cell Endocrinol* **4**, 103.
- Delgado-Reyes CV, Wallig MA & Garrow TA (2001). Immunohistochemical Detection of Betaine–Homocysteine S-Methyltransferase in Human, Pig, and Rat Liver and Kidney. *Arch Biochem Biophys* **393**, 184–186.
- Deneke SM & Fanburg BL (1989). Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* **257**, L163–L173.
- Deng Y-H, Wang H & Zhang H-S (2008). Determination of amino acid neurotransmitters in human cerebrospinal fluid and saliva by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *J Sep Sci* **31**, 3088–3097.
- Derbré F, Gratas-Delamarche A, Gómez-Cabrera MC & Viña J (2014). Inactivity-induced oxidative stress: A central role in age-related sarcopenia? *Eur J Sport Sci* **14**, S98–S108.
- Deschenes MR, Roby MA, Eason MK & Harris MB (2010). Remodeling of the neuromuscular junction precedes sarcopenia related alterations in myofibers. *Exp Gerontol* **45**, 389–393.
- Deutz NEP, Bauer JM, Barazzoni R, Biolo G, Boirie Y, Bosy-Westphal A, Cederholm T, Cruz-Jentoft A, Krznarić Z, Nair KS, Singer P, Teta D, Tipton K & Calder PC (2014). Protein intake and exercise for optimal muscle function with aging: Recommendations from the ESPEN Expert Group. *Clin Nutr*; DOI: 10.1016/j.clnu.2014.04.007.
- Dirks A & Leeuwenburgh C (2002). Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **282**, R519–R527.
- Dröge W (2002a). The plasma redox state and ageing. *Ageing Res Rev* **1**, 257–278.
- Dröge W (2002b). Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *Exp Gerontol* **37**, 1333–1345.

- Dröge W (2005). Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **360**, 2355–2372.
- 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.
- Dubuisson C, Lioret S, Touvier M, Dufour A, Calamassi-Tran G, Volatier J-L & Lafay L (2010). Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys. *Br J Nutr* **103**, 1035–1048.
- El-Khairi L, Ueland PM, Nygård O, Refsum H & Vollset SE (1999). Lifestyle and cardiovascular disease risk factors as determinants of total cysteine in plasma: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* **70**, 1016–1024.
- El-Khairi L, Ueland PM, Refsum H, Graham IM & Vollset SE (2001). Plasma Total Cysteine as a Risk Factor for Vascular Disease The European Concerted Action Project. *Circulation* **103**, 2544–2549.
- El-Khairi L, Vollset SE, Refsum H & Ueland PM (2003). Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *Am J Clin Nutr* **77**, 467–472.
- Eloranta TO & Kajander EO (1984). Catabolism and lability of S-adenosyl-L-methionine in rat liver extracts. *Biochem J* **224**, 137–144.
- Eloranta TO, Kajander EO & Raina A (1982). Effect of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine and erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl) adenine on the metabolism of S-adenosylhomocysteine, S-adenosylmethionine, and adenosine in rat liver. *Med Biol* **60**, 272–277.
- Elrod P, Zhang J, Yang X, Yin D, Hu Y, Borchardt RT & Schowen RL (2002). Contributions of Active Site Residues to the Partial and Overall Catalytic Activities of Human S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Biochemistry (Mosc)* **41**, 8134–8142.
- Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ, Pour HRN, Aleman A, Lock TM, Bosch JR, Grobbee DE & van der Schouw YT (2008). Effect of testosterone supplementation on functional mobility, cognition, and other parameters in older men: a randomized controlled trial. *Jama* **299**, 39–52.
- English KL & Paddon-Jones D (2010). Protecting muscle mass and function in older adults during bed rest: *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **13**, 34–39.
- Erden-İnal M, Sunal E & Kanbak G (2002). Age-related changes in the glutathione redox system. *Cell Biochem Funct* **20**, 61–66.
- Ershler WB & Keller ET (2000). Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med* **51**, 245–270.
- Esteve JM, Mompou J, De La Asuncion JG, Sastre J, Asensi M, Boix J, Vina JR, Vina J & Pallardo FV (1999). Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* **13**, 1055–1064.
- Evans M, Foret CM, Bellocco R, Fitzmaurice G, Fryzek JP, McLaughlin JK, Nyrén O & Elinder C-G (2009). Acetaminophen, aspirin and progression of advanced chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* **24**, 1908–1918.
- Favier FB, Benoit H & Freyssenet D (2008). Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. *Pflüg Arch - Eur J Physiol* **456**, 587–600.
- Feng C, Tollin G & Enemark JH (2007). Sulfite oxidizing enzymes. *Biochim Biophys Acta BBA - Proteins Proteomics* **1774**, 527–539.
- Ferrell B, Argoff C, Epplin J, Fine P, Gloth F 3rd, Herr K, Katz J, Mehr D, Reid M & Reisner L (2009). American Geriatrics Society Panel on the Pharmacological management of



- Persistent Pain in Older Persons. Pharmacological management of persistent pain in older persons. *Pain Med* **10**, 1062–1083.
- Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, Bhasin S, Morley JE, Newman AB, van Kan GA, Andrieu S, Bauer J, Breuille D, Cederholm T, Chandler J, de Meynard C, Donini L, Harris T, Kannt A, Guibert FK, Onder G, Papanicolaou D, Rolland Y, Rooks D & Sieber C (2011). Sarcopenia: An Undiagnosed Condition in Older Adults. Current Consensus Definition: Prevalence, Etiology, and Consequences. International Working Group on Sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* **12**, 249–256.
- Fine PG (2012). Treatment guidelines for the pharmacological management of pain in older persons. *Pain Med* **13**, S57–S66.
- Finkelstein JD (1967). Methionine metabolism in mammals: Effects of age, diet, and hormones on three enzymes of the pathway in rat tissues. *Arch Biochem Biophys* **122**, 583–590.
- Finkelstein JD (1990). Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* **1**, 228–237.
- Finkelstein JD (2000). Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Semin Thromb Hemost* **26**, 219–225.
- Finkelstein JD, Kyle WE, Harris BJ & Martin JJ (1982). Methionine Metabolism in Mammals: Concentration of Metabolites in Rat Tissues. *J Nutr* **112**, 1011–1018.
- Finkelstein JD & Martin JJ (1984). Methionine metabolism in mammals. Distribution of homocysteine between competing pathways. *J Biol Chem* **259**, 9508–9513.
- Finkelstein JD & Martin JJ (1986). Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. *J Biol Chem* **261**, 1582–1587.
- Finkelstein JD & Martin JJ (2000). Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 385–389.
- Finkelstein JD, Martin JJ & Harris BJ (1988). Methionine metabolism in mammals. The methionine-sparing effect of cystine. *J Biol Chem* **263**, 11750–11754.
- Finkelstein JD & Mudd SH (1967). Trans-sulfuration in Mammals THE METHIONINE-SPARING EFFECT OF CYSTINE. *J Biol Chem* **242**, 873–880.
- Fischer LJ, Green MD & Harman AW (1985). Studies on the fate of the glutathione and cysteine conjugates of acetaminophen in mice. *Drug Metab Dispos Biol Fate Chem* **13**, 121–126.
- Le Floch N, Melchior D & Obled C (2004). Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livest Prod Sci* **87**, 37–45.
- Fong Y, Moldawer LL, Marano M, Wei H, Barber A, Manogue K, Tracey KJ, Kuo G, Fischman DA & Cerami A (1989). Cachectin/TNF or IL-1 alpha induces cachexia with redistribution of body proteins. *Am J Physiol* **256**, R659–665.
- Fored CM, Ejerblad E, Lindblad P, Fryzek JP, Dickman PW, Signorello LB, Lipworth L, Elinder C-G, Blot WJ, McLaughlin JK, Zack MM & Nyrén O (2001). Acetaminophen, Aspirin, and Chronic Renal Failure. *N Engl J Med* **345**, 1801–1808.
- Forman HJ, Zhang H & Rinna A (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* **30**, 1–12.
- Forrest JA, Clements JA & Prescott LF (1982). Clinical pharmacokinetics of paracetamol. *Clin Pharmacokinet* **7**, 93–107.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P & Ames BN (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci* **87**, 4533–4537.
- Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, Olivieri F, de Luca M, Ottaviani E & de Benedictis G (2000). Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 244–254.

- Fried L, Tangen C, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, Seeman T, Tracy R, Kop WJ, Burke BG & McBurnie MA (2001). Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *J Gerontol Mar* **56**, 3.
- Frontera WR, Hughes VA, Fielding RA, Fiatarone MA, Evans WJ & Roubenoff R (2000). Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *J Appl Physiol* **88**, 1321–1326.
- Fujita S, Glynn EL, Timmerman KL, Rasmussen BB & Volpi E (2009). Supraphysiological hyperinsulinaemia is necessary to stimulate skeletal muscle protein anabolism in older adults: evidence of a true age-related insulin resistance of muscle protein metabolism. *Diabetologia* **52**, 1889–1898.
- Fukagawa NK, Ajami AM & Young VR (1996). Plasma methionine and cysteine kinetics in response to an intravenous glutathione infusion in adult humans. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **270**, E209–E214.
- Fukagawa NK, Yu YM & Young VR (1998). Methionine and cysteine kinetics at different intakes of methionine and cysteine in elderly men and women. *Am J Clin Nutr* **68**, 380–388.
- Gaffney-Stomberg E, Insogna KL, Rodriguez NR & Kerstetter JE (2009). Increasing Dietary Protein Requirements in Elderly People for Optimal Muscle and Bone Health: DIETARY PROTEIN AND MUSCLE AND BONE HEALTH. *J Am Geriatr Soc* **57**, 1073–1079.
- Galinsky RE & Levy G (1981). Dose- and time-dependent elimination of acetaminophen in rats: pharmacokinetic implications of cosubstrate depletion. *J Pharmacol Exp Ther* **219**, 14–20.
- Garcia RA & Stipanuk MH (1992). The splanchnic organs, liver and kidney have unique roles in the metabolism of sulfur amino acids and their metabolites in rats. *J Nutr* **122**, 1693–1701.
- Garibotto G, Sofia A, Saffioti S, Russo R, Deferrari G, Rossi D, Verzola D, Gandolfo MT & Sala MR (2003). Interorgan exchange of aminothiols in humans. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **284**, E757–E763.
- Garlick PJ, McNurlan MA & Ballmer PE (1991). Influence of Dietary Protein Intake on Whole-Body Protein Turnover in Humans. *Diabetes Care* **14**, 1189–1198.
- Ghosh S, Ting S, Lau H, Pulinilkunnil T, An D, Qi D, Abrahani MA & Rodrigues B (2004). Increased efflux of glutathione conjugate in acutely diabetic cardiomyocytes. *Can J Physiol Pharmacol* **82**, 879–887.
- Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM & Tarnopolsky MA (2004). Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol* **39**, 1391–1400.
- Giannini EG (2005). Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *Can Med Assoc J* **172**, 367–379.
- Giannoulis MG, Martin FC, Nair KS, Umpleby AM & Sonksen P (2012). Hormone Replacement Therapy and Physical Function in Healthy Older Men. Time to Talk Hormones? *Endocr Rev* **33**, 314–377.
- Giustarini D, Milzani A, Dalle-Donne I & Rossi R (2008). Red blood cells as a physiological source of glutathione for extracellular fluids. *Blood Cells Mol Dis* **40**, 174–179.
- Glazenburg EJ, Jekel-Halsema IMC, Baranczyk-Kuzma A, Krijgheld KR & Mulder GJ (1984). d-Cysteine as a selective precursor for inorganic sulfate in the rat in vivo: Effect of d-cysteine on the sulfation of harmol. *Biochem Pharmacol* **33**, 625–628.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei WEI & CONG J (2003). The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731–801.
- Goon D & Klaassen CD (1990). Dose-dependent intestinal glucuronidation and sulfation of acetaminophen in the rat in situ. *J Pharmacol Exp Ther* **252**, 201–207.

- Gosselin LE, Johnson BD & Sieck GC (1994). Age-related changes in diaphragm muscle contractile properties and myosin heavy chain isoforms. *Am J Respir Crit Care Med* **150**, 174–178.
- Graham GG, Davies MJ, Day RO, Mohamudally A & Scott KF (2013). The modern pharmacology of paracetamol: therapeutic actions, mechanism of action, metabolism, toxicity and recent pharmacological findings. *Inflammopharmacology* **21**, 201–232.
- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattström LE, Ueland PM, Palma-Reis RJ, Boers GHJ, Sheahan RG, Israelsson B, Uiterwaal CS, Meleady R, McMaster D, Verhoef P, Witterman J, Rubba P, Bellet H, Wautrecht JC, de Valk HW, Luis ACS, Parrot-Roulaud FM, Tan KS, Higgins I, Garcon D, Medrano MJ, Candito M, Evans AE & Andria G (1997). Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: The european concerted action project. *JAMA* **277**, 1775–1781.
- Gregus Z, White C, Howell S & Klaassen CD (1988). Effect of glutathione depletion on sulfate activation and sulfate ester formation in rats. *Biochem Pharmacol* **37**, 4307–4312.
- Greising SM, Gransee HM, Mantilla CB & Sieck GC (2012). Systems biology of skeletal muscle: fiber type as an organizing principle. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **4**, 457–473.
- Greiwe JS, Kwon G, McDaniel ML & Semenkovich CF (2001). Leucine and insulin activate p70 S6 kinase through different pathways in human skeletal muscle. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **281**, E466–E471.
- Griffith OW (1987). Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview. In *Methods in Enzymology*, ed. William B. Jakoby OWG, Sulfur and Sulfur Amino Acids, pp. 366–376. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987430656> [Accessed September 1, 2014].
- Grimble RF & Grimble GK (1998). Immunonutrition: role of sulfur amino acids, related amino acids, and polyamines. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif* **14**, 605–610.
- Grizard J, Dardevet D, Papet I, Mosoni L, Mirand PP, Attaix D, Tauveron I, Bonin D & Arnal M (1995). Nutrient Regulation of Skeletal Muscle Protein Metabolism in Animals. The Involvement of Hormones and Substrates. *Nutr Res Rev* **8**, 67–91.
- Grune T, Reinheckel T & Davies KJ (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* **11**, 526–534.
- Guillet C & Boirie Y (2005). Insulin resistance: a contributing factor to age-related muscle mass loss? *Diabetes Metab* **31 Spec No 2**, 5S20–25S26.
- Guillet C, Zangarelli A, Gachon P, Morio B, Giraudet C, Rousset P & Boirie Y (2004). Whole Body Protein Breakdown Is Less Inhibited by Insulin, But Still Responsive to Amino Acid, in Nondiabetic Elderly Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 6017–6024.
- Hagenbuch B & Meier PJ (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1609**, 1–18.
- Halliwell B & Gutteridge JMC (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* **280**, 1–8.
- Hardwick LJA, Velamakanni S & van Veen HW (2007). The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *Br J Pharmacol* **151**, 163–174.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298–300.
- Haute Autorité de Santé (2013). Fiche points clés & solutions : Comment repérer la fragilité en soins ambulatoires. Available at: [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-06/fiche\\_parours\\_fragilite\\_vf.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2013-06/fiche_parours_fragilite_vf.pdf).

- Heard KJ, Green JL, James LP, Judge BS, Zolot L, Rhyee S & Dart RC (2011). Acetaminophen-cysteine adducts during therapeutic dosing and following overdose. *BMC Gastroenterol* **11**, 20.
- Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, Liang MH, Kremers HM, Mayes MD, Merkel PA, Pillemer SR, Reveille JD, Stone JH & National Arthritis Data Workgroup (2008). Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States: Part I. *Arthritis Rheum* **58**, 15–25.
- Hernanz A, Fernández-Vivancos E, Montiel C, Vazquez JJ & Arnalich F (2000). Changes in the intracellular homocysteine and glutathione content associated with aging. *Life Sci* **67**, 1317–1324.
- Heymsfield SB, Smith R, Aulet M, Bensen B, Lichtman S, Wang J & Pierson RN (1990). Appendicular skeletal muscle mass: measurement by dual-photon absorptiometry. *Am J Clin Nutr* **52**, 214–218.
- Hicke L (1999). Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol* **9**, 107–112.
- Hiramatsu T, Fukagawa NK, Marchini JS, Cortiella J, Yu YM, Chapman TE & Young VR (1994). Methionine and cysteine kinetics at different intakes of cystine in healthy adult men. *Am J Clin Nutr* **60**, 525–533.
- Hirschberger LL, Daval S, Stover PJ & Stipanuk MH (2001). Murine cysteine dioxygenase gene: structural organization, tissue-specific expression and promoter identification. *Gene* **277**, 153–161.
- Hjelle JJ & Klaassen CD (1984). Glucuronidation and biliary excretion of acetaminophen in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **228**, 407–413.
- Hodgman MJ & Garrard AR (2012). A Review of Acetaminophen Poisoning. *Crit Care Clin* **28**, 499–516.
- Hoffmann K-J, Streeter AJ, Axworthy DB & Baillie TA (1985). Structural characterization of the major covalent adduct formed in vitro between acetaminophen and bovine serum albumin. *Chem Biol Interact* **53**, 155–172.
- Hogestatt ED (2005). Conversion of Acetaminophen to the Bioactive N-Acylphenolamine AM404 via Fatty Acid Amide Hydrolase-dependent Arachidonic Acid Conjugation in the Nervous System. *J Biol Chem* **280**, 31405–31412.
- Holleschau AM & Rathbun WB (1994). The effects of age on glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in lenses of Old World simians and prosimians. *Curr Eye Res* **13**, 331–336.
- Hollman JH, Kovash FM, Kubik JJ & Linbo RA (2007). Age-related differences in spatiotemporal markers of gait stability during dual task walking. *Gait Posture* **26**, 113–119.
- Huang CS, Chang LS, Anderson ME & Meister A (1993). Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *J Biol Chem* **268**, 19675–19680.
- Huang J & Forsberg NE (1998). Role of calpain in skeletal-muscle protein degradation. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 12100–12105.
- Huang J, Khan S & O'Brien PJ (1998). The glutathione dependence of inorganic sulfate formation from l- or d-cysteine in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* **110**, 189–202.
- Hum S, Koski KG & Hoffer LJ (1992). Varied Protein Intake Alters Glutathione Metabolism in Rats. *J Nutr* **122**, 2010–2018.
- Huneau J-F, Matorri F, Blouet C, Tomé D & Blachier F (2008). Implications métaboliques, physiologiques et fonctionnelles de l'apport en acides aminés soufrés et en protéines



- riches en acides aminés soufrés. In *Aliments fonctionnels (2e ed)*, pp. 337–382. Lavoisier.
- Huxley AF (1957). Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem* **7**, 255–318.
- Iantomasi T, Favilli F, Marraccini P, Magaldi T, Bruni P & Vincenzini MT (1997). Glutathione transport system in human small intestine epithelial cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1330**, 274–283.
- Ide T, Kushiro M, Takahashi Y, Shinohara K & Cha S (2002). mRNA expression of enzymes involved in taurine biosynthesis in rat adipose tissues. *Metabolism* **51**, 1191–1197.
- Ikezoe T, Mori N, Nakamura M & Ichihashi N (2011a). Atrophy of the lower limbs in elderly women: is it related to walking ability? *Eur J Appl Physiol* **111**, 989–995.
- Ikezoe T, Mori N, Nakamura M & Ichihashi N (2011b). Age-related muscle atrophy in the lower extremities and daily physical activity in elderly women. *Arch Gerontol Geriatr* **53**, e153–e157.
- İnal ME, Kanbak G & Sunal E (2001). Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* **305**, 75–80.
- Ingelman-Sundberg M (2004). Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **369**, 89–104.
- Ivanov AI & Romanovsky AA (2004). Prostaglandin E2 as a mediator of fever: synthesis and catabolism. *Front Biosci J Virtual Libr* **9**, 1977–1993.
- Jackson AA, Gibson NR, Lu Y & Jahoor F (2004). Synthesis of erythrocyte glutathione in healthy adults consuming the safe amount of dietary protein. *Am J Clin Nutr* **80**, 101–107.
- Jaeschke H, McGill MR & Ramachandran A (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev* **44**, 88–106.
- Jagoe RT & Goldberg AL (2001). What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **4**, 183–190.
- Jahoor F, Jackson A, Gazzard B, Philips G, Sharpstone D, Frazer ME & Heird W (1999). Erythrocyte glutathione deficiency in symptom-free HIV infection is associated with decreased synthesis rate. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **276**, E205–E211.
- James LP, Letzig L, Simpson PM, Capparelli E, Roberts DW, Hinson JA, Davern TJ & Lee WM (2009). Pharmacokinetics of Acetaminophen-Protein Adducts in Adults with Acetaminophen Overdose and Acute Liver Failure. *Drug Metab Dispos* **37**, 1779–1784.
- Jang YC & Van Remmen H (2011). Age-associated alterations of the neuromuscular junction. *Exp Gerontol* **46**, 193–198.
- Janošíková B, Pavlíková M, Kocmanová D, Vítová A, Veselá K, Krupková L, Kahleová R, Krijt J, Kraml P, Hyánek J, Zvárová J, Anděl M & Kožich V (2003). Genetic variants of homocysteine metabolizing enzymes and the risk of coronary artery disease. *Mol Genet Metab* **79**, 167–175.
- Janssen I (2011). The Epidemiology of Sarcopenia. *Clin Geriatr Med* **27**, 355–363.
- Janssen I, Heymsfield SB & Ross R (2002). Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc* **50**, 889–896.
- Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT & Roubenoff R (2004). The healthcare costs of sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* **52**, 80–85.
- Ji LL, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Fiebig R, Hollander J & Bejma J (1998). Oxidative Stress and Aging: Role of Exercise and Its Influences on Antioxidant Systems. *Ann N Y Acad Sci* **854**, 102–117.

- Jimenez-Andrade JM, Mantyh WG, Bloom AP, Freeman KT, Ghilardi JR, Kuskowski MA & Mantyh PW (2012). The effect of aging on the density of the sensory nerve fiber innervation of bone and acute skeletal pain. *Neurobiol Aging* **33**, 921–932.
- Jones DP, Carlson JL, Mody Jr VC, Cai J, Lynn MJ & Sternberg Jr P (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* **28**, 625–635.
- Jordan KM, Arden NK, Doherty M, Bannwarth B, Bijlsma JWJ, Dieppe P, Gunther K, Hauselmann H, Herrero-Beaumont G, Kaklamanis P, Lohmander S, Leeb B, Lequesne M, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Serni U, Swoboda B, Verbruggen G, Zimmerman-Gorska I & Dougados M (2003). EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* **62**, 1145–1155.
- Jourdan M, Cynober L, Moinard C, Blanc MC, Neveux N, Bandt JPD & Aussel C (2008). Splanchnic sequestration of amino acids in aged rats: in vivo and ex vivo experiments using a model of isolated perfused liver. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* **294**, R748–R755.
- Kadi F, Charifi N, Denis C & Lexell J (2004). Satellite cells and myonuclei in young and elderly women and men. *Muscle Nerve* **29**, 120–127.
- Kaivosaaari S, Finel M & Koskinen M (2011). N-glucuronidation of drugs and other xenobiotics by human and animal UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* **41**, 652–669.
- Kannan R, Mittur A, Bao Y, Tsuruo T & Kaplowitz N (1999). GSH Transport in Immortalized Mouse Brain Endothelial Cells. *J Neurochem* **73**, 390–399.
- Kasapoglu M & Özben T (2001). Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol* **36**, 209–220.
- Katakura, K. Katakura, Kishida, K. Kishida, Hirano & Dr. H. Hirano (2004). Changes in rat lens proteins and glutathione reductase activity with advancing age. *Int J Vitam Nutr Res* **74**, 329–333.
- Katsanos CS, Kobayashi H, Sheffield-Moore M, Aarsland A & Wolfe RR (2005). Aging is associated with diminished accretion of muscle proteins after the ingestion of a small bolus of essential amino acids. *Am J Clin Nutr* **82**, 1065–1073.
- Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, Anderson TE & Mitchell AA (2002). Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the united states: The slone survey. *JAMA* **287**, 337–344.
- Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239–257.
- Kim HJ, Rozman P & Klaassen CD (1995). Acetaminophen does not decrease hepatic 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **275**, 1506–1511.
- Kim HJ, Rozman P, Madhu C & Klaassen CD (1992). Homeostasis of sulfate and 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate in rats after acetaminophen administration. *J Pharmacol Exp Ther* **261**, 1015–1021.
- Kim SJ, Lee MY, Kwon DY, Kim SY & Kim YC (2009). Alteration in metabolism and toxicity of acetaminophen upon repeated administration in rats. *J Pharmacol Sci* **111**, 175–181.
- Kim SK, Choi KH & Kim YC (2003a). Effect of acute betaine administration on hepatic metabolism of S-amino acids in rats and mice. *Biochem Pharmacol* **65**, 1565–1574.
- Kim TN & Choi KM (2013). Sarcopenia: Definition, Epidemiology, and Pathophysiology. *J Bone Metab* **20**, 1.

- Kim YG, Kim SK, Kwon JW, Park OJ, Kim SG, Kim YC & Lee MG (2003b). Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition. *Life Sci* **72**, 1171–1181.
- Kinsella & Wan H (2009). An Aging World: 2008. *US Census Bur Int Popul Rep* **9**, 95/09–1.
- Kis B, Snipes JA & Busija DW (2005). Acetaminophen and the Cyclooxygenase-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions, and Uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 1–7.
- Klaassen CD & Boles JW (1997). Sulfation and sulfotransferases 5: the importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) in the regulation of sulfation. *FASEB J* **11**, 404–418.
- Kloor D, Lüdtke A, Stoeva S & Osswald H (2003). Adenosine binding sites at S-adenosylhomocysteine hydrolase are controlled by the NAD<sup>+</sup>/NADH ratio of the enzyme. *Biochem Pharmacol* **66**, 2117–2123.
- Klotz U (2012). Paracetamol (Acetaminophen) - a Popular and Widely Used Nonopioid Analgesic. *Arzneimittelforschung* **62**, 355–359.
- Knight JA (2000). The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* **35**, 1–62.
- Kohashi N, Yamaguchi K, Hosokawa Y, Kori Y, Fujii O & Ueda I (1978). Dietary Control of Cysteine Dioxygenase in Rat Liver. *J Biochem (Tokyo)* **84**, 159–168.
- Koj A, Frendo J & Janik Z (1967). [35S] Thiosulphate oxidation by rat liver mitochondria in the presence of glutathione. *Biochem J* **103**, 791–795.
- Koopman R, Ly CH & Ryall JG (2014). A metabolic link to skeletal muscle wasting and regeneration. *Front Physiol*; DOI: 10.3389/fphys.2014.00032.
- Kotb M & Geller AM (1993). Methionine adenosyltransferase: Structure and function. *Pharmacol Ther* **59**, 125–143.
- Krenzelok EP (2009). The FDA Acetaminophen Advisory Committee Meeting - what is the future of acetaminophen in the United States? The perspective of a committee member. *Clin Toxicol Phila Pa* **47**, 784–789.
- Kurpad AV, Regan MM, Varalakshmi S, Vasudevan J, Gnanou J, Raj T & Young VR (2003). Daily methionine requirements of healthy Indian men, measured by a 24-h indicator amino acid oxidation and balance technique. *Am J Clin Nutr* **77**, 1198–1205.
- Kutzbach C & Stokstad EL (1967). Feedback inhibition of methylene-tetrahydrofolate reductase in rat liver by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta* **139**, 217–220.
- Kutzbach C & Stokstad ELR (1971). Mammalian methylenetetrahydrofolate reductase Partial purification, properties, and inhibition by S-adenosylmethionine. *Biochim Biophys Acta BBA - Enzymol* **250**, 459–477.
- Kwon YH & Stipanuk MH (2001). Cysteine regulates expression of cysteine dioxygenase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **280**, E804–E815.
- Laidlaw SA, Shultz TD, Cecchino JT & Kopple JD (1988). Plasma and urine taurine levels in vegans. *Am J Clin Nutr* **47**, 660–663.
- Landi F, Marzetti E, Martone AM, Bernabei R & Onder G (2014). Exercise as a remedy for sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **17**, 25–31.
- Lang CA, Mills BJ, Mastropaolo W & Liu MC (2000). Blood glutathione decreases in chronic diseases. *J Lab Clin Med* **135**, 402–405.
- Lang CA, Naryshkin S, Schneider DL, Mills BJ & Lindeman RD (1992). Low blood glutathione levels in healthy aging adults. *J Lab Clin Med* **120**, 720–725.
- Lang CH, Frost RA, Nairn AC, MacLean DA & Vary TC (n.d.). TNF- $\alpha$  impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *American*.
- 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.

- Larsson L (1978). Morphological and functional characteristics of the ageing skeletal muscle in man. A cross-sectional study. *Acta Physiol Scand Suppl* **457**, 1–36.
- Lash LH & Jones DP (1983). Transport of glutathione by renal basal-lateral membrane vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* **112**, 55–60.
- Lash LH & Jones DP (1984). Renal glutathione transport. Characteristics of the sodium-dependent system in the basal-lateral membrane. *J Biol Chem* **259**, 14508–14514.
- Lauterburg BH, Corcoran GB & Mitchell JR (1983). Mechanism of Action of N-Acetylcysteine in the Protection Against the Hepatotoxicity of Acetaminophen in Rats In Vivo. *J Clin Invest* **71**, 980–991.
- Lauterburg BH & Mitchell JR (1987). Therapeutic doses of acetaminophen stimulate the turnover of cysteine and glutathione in man. *J Hepatol* **4**, 206–211.
- Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch R, Hochberg MC, Hunder GG, Liang MH, Pillemer SR, Steen VD & Wolfe F (1998). Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* **41**, 778–799.
- Lee J-I, Londono M, Hirschberger LL & Stipanuk MH (2004). Regulation of cysteine dioxygenase and  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase is associated with hepatic cysteine level. *J Nutr Biochem* **15**, 112–122.
- Lee S-H & Min K-J (2013). Caloric restriction and its mimetics. *BMB Rep* **46**, 181–187.
- Lenton KJ, Therriault H, Cantin AM, Fülöp T, Payette H & Wagner JR (2000). Direct correlation of glutathione and ascorbate and their dependence on age and season in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* **71**, 1194–1200.
- Leveille SG, Fried L & Guralnik JM (2002). Disabling symptoms. *J Gen Intern Med* **17**, 766–773.
- Leverve X (2001). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer Science & Business Media.
- Levine ME, Suarez JA, Brandhorst S, Balasubramanian P, Cheng C-W, Madia F, Fontana L, Mirisola MG, Guevara-Aguirre J, Wan J, Passarino G, Kennedy BK, Wei M, Cohen P, Crimmins EM & Longo VD (2014). Low Protein Intake Is Associated with a Major Reduction in IGF-1, Cancer, and Overall Mortality in the 65 and Younger but Not Older Population. *Cell Metab* **19**, 407–417.
- Levine RL & Stadtman ER (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* **36**, 1495–1502.
- Lexell J, Downham D & Sjöström M (1986). Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. Fibre type arrangement in m. vastus lateralis from three groups of healthy men between 15 and 83 years. *J Neurol Sci* **72**, 211–222.
- Lexell J, Henriksson-Larsén K, Winblad B & Sjöström M (1983). Distribution of different fiber types in human skeletal muscles: effects of aging studied in whole muscle cross sections. *Muscle Nerve* **6**, 588–595.
- Lexell J, Taylor CC & Sjöstrom M (1988). What is the cause of the ageine atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* **84**, 275–294.
- Li L, Lee TK, Meier PJ & Ballatori N (1998a). Identification of Glutathione as a Driving Force and Leukotriene C4 as a Substrate for oatp1, the Hepatic Sinusoidal Organic Solute Transporter. *J Biol Chem* **273**, 16184–16191.
- Li Y-P, Chen Y, Li AS & Reid MB (2003). Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *AJP Cell Physiol* **285**, C806–C812.



- Li Y-P, Schwartz RJ, Waddell ID, Holloway BR & Reid MB (1998b). Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NF- $\kappa$ B activation in response to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *FASEB J* **12**, 871–880.
- Lindsay J, Wang L-L, Li Y & Zhou S-F (2008). Structure, function and polymorphism of human cytosolic sulfotransferases. *Curr Drug Metab* **9**, 99–105.
- Liu C-J & Latham NK (2009). Progressive resistance strength training for improving physical function in older adults. *Cochrane Database Syst Rev*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD002759.pub2/pdf/standard> [Accessed July 1, 2014].
- Liu H, Harrell LE, Shenvi S, Hagen T & Liu R-M (2005). Gender differences in glutathione metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* **79**, 861–867.
- Liu H, Wang H, Shenvi S, Hagen TM & Liu R-M (2004). Glutathione Metabolism during Aging and in Alzheimer Disease. *Ann N Y Acad Sci* **1019**, 346–349.
- Liu L & Klaassen CD (1996). Different mechanism of saturation of acetaminophen sulfate conjugation in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **139**, 128–134.
- Lobley GE (1998). Nutritional and hormonal control of muscle and peripheral tissue metabolism in farm species. *Livest Prod Sci* **91**–114.
- Van der Loo B, Bachschmid M, Spitzer V, Brey L, Ullrich V & Lüscher TF (2003). Decreased plasma and tissue levels of vitamin C in a rat model of aging: implications for antioxidative defense. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 483–487.
- Lorico A, Rappa G, Finch RA, Yang D, Flavell RA & Sartorelli AC (1997). Disruption of the murine MRP (multidrug resistance protein) gene leads to increased sensitivity to etoposide (VP-16) and increased levels of glutathione. *Cancer Res* **57**, 5238–5242.
- Lu HH, Thomas JD, Tukker JJ & Fleisher D (1992). Intestinal water and solute absorption studies: comparison of in situ perfusion with chronic isolated loops in rats. *Pharm Res* **9**, 894–900.
- Lu SC (1999). Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J* **13**, 1169–1183.
- Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* **30**, 42–59.
- Lucas R, Warner TD, Vojnovic I & Mitchell JA (2005). Cellular mechanisms of acetaminophen: role of cyclo-oxygenase. *FASEB J*; DOI: 10.1096/fj.04-2437fje.
- Luo J-L, Hammarqvist F, Andersson K & Wernerman J (1998). Surgical trauma decreases glutathione synthetic capacity in human skeletal muscle tissue. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **275**, E359–E365.
- Lymn RW & Taylor EW (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemistry (Mosc)* **10**, 4617–4624.
- Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Ming-Yu Y, Lu X-M, Zurakowski D, Curley M, Collier S, Duggan C, Nurko S, Thompson J, Ajami A, Borgonha S, Young V & Castillo L (2001). Cysteine metabolism and whole blood glutathione synthesis in septic pediatric patients. *Crit Care Med* **29**, 870–877.
- Lyons J, Rauh-Pfeiffer A, Yu YM, Lu X-M, Zurakowski D, Tompkins RG, Ajami AM, Young VR & Castillo L (2000). Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proc Natl Acad Sci* **97**, 5071–5076.
- MacCoss MJ, Fukagawa NK & Matthews DE (2001). Measurement of intracellular sulfur amino acid metabolism in humans. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **280**, E947–E955.
- Mackenzie PI, Bock KW, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, Iyanagi T, Miners JO, Owens IS & Nebert DW (2005). Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* **15**, 677–685.

- Magne H, Savary-Auzeloux I, Migné C, Peyron M-A, Combaret L, Rémond D & Dardevet D (2012). Contrarily to whey and high protein diets, dietary free leucine supplementation cannot reverse the lack of recovery of muscle mass after prolonged immobilization during ageing. *J Physiol* no–no.
- Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P & Ballatori N (2007). Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* **293**, G271–G278.
- Mallet C, Daulhac L, Bonnefont J, Ledent C, Etienne M, Chapuy E, Libert F & Eschalier A (2008). Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *PAIN* **139**, 190–200.
- Malmezat T, Breuillé D, Capitan P, Mirand PP & Obled C (2000a). Glutathione Turnover Is Increased during the Acute Phase of Sepsis in Rats. *J Nutr* **130**, 1239–1246.
- Malmezat T, Breuillé D, Pouyet C, Buffière C, Denis P, Mirand PP & Obled C (2000b). Methionine transsulfuration is increased during sepsis in rats. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **279**, E1391–E1397.
- Malmezat T, Breuillé D, Pouyet C, Mirand PP & Obled C (1998). Metabolism of Cysteine Is Modified During the Acute Phase of Sepsis in Rats. *J Nutr* **128**, 97–105.
- Mannery YO, Ziegler TR, Park Y & Jones DP (2010). Oxidation of Plasma Cysteine/Cystine and GSH/GSSG Redox Potentials by Acetaminophen and Sulfur Amino Acid Insufficiency in Humans. *J Pharmacol Exp Ther* **333**, 939–947.
- Marchan R, Hammond CL & Ballatori N (2008). Multidrug resistance-associated protein 1 as a major mediator of basal and apoptotic glutathione release. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1778**, 2413–2420.
- Marzani B, Balage M, Venien A, Astruc T, Papet I, Dardevet D & Mosoni L (2008). Antioxidant Supplementation Restores Defective Leucine Stimulation of Protein Synthesis in Skeletal Muscle from Old Rats. *J Nutr* **138**, 2205–2211.
- Marzani B, Felzani G, Bellomo RG, Vecchiet J & Marzatico F (2005). Human muscle aging: ROS-mediated alterations in rectus abdominis and vastus lateralis muscles. *Exp Gerontol* **40**, 959–965.
- Marzetti E, Calvani R, Bernabei R & Leeuwenburgh C (2012). Apoptosis in Skeletal Myocytes: A Potential Target for Interventions against Sarcopenia and Physical Frailty – A Mini-Review. *Gerontology* **58**, 99–106.
- Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ & Leeuwenburgh C (2013). Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2288–2301.
- Marzetti E, Carter CS, Wohlgemuth SE, Lees HA, Giovannini S, Anderson B, Quinn LS & Leeuwenburgh C (2009). Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction. *Mech Ageing Dev* **130**, 272–280.
- Marzetti E, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY & Leeuwenburgh C (2008). Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* **44**, 160–168.
- Marzetti E, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M & Leeuwenburgh C (2010). Multiple Pathways to the Same End: Mechanisms of Myonuclear Apoptosis in Sarcopenia of Aging. *Sci World J* **10**, 340–349.
- Mauro A (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493–495.
- Maxwell CJ, Dalby DM, Slater M, Patten SB, Hogan DB, Eliasziw M & Hirdes JP (2008). The prevalence and management of current daily pain among older home care clients. *PAIN* **138**, 208–216.

- Mayot G, Breuillé D, Jarret AR, Obled C & Papet I (2008). Systemic low-grade inflammation does not decrease skeletal muscle mass and protein synthesis in old rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact* **8**, 410–417.
- Mayot G, Vidal K, Combaret L, Breuillé D, Blum S, Obled C & Papet I (2007a). Presence of low-grade inflammation in old rats does not worsen skeletal muscle loss under an endotoxemic and dietary stress. *Exp Gerontol* **42**, 1167–1175.
- Mayot G, Vidal K, Martin J-F, Breuillé D, Blum S, Obled C & Papet I (2007b). Prognostic values of alpha2-macroglobulin, fibrinogen and albumin in regards to mortality and frailty in old rats. *Exp Gerontol* **42**, 498–505.
- McBean GJ & Flynn J (2001). Molecular mechanisms of cystine transport. *Biochem Soc Trans* **29**, 717–721.
- McGill MR & Jaeschke H (2013). Metabolism and Disposition of Acetaminophen: Recent Advances in Relation to Hepatotoxicity and Diagnosis. *Pharm Res* **30**, 2174–2187.
- McGill MR, Lebofsky M, Norris H-RK, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, Williams CD, Wilkins DG, Rollins DE & Jaeschke H (2013). Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: Dose–response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol* **269**, 240–249.
- McGill MR, Yan H-M, Ramachandran A, Murray GJ, Rollins DE & Jaeschke H (2011). HepaRG cells: A human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. *Hepatology* **53**, 974–982.
- Mclean AEM, Armstrong GR & Beales D (1989). Effect of d- or l-methionine and cysteine on the growth inhibitory effects of feeding 1% paracetamol to rats. *Biochem Pharmacol* **38**, 347–352.
- Mecocci P, Fano G, Fulle S, MacGarvey U, Shinobu L, Polidori MC, Cherubini A, Vecchiet J, Senin U & Beal MF (1999). Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids, and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* **26**, 303–308.
- Meister A (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* **263**, 17205–17208.
- Meister A (1991). Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy. *Pharmacol Ther* **51**, 155–194.
- Mercier S, Breuillé D, Buffière C, Gimonet J, Papet I, Mirand PP & Obled C (2006). Methionine kinetics are altered in the elderly both in the basal state and after vaccination. *Am J Clin Nutr* **83**, 291–298.
- Merrill GF & Goldberg E (2001). Antioxidant properties of acetaminophen and cardioprotection. *Basic Res Cardiol* **96**, 423–430.
- Millian NS & Garrow TA (1998). Human betaine-homocysteine methyltransferase is a zinc metalloenzyme. *Arch Biochem Biophys* **356**, 93–98.
- Miners JO, Bowalgaha K, Elliot DJ, Baranczewski P & Knights KM (2011). Characterization of Niflumic Acid as a Selective Inhibitor of Human Liver Microsomal UDP-Glucuronosyltransferase 1A9: Application to the Reaction Phenotyping of Acetaminophen Glucuronidation. *Drug Metab Dispos* **39**, 644–652.
- Miners JO & Mackenzie PI (1991). Drug glucuronidation in humans. *Pharmacol Ther* **51**, 347–369.
- Mitch WE & Goldberg AL (1996). Mechanisms of muscle wasting—the role of the ubiquitin–proteasome pathway. *N Engl J Med* **335**, 1897–1905.
- Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR & Brodie BB (1973). Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J Pharmacol Exp Ther* **187**, 211–217.
- Moore ND, Gulmez E & Blin P (2013). Is paracetamol hepatotoxic at normal doses? *BMJ* **346**, f1519–f1519.

- Morais J, Chevalier S & Gougeon R (2006). Protein turnover and requirement in the healthy and frail elderly. *J Nutr Health Aging* **10**, 272–283.
- Morley JE, Argiles JM, Evans WJ, Bhasin S, Cella D, Deutz NEP, Doehner W, Fearon KCH, Ferrucci L, Hellerstein MK, Kalantar-Zadeh K, Lochs H, MacDonald N, Mulligan K, Muscaritoli M, Ponikowski P, Posthauer ME, Fanelli FR, Schambelan M, Schols AMWJ & Schuster MW (2010). Nutritional Recommendations for the Management of Sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* **11**, 391–396.
- Morley JE, Abbatecola AM, Argiles JM, Baracos V, Bauer J, Bhasin S, Cederholm T, Coats AJS, Cummings SR, Evans WJ, Fearon K, Ferrucci L, Fielding RA, Guralnik JM, Harris TB, Inui A, Kalantar-Zadeh K, Kirwan B-A, Mantovani G, Muscaritoli M & Newman AB (2011). Sarcopenia With Limited Mobility: An International Consensus. *J Am Med Dir Assoc* **12**, 403–409.
- Morris CA, Morris LD, Kennedy AR & Sweeney L (2005). Attenuation of skeletal muscle atrophy via protease inhibition. *J Appl Physiol* **99**, 1719–1727.
- Mosharov E, Cranford MR & Banerjee R (2000). The Quantitatively Important Relationship between Homocysteine Metabolism and Glutathione Synthesis by the Transsulfuration Pathway and Its Regulation by Redox Changes <sup>†</sup>. *Biochemistry (Mosc)* **39**, 13005–13011.
- Mosoni L, Breuillé D, Buffière C, Obled C & Mirand PP (2004). Age-related changes in glutathione availability and skeletal muscle carbonyl content in healthy rats. *Exp Gerontol* **39**, 203–210.
- Mosoni L, Malmezat T, Valluy MC, Houlier ML, Attaix D & Mirand PP (1999). Lower recovery of muscle protein lost during starvation in old rats despite a stimulation of protein synthesis. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **277**, E608–E616.
- Mosoni L & Mirand PP (2003). Type and timing of protein feeding to optimize anabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **6**, 301–306.
- Mosoni L, Patureau Mirand P, Houlier ML & Arnal M (1993). Age-related changes in protein synthesis measured in vivo in rat liver and gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev* **68**, 209–220.
- Mosoni L, Valluy MC, Serrurier B, Prugnaud J, Obled C, Guezennec CY & Mirand PP (1995). Altered response of protein synthesis to nutritional state and endurance training in old rats. *Am J Physiol* **268**, E328–335.
- Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Cao J & Vore M (2002). Expression of multidrug resistance-associated protein. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G41–50.
- Mudd SH, FINKELSTEIN D & Irreverre F (1965). Transsulfuration in mammals. Available at: [http://www.researchgate.net/publication/18215128\\_Transsulfuration\\_in\\_mammals\\_Microassays\\_and\\_tissue\\_distributions\\_of\\_three\\_enzymes\\_of\\_the\\_pathway/file/79e4150b8bb52a524e.pdf](http://www.researchgate.net/publication/18215128_Transsulfuration_in_mammals_Microassays_and_tissue_distributions_of_three_enzymes_of_the_pathway/file/79e4150b8bb52a524e.pdf) [Accessed July 13, 2014].
- Mulder GJ (1990). *Conjugation Reactions In Drug Metabolism: An Integrated Approach*. CRC Press.
- Muldrew KL, James LP, Coop L, McCullough SS, Hendrickson HP, Hinson JA & Mayeux PR (2002). Determination of acetaminophen-protein adducts in mouse liver and serum and human serum after hepatotoxic doses of acetaminophen using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Drug Metab Dispos* **30**, 446–451.
- Muramatsu T (1990). Nutrition and Whole-Body Protein Turnover in the Chicken in Relation to Mammalian Species. *Nutr Res Rev* **3**, 211–228.
- Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, Boirie Y, Bosaeus I, Cederholm T, Costelli P, Fearon KC, Laviano A, Maggio M, Fanelli FR, 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.
- Muth-Selbach US, Tegeder I, Brune K & Geisslinger G (1999). Acetaminophen inhibits spinal prostaglandin E2 release after peripheral noxious stimulation. *Anesthesiology* **91**, 231–239.
- Mutlib AE, Goosen TC, Bauman JN, Williams JA, Kulkarni S & Kostrubsky S (2006). Kinetics of Acetaminophen Glucuronidation by UDP-Glucuronosyltransferases 1A1, 1A6, 1A9 and 2B15. Potential Implications in Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity. *Chem Res Toxicol* **19**, 701–709.
- Nakamura A, Nakajima M, Yamanaka H, Fujiwara R & Yokoi T (2008). Expression of UGT1A and UGT2B mRNA in Human Normal Tissues and Various Cell Lines. *Drug Metab Dispos* **36**, 1461–1464.
- Nakamura K, Li Y-Q, Kaneko T, Katoh H & Negishi M (2001). Prostaglandin EP3 receptor protein in serotonin and catecholamine cell groups: a double immunofluorescence study in the rat brain. *Neuroscience* **103**, 763–775.
- Nakashima K, Ishida A, Yamazaki M & Abe H (2005). Leucine suppresses myofibrillar proteolysis by down-regulating ubiquitin–proteasome pathway in chick skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 660–666.
- Narici MV & Maffulli N (2010). Sarcopenia: characteristics, mechanisms and functional significance. *Br Med Bull* **95**, 139–159.
- Navarro-Arévalo A, Cañavate C & Sánchez-del-Pino MJ (1999). Myocardial and skeletal muscle aging and changes in oxidative stress in relationship to rigorous exercise training. *Mech Ageing Dev* **108**, 207–217.
- Needham D (1926). Red and white muscle. *Physiol Rev* **6**, 1–27.
- Neels JG & Olefsky JM (2005). Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* **116**, 33–35.
- Newton JF, Hoefle D, Gemborys MW, Mudge GH & Hook JB (1986). Metabolism and excretion of a glutathione conjugate of acetaminophen in the isolated perfused rat kidney. *J Pharmacol Exp Ther* **237**, 519–524.
- NICE (2014). Osteoarthritis Care and management in adults. *NICE Clin Guidel* 177.
- Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S & Satoh T (2003). Tissue Distribution of mRNA Expression of Human Cytochrome P450 Isoforms Assessed by High-Sensitivity Real-Time Reverse Transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* **123**, 369–375.
- Novak ML, Billich W, Smith SM, Sukhija KB, McLoughlin TJ, Hornberger TA & Koh TJ (2009). COX-2 inhibitor reduces skeletal muscle hypertrophy in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **296**, R1132–1139.
- Nuttall S, Martin U, Sinclair A & Kendall M (1998). Glutathione: in sickness and in health. *The Lancet* **351**, 645–646.
- O’Mahony L, Holland J, Jackson J, Feighery C, Hennessy TP. & Mealy K (1998). Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Immunol* **113**, 213–219.
- Obled C, Papet I & Breuillé D (2002). Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **5**, 189–197.
- Obled C, Papet I & Breuillé D (2004). Sulfur-containing amino acids and glutathione in diseases. In *Metabolic & Therapeutic Aspects of Amino Acids in Clinical Nutrition, Second Edition*, p. 778. CRC Press.
- Ohno S & Nakajin S (2009). Determination of mRNA Expression of Human UDP-Glucuronosyltransferases and Application for Localization in Various Human Tissues

- by Real-Time Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Drug Metab Dispos* **37**, 32–40.
- Oliveriusová J, Kery V, Maclean KN & Kraus JP (2002). Deletion Mutagenesis of Human Cystathionine  $\beta$ -Synthase Impact on activity, oligomeric status, and adenosylmethionine regulation. *J Biol Chem* **277**, 48386–48394.
- Ookhtens M & Kaplowitz N (1998). Role of the liver in interorgan homeostasis of glutathione and cyst(e)ine. *Semin Liver Dis* **18**, 313–329.
- Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A & Bertolini A (2006). The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* **531**, 280–281.
- Ouellet M & Percival MD (2001). Mechanism of Acetaminophen Inhibition of Cyclooxygenase Isoforms. *Arch Biochem Biophys* **387**, 273–280.
- Ozkan Y, Ozkan E & Simşek B (2002). Plasma total homocysteine and cysteine levels as cardiovascular risk factors in coronary heart disease. *Int J Cardiol* **82**, 269–277.
- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Katsanos CS, Zhang X-J & Wolfe RR (2006). Differential stimulation of muscle protein synthesis in elderly humans following isocaloric ingestion of amino acids or whey protein. *Exp Gerontol* **41**, 215–219.
- Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G & Marzatico F (1999). Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* **27**, 617–622.
- Parise G, Brose A & Tarnopolsky M (2005). Resistance exercise training decreases oxidative damage to DNA and increases cytochrome oxidase activity in older adults. *Exp Gerontol* **40**, 173–180.
- Park H, Park S, Shephard RJ & Aoyagi Y (2010). Yearlong physical activity and sarcopenia in older adults: the Nakanojo Study. *Eur J Appl Physiol* **109**, 953–961.
- Parsons MJ & Green DR (2010). Mitochondria in cell death. *Essays Biochem* **47**, 99–114.
- Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F & Oude Elferink RP (1997). A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatol Baltim Md* **25**, 1539–1542.
- Pavy-Le Traon A, Heer M, Narici MV, Rittweger J & Vernikos J (2007). From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986–2006). *Eur J Appl Physiol* **101**, 143–194.
- Pennings B, Boirie Y, Senden JM, Gijsen AP, Kuipers H & van Loon LJ (2011). Whey protein stimulates postprandial muscle protein accretion more effectively than do casein and casein hydrolysate in older men. *Am J Clin Nutr* **93**, 997–1005.
- Perneger TV, Whelton PK & Klag MJ (1994). Risk of Kidney Failure Associated with the Use of Acetaminophen, Aspirin, and Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *N Engl J Med* **331**, 1675–1679.
- Perrot S (2006). [Management strategies for the treatment of non malignant chronic pain in the elderly]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil* **4**, 163–170.
- Pini LA, Sandrini M & Vitale G (1996). The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur J Pharmacol* **308**, 31–40.
- Polaniak R, Bułdak RJ & Jacheć W (2011). Long-term Exposure to Acetaminophen is a Crucial for Activity of Selected Antioxidative Enzymes and Level of Lipid Peroxidation Process in Rat Liver. *J Bioequivalence Bioavailab*; DOI: 10.4172/jbb.1000082.
- Polge C, Heng A-E, Jarzaguat M, Ventadour S, Claustre A, Combaret L, Béchet 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 J* **25**, 3790–3802.
- Potter DW & Tran TB (1993). Apparent rates of glutathione turnover in rat tissues. *Toxicol Appl Pharmacol* **120**, 186–192.
- Prescott LF (1980). Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *Br J Clin Pharmacol* **10**, 291S–298S.
- Prescott LF (1983). Paracetamol overdose. Pharmacological considerations and clinical management. *Drugs* **25**, 290–314.
- Price VF & Jollow DJ (1988). Mechanism of decreased acetaminophen glucuronidation in the fasted rat. *Biochem Pharmacol* **37**, 1067–1075.
- Price VF & Jollow DJ (1989). Effects of sulfur-amino acid-deficient diets on acetaminophen metabolism and hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **101**, 356–369.
- Price VF, Miller MG & Jollow DJ (1987). Mechanisms of fasting-induced potentiation of acetaminophen hepatotoxicity in the rat. *Biochem Pharmacol* **36**, 427–433.
- Prod'homme M, Rieu I, Balage M, Dardevet D & Grizard J (2004). Insulin and amino acids both strongly participate to the regulation of protein metabolism. [Miscellaneous Article]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care January 2004* **7**, 71–77.
- Pujos-Guillot E, Pickering G, Lyan B, Ducheix G, Brandolini-Bunlon M, Glomot F, Dardevet D, Dubray C & Papet I (2012). Therapeutic paracetamol treatment in older persons induces dietary and metabolic modifications related to sulfur amino acids. *AGE* **34**, 181–193.
- Pumford NR, Hinson JA, Benson RW & Roberts DW (1990). Immunoblot analysis of protein containing 3-(cystein-S-yl)acetaminophen adducts in serum and subcellular liver fractions from acetaminophen-treated mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **104**, 521–532.
- Purucker E & Wernze H (1990). Hepatic efflux and renal extraction of plasma glutathione: Marked differences between healthy subjects and the rat. *Klin Wochenschr* **68**, 1008–1012.
- Al-Qusairi L & Laporte J (2011). T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet Muscle* **1**, 26–26.
- Raguso CA, Regan MM & Young VR (2000). Cysteine kinetics and oxidation at different intakes of methionine and cystine in young adults. *Am J Clin Nutr* **71**, 491–499.
- Rahman I, Smith CAD, Lawson MF, Harrison DJ & MacNee W (1996). Induction of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett* **396**, 21–25.
- Rana SK & Sanders TAB (1986). Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. *Br J Nutr* **56**, 17–27.
- Rao AM, Drake MR & Stipanuk MH (1990). Role of the Transsulfuration Pathway and of  $\gamma$ -Cystathionase Activity in the Formation of Cysteine and Sulfate from Methionine in Rat Hepatocytes. *J Nutr* **120**, 837–845.
- Rebber JF, Connolly GC & Ballatori N (2002). Inhibition of Mrp2- and Ycflp-mediated transport by reducing agents: evidence for GSH transport on rat Mrp2. *Biochim Biophys Acta* **1559**, 171–178.
- Reicks M & Hathcock JN (1989). Prolonged Acetaminophen Ingestion in Mice: Effects on the Availability of Methionine for Metabolic Functions. *J Nutr* **119**, 1042–1049.
- Reid MB (2001). Nitric oxide, reactive oxygen species, and skeletal muscle contraction. *Med Sci Sports Exerc* **33**, 371–376.
- Reiter C & Weinshilboum RM (1982). Acetaminophen and phenol: substrates for both a thermostable and a thermolabile form of human platelet phenol sulfotransferase. *J Pharmacol Exp Ther* **221**, 43–51.

- Renaud HJ, Cui JY, Khan M & Klaassen CD (2011). Tissue Distribution and Gender-Divergent Expression of 78 Cytochrome P450 mRNAs in Mice. *Toxicol Sci* **124**, 261–277.
- Richette P (2014). How safe is acetaminophen in rheumatology? *Joint Bone Spine* **81**, 4–5.
- Richman PG & Meister A (1975). Regulation of gamma-glutamyl-cysteine synthetase by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* **250**, 1422–1426.
- Rieu I, Balage M, Sornet C, Debras E, Ripes S, Rochon-Bonhomme C, Pouyet C, Grizard J & Dardevet D (2007). Increased availability of leucine with leucine-rich whey proteins improves postprandial muscle protein synthesis in aging rats. *Nutrition* **23**, 323–331.
- Rieu I, Balage M, Sornet C, Giraudet C, Pujos E, Grizard J, Mosoni L & Dardevet D (2006). Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol* **575**, 305–315.
- Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, Averous J, Bos C, Peyron MA, Combaret L & Dardevet D (2009). Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *J Physiol* **587**, 5483–5492.
- Rieu I, Sornet C, Bayle G, Prugnaud J, Pouyet C, Balage M, Papet I, Grizard J & Dardevet D (2003). Leucine-supplemented meal feeding for ten days beneficially affects postprandial muscle protein synthesis in old rats. *J Nutr* **133**, 1198–1205.
- Rikans LE & Hornbrook KR (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis* **1362**, 116–127.
- Ring EF, Collins AJ, Bacon PA & Cosh JA (1974). Quantitation of thermography in arthritis using multi-isothermal analysis. II. Effect of nonsteroidal anti-inflammatory therapy on the thermographic index. *Ann Rheum Dis* **33**, 353–356.
- Robert-Bobée I (2006). Projections de population pour la France métropolitaine à l’horizon 2050: la population continue de croître et le vieillissement se poursuit. Available at: <http://www.epsilon.insee.fr/jspui/handle/1/172> [Accessed July 2, 2014].
- Roberts DW, Pumford NR, Potter DW, Benson RW & Hinson JA (1987). A sensitive immunochemical assay for acetaminophen-protein adducts. *J Pharmacol Exp Ther* **241**, 527–533.
- Rockwood K, Song X, MacKnight C, Bergman H, Hogan DB, McDowell I & Mitnitski A (2005). A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *Can Med Assoc J* **173**, 489–495.
- Rockwood K, Stadnyk K, MacKnight C, McDowell I, Hébert R & Hogan DB (1999). A brief clinical instrument to classify frailty in elderly people. *The Lancet* **353**, 205–206.
- Rolland Y, Benetos A, Gentric A, Ankri J, Blanchard F, Bonnefoy M, De Decker L, Ferry M, Gonthier R, Hanon O, Jeandel C, Nourhashemi F, Perret-Guillaume C, Retornaz F, Bouvier H, Ruault G & Berrut G (2011). La fragilité de la personne âgée : un consensus bref de la Société française de gériatrie et gérologie. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* **9**, 387–390.
- Rolland Y & Vellas B (2009). La sarcopénie. *Rev Médecine Interne* **30**, 150–160.
- Rooyackers OE & Nair KS (1997). Hormonal Regulation of Human Muscle Protein Metabolism. *Annu Rev Nutr* **17**, 457–485.
- Rose WC & Wixom RL (1955). The Amino Acid Requirements of Man Xiii. the Sparing Effect of Cystine on the Methionine Requirement. *J Biol Chem* **216**, 763–774.
- Rosenberg IH (1989). Summary Comments. *Am J Clin Nutr* **50**, 1231–1233.
- Rothschild MA, Oratz M & Schreiber SS (1988). Serum albumin. *Hepatology* **8**, 385–401.
- Rudolf R<sup>1/4</sup>, Khan MM, Labeit S & Deschenes MR (2014). Degeneration of Neuromuscular Junction in Age and Dystrophy. *Front Aging Neurosci*; DOI: 10.3389/fnagi.2014.00099.



- Rumack BH, Peterson RC, Koch GG & Amara IA (1981). Acetaminophen overdose. 662 cases with evaluation of oral acetylcysteine treatment. *Arch Intern Med* **141**, 380–385.
- Said AK & Hegsted DM (1970). Response of Adult Rats to Low Dietary Levels of Essential Amino Acids. *J Nutr* **100**, 1363–1375.
- Saito C, Zwingmann C & Jaeschke H (2010). Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* **51**, 246–254.
- Sakuma K, Aoi W & Yamaguchi A (2014). Current understanding of sarcopenia: possible candidates modulating muscle mass. *Pflug Arch - Eur J Physiol*; DOI: 10.1007/s00424-014-1527-x.
- Salles J, Chanet A, Giraudet C, Patrac V, Pierre P, Jourdan M, Luiking YC, Verlaan S, Migné C, Boirie Y & Walrand S (2013). 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> enhances the stimulating effect of leucine and insulin on protein synthesis rate through Akt/PKB and mTOR mediated pathways in murine C2C12 skeletal myotubes. *Mol Nutr Food Res* **57**, 2137–2146.
- Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg Jr. P, Reed RL & Jones DP (1998). Glutathione in Human Plasma: Decline in Association with Aging, Age-Related Macular Degeneration, and Diabetes. *Free Radic Biol Med* **24**, 699–704.
- Sanes JR (2003). The Basement Membrane/Basal Lamina of Skeletal Muscle. *J Biol Chem* **278**, 12601–12604.
- Sasse CE & Baker DH (1974). Sulfur Utilization by the Chick with Emphasis on the Effect of Inorganic Sulfate on the Cystine-Methionine Interrelationship. *J Nutr* **104**, 244–251.
- Sastre J, Martín JA, Gómez-Cabrera M-C, Pereda J, Borrás C, Pallardó FV & Viña J (2005). Age-associated oxidative damage leads to absence of  $\gamma$ -cystathionase in over 50% of rat lenses: Relevance in cataractogenesis. *Free Radic Biol Med* **38**, 575–582.
- Schaap LA, Pluijm SMF, Deeg DJH, Harris TB, Kritchevsky SB, Newman AB, Colbert LH, Pahor M, Rubin SM, Tylavsky FA, Visser M & for the Health ABC Study (2009). Higher Inflammatory Marker Levels in Older Persons: Associations With 5-Year Change in Muscle Mass and Muscle Strength. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64A**, 1183–1189.
- Schaap LA, Pluijm SMF, Deeg DJH & Visser M (2006). Inflammatory Markers and Loss of Muscle Mass (Sarcopenia) and Strength. *Am J Med* **119**, 526.e9–526.e17.
- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dörsam J, Staehler G, Störkel S, Thon WF & Keppler D (1999). Expression of the MRP2 Gene-Encoded Conjugate Export Pump in Human Kidney Proximal Tubules and in Renal Cell Carcinoma. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1159–1169.
- Schiaffino S, Hanzlíková V & Pierobon S (1970). Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **47**, 107–119.
- Sciote JJ & Morris T (2000). Skeletal Muscle Function an Fiber Types: the Relationship Between Occlusal Function and the Phenotype of Jaw-Closing Muscles in Human. *J Orthod* **27**, 15–30.
- Segawa H, Fukasawa Y, Miyamoto K-I, Takeda E, Endou H & Kanai Y (1999). Identification and Functional Characterization of a Na<sup>+</sup>-independent Neutral Amino Acid Transporter with Broad Substrate Selectivity. *J Biol Chem* **274**, 19745–19751.
- Selhub J (1999). Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* **19**, 217–246.
- Sethna SS, Holleschau AM & Rathbun WB (1982). Activity of glutathione synthesis enzymes in human lens related to age. *Curr Eye Res* **2**, 735–742.
- Shanker G & Aschner M (2001). Identification and characterization of uptake systems for cystine and cysteine in cultured astrocytes and neurons: Evidence for methylmercury-targeted disruption of astrocyte transport. *J Neurosci Res* **66**, 998–1002.

- Sheweita SA (2000). Drug-metabolizing enzymes mechanisms and functions. *Curr Drug Metab* **1**, 107–132.
- Shi MM, Kugelmann A, Iwamoto T, Tian L & Forman HJ (1994). Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells. *J Biol Chem* **269**, 26512–26517.
- Simmons TW, Anders MW & Ballatori N (1992). L-cysteine and S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine transport in rat liver canalicular membrane vesicles: potential reabsorption mechanisms for biliary metabolites of glutathione and its S-conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* **262**, 1182–1188.
- Simmons TW, Hinchman CA & Ballatori N (1991). Polarity of hepatic glutathione and glutathione S-conjugate efflux, and intraorgan mercapturic acid formation in the skate. *Biochem Pharmacol* **42**, 2221–2228.
- Sinacore DR & Gulve EA (1993). The role of skeletal muscle in glucose transport, glucose homeostasis, and insulin resistance: implications for physical therapy. *Phys Ther* **73**, 878–891.
- Skelton DA, Greig CA, Davies JM & Young A (1994). Strength, Power and Related Functional Ability of Healthy People Aged 65–89 Years. *Age Ageing* **23**, 371–377.
- Skoglund LA, Skjelbred P & Fyllingen G (1991). Analgesic efficacy of acetaminophen 1000 mg, acetaminophen 2000 mg, and the combination of acetaminophen 1000 mg and codeine phosphate 60 mg versus placebo in acute postoperative pain. *Pharmacotherapy* **11**, 364–369.
- Slattery JT, Wilson JM, Kalhorn TF & Nelson SD (1987). Dose-dependent pharmacokinetics of acetaminophen: evidence of glutathione depletion in humans. *Clin Pharmacol Ther* **41**, 413–418.
- Smith JT (1973). An Optimal Level of Inorganic Sulfate for the Diet of a Rat. *J Nutr* **103**, 1008–1011.
- Sneader W (2005). *Drug discovery: a history*. Wiley, Hoboken, N.J.
- Snijders T, Verdijk LB & van Loon LJC (2009). The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. *Ageing Res Rev* **8**, 328–338.
- Soeters PB, Poll MCG van de, Gemert WG van & Dejong CHC (2004). Amino Acid Adequacy in Pathophysiological States. *J Nutr* **134**, 1575S–1582S.
- 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.
- Song X, Mitnitski A & Rockwood K (2010). Prevalence and 10-year outcomes of frailty in older adults in relation to deficit accumulation. *J Am Geriatr Soc* **58**, 681–687.
- Soriano-García JF, Torras-Llort M, Ferrer R & Moretó M (1998). Multiple pathways for L-methionine transport in brush-border membrane vesicles from chicken jejunum. *J Physiol* **509**, 527–539.
- Spangenburg EE (2009). Changes in muscle mass with mechanical load: possible cellular mechanisms. *Appl Physiol Nutr Metab* **34**, 328–335.
- Sriram S, Subramanian S, Sathiakumar D, Venkatesh R, Salerno MS, McFarlane CD, Kambadur R & Sharma M (2011). Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF-κB: Myostatin induces reactive oxygen species. *Aging Cell* **10**, 931–948.
- Stillings M, Havlik I, Chetty M, Clinton C, Schall R, Moodley I, Muir N & Little S (2000). Comparison of the pharmacokinetic profiles of soluble aspirin and solid paracetamol tablets in fed and fasted volunteers. *Curr Med Res Opin* **16**, 115–124.
- Stipanuk MH (1986). Metabolism of Sulfur-Containing Amino Acids. *Annu Rev Nutr* **6**, 179–209.

- Stipanuk MH (2004). SULFUR AMINO ACID METABOLISM: Pathways for Production and Removal of Homocysteine and Cysteine. *Annu Rev Nutr* **24**, 539–577.
- Stipanuk MH & Beck PW (1982). Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* **206**, 267–277.
- Stipanuk MH, Coloso RM, Garcia RAG & Banks MF (1992). Cysteine Concentration Regulates Cysteine Metabolism to Glutathione, Sulfate and Taurine in Rat Hepatocytes. *J Nutr* **122**, 420–427.
- Stipanuk MH, Hirschberger LL, Londono MP, Cresenzi CL & Yu AF (2004a). The ubiquitin-proteasome system is responsible for cysteine-responsive regulation of cysteine dioxygenase concentration in liver. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **286**, E439–E448.
- Stipanuk MH, Londono M, Hirschberger LL, Hickey C, Thiel DJ & Wang L (2004b). Evidence for expression of a single distinct form of mammalian cysteine dioxygenase. *Amino Acids* **26**, 99–106.
- Stipanuk MH, Londono M, Lee J-I, Hu M & Yu AF (2002). Enzymes and Metabolites of Cysteine Metabolism in Nonhepatic Tissues of Rats Show Little Response to Changes in Dietary Protein or Sulfur Amino Acid Levels. *J Nutr* **132**, 3369–3378.
- Stipanuk MH & Ueki I (2011). Dealing with methionine/homocysteine sulfur: cysteine metabolism to taurine and inorganic sulfur. *J Inherit Metab Dis* **34**, 17–32.
- Storch KJ, Wagner DA, Burke JF & Young VR (1988). Quantitative study in vivo of methionine cycle in humans using [methyl-2H3]- and [1-13C]methionine. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **255**, E322–E331.
- Storch KJ, Wagner DA, Burke JF & Young VR (1990). [1-13C; methyl-2H3]methionine kinetics in humans: methionine conservation and cystine sparing. *Am J Physiol* **258**, E790–798.
- Strasser H, TIEFENTHALER M, STEINLECHNER M, EDER I, BARTSCH G & KONWALINKA G (2000). Age dependent apoptosis and loss of rhabdosphincter cells. *J Urol* **164**, 1781–1785.
- Streeter AJ, Dahlin DC, Nelson SD & Baillie TA (1984). The covalent binding of acetaminophen to protein. Evidence for cysteine residues as major sites of arylation in vitro. *Chem Biol Interact* **48**, 349–366.
- Sugiyama K, Kushima Y & Muramatsu K (1987). Effect of Dietary Glycine on Methionine Metabolism in Rats Fed a High-Methionine Diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **33**, 195–205.
- Sullivan DM & Hoffman JL (1983). Fractionation and kinetic properties of rat liver and kidney methionine adenosyltransferase isozymes. *Biochemistry (Mosc)* **22**, 1636–1641.
- Sun J, Schnackenberg LK, Holland RD, Schmitt TC, Cantor GH, Dragan YP & Beger RD (2008). Metabonomics evaluation of urine from rats given acute and chronic doses of acetaminophen using NMR and UPLC/MS. *J Chromatogr B* **871**, 328–340.
- Sunden SL, Renduchintala MS, Park EI, Miklasz SD & Garrow TA (1997). Betaine-homocysteine methyltransferase expression in porcine and human tissues and chromosomal localization of the human gene. *Arch Biochem Biophys* **345**, 171–174.
- Switzar L, Kwast LM, Lingeman H, Giera M, Pieters RHH & Niessen WMA (2013). Identification and quantification of drug-albumin adducts in serum samples from a drug exposure study in mice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **917-918**, 53–61.
- Szabó C (2007). Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 917–935.

- Szczepkowski TW, Skarzynski B & Weber M (1961). The metabolic state of thiosulphate. *Nature* **189**, 1007–1008.
- Szyperski T (1995). Biosynthetically Directed Fractional <sup>13</sup>C-labeling of Proteinogenic Amino Acids. *Eur J Biochem* **232**, 433–448.
- Taaffe DR, Henwood TR, Nalls MA, Walker DG, Lang TF & Harris TB (2009). Alterations in Muscle Attenuation following Detraining and Retraining in Resistance-Trained Older Adults. *Gerontology* **55**, 217–223.
- Takamori M (2012). Structure of the neuromuscular junction: function and cooperative mechanisms in the synapse: Synapse and muscle contraction. *Ann N Y Acad Sci* **1274**, 14–23.
- Tavassoli N, Guyonnet S, Abellan Van Kan G, Sourdet S, Krams T, Soto ME, Subra J, Chicoulaa B, Ghisolfi A, Balardy L, Cestac P, Rolland Y, Andrieu S, Nourhashemi F, Oustric S, Cesari M, Vellas B & Geriatric Frailty Clinic (G.F.C) for Assessment of Frailty and Prevention of Disability Team (2014). Description of 1,108 older patients referred by their physician to the “Geriatric Frailty Clinic (G.F.C) for Assessment of Frailty and Prevention of Disability” at the gerontopole. *J Nutr Health Aging* **18**, 457–464.
- Taylor CG, Nagy LE & Bray TM (1996). Nutritional and hormonal regulation of glutathione homeostasis. In *Current Topics in Cellular Regulation*, ed. Earl R. Stadtman and P. Boon Chock, pp. 189–208. Academic Press. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070213796800070> [Accessed July 30, 2014].
- Teixeira V de O, Filippin LI & Xavier RM (2012). Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia. *Rev Bras Reumatol* **52**, 247–259.
- Temple AR, Benson GD, Zinsenheimer JR & Schweinle JE (2006). Multicenter, Randomized, Double-Blind, Active-Controlled, Parallel-Group Trial of the Long-Term (6–12 Months) Safety of Acetaminophen in Adult Patients with Osteoarthritis. **28**, 222–235.
- Temple R (2006). Hy’s law: predicting serious hepatotoxicity. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **15**, 241–243.
- Tesseraud S, Métayer Coustard S, Collin A & Seilliez I (2009). Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *Br J Nutr* **101**, 1132.
- Tesseraud S, Peresson R, Lopes J & Chagneau AM (1996). Dietary lysine deficiency greatly affects muscle and liver protein turnover in growing chickens. *Br J Nutr* **75**, 853–865.
- Thom JM, Morse CI, Birch KM & Narici MV (2007). Influence of muscle architecture on the torque and power–velocity characteristics of young and elderly men. *Eur J Appl Physiol* **100**, 613–619.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M & Pickart CM (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**, 94–102.
- Tian L, Shi MM & Forman HJ (1997). Increased Transcription of the Regulatory Subunit of  $\gamma$ -Glutamylcysteine Synthetase in Rat Lung Epithelial L2 Cells Exposed to Oxidative Stress or Glutathione Depletion. *Arch Biochem Biophys* **342**, 126–133.
- Topinkova E (2008). Aging, Disability and Frailty. *Ann Nutr Metab* **52**, 6–11.
- Trappe TA, Carroll CC, Dickinson JM, LeMoine JK, Haus JM, Sullivan BE, Lee JD, Jemiolo B, Weinheimer EM & Hollon CJ (2011). Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *AJP Regul Integr Comp Physiol* **300**, R655–R662.
- Trappe TA, Standley RA, Jemiolo B, Carroll CC & Trappe SW (2013). Prostaglandin and myokine involvement in the cyclooxygenase-inhibiting drug enhancement of skeletal



- muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *AJP Regul Integr Comp Physiol* **304**, R198–R205.
- Trappe TA, White F, Lambert CP, Cesar D, Hellerstein M & Evans WJ (2002). Effect of ibuprofen and acetaminophen on postexercise muscle protein synthesis. *Am J Physiol-Endocrinol Metab* **282**, E551–E556.
- Tsuboyama N, Hosokawa Y, Totani M, Oka J, Matsumoto A, Koide T & Kodama H (1996). Structural organization and tissue-specific expression of the gene encoding rat cysteine dioxygenase. *Gene* **181**, 161–165.
- Turner JM, Humayun MA, Elango R, Rafii M, Langos V, Ball RO & Pencharz PB (2006). Total sulfur amino acid requirement of healthy school-age children as determined by indicator amino acid oxidation technique. *Am J Clin Nutr* **83**, 619–623.
- Turrina A, Martínez-González MA & Stecco C (2013). The muscular force transmission system: Role of the intramuscular connective tissue. *J Bodyw Mov Ther* **17**, 95–102.
- United Nations (2013). World Population Prospects: The 2012 Revision, Volume II, Demographic Profiles.
- Vellas B, Balardy L, Gillette-Guyonnet S, Kan GAV, Ghisolfi-Marque A, Subra J, Bismuth S, Oustric S & Cesari M (2013). Looking for frailty in community-dwelling older persons: The Gerontopole Frailty Screening Tool (GFST). *J Nutr Health Aging* **17**, 629–631.
- Visser M, Kritchevsky SB, Goodpaster BH, Newman AB, Nevitt M, Stamm E & Harris TB (2002). Leg Muscle Mass and Composition in Relation to Lower Extremity Performance in Men and Women Aged 70 to 79: The Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* **50**, 897–904.
- Vitvitsky V, Mosharov E, Tritt M, Ataulakhanov F & Banerjee R (2003). Redox regulation of homocysteine-dependent glutathione synthesis. *Redox Rep* **8**, 57–63.
- Viveros M-P, Arranz L, Hernanz A, Miquel J & De la Fuente M (2007). A Model of Premature Aging in Mice Based on Altered Stress-Related Behavioral Response and Immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* **14**, 157–162.
- Volpi E, Campbell WW, Dwyer JT, Johnson MA, Jensen GL, Morley JE & Wolfe RR (2013). Is the Optimal Level of Protein Intake for Older Adults Greater Than the Recommended Dietary Allowance? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **68**, 677–681.
- Volpi E, Mittendorfer B, Rasmussen BB & Wolfe RR (2000). The Response of Muscle Protein Anabolism to Combined Hyperaminoacidemia and Glucose-Induced Hyperinsulinemia Is Impaired in the Elderly 1. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 4481–4490.
- Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE & Wolfe RR (1999). Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **277**, E513–E520.
- Volpi E, Sheffield-Moore M, Rasmussen BB & Wolfe RR (2001). Basal Muscle Amino Acid Kinetics and Protein Synthesis in Healthy Young and Older Men. *Clin Investig* **286**, 1206–1212.
- Walrand S, Guillet C, Salles J, Cano N & Boirie Y (2011). Physiopathological Mechanism of Sarcopenia. *Clin Geriatr Med* **27**, 365–385.
- Wang H, Liu H & Liu R-M (2003). Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice. *Exp Gerontol* **38**, 507–517.
- Wang TJ, Larson MG, Vasan RS, Cheng S, Rhee EP, McCabe E, Lewis GD, Fox CS, Jacques PF, Fernandez C, O'Donnell CJ, Carr SA, Mootha VK, Florez JC, Souza A, Melander O, Clish CB & Gerszten RE (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med* **17**, 448–453.

- Wang W & Ballatori N (1998). Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *Pharmacol Rev* **50**, 335–356.
- Watt MJ & Hoy AJ (2012). Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *AJP Endocrinol Metab* **302**, E1315–E1328.
- Weinstein CL & Griffith OW (1988). Cysteinesulfonate and beta-sulfopyruvate metabolism. Partitioning between decarboxylation, transamination, and reduction pathways. *J Biol Chem* **263**, 3735–3743.
- Weiskopf D, Weinberger B & Grubeck-Loebenstien B (2009). The aging of the immune system. *Transpl Int* **22**, 1041–1050.
- Welle S (2002). Cellular and Molecular Basis of Age-Related Sarcopenia. *Can J Appl Physiol* **27**, 19–41.
- Welle S, Thornton C, Statt M & McHenry B (1994). Postprandial myofibrillar and whole body protein synthesis in young and old human subjects. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* **267**, E599–E604.
- White AC, Thannickal VJ & Fanburg BL (1994). Glutathione deficiency in human disease. *J Nutr Biochem* **5**, 218–226.
- White TA & LeBrasseur NK (2014). Myostatin and Sarcopenia: Opportunities and Challenges - A Mini-Review. *Gerontology* **60**, 289–293.
- Wilkes EA, Selby AL, Atherton PJ, Patel R, Rankin D, Smith K & Rennie MJ (2009). Blunting of insulin inhibition of proteolysis in legs of older subjects may contribute to age-related sarcopenia. *Am J Clin Nutr* **90**, 1343–1350.
- Wolf DH & Hilt W (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* **1695**, 19–31.
- Wolfe R, Miller S & Miller K (2008). Optimal protein intake in the elderly. *Clin Nutr* **27**, 675–684.
- Wolfe RR (2012). The role of dietary protein in optimizing muscle mass, function and health outcomes in older individuals. *Br J Nutr* **108**, S88–S93.
- Won AB, Lapane KL, Vallow S, Schein J, Morris JN & Lipsitz LA (2004). Persistent nonmalignant pain and analgesic prescribing patterns in elderly nursing home residents. *J Am Geriatr Soc* **52**, 867–874.
- Wong LT, Whitehouse LW, Solomonraj G & Paul CJ (1981). Pathways of disposition of acetaminophen conjugates in the mouse. *Toxicol Lett* **9**, 145–151.
- Woolf AD & Pfleger B (2003). Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* **81**, 646–656.
- Wu M, Katta A, Gadde MK, Liu H, Kakarla SK, Fannin J, Paturi S, Arvapalli RK, Rice KM, Wang Y & Blough ER (2009). Aging-Associated Dysfunction of Akt/Protein Kinase B: S-Nitrosylation and Acetaminophen Intervention ed. Vina J. *PLoS ONE* **4**, e6430.
- Wu M, Liu H, Fannin J, Katta A, Wang Y, Arvapalli RK, Paturi S, Karkala SK, Rice KM & Blough ER (2010). Acetaminophen Improves Protein Translational Signaling in Aged Skeletal Muscle. *Rejuvenation Res* **13**, 571–579.
- Yagi T, Kagamiyama H & Nozaki M (1979). Cysteine sulfinic acid transamination activity of aspartate aminotransferases. *Biochem Biophys Res Commun* **90**, 447–452.
- Yakes FM & Van Houten B (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 514–519.
- Yamaguchi K, Hosokawa Y, Kohashi N, Kori Y, Sakakibara S & Ueda I (1978). Rat Liver Cysteine Dioxygenase (Cysteine Oxidase). *J Biochem (Tokyo)* **83**, 479–491.

- Yang H, Wang J, Huang ZZ, Ou X & Lu SC (2001). Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the rat glutamate-cysteine ligase catalytic subunit. *Biochem J* **357**, 447–455.
- Yang SY, Hoy M, Fuller B, Sales KM, Seifalian AM & Winslet MC (2010). Pretreatment with insulin-like growth factor I protects skeletal muscle cells against oxidative damage via PI3K/Akt and ERK1/2 MAPK pathways. *Lab Invest* **90**, 391–401.
- Young VR & Borgonha S (2000). Nitrogen and Amino Acid Requirements: The Massachusetts Institute of Technology Amino Acid Requirement Pattern. *J Nutr* **130**, 1841S–1849S.
- Young VR, Wagner DA, Burini R & Storch KJ (1991). Methionine kinetics and balance at the 1985 FAO/WHO/UNU intake requirement in adult men studied with L-[2H<sup>3</sup>-methyl-1-13C]methionine as a tracer. *Am J Clin Nutr* **54**, 377–385.
- Yuan L & Kaplowitz N (2009). Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med* **30**, 29–41.
- Zaman GJ, Lankelma J, Tellingen O van, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, Elferink RPO, Baas F & Borst P (1995). Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proc Natl Acad Sci* **92**, 7690–7694.
- Zarowitz BJ (2012). Analgesic warfare: acetaminophen, really? *Geriatr Nur (Lond)* **33**, 51–53.
- Zeanandin G, Balage M, Schneider SM, Dupont J, Hébuterne X, Mothe-Satney I & Dardevet D (2012). Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. *AGE* **34**, 371–387.
- Zezulka AY & Calloway DH (1976). Nitrogen Retention in Men Fed Isolated Soybean Protein Supplemented with l-Methionine, d-Methionine, N-Acetyl-l-Methionine, or Inorganic Sulfate. *J Nutr* **106**, 1286–1291.
- Zhang H, Court N & Forman HJ (2007). Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induce glutamate cysteine ligase expression in HBE1 cells. *Redox Rep Commun Free Radic Res* **12**, 101–106.
- Zhang H & Forman HJ (2012). Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol* **23**, 722–728.
- Zhang H, Liu H, Dickinson DA, Liu R-M, Postlethwait EM, Laperche Y & Forman HJ (2006).  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase is induced by 4-hydroxynonenal via EpRE/Nrf2 signaling in rat epithelial type II cells. *Free Radic Biol Med* **40**, 1281–1292.
- Zhang W, Doherty M, Arden N, Bannwarth B, Bijlsma J, Gunther K-P, Hauselmann HJ, Herrero-Beaumont G, Jordan K, Kaklamanis P, Leeb B, Lequesne M, Lohmander S, Mazieres B, Martin-Mola E, Pavelka K, Pendleton A, Punzi L, Swoboda B, Varatojo R, Vergbruggen G, Zimmermann-Gorska I & Dougados M (2005). EULAR evidence based recommendations for the management of hip osteoarthritis: report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* **64**, 669–681.
- Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, Bierma-Zeinstra S, Brandt KD, Croft P, Doherty M, Dougados M, Hochberg M, Hunter DJ, Kwoh K, Lohmander LS & Tugwell P (2008). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage* **16**, 137–162.
- Zimmermann KC, Bonzon C & Green DR (2001). The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**, 57–70.
- Zoico E & Roubenoff R (2002). The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function. *Nutr Rev* **60**, 39–51.

- Zou C-G & Banerjee R (2003). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -induced Targeted Proteolysis of Cystathionine  $\beta$ -Synthase Modulates Redox Homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 16802–16808.
- Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D & Högestätt ED (2000). The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* **396**, 39–42.