

Importance de l'apport protéique sur le métabolisme protéine-énergétique : étude dans un modèle préclinique de cancer avec chimiothérapie

Martin Boutiere

► To cite this version:

Martin Boutiere. Importance de l'apport protéique sur le métabolisme protéine-énergétique : étude dans un modèle préclinique de cancer avec chimiothérapie. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV055 . tel-04046462

HAL Id: tel-04046462 https://theses.hal.science/tel-04046462

Submitted on 26 Mar 2023 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : BIOLOGIE Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Martin BOUTIERE

Thèse dirigée par Christophe MOINARD PU, Université Grenoble-Alpes

préparée au sein du Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée (LBFA, INSERM U1055) dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Importance de l'apport protéique sur le métabolisme protéino-énergétique : étude dans un modèle préclinique de cancer avec chimiothérapie.

Effect of protein diets on energy-protein homeostasis: a preclinical study in a model of tumor bearing rats with chemotherapy.

Thèse soutenue publiquement le 25 Mars 2022, devant le jury composé de :

Mr. Pascal MOSSUZ PU-PH, Université Grenoble Alpes (Président)

Mr. Xavier HÉBUTERNE PU-PH, Université Côte d'Azur (Rapporteur)

Mme. Sabine COLNOT DR INSERM, Université de Paris (Rapporteur)

Mr. Dalil HANNANI CR CNRS, Université Grenoble-Alpes (Examinateur)

Mme. Béatrice DORIGNY Directrice des Affaires Médicales, Nestlé Health Science France (Invitée)



REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury de l'intérêt qu'ils portent à ce projet. Je remercie Monsieur Xavier HEBUTERNE et Madame Sabine COLNOT d'avoir accepté d'être rapporteurs. Je remercie également Madame Béatrice DORIGNY, Monsieur Dalil HANNANI et Monsieur Pascal MOSSUZ d' avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite remercier le professeur Uwe SCHLATTNER pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du LBFA et pour son encadrement au cours de mes comités de suivi individuel.

Merci au Professeur Christophe MOINARD, pour votre encadrement, vos enseignements et vos conseils au cours de cette thèse, et de m'avoir permis de poursuivre le projet « Nutr'avenir » en parallèle de ma thèse.

Je souhaite remercier Madame Christelle GUILLET et Monsieur Thomas DECAENS d'avoir accepté de faire partie de mes comités de suivi individuel.

Merci à Morgane COUCHET et Charlotte BREUILLARD pour m'avoir accueilli dans les stages qui me conduiront à réaliser cette thèse, et merci à Charlotte BREUILLARD pour ton encadrement au début et à la fin de ce projet.

Je remercie la fondation « Agir pour les Maladies Chroniques » pour votre confiance et le financement de ces trois années de thèse.

Merci à Béatrice MORIO, Céline COPPARD, Carole FOURNIER et Christelle CORNE pour votre aide précieuse et votre savoir au cours des expérimentations.

Je tiens à remercier l'Unité de Reconstitution Centralisée des Cytotoxiques de l'hôpital universitaire Grenoble Alpes pour la fourniture des chimiothérapies qui a permis de mener à bien ce projet de thèse.

Je souhaite également remercier la Société Française Nutrition Clinique et Métabolisme (SFNCM) et exprimer ma gratitude pour leur confiance et leur aide à travers l'attribution de bourses de voyage.

Un grand merci à l'EIT Health, et plus particulièrement Claire NASSIET, pour votre confiance et toutes ces expériences auxquelles vous m'avez permis de prendre part dans le cadre du projet « Nutr'avenir ».

Merci à Maria Nuria CALVES VENTUROS et Karim BENTROUDI de l'Université Grenoble Alpes pour votre aide précieuse et votre accompagnement dans le cadre des EIT *Award* 2020.

Bien sûr merci à tous les membres du LBFA qui m'ont accueilli et aidé au cours de ces années de thèse.

Merci à Hervé DUBOUCHAUD pour les conseils scientifiques, la réalisation des manips, la résolution des problèmes, les discussions tard le soir au labo et pour tes encouragements qui tombaient toujours à pic !

Et merci à Karine COUTURIER pour ton aide précieuse sur les manips et tous les conseils qui m'ont été d'un précieux soutien.

Merci à Éric FONTAINE pour m'avoir réconcilié et fait aimer l'étude des mitochondries.

Merci à Frédéric LAMARCHE pour ton savoir et tes conseils sur les expérimentations mitos, ainsi que sur tes choix musicaux pendant les manips (petit plus quand Guillaume VIAL était présent) notre trio qui va me manquer, merci à tous les deux.

Merci à Cindy, pour toute ton aide, tes conseils et ta patience dans les études que l'on a fait (j'espère que mes « HO » de panique te manqueront un peu quand même !!). Et merci à Thibault et Pauline pour votre aide précieuse.

Un grand merci Amel pour toute ton aide, j'espère ne pas avoir été trop fatiguant en tant que collègue de bureau avec toutes mes blagues d'un niveau de qualité. Merci également pour (le grand nombre de fois) où tu m'as offert tes délicieuses créations culinaires.

Je remercie également Stéphane pour ton aide pour les manips, et pour nos débats enflammés sur Marvel. Et merci à Geoffrey pour ton aide au cours de mes stages qui m'ont conduit à la thèse.

Merci à Cécile pour ton aide sur toutes les manips de ce projet et pour ta disponibilité.

Je remercie Malgorzata pour ta disponibilité (et la mousse au chocolat bien évidemment)

Merci à Sandrine pour tous les mots d'encouragement.

Un immense merci à Sarah, Lucille et Régis pour votre aide et votre disponibilité.

Salvatore, merci chef pour ces 4 ans, et pour toutes les fois où tu m'as aidé dans les démarches. Hélas sans être devenu meilleur que toi au basket !

Un immense merci à Edwige et Emily pour tous ces moments, votre soutien et ces longues, mais motivantes, conversations sur l'avenir.

Merci à l'équipe de doctorant : Bilgue, Alaa, Nour, Marie et Marius avec qui nous avons fait un bout de chemin ensemble.

Je souhaiterais également remercier les stagiaires qui m'ont aidé sur ce projet (Valentine BUDRIA, L3 ; Clarisse DI GIOIA, M1 ; et Benoit BOMAL, dernière année d'école d'ingénieur).

Merci à mes amis, qui m'ont supporté et changé les idées pendant ces années, notamment Nicolas, Julie, Kévin, Paul-Clément, Pauline, Charlène, Laura, Audrey, Hermance et à mes collocs Justine, Alessandra et Alexia, qui m'ont supporté et entendu râler beaucoup trop de fois le soir quand je rentrais. Un merci tout particulier à Clémence, pour ta patience et tes encouragements notamment au cours de ces derniers mois que l'on n'a pas pu passer ensemble. Ton soutien et tes encouragements ont été un élément majeur pour mener à bien cette thèse, j'ai hâte de voir notre avenir.

Merci à toute ma famille (cousins, cousines, oncles et tantes), qui de près ou de loin ont toujours pris des nouvelles et apporté leur soutien. Un Immense merci à ma maman Nadine, ma sœur Gaëlle et mon frère Florian pour leur soutien et ils m'ont poussé à aller jusqu'au bout de ce projet, et ils ont été toujours là quand j'en avais besoin. A mon papa, J'espère que de là où tu es, tu seras fier (...on ne s'impose pas sur la mer, on passe simplement sur la pointe des pieds, un peu comme dans la vie...)

•

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEN	IENTS	1
TABLE DES I	MATIÈRES	6
LISTE DES A	BRÉVIATIONS	9
TABLE DES I	LLUSTRATIONS	0
PUBLICATIO	NS, COMMUNICATIONS, DISTINCTIONS, FORMATIONS SUIVIES	2
INTRODUCT	ION GÉNÉRALE	7
DONNÉES B	IBLIOGRAPHIQUES	12
1. Le Ca	ncer	13
2. La Dé	nutrition	
2.1.	Définition	
2.2.	Dénutrition dans le cancer	
) Coch		14
3. Cach	exie	
3.1.		
3.2.	Cacnexie cancereuse	
3.3.	Les trois stades de la cachexie cancereuse	
3.4.	Impact sur le patient et le système de sante.	
4. Les T	raitements	21
4.1.	Chirurgie	
4.2.	Radiothérapie	
4.3.	Hormonothérapie	
4.4.	Immunothérapie	
4.5.	Chimiothérapie	
4.5.1.	Le 5-Fluorouracile (5-FU)	
4.5.2.	L'Irinotecan (CPT-11)	
5. Utilis	ation de modèles animaux pour l'étude de la cachexie cancéreuse, et e	xtrapolation à
l'Homme.		24
6. Nutri	tion en cancérologie	26
6.1.	Détection de la dénutrition en cancérologie	
6.2.	Supports nutritionnels chez le patient cancéreux :	
6.2.1.	Nutrition orale	
6.2.2.	Nutrition artificielle	
6.3.	Énergie	
6.4.	Protéines	
6.5.	Acides aminés	
6.5.1.	Acides aminés à chaîne ramifiée	
6.5.2.	β-hvdroxv β-methvl butvrate (HMB)	
6.5.3	Carnitine et créatine	
6.5.4.	Glutamine	
6.5.5.	Citrulline	
6.5.6.	Arginine	
6.5.7	Alpha-cétoglutarate d'ornithine	
/		
7. Méta	bolisme energétique et Cachexie cancéreuse	
7.1.	Métabolisme glucidique	35
7.2.	Métabolisme protéique	

7.2.1.	Métabolisme protéique au niveau musculaire	37
7.2.2.	Implication de la voie PI3K/AKT/mTOR au niveau tumoral	38
7.3. N	Nétabolisme lipidique	39
7.4. N	Iétabolisme Mitochondrial	41
7.4.1.	Métabolisme mitochondrial hépatique	42
7.4.2.	Métabolisme mitochondrial musculaire	43
BUT DE L'ÉTU	IDE	44
TRAVAUX EX	PÉRIMENTAUX	46
PUBLICATION	l N°1	47
Étude numé	éro 1	48
PUBLICATION	۱ N°2	87
Étude numé	éro 2	88
PUBLICATION	l N°3	131
Étude numé	éro 3	132
DISCUSSION	GÉNÉRALE	159
CONCLUSION	ET PERSPECTIVES	168
RÉFÉRENCES	BIBLIOGRAPHIQUES	171

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-FU : 5-FLUROURACILE

ACO : Alpha-cétoglutarate d'ornithine

AKT: Protéine Kinase B

AMPK : Protéine Kinase acitivée par l'AMP

ASPEN : American Society for Clinical and Nutrition Metabolism

CoA : Coenzyme A

Complexe IV : Cytochrome c oxydase

CPT-11 : Irinotécan

ESPEN : European Society for Clinical Nutrition and Metabolism

FADH₂ : forme reduite de la falvine adénine dinucléotide

FdUMP : fluorodeoxyuridine monophosphate

FdUTP : fluorodeoxyuridine triphosphate

FELANPE : Fereracion Latinoamericana de Terapia Nutricional, Nutricion Clinica Y Metabolismo

FOXO : Forkhead box O

FTUP : fluorouridine triphosphate

GLIM : Global leadership inititative on malnutrition

HMB : beta-hydroxy beta-méthyl butyrate

IGF-1 : Insuline-like growth factor-1

IL-1 : Interleukine 1

IL-6 : Interleukine 6

IMC : Indice De Masse Corporelle

INF-γ : Interféron gamma

IRS1 : Substrat 1 du récepteur à l'insuline

LPL : Lipoprotéine-Lipase

MAFBX : Muscle Atrophy F-box

MAM : Mitochondria-associated endosplasmic reticulum membranes

mTOR : Mammalian target of rapamycin

MURF-1 : Muscle Ring Finher-1

NADH : Forme réduite de la nicotinamide adénine

NE : Nutrition Entérale

NF-kB : Nuclear Factor-kappa B

NP : Nutrition Parentérale

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

P70S6K : ribosomal protein S6 kinase beta-1

PENSE : Parenteral and Enteral Nutrition Society of Asia

PI3K :phosphoinositide 3-kinase

PIF : Proteolysis-inducing factor

ROS : reactive oxygen species

SN-38 : ethyl-10-hydroxy-camptothecine

TOP1 : Topo isomerase de type I

TS: Thymidylate Synthase

UCP-1 : Uncoupling Protein 1

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Liste des Figures

Figure 1. Diagramme illustratif de la relation entre nutriments, cellules tumorales, et système
immunitairePage 9
Figure 2. Symptômes associés à la cachexie cancéreuse (adaptée de l'article de Muscariloti <i>et</i>
<i>al.,</i> 2010)Page 16
Figure 3. Principales adaptations métaboliques associées à la tumeur (Argilès et al., 2014)
Page 17
Figure 4. Stades et évolutions de la cachexie cancéreuse (adaptée de Fearon et al.,
2011)Page 18
Figure 5. Prévalence de la dénutrition chez les patients cancéreux (adaptée de Hébuterne <i>et</i>
<i>al.</i> , 2014)Page 18
Figure 6. Caractéristiques d'un problème de santé publique (adaptée de Farkas et al., 2013)
Page 19
Figure 7. Nombre de résultats de recherche par mots clés de 1940 à nos jours sur PubMed.
Mots clés : « Cancer », « Cancer Cachexia », « Chemotherapy Cachexia » et « Cancer and
<i>Cachexia</i> » en date de Janvier 2022, sur la période de 1940 à 2021Page 20
Figure 8. Mécanisme d'action du 5-Fluorouracile (A) et de l'Irinotecan (B)Page 24
Figure 9. Cycle de Cori (adaptée de Argiles <i>et al.,</i> 2014)Page 36
Figure 10. Principaux mécanismes responsables de la fonte musculaire en situation de cancer.
Page 38

Liste des Tableaux

Tableau	1. Pri	ncipaux m	odèles	anim	aux utilis	sés po	our l'é	tude de	e la	cachexie	cancér	euse
(adapté	de	Ballarò	et	al.,	2016	et	de	Van	de	Worp	et	al.,
2020)											Pag	je 25

PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS, DISTINCTIONS, FORMATIONS SUIVIES

Publications

Articles Scientifiques

- Protein intake in cancer: does it improve nutritional status and/or modify tumour response to chemotherapy? Martin Boutière, Cécile Cottet-Rousselle, Céline Coppard, Karine Couturier, Morgane Couchet, Christelle Corne, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard.
- CPT-11 and 5-FU induce cachexia by impairment of energy metabolism in hepatic mitochondria.

Martin Boutière, Frédéric Lamarche, Guillaume Vial, Cécile Cottet-Rousselle, Hervé Dubouchaud, Béatrice Morio, Stéphane Attia, Eric Fontaine, Charlotte Breuillard, Christophe Moinard.

 Effect of protein intake and enteral nutrition on tumour growth and the nutritional status of tumor-bearing rats undergoing chemotherapy.
 Martin Boutière, Benoît Bomal, Cindy Tellier, Karine COUTURIER, Hervé Dubouchaud, Charlotte Breuillard, Christophe Moinard.

Communications écrites

- La chimiothérapie impacte directement le métabolisme protéino-énergétique au niveau hépatique.
 Martin Boutière, Frédécric Lamarche, Cécille Cottet-Rousselle, Eric Fontaine, Christophe Moinard.
 Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2021, Lilles (France)
- Perturbation du métabolisme mitochondriale hépatique et musculaire, et du métabolisme énergétique, dans un modèle murin de cancer du côlon et de chimiothérapie.
 Martin Boutière, Guillaume Vial, Frédéric Lamarche, Hervé Dubouchaud, Eric Fontaine, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2020, e-congrès.
- Does protein intake modulate immune function in a murin model of cancer and chemotherapy?

Martin Boutière, Cécille Cottet-Rousselle, Céline Coppard, Christelle Corne, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard. 42^{ème} congrès ESPEN, Septembre 2020, (e-congrès).

- Hepatic and muscular mitochondrial dysfunction and energy metabolism disturbances in a murine colon ward cancer and chemotherapy model.
 Martin Boutière, Guillaume Vial, Frédéric Lamarche, Hervé Dubouchaud, Eric Fontaine, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard.
 42^{ème} congrès ESPEN, Septembre 2020, (e-congrès).
- L'apport protéique module-t-il la fonction immunitaire dans un modèle murin de cancer et chimiothérapie ?
 Martin Boutière, Cécille Cottet-Rousselle, Céline Coppard, Christelle Corne, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard.
 Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2019, Rennes (France) (Bourse de voyage de 350 euros alouée par la SFNCM).
- Protein intake in cancerology: does it limit malnutrition or promote tumor growth? Martin Boutière, Karine Couturier, Christophe Moinard and Charlotte Breuillard 41^{ème} congrès ESPEN, Septembre 2019, Cracovie (Pologne).
- L'apport protéique en cancérologie : limite-t-il la malnutrition ou favorise-t-il la croissance tumorale ?
 Martin Boutière, Karine Couturier, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard. Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2018, Nice (France)
- Le cancer et la chimiothérapie affecte la fonction mitochondirale hépatique dans un modèle murin de cancer colorectal.
 Martin Boutière, Frédéric Lamarche, Eric Fontaine, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard Journées Francophones de Nutrition, Novembre 2018, Nice (France).

Communications orales

• Cancer and chemotherapy strongly affect hepatic mitochondrial function in murine colon ward cancer model.

Martin Boutière, Frédéric Lamarche, Eric Fontaine, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard.

ESPEN, Madrid, Septembre 2018

 L'apport protéique en cancérologie : limite-t-il la malnutrition ou favorise-t-il la croissance tumorale ? Martin Boutière, Karine Couturier, Christophe Moinard, Charlotte Breuillard Assises Régionales de Nutrition, Lyon, Jeudi 12 Septembre 2019

Formations suivies

Expérimentation animale : Obtention du Niveau 1 et 2, Université Grenoble-Alpes, (Juin 2018).

Expérimentation initiation à la chirurgie expérimentale sur rongeur, Université Grenoble-Alpes, (Juin 2018).

Demande d'autorisation de projet en expérimentation animale. Université Grenoble-Alpes, (Février 2019).

Participation à l'événement ma thèse en 180 secondes (Edition 2021).

26th ESPEN Course of clinical nutrition and metabolic care Kranjska Gora (Slovénie) Novembre 2019 (Obtention d'une bourse de voyage de 400 euros attribuée par la SFNCM).

Expériences

Encadrement d'un groupe de travail lors des « Innovations days » 2021 organisés par l'Université Grenoble Alpes et l'EIT *Health*, Novembre 2021

EIT Health Graduation ceremony, Intervenant, Novembre 2021.

1st EIT Health Students Workshop for Master of Technological Innovation in Health (MTiH), intervenant, Université Polytechnique de Madrid, Espagne, Octobre 2018

Communications, évènements, distinctions dans le cadre du projet « Nutr'avenir ».

EIT Health translational fellowship Training Camp, Août 2019, Oxford (Angleterre) Bourse de voyage de 1500 euros. Obtention d'un prix de 5000 euros.

EIT Awards 2020

2^{ème} prix dans la catégorie *CHANGE* (20000 euros) et 4^{ème} prix du public.

Relations avec les médias

Presse télévisée

- Interview en direct au journal de midi France 3 Alpes (<u>https://lbfa.univ-grenoble-alpes.fr/actualites/eit-awards</u>)
- Reportage télévisé France 3 « Grenoble : une étude visant à améliorer la nutrition des malades du cancer reçoit un prix européen » (<u>https://www.youtube.com/watch?v=dbqldHyUjxM</u>)

Presse écrite

https://www.ledauphine.com/sante/2020/11/30/isere-un-chercheur-grenobloisnomine-pour-un-prix-europeen-pour-son-travail-sur-la-nutrition-des-malades-ducancer

- <u>https://www.culture-nutrition.com/2021/01/26/nutravenir-plateforme-de-recherche-en-nutrition-clinique/</u>
- <u>https://lejournaldeleco.fr/sante-nutravenir-en-lice-pour-les-prix-europeens-de-linnovation/</u>
- <u>https://www.lessor38.fr/nutri-avenir-remporte-le-deuxieme-prix-europeen-de-l-innovation-sante-28007.html</u>
- <u>https://www.canceropole-clara.com/grenoble-projet-nutravenir-nourrir-</u> correctement-le-patient-et-non-la-tumeur-au-eit-awards-2020/

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le cancer est un problème majeur de santé publique. C'est la seconde cause de décès dans le monde, avec 10 millions de morts en 2020. Le nombre de nouveaux cas augmente au cours des années (19 millions dans le monde en 2020) (Sung et al., 2021; Ferlay et al., 2021). Après avoir étudié pendant des décennies les différents traitements possibles pour éliminer ces tumeurs, il est apparu que le cancer était une pathologie multifactorielle et que sa prise en charge nécessitait une approche médicale multimodale, afin d'identifier les facteurs qui peuvent influer le développement des tumeurs et/ou en altérer les traitements. Un de ces facteurs est de plus en plus évoqué : la dénutrition, qui dans sa forme ultime conduit à la Cachexie. Ce phénomène est présent chez 50 à 80 % des patients atteints d'un cancer (Ryan et al., 2016), et 10 à 20 % des décès observés chez ces patients sont liés à la cachexie (Muscaritoli et al., 2021). C'est donc un enjeu majeur pour la prise en charge des patients cancéreux. La cachexie est un état multifactoriel caractérisé par une perte de poids associée à une réduction de l'apport alimentaire, combinée à une altération du métabolisme (catabolique) et à un dérèglement des fonctions immunitaires (Arends et al., 2017). La dénutrition fait partie de la cachexie, il n'existe pas d'interventions thérapeutiques suffisamment efficaces pour résoudre ce phénomène, et contrairement à la dénutrition, la cachexie ne peut pas être résolue par un simple apport nutritionnel (Arends et al., 2017). Plusieurs axes de recherche existent pour étudier l'état de cachexie, afin d'avoir une meilleure compréhension des intéractions entre l'hôte, la tumeur et les interventions thérapeutiques (tel que la chimiothérapie), combinée à la compréhension des interventions nutritionnelles, ceci dans le but de comprendre l'ensemble des mécanismes impliqués dans ce phénomène et émettre des hypothèses sur des interventions thérapeutiques efficaces. Une des premières lignes de traitement du cancer est la chimiothérapie. En plus de l'activité tumorale et son implication dans la cachexie, il a été mis en évidence que des chimiothérapies contribuent elles aussi au développement et à la progression de ce phénomène (Kamp et al., 2014; Sanders et al., 2016).

Le premier axe de recherche concerne les interventions nutritionnelles pour essayer de limiter l'état de cachexie. En effet, en situation clinique, pour tenter de restreindre cette dénutrition et les conséquences qui en découlent, les patients sont placés sous régimes hyperprotéiques et hyper-énergétiques. Or, il n'existe aucune donnée fondamentale sur ce sujet, la majorité des études ayant été réalisée dans des modèles *in vivo* uniquement cancéreux, sans traitements thérapeutiques (que ce soit la chimiothérapie ou autres). En effet, si la fraction protéique semble essentielle (pour préserver la masse maigre et les fonctions immunitaires), elle est parfois contestée car elle pourrait favoriser la croissance tumorale. Les cellules cancéreuses sont des organismes à renouvellement rapide, avec des besoins nutritionnels élevés, ainsi que des besoins en acides aminés élevés (en particulier en glutamine et en arginine, comme toutes les cellules à renouvellement rapide) (Li et al., 2016). Il est proposé qu'une réduction de l'apport en nutriments, et plus spécifiquement en protéines, puisse priver la tumeur d'un moyen de se développer et également la sensibiliser aux traitements anticancéreux (Fontana et al., 2013 ; Rubio et al., 2018). Dans la pratique, les choses ne sont pas si simples car cette diminution des apports protéiques risque d'entrainer et aggraver la dénutrition qui peut affecter la survie des patients. Par ailleurs, l'apport en protéines va conditionner la croissance tumorale, mais il va également influencer le système immunitaire (qui lutte contre le développement de la tumeur) (Lee *et al.,* 2012). La relation existante entre cellules du système immunitaire et nutriments est connue depuis de nombreuses années car, comme les cellules cancéreuses, elles ont un renouvellement rapide avec des besoins métaboliques particulièrement élevés et sont en compétition pour l'utilisation des nutriments (en particulier la glutamine et l'arginine). Ainsi, la disponibilité en nutriments, si elle affecte en théorie les cellules cancéreuses, aura également un impact sur les cellules immunitaires et il est extrêmement difficile de pouvoir prédire quelle en sera la résultante (Figure 1)



Figure 1. Diagramme illustratif de la relation entre nutriments, cellules tumorales, et système immunitaire.

Le deuxième axe de recherche étudié est d'explorer les origines des perturbations du métabolisme énergétique. En effet, parmi les mécanismes proposés, il a été montré que le cancer pouvait affecter le métabolisme mitochondrial. Une balance énergétique négative est causée par des perturbations mitochondriales au niveau hépatique (Dumas *et al.*, 2011) puis musculaire (Julienne *et al.*, 2012) conduisant à une perte de la masse musculaire squelettique (Dodson *et al.*, 2011) ainsi qu'à une fonte du tissu adipeux (Argilés *et al.*, 2014). Tous ces phénomènes conduisent à un gaspillage énergétique.

De manière évidente, pour des raisons éthiques, ces recherches ne peuvent pas être conduites chez le patient (par exemple diminuer son apport protéique n'est pas envisageable), d'où l'importance d'avoir des modèles de recherche précliniques représentatifs de ce que l'on peut observer au niveau clinique. Par ailleurs, il n'est pas possible non plus d'évaluer l'influence de la nutrition sur la croissance tumorale.

Le but de ce travail est donc d'explorer dans un premier temps l'effet d'un apport plus ou moins riche en protéines (en situation iso-énergétique) sur le développement de l'état de cachexie et de la tumeur. Puis dans un second temps d'étudier les perturbations énergétiques en lien avec la cachexie cancéreuse. Le tout dans un modèle de recherche comprenant le cancer et la chimiothérapie.

Dans une première étude (publication numéro 1), nous avons étudié les conséquences de la modulation de l'apport protéique sur l'évolution de la cachexie et de la croissance tumorale, de manière orale dans ce modèle *in vivo*. Dans une deuxième étude (publication numéro 2) nous avons exploré les perturbations du métabolisme énergétique *in vivo*, en présence du cancer et/ou de la chimiothérapie, pour ensuite finir sur une étude *in vitro* afin d'explorer les mécanismes au niveau cellulaire qui pourraient être impliqués. Ensuite, comme en clinique certains patients ne peuvent plus se nourrir de manière orale suite à l'évolution de la maladie ou de certains effets secondaires des traitements, ils sont placés sous nutrition artificielle afin de subvenir aux besoins nutritionnels nécessaires. C'est pour cela que nous avons dans une troisième étude combiné deux modèles : celui de cachexie cancéreuse comprenant le cancer et la chimiothérapie, avec un modèle de nutrition entérale chez le rongeur. Ceci dans le but d'observer l'effet de cette modulation en apport protéique *via* une nutrition artificielle administrée par la voie entérale pour étudier si cela peut

atténuer voire contrer l'état de cachexie dans ce modèle et connaître l'impact de la nutrition artificielle sur la croissance tumorale.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Le Cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par la mutation de cellules qui deviennent anormales et prolifèrent de façon excessive. Ces cellules déréglées finissent par former une masse que l'on appelle tumeur maligne. Les cellules cancéreuses ont tendance à envahir les tissus voisins et à se détacher de la tumeur, elles migrent alors *via* les vaisseaux sanguins et lymphatiques pour former une autre tumeur (métastase). C'est la deuxième cause de décès dans le monde, avec un nombre de cas de plus en plus important au fil des décennies (19 millions de nouveaux cas en 2020, et 10 millions de décès la même année (Sung *et al.* 2021; Ferlay *et al.*, 2021)). L'impact économique est de 1160 milliards de dollars par an (Données de l'OMS, 2018). Au fil du temps, de multiples recherches ont été effectuées pour trouver des traitements sous différentes formes afin de prévenir et lutter contre ce problème de santé publique. Un aspect est de plus en plus présent dans ces recherches et dans la prise en charge des patients cancéreux : les facteurs annexes, liés au cancer et/ou à la chimiothérapie, qui contribuent à l'augmentation des complications, à la dégradation de la qualité de vie des patients, et à l'augmentation de la mortalité. Un de ces facteurs est la dénutrition.

2. La Dénutrition

2.1. Définition

Il faut distinguer les termes « malnutrition » et « dénutrition ». Le premier comprend la malnutrition par excès, par déficit, ou par des carences spécifiques (Cederholm *et al.*, 2017a). Alors que la dénutrition peut être définie comme "*un état résultant d'un manque des apports ou d'une mauvaise absorption des nutriments qui entraîne une modification de la composition corporelle (diminution de la masse adipeuse) et de la masse cellulaire corporelle, entraînant une diminution des fonctions physiques et mentales ainsi qu'une altération du résultat clinique de la maladie*". La dénutrition peut résulter de la famine, d'une maladie ou d'un vieillissement avancé, de manière séparée ou en combinaison (Cederholm *et al.*, 2017b). La dénutrition liée à une maladie a été définie comme un état résultant de l'activation d'une inflammation systémique par une maladie sous-jacente, telle que le cancer. La réponse inflammatoire provoque une anorexie et une dégradation des tissus qui peuvent, à leur tour, entraîner une perte de poids significative, des altérations de la composition corporelle et un déclin de la fonction physique (Arends *et al.*, 2017). Plus récemment, le GLIM (*Global Leadership Initiative on Malnutrition*) composé de groupes d'experts représentant des sociétés savantes (*American Society for Clinical and Nutrition Metabolism* (ASPEN), *European Society for Clinical Nutrition and Metabolism* (ESPEN), *Fereracion Latinoamericana de Terapia Nutricional, Nutricion Clinica Y Metabolismo* (FELANPE), *Parenteral and Enteral Nutrition Society of Asia* (PENSE)) ont proposé des recommandations associant des critères phénotypiques et des critères étiologiques (perte de poids non volontaire, diminution de l'Indice de Masse Corporelle (IMC), réduction de la masse musculaire, diminution des apports alimentaires ou de l'absorption, présence d'une maladie/inflammation) (Cederholm *et al.*, 2019).

2.2. Dénutrition dans le cancer

La dénutrition n'est pas un item nouveau chez le patient cancéreux. Warren *et al.*, dans les années 30, décrivaient la dénutrition comme un facteur de risque pour l'aggravation de l'état des patients atteint d'un cancer (Warren *et al.*, 1932). Toutefois, le problème de la dénutrition est de plus en plus cité dans la prise en charge de ces patients, ainsi que dans les projets de recherche. Les diminutions progressives des apports alimentaires et du poids corporel sont de puissants indicateurs sur l'évolution négative de la survie chez les patients cancéreux (Nelson *et al.*, 1994; Ottery, 1996). Il est important de considérer les trois paramètres suivants pour la détection et la prise en charge de la dénutrition : l'état nutritionnel, la diminution de la prise alimentaire, et le cancer sous-jascents.

3. Cachexie

3.1. Définition

Le mot cachexie vient du grec « *kakos* » et « *hexis* » signifiant « mauvaise condition ». Jusque dans les années 2000, ce terme n'avait aucune définition officielle, ayant comme effet pervers un mauvais diagnostic de ce syndrome. La cachexie est le résultat d'une interaction complexe et multifactorielle entre une maladie sous-jacente, des réactions inflammatoires, des modifications métaboliques et une diminution des apports nutritionnels.

Les symptômes et séquelles pathologiques de la cachexie comprennent l'anorexie, la fonte musculaire, la fatigue, l'anémie, l'ensemble conduisant à une diminution des capacités physiques, un faible diagnostic et une augmentation de la toxicité des traitements (Martin *et al.,* 2015). On retrouve trois facteurs qui conduisent à la cachexie : un hyper-métabolisme, une augmentation du catabolisme lipidique et protéique, conduisant à une balance énergétique négative, et un dérèglement neuro-hormonal (Grossberg *et al.,* 2010; Fearon *et al.,* 2012). A l'inverse de la dénutrition, la cachexie ne peut pas être complétement résolue par un support nutritionnel (Arends *et al.,* 2017). Un patient dénutri n'est pas forcément cachectique, alors qu'un patient cachectique est dénutri (Muscaritoli *et al.,* 2010).

3.2. Cachexie cancéreuse

La cachexie est présente chez 60 à 80 % des patients cancéreux (Ryan *et al.*, 2016), et 10 à 20 % des décès chez ces derniers sont liés à ce phénomène de cachexie cancéreuse (Muscariloti *et al.*, 2021). En 2011, Fearon *et al.*, ont défini la cachexie cancéreuse comme un syndrome multifactoriel caractérisé par une perte de la masse musculaire squelettique (avec ou sans perte de masse grasse) qui ne peut pas être inversée par un simple support nutritionnel conventionnel et qui conduit à un dysfonctionnement fonctionnel progressif. De plus ils l'ont associée au développement d'une anorexie, d'une inflammation et de multiples perturbations du métabolisme (lipidique, glucidique et protéique) (Figure 2).



Figure 2. Symptômes associés à la cachexie cancéreuse (figure adaptée de l'article de Muscaritoli *et al.*, 2010)

La présence de la tumeur et du traitement (que ce soit la radiothérapie ou la chimiothérapie par exemple) vont perturber cet équilibre, en agissant notamment sur le capital musculaire (Figure 3). ils vont augmenter une dégradation protéique afin de fournir des acides aminés qui vont être capté par la tumeur, (comme la glutamine permettant la croissance de la tumeur, ou encore l'alanine qui va être utilisée à des fins néoglocogéniques). Puis, le pyruvate/ lactate libéré par la tumeur sera recapté par le foie pour redonner du glucose créant ainsi un cercle vicieux où la tumeur va s'autoalimenter en glucose (il s'agit du cycle de Cori notamment, qui est décrit en détail dans la partie 7.1)



Figure 3. Principales adaptations métaboliques associées à la tumeur (Argilés *et al.*, 2014) Ainsi la tumeur modifie le métabolisme de l'hôte afin de détourner l'énergie qui est nécessaire à sa croissance en perturbant le métabolisme énergétique de l'hôte et favorisant ainsi une fonte musculaire.

3.3. Les trois stades de la cachexie cancéreuse

La cachexie est composée de trois stades (Fearon et al., 2011):

- La pré-cachexie : Perte de poids inférieure ou égale à 5%, anorexie et changements métaboliques. A ce stade-là, la progression de la cachexie va dépendre du type de cancer et de son avancée.
- La cachexie : Perte de poids supérieure à 5%, ou IMC < à 20 et perte de poids supérieure à 2 % ou alors sarcopénie et perte de poids supérieure à 2 %. De plus il est observé une diminution de la consommation alimentaire, avec une inflammation systémique.
- La cachexie réfractaire : Survie inférieure à 3 mois, pas de réponse au traitements anticancéreux. A ce stade il n'y a aucun retour possible pour éviter la perte de poids.



Figure 4. Stades et évolutions de la cachexie cancéreuse (adaptée de Fearon et al., 2011)

Malgré la grande diversité des cancers et de leurs métabolisme, la cachexie est présente dans la majorité de ces cancers (Anker *et al.*, 2019; Farkas *et al.*, 2013), mais sa fréquence va être plus ou moins importante en fonction de la localisation de la tumeur. Il a été estimé que 39 % des patients atteints d'un cancer digestif souffrent de ce phénomène, 49 % pour les cancers de la tête et du cou, 45 % pour les cancers pulmonaires. Le cancer du sein est lui à un taux beaucoup plus faible (21 %) (Figure 5). La cachexie représente donc un large panel de patients, la lutte contre ce phénomène est un enjeu majeur. Le développement des traitements thérapeutiques efficaces contre la cachexie cancéreuse est difficile, et à ce jour aucun traitement standard efficace existe. Si ce dernier parviendrait à être développé, les effets pourraient être très significatifs, car des études suggèrent que la stabilisation du poids est associée à une amélioration de la survie et de la qualité de vie des patients (Davidson *et al.*, 2004).



Figure 5. Prévalence de la dénutrition chez les patients cancéreux. (Adaptée de Hébuterne *et al.*, (2014)).

3.4. Impact sur le patient et le système de santé.

La cachexie a un impact négatif sur la santé, la survie, la qualité de vie des patients et sur les coûts économiques supplémentaires que va engendrer ce phénomène.

La perte de poids, de masse musculaire, entraine une diminution des capacités physiques (Fearon *et al.*, 2011), la déficience du système immunitaire (qui entraine une augmentation des infections) (Fearon *et al.*, 2013), une diminution des réponses aux traitements et une augmentation de leur toxicité (Aaldriks *et al.*, 2013). Cet ensemble va affecter la qualité de vie des patients et engendrer une hausse de la mortalité (Fearon *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les coûts, la dénutrition chez les patients cancéreux entraine une augmentation des soins, des traitements supplémentaires prolongeant la durée d'hospitalisation (Maasberg *et al.*, 2015) Ainsi le temps moyen d'hospitalisation d'un patient non cachectique est de 3 jours, *vs* 6 jours pour un patient cachectique (Arthur *et al.*, 2014).

La cachexie cancéreuse regroupe toutes les caractéristiques pour être décrite comme un problème de santé majeur : en augmentation dans la population, impact sur la morbidité, sur la qualité de vie, sur la mortalité, stratégies de lutte pas efficaces, ce qui engendre des coûts supplémentaires (Farkas *et al.*, 2013) (Figure 6).





En plus de l'activité de la tumeur et des réponses de l'hôte à celle-ci qui peuvent conduire à ce phénomène de cachexie, les études se sont ensuite tournées vers les traitements qui peuvent, dans certains cas, contribuer de manière directe au développement de la cachexie au niveau clinique (Sanders *et al.*, 2016; Kamp *et al.*, 2014).Ceci se retrouve aussi dans des modèles animaux, où la chimiothérapie peut provoquer une perte de la masse musculaire, avec des effets distincts ou associés au cancer (Le Bricon *et al.*, 1995; Pin *et al.*, 2019; Damrauer *et al.*, 2018; Xue *et al.*, 2008), ce qui indique que les traitements thérapeutiques efficaces de la cachexie induite par le cancer et la chimiothérapie doivent tenir compte des altérations métaboliques spécifiques dues aux médiateurs pathologiques ou pharmacologiques de la cachexie venant du cancer et de la chimiothérapie (Argilés et al., 2019). Toutefois, le nombre d'études sur le sujet est encore faible comparé au nombre d'études sur le cancer dans la littérature. A ce titre, la figure 7 illustre le nombre de résultats de recherche par mot clé pour « *Cancer* », « *cancer cachexia* » « *chemotherapy cachexia* » et « cancer and *chemotherapy cachexia* »



Figure 7. Nombre de Résultats de recherche par Mots clés de 1940 à nos jours sur PubMed. Mots clés : « *Cancer* », « *Cancer Cachexia* », « *Chemotherapy Cachexia* » et « *Cancer and Chemotherapy Cachexia* » en date de Janvier 2022, sur la période de 1940 à 2021.

4. Les Traitements

Les traitements contre les cancers sont multiples, et vont différer en fonction du type de cancer et de son stade d'avancement. Ils peuvent être prescrits seuls, ou associés, en fonction de chaque situation. Les traitements les plus courants sont la chimiothérapie, la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie ou l'immunothérapie. Ils peuvent agir de manière locale (*i.e.* chirurgie, radiothérapie) ou bien générale (*i.e.* la chimiothérapie ou l'hormonothérapie). Avec les progrès technologiques réalisés au cours des dernières décennies, les traitements connaissent une énorme évolution et la compréhension des effets sous-jacents a été améliorée. Malgré cela, le cancer reste l'une des causes de mortalité majeure dans le monde. Ces traitements possèdent des effets secondaires, telle que la toxicité, pouvant provoquer des modifications dans l'efficacité des traitements, la durée d'hospitalisation, la qualité de vie des patients et entrainer des coûts économiques supplémentaires. Les traitements sont passés en revue brièvement, nous aborderons plus en détail la chimiothérapie, qui va être l'intervention thérapeutique utilisée lors de cette étude.

4.1. Chirurgie

C'est le plus ancien traitement en oncologie. Le but de la chirurgie est d'enlever les tissus cancéreux du corps. Cela peut avoir des effets secondaires selon le type de cancer et l'état de santé de la personne. Elle s'applique essentiellement aux cancers localisés ou de petites tailles (Wyld *et al.*, 2015). D'autres procédures peuvent être réalisées avant ou après la chirurgie, pour compléter la thérapie et éliminer toutes les traces tumorales restantes. L'impact de la cachexie sur l'efficacité du traitement chirurgical a été étudié à maintes reprises, montrant que la cachexie et ses facteurs associés (dénutrition, faible masse musculaire, carences vitaminiques) entrainent des complications péri- et post-opératoires conduisant à une mortalité plus élevée (Chowdhry *et al.*, 2019).

4.2. Radiothérapie

La radiothérapie utilise de fortes doses de radiations (la plupart du temps des radiations ionisantes) qui vont viser l'ADN des cellules cancéreuses, pour tuer ces dernières. Cette méthode est très souvent complémentaire de la chirurgie. Des effets secondaires peuvent être observés, notamment en raison des radiations ionisantes. Elle n'est pas utilisée si le cancer est à un stade très avancé ou à un endroit vulnérable. Ce traitement est utilisé de manière significative chez les patients cachectiques (Sanders *et al.*, 2016), en raison probablement des perturbations métaboliques et physiologiques qui font que d'autres traitements tel que la chirurgie ou l'immunothérapie sont moins bien tolérées (Chowdhry *et al.*, 2019).

4.3. Hormonothérapie

Le principe consiste à modifier les quantités d'hormones présentes dans le corps pour traiter certains types de cancer (sein, prostate, appareil reproducteur) qui dépendent de ces substances chimiques pour se propager et se développer (Pronzato *et al.*, 2005).

4.4. Immunothérapie

C'est une méthode de traitement qui va consister à supporter le système immunitaire pour combattre la tumeur. C'est une méthode qui ne présente pas d'effets secondaires majeurs. Dans le cas de présence de la cachexie, l'efficacité de ce traitement peut être atténuée, avec l'hypothèse d'une plus grande clairance des anticorps due à l'anorexie et/ou la cachexie (Brocco *et al.*, 2019) ce qui pourrait entrainer une diminution de la survie globale (Turner *et al.*, 2018).

4.5. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à utiliser des substances chimiques qui vont interférer avec les cellules tumorales afin de stopper leur développement. Elle présente des effets secondaires, qui vont varier selon le type des médicaments utilisés, et peut détruire également les tissus sains. En 2018, 57% des patients atteints d'un cancer avaient besoin d'un traitement par chimiothérapie (Arnold *et al.*, 2019). Le lien entre cachexie et chimiothérapie est un cercle vicieux. En effet, d'un côté chez les patients recevant la chimiothérapie, il a été montré qu'ils ont une plus faible tolérance à la chimiothérapie lorsqu'ils sont dénutris (Andreyev *et al.*, 1998; Swenerton *et al.*, 1979; Person *et al.*, 2002). De plus, la chimiothérapie peut contribuer à cette cachexie et à la perte musculaire, qui est corrélée à une moins bonne survie (Bozzetti, 2017). Aux vues de la très grande diversité et du grand nombre d'études disponibles dans la littérature, nous allons nous consacrer à deux composés chimiques dans toutes les études de ce sujet de thèse : le 5-Fluorouracile (5-FU) et l'irinotecan (CPT-11).

4.5.1. Le 5-Fluorouracile (5-FU)

C'est un agent cytostatique de la famille des fluoropyrimidines, développé dans les années 50 (Longley *et al.*, 2003). Il s'agit d'un des agents chimio-thérapeutiques les plus utilisés pour traiter les cancers colorectaux (Le *et al.*, 1993), et une grande variété de cancers (Xie *et al.*, 2020). Il est converti en trois métabolites : le fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) qui inhibe l'enzyme thymidylate synthase (TS, essentielle à la synthèse de l'ADN auquel elle fournit un de ses précurseurs), le fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) qui va intégrer l'ADN et le fluorouridine triphosphate (FUTP) qui va agir en intégrant l'ADN et ainsi perturber et inhiber son fonctionnement normal, entrainant ainsi une réduction de la réplication et des réparations de l'ADN ou de l'ARN et donc une inhibition de la croissance des cellules tumorales (Xie *et al.*, 2020) (Figure 8A).

4.5.2. L'Irinotecan (CPT-11)

C'est un analogue de la camptothécine, un alcaloïde végétal issu du *Camptotheca Acumintata.* Il a été approuvé pour la première fois au Japon en 1995 (Bailly, 2019). Son activité anti-tumorale est permise grâce à une transformation rapide dans sa forme métabolite active : l'ethyl-10-hydroxy-camptothecine : SN-38 (Ramesh *et al.*, 2010), qui va permettre l'inhibition de la topo isomérase de type I (TOP1), qui est une enzyme nucléaire, impliquée dans la résolution des problèmes de conformation et de topologie pendant la réplication, la transcription ou les recombinaisons du matériel génétique (Armand *et al.*, 1995). C'est une molécule chimique utilisée surtout pour les tumeurs solides, en particuliers les cancers colorectaux, pancréatiques, pulmonaires ou gastriques (De Man *et al.*, 2018; Reita *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2015; Glassman *et al.*, 2018; Fukuchi *et al.*, 2020) (Figure 8B).


Figure 8. Mécanisme d'action du 5-Fluorouracile (A) et de l'Irinotecan (B)

Au niveau clinique, l'utilisation combinée du 5-FU et du CPT-11 a été démontrée à plusieurs reprises, avec une meilleure efficacité et survie chez les patients comparée à une utilisation mono-thérapeutique du 5-FU (André *et al.*, 2009). Leur utilisation combinée a permis d'améliorer le taux de réponse pour les cancers colorectaux de 40 à 50% (Giacchetti *et al.*, 2000; Douillard *et al.*, 2000). Mais parallèlement à cette amélioration, l'utilisation combinée a augmenté le risque d'effets secondaires et toxiques, notamment au niveau de la muqueuse intestinale (Logan *et al.*, 2009). La toxicité gastro-intestinale est l'un des effets secondaires les plus fréquents au cours de ces traitements (Jones *et al.*, 2006). D'autres effets secondaires sont observés : la neutropénie (diminution des neutrophiles circulants), l'asthénie (fatigue) ou encore leucopénie (diminution du nombre de globules blancs circulants (Masuda *et al.*, 1996 ; De Man *et al.*, 2018).

5. Utilisation de modèles animaux pour l'étude de la cachexie cancéreuse, et extrapolation à l'Homme.

L'hétérogénéité de la cachexie induite par le cancer, ainsi que la grande variabilité des modèles de recherche (méthode d'implantation de la tumeur, chimiothérapie(s) utilisée(s), durée des études, apport(s) nutritionnel(s) utilisé(s)) font que chaque modèle ne représente pas à 100% la complexité de la cachexie cancéreuse chez l'Homme. Cela implique le besoin d'une normalisation des paramètres afin d'obtenir des modèles qui reproduisent au mieux l'étiologie de la cachexie humaine, afin de faciliter la transposition des expériences vers la pratique clinique (Ballarò *et al.*, 2016; van de Worp *et al.*, 2020). Au début de la recherche sur la cachexie cancéreuse en utilisant des modèles animaux, la grande majorité comportait uniquement une tumeur, sans traitement. Or il a été démontré l'importance de la chimiothérapie dans le développement de la cachexie (Op den Kamp *et al.*, 2014; Sanders *et al.*, 2016), son utilisation améliore l'étude des mécanismes sous-jacents. L'utilisation d'un modèle combinant la tumeur et la chimiothérapie (ou un autre traitement) permet une meilleure compréhension des intéractions entre la tumeur, l'hôte et le traitement, combinée à la compréhension des interventions nutritionnelles dans ces modèles, ce qui est crucial pour développer ou émettre des hypothèses sur des interventions thérapeutiques efficaces pour lutter contre la cachexie cancéreuse (Van de Worp *et al.*, 2020). Il est essentiel de garder en tête les perspectives de la nutrition chez le patient cancéreux lorsque l'on travaille sur un modèle animal (Baracos *et al.*, 2000).

Tableau 1: Principaux modèles animaux utilisés pour l'étude de la cachexie cancéreuse,adapté de Ballarò et al., (2016) et de Van de Worp et al., (2020).

	Modèle	Hôte	Site d'injection de	Durée d'expérimentation	Perte muscle squelettique et	Anorexie	Ref
			la tumeur	(jours)	masse grasse		
Souris	C26 Carsinoma	Balb/C ; CD2F1	s.c. ;i.m. ;i.p.	11->21	Oui	Oui/Non	(Busquets <i>et al .,</i> 2016; Matsuyama <i>et al.,</i> 2015)
	Lewis lung Carcinoma (LLC)	C57B1/6	s.c. ;i.m	15->34	Oui	Oui	(Pin <i>et al</i> ., 2015; Chen <i>et al</i> ., 2015)
	MAC 16 Adénocarcinoma	NMRI	S.C.	01->20	Oui	Non	(Mirza and Tisdale, 2014)
	B16 Melanoma	C57B1/6	s.c.	14->16	Oui	Oui	(Toledo <i>et al</i> ., 2014)
Rats	Walker 256 carcinoma	Sprague- Dawley ; Wistar	s.c.	7->33	Oui	Oui	(Beluzi <i>et al.,</i> 2015; Schiessel <i>et al.,</i> 2015)
	Yoshida ascites hepatoma 130 (AH 130)	Wistar	i.p.	7->24	Oui	Oui	(Penna <i>et al .,</i> 2016; Toledo <i>et al.,</i> 2016)
	Ward Colon Tumor	Fischer	S.C.	14->21	Oui	oui	(Xue et al ., 2008; Cao et al ., 1994)

(s.c., sous-cutané ; i.m., intra-musculaire ; i.p., intra-péritonéal)

6. Nutrition en cancérologie

6.1. Détection de la dénutrition en cancérologie

Pour détecter une perturbation nutritionnelle chez un patient cancéreux le plus tôt possible, il est recommandé de faire une évaluation de la prise nutritionnelle, des variations pondérales, et de l'indice de masse corporelle (IMC) au moment du diagnostic, et ceci à chaque évolution clinique de la maladie (Muscaritoli et al., 2021). Concernant les patients dont le dépistage est incertain ou anormal, une évaluation de l'apport nutritionnel, des symptômes d'impact de la nutrition, de la masse musculaire, des performances physiques (des études ont aussi montré le lien entre perte de fonction physique et survie face au cancer (Arends et al., 2017) et du degré de l'inflammation systémique que présente le patient est recommandée (Muscaritoli et al., 2021)). Il est essentiel d'avoir une approche multimodale. En effet, certains paramètres regardés d'une manière isolée pourraient ne pas refléter la gravité de la situation (par exemple, l'IMC seul est peu sensible à la détection des changements de l'état nutritionnel, en particulier chez les patients obèses) (Thompson et al., 2017). L'imagerie est également une méthode importante car elle va fournir des informations sur la composition corporelle en détectant la perte de masse musculaire ainsi que l'infiltration de graisse intra-musculaire (Méthode originale développée par l'équipe du professeur BARACOS (Prado et al., 2009 ; Fearon et al., 2011)).

6.2. Supports nutritionnels chez le patient cancéreux :

La forme de support nutritionnel va dépendre de plusieurs facteurs : l'historique médical du patient, le type de cancer, sa progression, les réponses aux traitements et la capacité à pouvoir manger et avoir de l'appétit (Fearon *et al.*, 2011).

6.2.1. Nutrition orale

Il est recommandé de nourrir les patients de manière orale lorsqu'ils en sont capables, et qu'ils sont à risque de malnutrition, ou qu'ils en soient déjà atteints. Cette intervention comprend des conseils diététiques, le traitement des symptômes et des troubles altérant la prise alimentaire (symptômes d'impact de la nutrition) et l'offre de compléments nutritionnels oraux (Muscaritoli *et al.*, 2021). Le soutien nutritionnel oral peut donc se présenter sous deux formes : des aliments ordinaires ou enrichis sous forme de repas ou de collations, et des compléments nutritionnels oraux si le patient est à risque sur le plan nutritionnel (Muscaritoli *et al.*, 2021). Les études pour déterminer l'impact que pourrait avoir un régime plus faible en protéines ou en énergie, sont pour des raisons éthiques évidentes, impossibles. Au niveau de la recherche fondamentale, les effets des différents régimes ont été étudiés chez des modèles de rongeurs. Si la nutrition orale est inadéquate ou insuffisante, la nutrition artificielle doit être envisagée.

6.2.2. Nutrition artificielle

Si le patient ne peut plus se nourrir de manière orale, le recours à une nutrition médicale est nécessaire pour stabiliser son statut nutritionnel. Les critères pour la décision d'une mise en place de mesures nutritionnelles sont : (1) une prise alimentaire inadéquate (<50% des besoins) pendant plus de 10 jours en raison d'une chirurgie, d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie; (2) si la prise alimentaire est inférieure à 50% des besoins pendant plus d'une à deux semaines ; (3) s'il est prévu que les patients sous-alimentés ne soient pas en mesure de manger et d'absorber la quantité adéquate de nutriments pendant une longue période, en raison des traitements; (4) si la masse tumorale elle-même entrave la prise orale et la progression des aliments dans le tube digestif supérieur (Thompson et al., 2017; Arends et al., 2017). La décision entre l'utilisation de la nutrition entérale ou de la nutrition parentérale doit tenir compte du lieu de la tumeur, de l'étendue de la maladie, des complications, du plan de traitement, du pronostic, de l'état physique général du patient et de la durée du soutien nutritionnel prévu. Toutefois, la solution privilégiée lorsque c'est possible pour la nutrition artificielle est la nutrition entérale, préférée à la nutrition parentérale, en raison de son aspect plus physiologique (maintien de l'intégrité du tube digestif, diminution du risque de contamination et d'infections) (Muscaritoli et al., 2021). Comme pour la nutrition orale, les études chez l'Homme pour déterminer l'effet des régimes plus ou moins riches en protéines ou en énergie sont impossibles. Au niveau de la recherche fondamentale, les études menées sur le sujet ne sont pas récentes et datent des années 80-90 et ne permettent pas de répondre clairement à la question.

En 1979, Cameron *et al.*, ont réalisé une étude sur des rats cancéreux, où ils ont montré que malgré l'utilisation de la nutrition entérale (NE), comparé à un groupe sain nourri

oralement, il y avait une perte du poids corporel. La croissance tumorale, elle, n'était pas impactée par l'utilisation de la NE, de même que le bilan azoté (Cameron *et al.*, 1979). Cette étude avait mis en avant également le fait que l'utilisation d'un modèle avec une tumeur à croissance rapide pouvait être un point de non-retour et qu'une hyper-alimentation ne pourrait pas combler les besoins nutritionnels de la tumeur et de l'hôte, cela s'explique par le fait que la tumeur agit comme un « piège » à azote (Stein *et al.*, 1976).

Lors de l'utilisation d'une plus grande quantité de protéines, dans la nutrition entérale, la toxicité de la chimiothérapie est diminuée (Torosian *et al.*, 1990), en revanche ceci n'a aucun effet sur la croissance tumorale. Une étude datant de 1994 (Stallion *et al.*, 1994) constate que le contenu protéique musculaire (*gastrocnemius*) est augmenté chez des groupes de rats cancéreux sous nutrition entérale et sous nutrition parentérale comparés *vs*. un groupe sain.

De très nombreux travaux de la littérature ont exploré la capacité de la nutrition à préserver le statut nutritionnel (apports protéiques, glucidiques, lipidiques, en vitamines etc.). Dans notre travail, nous ne détaillerons que les stratégies visant à moduler l'apport azoté.

6.3. Énergie

« L'European Society for Clinical Nutrition and Metabolism » (ESPEN) recommande que la dépense énergétique totale pour les patients cancéreux soit la même que pour des sujets sains : 30 kcal/kg/jour (Muscaritoli *et al.*, 2021). Attention, ces valeurs peuvent varier en fonction des complications annexes que peuvent présenter les patients, comme ceux insulino-résistants, où il est recommandé d'augmenter le rapport entre l'énergie provenant des graisses et celle provenant des glucides, dans le but d'augmenter la densité énergétique du régime nutritionnel et diminuer la charge glycémique (Muscaritoli *et al.*, 2021).

6.4. Protéines

Un apport adéquat en protéines est à la base du maintien de la masse musculaire. A ce jour, il n'y a pas de définition ni de quantité optimale pour une protéine adéquate. Les experts de l'ESPEN recommandent 1g/kg/jour, avec si possible une augmentation jusqu'à 1,5 g/kg/jour. Cependant, cette approche purement quantitative est réductrice, et différents travaux ont approché l'aspect qualitatif que pourrait avoir un soutien nutritionnel.

28

6.5. Acides aminés

Des interventions avec des acides aminés ont été testées dans le cas du cancer, pour essayer d'optimiser l'état nutritionnel et de contrer la diminution de la masse musculaire. Elles comprennent une supplémentation en acides aminés ou en métabolites de ces acides aminés, qui vont avoir un rôle métaboliques spécifique au cours de la cachexie cancéreuse tels que les acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, isoleucine et valine), le β-hydroxy β-méthyl butyrate (HMB), la carnitine, la créatine ou encore la glutamine.

6.5.1. Acides aminés à chaîne ramifiée

Il a été montré que les patients atteints de cachexie présentent des niveaux d'acides aminés plasmatiques plus bas que le sujet sain (Beck et al., 1989; Cala et al., 2018; Der-Torossian et al., 2013; Pin et al., 2019). Les acides aminés à chaîne ramifiée composés de la valine, de l'isoleucine et de la leucine ont été mis en avant. Ils sont connus pour avoir un rôle majeur dans l'anabolisme musculaire lié à la prise alimentaire (Yoshizawa, 2004). Une supplémentation de ces acides aminés pourrait exercer un effet thérapeutique dans les maladies où il y a une fonte de la masse musculaire, telle que la cachexie cancéreuse. Pour cela ils atténuent la protéolyse et améliorent la synthèse des protéines par l'activation de la voie mTORC1 (Mammalian Target of Rapamycin, qui est impliquée dans la synthèse protéique, la prolifération, la croissance et la mobilité des cellules) et la modulation de l'état inflammatoire par la production de glutamine (dont on observe une carence dans le cadre de la cachexie cancéreuse) (de Campos-Ferraz et al., 2014). Dans des modèles animaux de cachexie, une diminution de leur niveau est observée (Pin et al., 2019; O'Connell et al., 2019), et une supplémentation en Leucine chez souris CD2F1 avec un adénocarcinome C-26 ou des rats Wistar recevant un adénocarcinome Walher 256 atténue la perte de masse musculaire comparés à des groupes tumoraux sans supplémentation (Gomes-Marcondes et al., 2003; Peters et al., 2011). Alors que ces études ont regardé l'effet de supplémentation pour maintenir le maintien du tissu musculaire, d'autres ont regardé si la privation en acides aminés à chaîne ramifiée aurait un impact sur la croissance tumorale, mais sans conclusion claire (Baracos et al., 2006). Chez l'homme des études ont également été menées avec comme effets une meilleur prise alimentaire et une augmentation de la synthèse protéique au niveau du corps entier, sans effets secondaires observés conduisant à l'hypothèse qu'ils peuvent améliorer le maintien protéique au niveau des muscles squelettiques (Cangiano *et al.*, 1996; Ventrucci *et al.*, 2007; Tayek *et al.*, 1986; Yamanaka *et al.*, 1990). Toutefois, ces études étaient sur des effectifs réduits et des expérimentions supplémentaires sont nécessaires pour attester des effets bénéfiques de la supplémentation en acides aminés à chaîne ramifiée chez les patients cancéreux cachectiques.

6.5.2. β-hydroxy β-methyl butyrate (HMB)

C'est un métabolite de la leucine, qui est impliqué dans le contrôle du renouvellement des protéines en minimisant leur dégradation (Nissen et al., 1997), c'est pourquoi il est étudié dans la cachexie cancéreuse. Les études menées sur l'utilisation du HMB sont peu nombreuses, et dans la totalité des cas, il est associé à de l'arginine et de la glutamine ce qui ne permet pas de conclure quant à son effet thérapeutique. Ces études montrent une diminution significative de la masse maigre dans l'une (May et al., 2002), alors que dans la deuxième cette diminution est non significative (Berk et al., 2008). Une étude incluant également la croissance tumorale (dans un modèle de rat Wistar avec un adénocarcinome Walker 256), a montré que parallèlement au maintien de la masse musculaire avec une supplémentation en HMB, cette dernière peut également limiter la croissance de la tumeur, en agissant sur la voie du facteur nucléaire kappa B (Nuclear factor kappa B (NF-kB) dont nous verrons la fonction dans une partie ultérieure) des cellules tumorales (Nunes et al., 2008). L'hypothèse émise pour expliquer les différences de résultats et de significativité serait l'avancée du cancer chez les patients présents dans l'étude, l'apport supplémentaire en glutamine du mélange serait plus efficace à un stade précoce de la cachexie plutôt qu'au stade réfractaire. En conclusion, aucune recommandation ne peut être faite quant à son intérêt.

6.5.3. Carnitine et créatine

La carnitine est présente en plus faible quantité chez les patients cancéreux, ceci est dû à une diminution de l'apport alimentaire, de son absorption et d'une augmentation de son excrétion urinaire (Ringseis *et al.*, 2013). En supplémentant des groupes de patients avec de la carnitine, il a été observé une augmentation de la qualité de vie par une diminution de la fatigue et une augmentation de la masse corporelle, comparés à ceux sans supplémentation (Kraft *et al.*, 2012; Gramignano *et al.*, 2006). Au niveau préclinique, l'effet de la supplémentation en carnitine a été un moyen de limiter la perte musculaire *via* une diminution de l'activité du protéasome et de l'activité d'*Atrogin-1* et *MURF-1* (dont nous verrons l'implication dans une partie suivante) au niveau du *gastrocnemius* (Busquets *et al.*, 2012; Busquets *et al.*, 2020).

La créatine a fait l'objet de recherches en cancérologie car son utilisation dans des maladies caractérisées par des conditions atrophiques, des perturbations métaboliques ou musculaires, améliore la masse et la fonction musculaire (l'augmentation du contenu en créatine et en phosphorylcréatine permet une augmentation de l'apport en énergie impactant la masse et la fonction musculaire)(Gualano *et al.*, 2010). Toutefois, il existe très peu d'études concernant son effet chez le patient cancéreux, certaines montrant un effet bénéfique sur la masse musculaire et d'autres non (Lønbro *et al.*, 2013; Jatoi *et al.*, 2017).

Les effets sur la croissance tumorale sont aussi divergents. Jusqu'à récemment, des études avaient montré qu'une supplémentation en créatine pouvait limiter la croissance tumorale dans des modèle précliniques de cachexie cancéreuse en invoquant plusieurs raisons. Premièrement, de manière in *vitro* et in *vivo,* il a été démontré qu'un analogue de la créatine, la cyclocréatine, est phosphorylée efficacement par la créatine kinase pour former la phosphocyclocréatine. La phosphocyclocréatine est structurellement similaire à la phosphocréatine, mais il est beaucoup plus difficile de la catalyser de manière inverse pour libérer de l'ATP en raison de ses propriétés cinétiques et thermodynamiques distinctes. Ainsi, la phosphocytocréatine pourrait agir potentiellement comme un « privatiseur » d'énergie en piégeant l'ATP transporté depuis les mitochondries intracellulaires ou de l'environnement extracellulaire vers le cytoplasme, in *vitro* et in *vivo* (Kristensen *et al.*, 1999; Lillie *et al.*, 1993). Deuxièmement la raison peut venir du rôle qu'a la créatine dans la régulation de l'inflammation, il a été montré que la créatine est essentielle au maintien de la réponse anti-tumorales des lymphocytes T-CD8+ (qui joue une rôle majeur dans l'élimination des cellules tumorales) (Chen *et al.*, 2021; Di Biase *et al.*, 2019).

Mais récemment, des études ont montré que la supplémentation en créatine pouvait avoir un effet favorisant la progression du cancer, en particulier en augmentant l'invasion et la progression des métastases dans des modèles de cancers du pancréas et colorectaux, qui se métastasent principalement au niveau du foie. Il a été démontré que la phosphocréatine capture l'ATP extracellulaire dans le microenvironnement du foie, alimentant la survie et la

31

croissance des cellules métastasiques qui s'adaptent à leur nouvel environnement dans ces deux types de cancers (Loo *et al.*, 2015; Papalazarou *et al.*, 2020).

6.5.4. Glutamine

La glutamine est un acide aminé non essentiel, mais qui peut être important dans un état pathologique comme le cancer par son implication comme carburant pour les entérocytes, comme substrat pour la gluconéogenèse et comme régulateur du turnover protéique (Millward et al., 1976). Des études cliniques ont montré qu'une supplémentation en glutamine n'avait aucun effet indésirable (Peterson et al., 2007), et qu'une supplémentation de 4 semaines en glutamine chez des patients subissant un traitement chirurgical au cours d'un cancer du cou et de la tête augmentait la masse maigre. Il convient de noter que ces résultats doivent être interprétés avec prudence car l'étude était de faible effectif et de courte durée (Cerchietti et al., 2006). Une étude chez l'animal utilisant un modèle de rat FISCHER recevant une tumeur du colon « Ward » (Ward colon tumor) ainsi qu'un traitement chimio-thérapeutique utilisant uniquement du CPT-11, a montré que la supplémentation en glutamine diminue les effets indésirables de la chimiothérapie au niveau intestinal, sans altérer l'efficacité du traitement. De plus, la supplémentation en glutamine n'a pas eu d'effet sur la croissance tumorale (Xue et al., 2008). Ce résultat sur la croissance tumorale diverge, avec notamment une étude in vivo où la supplémentation en glutamine a eu l'effet d'augmenter la croissance tumorale (Kang et al., 1994). En plus de l'aspect nutritionnel de la glutamine, des études se sont penchées sur son effet protecteur des effets indésirables des traitements (comme la chimiothérapie), tel que les phénomènes de mucite (qui est une cause importante de morbidité dans le traitement des patients cancéreux (Garcíade-Lorenzo et al., 2003)). La glutamine est une des sources principales d'énergie de l'épithélium intestinal, et des études précliniques ont montré qu'une supplémentation en glutamine protège l'intestin des effets secondaires de la chimiothérapie ou de la radiation (Gaurav et al., 2012) Il n'y a pas suffisamment de preuves pour soutenir l'utilisation générale de la glutamine chez les patients atteints d'un cancer.

6.5.5. Citrulline

Il est connu que la citrulline est un activateur de la synthèse protéique au niveau musculaire, notamment lorsque que l'on est dans une situation de fonte de la masse musculaire (Le Plénier *et al.*, 2017). Elle peut induire l'activité de la voie mTORC1, et donc pourrait également induire l'activation de cette voie au sein de la tumeur et ainsi augmenter la croissance tumorale (Lim *et al.*, 2015). Une étude de 2021, a étudié l'effet d'une supplémentation en citrulline dans le modèle de rat FISCHER recevant la tumeur « *Ward colon tumor* » avec un traitement de chimiothérapies comprenant le 5-FU ainsi que le CPT-11 (Breuillard *et al.*, 2021). Ils ont observé que l'apport supplémentaire en citrulline n'avait pas eu d'impact sur la croissance tumorale ou le statut nutritionnel.

6.5.6. Arginine

L'arginine est un acide aminé non essentiel, qui peut jouer un rôle important dans le développement et la progression du cancer. L'arginine et ses métabolites jouent un rôle important dans le développement des cellules T du système immunitaire. Des études ont montré que la perte d'arginine dans l'environnement de la tumeur entraine une dysplasie des lymphocytes T et une diminution de la réponse immunitaire envers les cellules tumorales (Rodriguez *et al.*, 2007; Yachimovich-Cohen *et al.*, 2010). Mais l'arginine *via* l'arginase-1 est convertie en ornithine, et cette dernière va donner des polyamines suite à une série de réactions cataboliques, qui vont jouer un rôle dans la croissance tumorale, l'invasion et le développement de métastases (Selvi *et al.*, 2019). Il a été montré que l'utilisation d'un régime limité en arginine pouvait réduire la synthèse de polyamine et ainsi limiter l'incidence dans un modèle de cancer colorectal (Du *et al.*, 2021).

Il a également été montré que l'arginine pouvait avoir un effet bénéfique, sur la chimiothérapie, dans un modèle cellulaire *in vitro* du cancer du sein, où l'utilisation combinée d'arginine et de 5-FU améliore l'efficacité du traitement sur les cellules tumorales (Jahani *et al.*, 2017).

6.5.7 Alpha-cétoglutarate d'ornithine

L'alpha-cétoglutarate d'ornithine (ACO, qui est un sel constitué d'une molécule d'alpha-cétoglutarate et de deux molécules d'ornithine) est efficace dans divers états cataboliques tels que les chirurgies, les brulures ou les septicémies (Cynober, 1999). Son utilisation dans un modèle préclinique cancéreux nourri par nutrition entérale a montré que cela pouvait améliorer le statut nutritionnel des animaux sans impacter la croissance tumorale (Le Bricon *et al.*, 1994), alors qu'une autre étude sur le même modèle mais nourrit de manière orale, n'a pas amélioré le statut nutritionnel des animaux (Segaud *et al.*, 2007).

Des soins nutritionnels optimaux sont donc très importants au traitement de la cachexie cancéreuse, et les effets des nutriments peuvent aller plus que loin que la fourniture d'énergie, en ciblant différents mécanismes ou voies métaboliques qui sont affectés ou modifiés par la cachexie. La compréhension du contrôle du métabolisme et de ses paramètres chez l'hôte porteur de tumeurs et recevant un traitement de chimiothérapie permet, non seulement d'améliorer les connaissances sur la régulation métabolique chez le patient, mais aussi de mettre au point des régimes de soutien nutritionnel améliorés et ciblés sur l'hôte. Des recherches plus systématiques utilisant divers modèles sont nécessaires à l'avenir pour délimiter l'action et les mécanismes d'action des acides aminés. Toutes ces données illustrent le fait qu'il y a besoin de justifications pour des régimes basés sur des maladies spécifiques, en particulier dans le cas du cancer, car une localisation différente, un métabolisme tumoral différents.

7. Métabolisme énergétique et Cachexie cancéreuse

7.1. Métabolisme glucidique

Chez le patient atteint d'un cancer, il est connu que le métabolisme des cellules cancéreuses nécessite un important besoin en glucose comme source d'énergie pour pouvoir proliférer (il est estimé que les cellules cancéreuses ont besoin de 4 à 5 fois plus de glucose que des cellules saines (Mathupala et al., 2001)). Ces cellules ont un métabolisme de glycolyse aérobie. Les cellules tumorales détournent la production d'énergie d'une phosphorylation oxydative, à une glycolyse cytosolique, forçant l'organisme à dépendre du glucose comme source d'énergie (Bezuidenhout et al., 2019). Contrairement aux cellules saines qui dépendent principalement de la phosphorylation oxydative mitochondriale pour produire l'énergie nécessaire au bon fonctionnement des cellules. Le glucose est utilisé comme source d'énergie pour le convertir en lactate plutôt qu'en eau et en CO₂ (Argilés et al., 2015). Ceci est l'effet « Warburg ». Les tumeurs génèrent donc un état énergétique inefficace, due à la mobilisation massive de glucose qui conduit à une grande production de Lactate (Argilés et al., 2015). Il faut donc un fort apport en glucose, et le lactate produit n'est pas métabolisable par la tumeur, il va donc être excrété en direction du foie et être métabolisé en glucose. Ce glucose produit au niveau hépatique va être capté par la tumeur et être transformé de nouveau en lactate et ainsi de suite. Ceci est le cycle de Cori (Argilés et al., 2015) (Figure 9). Le lactate produit va augmenter l'acidité locale, et améliorer ainsi la survie des cellules cancéreuses. La perte énergétique est encore aggravée par le fait que la conversion du glucose en lactate par la tumeur, génère beaucoup moins d'ATP (2 molécules d'ATP) que la quantité nécessaire pour produire du glucose à partir du lactate (6 molécules d'ATP). Énergétiquement ce n'est pas rentable pour une cellule saine, mais cela permet à la cellule cancéreuse d'assurer son propre approvisionnement en glucose. Chez les patients cancéreux, cette perte d'énergie est observée, non seulement au niveau tumoral, mais aussi au niveau musculaire et hépatique (Argilés et al., 2014). La tumeur a aussi besoin de la glycolyse pour pouvoir transformer les cellules tumorales « normales » en cellules tumorales « malignes » et pouvoir ainsi se répandre dans l'organisme (Lazo, 1985).



Figure 9. Cycle de Cori (adaptée de Argiles et al., 2014).

La tumeur est donc approvisionnée en glucose *via* le cycle de Cori et la néoglucogenèse. Un autre élément de la cachexie cancéreuse va perturber le métabolisme glucidique : le développement d'une résistance à l'insuline. Ainsi le glucose va être moins capté par les cellules insulino-dépendantes : le tissu adipeux ou le muscle squelettique, ce qui va entrainer une diminution de la synthèse des triglycérides pour le premier, du glycogène pour le deuxième et donc des apports protéiques. Les causes de développement de cette insulino-résistance ne seront pas abordées ici (Argilés *et al.*, 2014).

7.2. Métabolisme protéique

La cachexie cancéreuse est caractérisée par un bilan azoté négatif dû à la combinaison d'un métabolisme anormal et d'un apport alimentaire réduit (Fearon *et al.,* 2011).

La synthèse protéique et la protéolyse doivent être en équilibre pour assurer une préservation de la masse musculaire. Un bon équilibre permet un renouvellement des protéines au quotidien.

Les anomalies observées dans les muscles cachectiques peuvent venir soit de l'altération de la synthèse des protéines soit d'une augmentation leur protéolyse (Argilés *et al.*, 2014). Cela peut aussi venir de l'apoptose ou d'un dysfonctionnement de la régénération. Cet ensemble provoque une perte musculaire. Selon la littérature, le phénomène le plus impliqué dans le processus de perte musculaire est la dégradation des protéines *via* l'activation de la voie de l'ubiquitine-protéasome-ATP dépendante (Argilés *et al.*, 1996). Comprendre comment les muscles peuvent atteindre un état de protéolyse ou d'hypertrophie contribue non seulement

à la compréhension du développement musculaire mais peut également fournir des indices pour la conception des thérapies pour limiter cette perte des muscles squelettiques.

7.2.1. Métabolisme protéique au niveau musculaire

L'implication de la voie de l'ubiguitine-protéasome-ATP dépendante conduisant à des phénomènes de protéolyse est induite par l'action des cytokines pro-inflammatoires et procachectiques qui sont produites par le système immunitaire et la tumeur (tel que le TNF-alpha et l'interleukine-1 (IL-1), ou encore par des facteurs tumoraux tels que le facteur induisant la protéolyse (PIF)). Ceci va agir de deux manières, via la voie de l'AMPK P38 qui va conduire à l'apoptose, et via la voie du facteur nucléaire kB (NF-kB) qui en activant les facteurs de transcription « Forkhead » (FOXO) va induire l'expression des ligases E3 : MURF-1 et MAFBX (atrogin) qui sont impliquées dans la dégradation des protéines musculaires structurelles (Sandri et al., 2004). L'implication du phénomène de synthèse protéique va venir de la signalisation du facteur de croissance IGF1 (insulin-like growth factor 1) qui est le mécanisme le plus caractéristique pour induire l'hypertrophie. Il active la voie de signalisation du substrat 1 du récepteur à l'insuline (IRS1) qui agit sur la voie PI3K-AKT permettant la synthèse des protéines en permettant l'activation de mTOR. AKT va aussi avoir un impact sur la partie protéolyse en phosphorylant le facteur de transcription FOXO empêchant ainsi la protéolyse. Ainsi en situation de cancer, avec la baisse du taux d'insuline suite au développement d'une insulino-résistance (comme vu dans la partie sur les perturbations du métabolisme glucidique), l'activité de la voie PI3K-AKT-mTOR va être diminuée conduisant à la baisse de la synthèse protéique et à une diminution du blocage de FOXO entrainant une absence de régulation de la protéolyse qui va se combiner à l'augmentation des cytokines proinflammatoires, pro-cachectiques ou des facteurs tumoraux qui vont augmenter l'activité de l'apoptose et de la voie du facteur NF-kB conduisant également à une augmentation de la protéolyse.



Figure 10. Principaux mécanismes responsables de la fonte musculaire en situation de cancer.

La voie mTOR est impliquée dans d'autres processus biologiques telles que la tumorogenèse (Guertin *et al.,* 2007; Laplante *et al.,* 2012). Il a été observé dans cette voie, chez des modèles animaux, qu'une utilisation d'un régime hypo-protéique entraine une diminution de l'activation de la voie mTOR (Fontana *et al.,* 2013).

7.2.2. Implication de la voie PI3K/AKT/mTOR au niveau tumoral

Fontana *et al.*, (2013), ont testé des régimes hypo-protéiques iso-caloriques mais hyper-glucidiques (un mix de protéines « 21% » avec 21% de protéines, 20% de lipides et 59% de glucides, et un mix de protéines « 7% » avec 7% de protéines, 20% de lipides et 73% de glucides) dans deux modèles xénographes différents de tumeurs chez la souris : le modèle « LuCaP 23.1 » qui est un modèle du cancer de la prostate, et le modèle « WHIM16 » qui est un modèle du cancer du sein. Ils ont observé la diminution de la croissance tumorale (avec une réduction de 70% des protéines entre le régime hypo-protéique et le régime contrôle).

Ils observent une diminution de la concentration d'IGF1 qui inhibe l'activité de la voie mTOR conduisant à une plus faible activité des formes phosphorylées de mTOR et de P70S6K, conduisant à une réduction de la prolifération cellulaire.

Ils ont également amené une nouvelle donnée : ce phénomène est observé lorsque le régime est mis en place 4 semaines avant l'injection de la tumeur ou alors 4 semaines après son implantation. En revanche lorsque le régime est mis en place 4 mois après l'implantation de la tumeur, il n'y a aucun effet sur la croissance tumorale. Pour ces trois expérimentations, le poids corporel n'est pas affecté (Fontana *et al.*, 2013). De ce fait, ce travail n'est guère transposable chez l'Homme.

Rubio *et al.*, ont également montré, dans trois modèles de souris différentes, que l'utilisation d'un régime plus faible en protéines (25% de protéines en moins que le contrôle) mais isocalorique et iso-glucidique, entraine une diminution de la croissance tumorale (Rubio *et al.*, 2018). Ils ont apporté des précisions sur la condition probable de la diminution de la croissance tumorale en utilisant un régime plus faible en protéines : la présence de macrophages dans l'environnement de la tumeur. En effet, ils ont observé une augmentation de la réponse des cellules T-CD8+ dans les animaux sous régimes hypo-protéiques, qui dépendent de l'expression de l'interféron γ (IFN- γ) (la déplétion des cellules CD8+ ou l'atténuation de l'expression de IFN- γ annule l'effet réducteur du régime hypo-protéique sur la tumeur). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène, mais ne seront pas abordées dans cette étude (Green, 2018).

7.3. Métabolisme lipidique

Dans toutes les cellules vivantes, les lipides sont nécessaires pour le maintien de la structure et la signalisation cellulaire, ainsi que la fourniture d'énergie. Les acides gras sont produits à partir de précurseurs d'acétyl-coenzyme A et de malonyl-coenzyme A, par des lipases lors de la dégradation des glycérolipides ou par les phospholipases lors de la dégradation des glycérolipides. La dégradation des acides gras par la β-oxydation conduit à la production d'acétyl-CoA qui sera oxydé par le cycle de Krebs, et à la production de NADH et FADH₂ qui lors de la phosphorylation oxydative transfèrent leurs électrons à la chaîne respiratoire. Ceci conduit à la libération d'énergie (*via* l'ATP) et génère des espèces réactives de l'oxygène (Pethő *et al.*, 2012; Rosca *et al.*, 2012).

39

Il existe deux types principaux d'adipocytes : les blancs et les bruns. Les blancs permettent le stockage des lipides, et les bruns assurent la régulation de la thermogénèse. Cela permet la production de chaleur et la régulation du métabolisme glucidique et lipidique (Cypess *et al.*, 2009). Le tissu adipeux brun est un organe vital dans le contrôle de la composition corporelle par la régulation de l'homéostasie énergétique. Les effets thermogéniques du tissu adipeux brun suggèrent une augmentation de la dépense énergétique au repos et la mobilisation de lipides (Da Fonseca *et al.*, 2020).

Le tissu adipeux blanc peut contribuer aussi aux perturbations énergétiques, car une perte de ce tissu accompagne souvent la perte du muscle squelettique. La fonte de ce tissu adipeux blanc peut résulter de 3 mécanismes distincts :

1) La lipogenèse dans le tissu adipeux est réduite. Le stockage des triglycérides se fait par l'action de la lipoprotéine-lipase (LPL), responsable du clivage des tri-acylglycérols en glycérols et en acide gras, qui sont ensuite captés par les adipocytes et stockés pour fournir de l'énergie. La tumeur, par la libération de cytokines pro-inflammatoires, provoquerait une diminution de l'activité de ces LPL (Noguchi *et al.*, 1991).

2) Une augmentation de la lipolyse a été constatée chez des patients cancéreux (Ryden *et al.,* 2008) et pourrait venir d'une augmentation de l'activité de la lipase hormono-sensible qui catalyse l'hydrolyse des triglycérides. L'inflammation pourrait également avoir un impact sur la lipolyse.

3) L'augmentation de lipolyse et la diminution des LPL conduisent à une augmentation de la concentration en acides gras et participeraient au développement de l'insulino-résistance observée chez les patients cancéreux (Ryden *et al*, 2008).

Chez le patient cancéreux, un phénomène a été décrit impliquant les deux types d'adipocytes : une transformation des adipocytes blancs en adipocytes bruns (Petruzzelli *et al.*, 2014). Les cellules adipeuses blanches acquièrent une partie des mécanismes moléculaires qui caractérisent les cellules adipeuses brunes. Il s'agit d'un "brunissement", la protéine de découplage 1 (UCP1 *pour uncoupling protein 1*) est exprimée et favorise le découplage et, par conséquent, la production de chaleur et l'inefficacité énergétique. Cette conversion cellulaire peut être déclenchée à la fois par des médiateurs inflammatoires humoraux, comme

40

l'interleukine-6 (IL-6), et par des composés dérivés de tumeurs impliquant une augmentation de la densité mitochondriale ainsi qu'un découplage (Argilés *et al.*, 2015). Chez les rongeurs et d'autres animaux, cette mutation joue un rôle important dans la balance énergétique et la thermogénèse. Des études chez l'homme suggèrent qu'elle pourrait avoir un rôle similaire et pourrait ainsi participer au dérèglement énergétique présent chez les patients cancéreux cachectiques (Virtanen, 2014). Ce changement de tissu adipeux entraîne une dérivation des électrons présents dans la chaîne mitochondriale (grâce à UCP1), délaissant la synthèse d'ATP en faveur de la thermogénèse, ce qui a pour effet d'augmenter l'utilisation de lipides ainsi que la dépense d'énergie (Argilés *et al.*, 2014).

Le remodelage métabolique est donc une caractéristique clé du cancer (Martínez-Reyes et al., 2021). Les recherches au cours de la dernière décennie ont permis de mieux comprendre le métabolisme au cours du cancer, et ainsi élargir sa compréhension au-delà des observations initiales (c'est à dire l'effet Warburg), en comprenant l'utilisation des divers nutriments (comme le glucose, les acides aminés ou encore les lipides). Ces altérations anormales du métabolisme des nutriments entraînent une prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses et modulent le microenvironnement tumoral, facilitant ainsi d'autres comportements des cellules tumorales malignes, tels que l'invasion cancéreuse et les métastases (Martínez-Reyes et al., 2021). Par conséquent, les interventions métaboliques, en particulier la gestion de la disponibilité des nutriments, deviennent plus attrayantes pour le traitement du cancer. De plus, l'ensemble de ces perturbations métaboliques au niveau lipidique, glucidique et protéique entraîne un gaspillage énergétique, nécessitant donc plus d'énergie pour subvenir aux besoins (par exemple, au niveau du foie pour la néoglucogenèse et le cycle de Corie, ou bien alors au niveau musculaire avec la protéolyse réalisée en grande partie par l'ubiquitine-protéasome-ATP dépendante). Les muscles et le foie, qui sont de base de gros consommateurs d'énergie, vont donc voir leurs besoins en ATP accrus.

7.4. Métabolisme Mitochondrial

Les mitochondries sont des éléments essentiels pour les stabilités bioénergétiques et biosynthétiques nécessaires au bon fonctionnement des cellules et à la santé du corps humain. Comme vu dans les parties précédentes, certains mécanismes développés lors de la cachexie cancéreuse consomment de l'ATP, impliquant le métabolisme mitochondrial dans le phénomène de cachexie cancéreuse.

7.4.1. Métabolisme mitochondrial hépatique

Le foie est l'un des organes du corps humain qui consomme le plus d'énergie et est hautement métabolique (Rolfe *et al.*, 1997). Il pourrait être impliqué dans l'augmentation de la dépense énergétique chez les patients cachectiques. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication possible du foie dans ce dérèglement métabolique. Chez les patients cancéreux atteints d'un cancer colorectal, le poids du foie et la dépense énergétique au repos sont augmentés (Lieffers *et al.*, 2009). Au niveau de la recherche fondamentale, plusieurs études ont montré chez des modèles de rats cancéreux cachectiques une perturbation du métabolisme énergétique au niveau hépatique (Perumal *et al.*, 2005; Hochwald *et al.*, 1996; Tsuburaya *et al.*, 1995)

En 2010, Dumas et al., ont étudié le métabolisme mitochondrial dans un modèle de cachexie cancéreuse, utilisant des rats males BDIX (Berlin-Druckrey IX), avec une injection de cellules cancéreuses du côlon en intra-péritonéal. Ils ont observé que l'efficacité de la phosphorylation oxydative est diminuée, avec une augmentation de la consommation de l'oxygène liée à la perte énergétique dans les mitochondries hépatiques (Dumas et al., 2011), traduisant une diminution du rendement de la synthèse d'ATP. Cela suggère que les mitochondries hépatiques ont besoin de plus de nutriments pour parvenir à maintenir un taux d'ATP suffisant, et qu'en plus de la prise alimentaire réduite à cause du phénomène d'anorexie, cela participe à l'aggravation de la perte de poids dans les modèles cachectiques. Dans cette étude, on retrouve également une augmentation de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) (Dumas et al., 2011). Cela a été retrouvé dans une autre étude de cachexie cancéreuse utilisant des rats mâles Wistar avec une tumeur yoshida AH 130 injectée en intra-péritonéal (Springer et al., 2012). Les ROS sont connus pour être à la base de nombreux troubles pathologiques (tel que les ischémies, les maladies neurodégénératives, le diabète ou encore certains cancers) (Dröge, 2002). Plus récemment en 2019, une équipe a étudié l'effet du cancer et de la chimiothérapie dans un modèle de souris avec un adénocarcinome C26 associé à un traitement impliquant le 5-FU, le CPT-11 et la leucovorine.

Cette dernière est un adjuvant qui protège les cellules saines des effets de la chimiothérapie, en améliorant le taux de régression de la tumeur, avec une amélioration de la survie, de la qualité de vie, le tout avec une toxicité modérée (Saltz *et al.*, 2000). Les trois traitements sont couramment utilisés en trio dans les cas des cancers colorectaux (Kulig *et al.*, 2007). Cette étude a la particularité d'explorer à la fois l'effet cancer, puis l'effet chimiothérapie et les deux associés. Ils ont observé une augmentation des ROS dans le foie, dans les groupes « chimiothérapie seule » et « associée au cancer » (Pin *et al.*, 2019).

7.4.2. Métabolisme mitochondrial musculaire

Des études ont montré qu'une augmentation de la biogénèse des mitochondries au niveau du muscle ne permet pas de limiter ou d'inverser la fonte musculaire dans un modèle de souris. En revanche cette biogénèse a un effet sur l'augmentation de la taille de la tumeur (Wang *et al.*, 2012). Au cours de la fonte musculaire, les conséquences mises en avant sont entre autre : les anomalies mitochondriales (morphologie et fonctions altérées, diminution de la synthèse d'ATP et découplage) (Argilés et *al.*, 2015). Concernant les capacités oxydatives ou la synthèse d'ATP au niveau musculaire, les résultats divergent selon les études et les modèles d'animaux utilisés. Julienne *et al.* (Julienne *et al.* 2012) ont montré une diminution de la capacité oxydative du complexe IV, sans aucune altération de la synthèse d'ATP. D'autres équipes ont montré une altération de la synthèse d'ATP avec une augmentation du découplage mitochondrial (Constantinou *et al.*, 2011; Tzika *et al.*, 2013). La chimiothérapie seule peut également affecter le métabolisme mitochondrial musculaire au niveau du contenu mitochondrial et de la production d'espèces réactives de l'oxygène (Davis *et al.*, 2019).

Dans l'ensemble, malgré la disparité des résultats et des différentes études, il semblerait que la cachexie cancéreuse induirait une diminution de la production de la synthèse d'ATP, en lien avec une modification des différents complexes de la chaîne respiratoire. Mais la grande majorité de ces études a exploré ces aspects dans des modèles uniquement cancéreux, sans prendre en compte le facteur du traitement présent chez les patients en situation clinique : la chimiothérapie.

43

BUT DE L'ÉTUDE

Nous proposons de mieux comprendre les modulations croisées des fonctions énergétiques, de l'homéostasie nutritionnelle, des fonctions immunitaires et de la croissance tumorale au cours de l'apparition et du développement du phénomène de cachexie cancéreuse.

La grande majorité des études *in vivo* faites sur ces sujets utilisent des modèles de cancers uniquement, sans chimiothérapies ou autres traitements. L'originalité de notre approche est d'utiliser un modèle plus représentatif de ce qui est observé en situation clinique en nous servant d'un modèle préclinique de cancer associé à la chimiothérapie. Par ailleurs, ce modèle (validé par l'équipe du professeur V.E BARACOS) est plutôt réaliste en terme de dénutrition car celle-ci reste dans des proportions comparables à ce qui est observé chez l'Homme.

Ainsi nous explorerons dans un premier temps (publication numéro 1) l'influence du niveau des apports protéiques administrés oralement, et les effets sur la relation croissance tumorale/statut nutritionnel ainsi que la manière dont ils affectent la réponse du système immunitaire (qui est extrêmement dépendant du statut nutritionnel).

Dans une deuxième partie (publication numéro 2), les perturbations du métabolisme énergétique au cours de la cachexie cancéreuse seront étudiées. Il a été montré que plusieurs paramètres peuvent participer à ce gaspillage énergétique (au niveau hépatique, musculaire ou du tissu adipeux) et voir les implications séparées du cancer seul et de la chimiothérapie seule, ainsi que l'effet des deux combinés. Dans un premier temps au niveau *in vivo* pour voir les modifications au niveau du corps entier, puis *in vitro* pour explorer les mécanismes cellulaires qui peuvent être impliqués.

Enfin, lors de la mise en place du modèle, nous avons clairement observé qu'il est extrêmement difficile d'avoir une stratégie nutritionnelle efficace car l'anorexie (causée par l'administration de la chimiothérapie) ne permet pas d'atteindre des cibles calorico-azotées efficaces. Aussi nous complèterons dans une troisième partie (publication numéro 3) ce modèle par la mise en place d'une nutrition artificielle (comme c'est le cas en pratique clinique), et étudierons ainsi l'influence d'une prise en charge nutritionnelle efficace sur les altérations métaboliques et nutritionnelles observées.

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

PUBLICATION N°1

Étude numéro 1

L'apport protéique dans le cancer améliore-t-il l'état nutritionnel ou modifie-t-il la réponse tumorale à la chimiothérapie ?

Martin BOUTIERE, Cécile COTTET-ROUSSEL, Céline COPPARD, Karine COUTURIER, Morgane COUCHET, Christelle CORNE, Christophe MOINARD et Charlotte BREUILLARD.

Introduction : L'utilisation des protéines chez le patient atteint d'un cancer fait encore l'objet de débats en raison de l'ambivalence des résultats que pourraient amener leur utilisation. D'une part, un régime pauvre en protéines pourrait réduire la taille de la tumeur sans tenir compte de la cachexie, et d'autre part, un apport élevé en protéines pourrait préserver la masse corporelle mais en risquant de favoriser la croissance tumorale. De telles études n'étant pas réalisables chez l'Homme, il convient de disposer de données expérimentales robustes. Il existe peu de données au niveau de la recherche fondamentale, et la grande majorité des études réalisées sur le sujet sont faites dans des modèles uniquement cancéreux, sans chimiothérapies ou autres formes de traitement.

But de l'étude : Cette étude évalue l'influence de différents apports en protéines sur la cachexie, la croissance tumorale et le système immunitaire, en utilisant un modèle réaliste de cachexie combinant la tumeur et la chimiothérapie. Ceci afin de pouvoir optimiser la compréhension de l'effet de l'apport en protéines chez les patients cancéreux sous chimiothérapie.

Méthodes : Soixante-dix-huit animaux ont été randomisés en 6 groupes différents : un groupe contrôle (Ct) avec des animaux sains absolus et un régime standard contenant 16% de protéines, et 5 groupes recevant l'implantation d'une tumeur (« *Ward colon tumor* ») et un traitement de chimiothérapies, avec 5 régimes protéiques différents (mais tous iso-caloriques), « *low-protein* 8% » (LP8%), « *low-protein* 12% »(LP12%), « *normo-protein* 16% » (NP16%), « *high-protein* 24% » (HP24%) et « *high-protein* 32% » (HP32%). La chimiothérapie comprenait 2 cycles, à une semaine d'intervalle, chacun consistant en une injection de CPT-11 (50 mg/kg) et de 5-fluorouracile (50 mg/kg) le jour suivant. La prise alimentaire, le poids,

la taille de la tumeur ont été mesurés quotidiennement. A l'euthanasie, les organes ont été pesés, la composition corporelle a été déterminée, la teneur en protéines a été mesurée sur le muscle, le foie, l'intestin (jéjunum et iléon) et la tumeur, comme la synthèse protéique qui a été évaluée par la méthode Sunset. La fonction immunitaire a été explorée par cytométrie de flux.

Résultats : Tout d'abord le modèle a bien été validé, avec une anorexie observée et un état de cachexie qui conduit à une diminution du poids à la fois de la masse maigre (Ct = 172 ± 3 g vs NP16% = 151 ± 2 g ; p<0,001), et de la masse grasse (Ct = $13,6 \pm 0,7$ g vs NP16% = $6,0 \pm 0,4$ g ; p<0,001) en présence de cancer et de chimiothérapie. Cependant, les différents régimes n'ont pas influencé cette perte de poids. Le contenu protéique du jéjunum a été modifié par le cancer et la chimiothérapie (Ct = $15,0 \pm 1,5$ g vs NP16% = $11,6 \pm 0,9$ g ; p=0,04) et sa synthèse protéique a eu tendance à être diminuée par le cancer et la chimiothérapie (Ct = $0,61 \pm 0,22$ g vs NP16% = $0,31 \pm 0,18$ g ; p= 0,07 pour le jéjunum). De façon surprenante, l'apport en protéines n'a eu aucun effet sur les paramètres musculaires ou tumoraux (poids, contenu protéique ou synthèse protéique). Le système immunitaire a été affecté par le cancer et la chimiothérapie (notamment une baisse des monocytes (p=0.001) et des cellules dendritiques (p=0.017)), mais pas par les différents apports en protéines.

Conclusion : Nous avons montré dans notre modèle de cancer + chimiothérapie que la modulation des apports en protéines n'influence pas la croissance tumorale (que ce soit de manière positive ou négative). De plus, nos données suggèrent qu'un régime riche en protéines n'est pas en mesure d'améliorer l'état nutritionnel ce résultat suggère que l'important n'est pas l'aspect qualitatif (pourcentage de protéines) mais l'aspect qualitatif (profil des acides aminés apportés par l'alimentation). Une limite a été mise en évidence, l'anorexie observée au moment des deux cycles de chimiothérapies entraine une diminution des apports protéiques escomptés. Pour pallier à ce problème, la mise en place d'une nutrition artificielle comme il est observé chez les patients, pourra être mis en place dans une étude future.

Protein intake in cancer: does it improve nutritional status and/or modify tumour response to chemotherapy?

Martin Boutière¹, Cécile Cottet-Rousselle¹, Céline Coppard², Karine Couturier¹, Morgane Couchet¹, Christelle Corne³, Christophe Moinard¹, Charlotte Breuillard¹

¹Université Grenoble Alpes, Inserm, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics (LBFA), 38000 Grenoble, France

²Université Grenoble Alpes, Inserm, CNRS, Institute for Advanced Biosciences (IAB), 38000 Grenoble, France.

³Université Grenoble Alpes, Laboratory of Metabolic Diseases, Institute of Biology, Grenoble Alpes Hospital, 38000 Grenoble, France.

Corresponding author: Dr Charlotte Breuillard Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U 1055 2280 rue de la piscine 38000 Grenoble charlotte.breuillard@univ-grenoble-alpes.fr

Financial disclosure: This work was supported by grants from the SFNCM (Société Francophone de Nutrition Clinique et Métabolique) and the 'Fonds pour les maladies chroniques'.

Abstract

Background: The use of proteins in cancer is still debated due to their multiple effects. A lowprotein diet could reduce tumour size but without addressing cachexia, whereas high protein intake could preserve lean body mass but may promote tumour growth. Here we used a realistic rodent model of cancer and chemotherapy to evaluate the influence of different protein intakes on cachexia, tumour growth and immune system response and gain a firmer understanding of the effect of protein intakes in cancer patients undergoing chemotherapy.

Methods: Female Fischer 344 rats (n=78) were divided into 6 groups: 5 groups with cancer (Ward colon tumour) and chemotherapy (n=14 per group) were fed isocaloric diets containing different quantities of protein (8%, 12%, 16%, 24% and 32% of protein), and one healthy control group without cancer or chemotherapy (n=8) was fed a 'normal-protein' (16% protein) diet. Chemotherapy included two cycles, one week apart, each consisting of an injection of CPT-11 (50 mg/kg) then 5-fluorouracil (50 mg/kg) the day after. Food intake, body weight, and tumour size were measured daily. On day 9, the rats were euthanized and organs were weighed, body composition was determined and protein content and protein synthesis (SUnSET method) were measured in the muscle, liver, intestine (jejunum and ileum), and tumour. Immune function was explored by flow cytometry.

Results: Cancer and chemotherapy led to a decrease in body weight linked to decreases in both fat mass (-56 \pm 3%, p<0.05) and fat-free mass (-8 \pm 1%, p<0.05). Cancer and chemotherapy modified protein content in the jejunum (p=0.04) and tended to modify intestinal-level protein synthesis (p= 0.07 for jejunum; p = 0.08 for ileum). Surprisingly, there was no effect of protein intake on muscle or tumour parameters (weight, protein content, or protein synthesis). The immune system was impacted by cancer and chemotherapy but not by the different levels of protein intake.

Conclusions: Using a realistic model of cancer and chemotherapy, we demonstrated for the first time that protein intake does not modulate tumour growth (positively or negatively). Moreover, our data suggest that a high-protein diet is unable to improve nutritional status in cancer associated to chemotherapy. Although this work cannot be evaluated clinically for

ethical reasons, it nevertheless brings an essential contribution to nutrition management for cancer patients.

Data produced in this model of tumour-bearing rats receiving chemotherapy and different protein diets was unable to establish any influence of protein intake on tumour growth, immune-system response or nutritional status. This work must now be duplicated in other cancer models (with treatments) as a step towards order proposing realistic recommendations based on experimental data mirroring the conditions of real-world clinical nutrition management.

Keywords: Cancer, Chemotherapy, Protein diet, Tumour, Cachexia, Malnutrition

Abbreviations

5-FU: 5-Fluorouracil AAs: Amino acids AU: Arbitrary Unit BCA: Bicinchoninic acid BW: Body weight C+C rats: Cancer + Chemotherapy rats CPT-11: Irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin) Ctrl: Control EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid EGTA: Ethylene glycol-bis(ß-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetra acetic acid. FBS: Foetal bovine serum HP24%: High-protein group fed a 24% protein diet HP32%: High-protein group fed a 32% protein diet LP8%: Hypo-protein group fed an 8% protein diet LP12%: Hypo-protein group fed a 12% protein diet mTOR: Mammalian target of rapamycin NaCl: Sodium chloride NaOH: Sodium hydroxide NP16%: Normal-protein group fed a 16% protein diet PBS: Phosphate-buffered saline **RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium** SDS: Sodium dodecyl sulphate SEM: Standard error of the mean Tris-HCI: Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrogen chloride

URCC: Centralized cytotoxic drug reconstitution unit

Introduction

The prevalence of malnutrition among people with cancer is about 20% to more than 70% depending on patient age, cancer type and cancer stage. Malnutrition in cancer leads to weight loss and then to decreased tolerance to chemotherapy, forcing oncologists to reduce chemotherapy dose and thus chemotherapy efficacy (Arends *et al.*, 2017a; Argilés *et al.*, 2014; Arends *et al.*, 2017b; Arends *et al.*, 2021; Prado *et al.*, 2020; Prado *et al.*, 2011; Peixoto da Silva *et al.*, 2020). It is a stark fact that 10–20% of mortality in cancer patients is due to malnutrition rather than malignancy itself (Arends *et al.*, 2017a; Argilés *et al.*, 2014). Combating malnutrition and cachexia is therefore a core challenge in oncology, as underlined by experts from the ESPEN (European Society for Clinical Nutrition and Metabolism) and the ESMO (European Society for Medical Oncology) (Arends *et al.*, 2017a; Arends *et al.*, 2017b; Arends *et al.*, 2021).

Both ESPEN and ESMO recommend appropriate nutritional support in cancer. However, nutrition in oncology is a complex challenge, because it is important to feed the patient without feeding the tumour (even though the ESPEN expert group rules out this possibility) (Arends *et al.*, 2017b; Prado *et al.*, 2020). In clinical practice, many clinicians dare not take the risk of supplementing patients for fear of feeding the tumour, and therefore only do so for patients given surgery.

It is particularly complex concerning dietary proteins. Indeed, even if experts agree that relevant data is scarce and that further studies are needed, they recommend increasing protein intake from 0.8g/kg/d for healthy people to 1.2–1.5 g/kg/d in cancer patients (Arends *et al.*, 2017a; Arends *et al.*, 2017b; Arends *et al.*, 2021; Prado *et al.*, 2020; van de Worp *et al.*, 2020). There is effectively a strong rationale to increase patient muscle mass by using protein which activate *mTORC1* (mammalian target of rapamycin complex 1) and thus increase muscle protein synthesis (MPS). Furthermore, a high-protein diet could activate the immune system to help fight against tumour cells (Li *et al.*, 2007). However, the counterargument is that dietary proteins could also induce protein synthesis in the tumour and thereby promote tumour growth.

Conversely, a low-protein diet would limit tumour growth by increasing tumour immunosurveillance (Fontana *et al.*, 2013; Rubio-Patiño *et al.*, 2018), but decreased protein intake in patients with cancer can have harmful consequences by worsening the state of

54

undernutrition and cachexia. Investigation is therefore needed to unravel this complex paradigm.

To date, to the best of our knowledge, the role of protein intake level in both muscle wasting and tumour growth has never been evaluated in a realistic research model involving cancer and chemotherapy. Here, to address this gap, we evaluated the influence of different protein diets on muscle wasting, tumour growth and immune system response in a tumour-bearing rat model under chemotherapy. The objective of this work was to gain a firm understanding of the effect of protein intake in oncology and determine the optimal dose of protein that would reduce cancer cachexia to a minimum while minimizing tumour growth. This work has important implications for improving the management and effectiveness of treatment for cancer.

Material and Methods

Animals

All the procedures were registered as compliant with European Directives on animal care and use for research purposes (APAFIS#11492-2017112715178992), approved by the institutional animal care and use committee affiliated to the animal facility of the Grenoble Alpes University (B3842110001), and endorsed by the French Ministry of Research (9998_LBFA-U1055).

Seventy-eight female Fischer 344 rats (10–12 weeks old, 130–160 g) were housed for the 8day acclimatization period at six per cage in a temperature-controlled facility ($22 \pm 2^{\circ}$ C) on a 12h light/dark cycle. Water and food were available *ad libitum*.

Experimental design

Relative body weight, relative food intake and relative tumour volume for each animal were compared against the baseline (Day 0 value).

Tumour

After an 8-day acclimatization period (*Figure* 1), 70 "*cancer* + *chemotherapy rats*" rats (*C+C rats*) were injected with Ward colon tumour. Pieces of non-necrotic tumour (0.1 g) were subcutaneously transplanted onto the flank of the animals to serve for tumour growth monitoring (Cao *et al.*, 1994; Cao *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2009; Breuillard *et*

al., 2021). As tumour growth is heterogeneous, each C+C rat group used 14 rats. Tumour volume was measured every day in three dimensions with a calliper to determine length (L, cm), width (W, cm) and height (H, cm). Tumour volume was then calculated using the formula: 0.5xLxWxH cm³.

Diets

One week after tumour injection (*Figure* 1), the rats were housed in individual cages in order to follow food intake. The rats received a standard semi-purified diet (AIN93G -15.9% protein, 7.4% lipids, 61.7% carbohydrates; SAFE, Augy, France), called "normal-protein diet", *ad libitum* (*Table* 1). Body weight and food intake were monitored daily.

After 12 days of tumour growth, when the tumours had reached approximatively 1 cm³, the C+C rats were divided into 5 groups according to body weight and tumour size, to ensure that the 5 groups had a roughly similar average for these parameters at this point in the study. Each group then received one of 5 iso-caloric diets stratified into 5 different protein contents (*Table* 1). The healthy control group ("Ctrl", n=8) and the first C+C group ("NP16%", n=14) received the normal-protein diet, which contained 16% protein. The second and third groups received a 'low-protein' diet with either 8% protein ("LP8%", n=14), i.e. 50% of the protein content of the normal-protein diet, or 12% protein ("LP12%", n=14), i.e. 75% of the protein diet, or 32% protein ("HP24%", n=14), i.e. 200% of the protein content of the normal-protein diet. All the diets were offered *ad libitum*.

Chemotherapy

The chemotherapy cycles were started at D0, i.e. 14 days after tumour implantation and two days after receiving the different diets (*Figure* 1). The tumour was treated with a combination of the irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin; CPT-11) and 5 fluorouracil (5-FU) solutions (Centralized Cytotoxic Drug Reconstitution Unit (URCC), Michalon University Hospital, Grenoble, France)). One cycle of chemotherapy corresponds to an intraperitoneal injection of CPT-11 (50mg/kg; Medac S.A.S, Lyon, France) at D0 and D7, followed the day after by an intraperitoneal injection of 5-FU (50mg/kg; Accord Healthcare, Lille, France) (D1 and D8) (Cao *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2009; Breuillard *et al.*, 2021). At 15

minutes before each injection of CPT-11, the rats received an injection of atropine (1mg/kg; Aguettan, Lyon, France) to prevent and relieve early cholinergic symptoms.

Euthanasia and sample collection

At D9, after a fast of 3 hours and a puromycin injection 30 minutes before the euthanasia in order to measure protein synthesis, rats were euthanized by decapitation.

Blood was collected in tube of lithium heparin, centrifuged (2000g for 15 min at 4°C), and plasma was aliquoted: a part was frozen in liquid nitrogen and stored at -80° C until analysis and a part was treated (see below) and then stored at -80° C until amino acids measurements. The pellets were directly used for immune exploration (see below).

Thymus, kidney (left), heart, pancreas, adrenal gland (left), muscles (*EDL -Extensor Digitorum Longus*- and *Soleus*; right and left), urogenital, retroperitoneal, subcutaneous and brown adipose tissue were removed and weighed. The proximal part of the jejunum, of the ileum and the colon were scraped and mucosa were collected and weighed. Only mucosa of jejunum and of ileum were frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis. *Tibialis* (right and left) and the liver were weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further analysis. The entire weight of the dissected tumour was recorded, and 3 samples of the tissue were taken of the tissue at the tumour margin, avoiding any necrotic central portion: 2 were frozen in liquid nitrogen for biochemical analysis. The spleen was weighed and collected in RPMI1640 containing 1% antibiotics for immune analysis.

Body composition was determined as follows: fat-free mass was the summed weights of the heart, kidney, pancreas, adrenal gland, liver, spleen, thymus, muscles, viscera, skin, head and carcass; fat mass was the weight of urogenital, retroperitoneal and subcutaneous adipose tissue.

Plasma amino acids

At euthanasia, plasma (see above) was deproteinized with 10% (w/v) sulfosalicylic acid and centrifuged (10600 g for 10 min at 4°C). Amino acid concentrations were measured by UPLC-MS (Acquity UPLC H-Class QDa, Waters) using a CORTECS UPLC C18 column after a derivatization step (AccQTag Ultra®kit, Waters).

Immune analysis

After centrifugation, the pellet was diluted with PBS and 200 µl was collected to be labelled with antibodies as described below. The organs (spleen, Peyer's patches and tumour) were crushed using a syringe plunger, or chopped with scissors and filtered through a sieve. The cell suspensions obtained were washed with complete RPMI1640 medium containing 10% FBS and 1% antibiotics (except the spleen cells which were washed in complete RPMI1640 medium without FBS) then centrifuged at 600 g for 5 minutes at 4°C). The pellets, including for spleen cells, were suspended with 5 mL of complete medium. A 200 µL subsample was collected, diluted with 300 μ L of PBS, and centrifuged at 600 g for 5 minutes at 4°C. The pellets were incubated in 100 µL of 1X Viobility fixable dye (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) for 20 min at room temperature in darkness. After dilution with 400 µL of PBS, the cell suspensions were centrifuged. The pellets were incubated in the mix of antibodies freshly prepared in PBS-10%FBS for 20 min at 4°C in darkness (including samples for isotypes control and Fluorescence Minus One (FMO)) (CD25-BV421, CD3-BV605 and CD161-BV786 from BD Biosciences; CD45R-VioBright-FITC, CD11b/c-PE and RT1B-PerCP-Vio700 from Miltenyi; CD4-PE-Cy7, CD8a-APC and CD45-APC-Cy7 from Biolegend). Cells were washed twice in PBS-10%FBS and then fixed in 1X FACS lysing buffer (BD Biosciences). After two washes in PBS, 250 µL aliquots of the samples were kept for 48h at 4°C in darkness before analysis in a FACS BD-LSRII flow cytometer (BD Biosciences, Le Pont-De-Claix, France) using BD FACSDiva 6.3.1 software for data acquisition and Diva software for analysis. The immune populations analyzed are described in supplementary data (Table S1).

Protein content

Frozen *tibialis*, liver, tumour, jejunal mucosa and ileal mucosa were homogenized in 10 volumes of ice-cold 10% trichloroacetic acid with 0.5 mmol/L EDTA. After delipidation with acetone, the pellets were solubilized in NaOH 1N (4 mL per 0.1 g) overnight at 37°C, and total protein content was determined using a BCA kit (Pierce[™] BCA Protein Assay Kit; ThermoScientific, Rockford, IL).

Protein expression

Protein extraction

Frozen *tibialis*, liver, tumour, jejunal mucosa and ileal mucosa were homogenized at 4°C in extraction buffer (Mammalian buffer [Merck KGaA, Darmstadt, Germany] with dithiothreitol 1 mM, protease inhibitor 1X, phosphatase inhibitor 1X, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) using a ball extractor (30 Hz for 2x1min at 4°C). After centrifugation (20800 g for 20 min at 4°C), the supernatant was collected and assayed using the BCA kit (ThermoScientific) to standardize the samples at 30 μ g of proteins per 10 μ L of solution by dilution with 3X Blue Loading Buffer (187.5 mM Tris-HCl (pH 6.8 at 25°C), 6% (w/v) SDS (sodium dodecyl sulphate), 30% glycerol, 0.03% (w/v) bromophenol blue) and 30X Reducing Agent (1.25 M dithiothreitol). The dilution was heated for 10 min at 95°C, centrifuged, and the supernatant was frozen.

Protein separation

Extracted proteins were loaded onto a SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (15%) and transferred onto a nitrocellulose membrane (AmershamTM Protran TM; GE Healthcare, Germany). Proteins were revealed by staining the membrane with Ponceau S dye (Sigma-Aldrich). After incubation in blocking buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 5% milk powder), the membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibody. Primary antibody was then removed and a 1 h incubation was done with horseradish peroxidase-conjugated mouse or rabbit secondary antibody (1:10000 dilution or 1:5000 dilution, respectively; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD). Immunoblots were visualized on an ImageQuant LAS4000 system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) using the ECL Select[™] Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare).

mTOR pathway activation

mTOR pathway activation was analyzed with the phosphorylated form of 4E-BP1 on serine 65 (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology, Ozyme, France). Results obtained were normalized by the total form of anti-4E-BP1 (1:1000 dilution; Cell Signaling Technology).

Protein synthesis

Protein synthesis was studied using the anti-puromycin antibody clone 12D10 (1:1000 dilution; Millipore, Temecula, CA) and normalized with Ponceau S data.
Proteolytic activity

Proteolytic activity was studied using anti-Atrogin-1 (1:1000 dilution) and anti-Murf-1 (1:1000 dilution) antibodies (Abcam, Cambridge, UK), and normalized with Ponceau S data.

Statistical analysis

Results are reported as means \pm SEM. A Student *t*-test was used to study the cancer + chemotherapy effect (between the Ctrl group and the NP16% group). ANOVA was used to test for effects of protein diets. Normality and homogeneity of the variance were checked prior to these tests to compare the different groups. If the normality test (Shapiro-Wilk) failed (at p<0.05), the Student *t*-test test was replaced by a Mann-Whitney test, and the ANOVA was replaced by Kruskal-Wallis one-way analysis. Differences were considered statistically significant at a p-value < 0.05.

Results

Mortality

No animals died during the study in any of the groups.

Nutritional status

Body weight

At D0, animal weight was the same in all 6 groups (*Table* 2). The weight of the rats of the five C+C groups decreased between D0 and D2, then increased between D2 and D7 and decreased again between D7 and D9 to fall to 91%–94% of initial body weight (*Figure* 2A).

The difference in body weight between Ctrl-group rats and NP16%-group rats was significant from D1 to D9, and there was no protein load-related difference.

Food intake

Food intake decreased drastically in all 5 C+C groups at D1 then increased progressively until D5 to reach the same level as the control group in all the C+C groups except the HP24% group which had higher food intake than controls (*Figure* 2B). All the C+C groups showed a second substantial decrease after the second cycle of chemotherapy (i.e. D8).

From D0 to D9, food intakes were similar in all C+C groups, as illustrated by cumulative food intake, and lower than the Ctrl group (i.e. 70%) (*Figure* 2C).

Protein intake

Due to individual variations in overall food intake, protein intake varied from 0.4 ± 0.2 to 5.6 ± 0.3 g/kg/d in LP8%-group rats, from 1.0 ± 0.3 to 7.4 ± 0.3 g/kg/d in LP12%-group rats, from 1.6 ± 0.4 to 9.6 ± 0.5 g/kg/d in NP16%-group rats, from 2.6 ± 0.7 to 14.1 ± 0.7 g/kg/d in HP24%-group rats, and from 4.2 ± 1.3 to 17.5 ± 1.0 g/kg/d in HP32%-group rats (*Figure* 2D). Protein intake the Ctrl-group rats varied from 8.0 ± 0.6 to 9.3 ± 0.4 g/kg/d.

Measures of cumulated protein intake at D9 (*Figure* 2E) showed that low-protein-diet rats and normal-protein-diet rats ingested less protein than Ctrl-group rats. HP24%-group rats ingested the same amount of protein as Ctrl-group rats, and HP32%-group rats ingested a higher amount of protein than Ctrl-group rats.

Anthropometric data

C+C rats showed decreased fat-free mass (-8 \pm 1%, p<0.05) and decreased fat mass (-56 \pm 3%, p<0.05) (*Table* 2). Concerning organ weights, only the liver, thymus and heart were lower in the NP16%-group rats compared to Ctrl-group rats.

The only significant differences between the 5 C+C groups were for kidney, liver and subcutaneous adipose tissue weights and total fat mass.

Tissue protein content

There were no significant differences in tissue protein content whatever the tissue and group considered (*Table* 3).

Protein synthesis

Protein synthesis in the post-absorptive state was not different between Ctrl-group and NP16%-group rats for muscle, liver and intestine (*Table* 3). There was no diet effect in these organs. As further confirmation, the mTOR activation pathway (the main activator of protein synthesis) in muscle was not significantly different between Ctrl-group and NP16%-group rats, nor between the 5 C+C groups (*Table* 3).

Muscle proteolysis

Atrogin-1 and MURF-1 expression were not different between Ctrl-group and NP16%-group rats, nor between the 5 C+C groups (*Table* 3).

Plasma amino acids levels

Plasma arginine, asparagine, citrulline, isoleucine, leucine, methionine, proline, threonine and valine concentrations were lower in C+C groups compared to Ctrl rats, whereas plasma cystine and glycine concentrations were higher in C+C groups compared to Ctrl rats.

Plasma glutamine, glycine, serine and threonine decreased with increased protein load. Conversely, valine increased with increased protein load.

Tumour response to chemotherapy

Tumour volume and weight

At D0, the 5 C+C groups had a similar mean tumour volume (*Data not shown*). Tumour size then decreased in each group between D0 and D2 and between D7 and D8, i.e. during the two

chemotherapy cycles (*Figure* 3). There was no difference in tumour size between the 5 C+C groups.

Daily evolution of tumour growth as a function of cumulative protein intake showed no specific trend at any time (*Data not shown*).

Tumour mass was the same in the different groups (Table 5).

Tumour protein content and synthesis

These parameters did not change in response to protein loads (*Table* 5).

Immune system

Immune cell population was modified by C+C, with higher CD4+/CD45+ and CD45R+ RTB1/CD45+ populations in blood and lower CD3+ CD11+/CD45+ and CD3+ CD11+ RTB1+/CD45+ populations in spleen compared to Ctrl group (Supplementary data, Figure S1). C+C had no effect on immune cell populations in the Peyer's patches (Supplementary data, Figure S1).

There was no effect of protein diets on immune-system responses whatever the immune cell population or organ studied (Supplementary data, Figure S1).

Discussion

The role of protein intake during cancer has been a subject of debate for. It is well known that a high protein intake increases muscle mass in healthy people, but data on the effects in patients with cancer are too sparse to draw firm conclusions (Prado et al., 2020). Furthermore, the effects of modulated protein intake on tumour growth are unknown. From a conceptual standpoint, an increase of protein intake would promote tumour growth, as cancerous cells are cells with a high turnover and thus high amino acid (AA) requirements. However, immune cells also have high AA requirements and they are the first line of defence against tumour growth. Thus, the final outcome can only be speculated. Many papers have shown that a small amount of protein could reduce tumour growth by decreasing mTOR pathway activation (Fontana et al., 2013) or by decreasing the tumour immunosurveillance (Rubio-Patiño et al., 2018). However, all these papers have only limited value here, since the models used fail to include cancer treatment (chemotherapy, radiotherapy, etc). Moreover, the research needed is not possible in humans due to ethical reasons. To address this issue, we used realistic model of cancer and chemotherapy to evaluate the influence of protein load on tumour growth and cachexia. To the best of our knowledge, this is the first time that such study has been performed.

Very surprisingly, the amount of protein in the diet had no effect on nutritional status, even despite the very substantial difference between the lower and higher percentage of protein in the diet (from 8% to 32%). Unfortunately, it is difficult to compare our findings with clinical data, because i) in practice it is unethical to give a low-protein diet to cancer patients, and ii) there is only little data available on the effects on high-protein diets on muscle mass, and every time the high protein intakes were associated with higher energy intake, unlike our study where the diets were iso-caloric to specifically individualize the protein effect (for reviews see Capitão *et al.*, 2021; Mochamat *et al.*, 2017; Zanetti *et al.*, 2020). Several hypothesis can be advanced to explain the absence of effect of protein load on muscle mass found here. First, in the framework of this original work, it was essential for all the groups to be iso-energetic in order to individualize the effect of the protein load. However, in such conditions, the nitrogen–calorie ratio (*Table* 1) for HP32% and HP24% (i.e. 50.1 Kcal/g and 74.9 Kcal/g, respectively) was too low, as the recommended values are between 100 and 150 Kcal/g for optimal assimilation of the nitrogen intake (Arends *et al.*, 2017a). Therefore,

although we can conclude that the low-protein diets had no effect on nutritional status, we cannot give a definitive opinion on the high-protein diets. Further study with the use of high-protein and high-energy diets could resolve this issue. Second, protein intake *per se* cannot efficiently cover the specific AA requirements induced by cancer and chemotherapy. This is well illustrated by the AA profiles that were profoundly affected in C+C rats and not restored by the increase of protein intake, as discussed by van der Meij *et al* (van der Meij et al., 2019). Quality of the dietary protein, and thus of AAs, seems to be important for muscle anabolism in cancer patients (Ford *et al.*, 2022; Engelen *et al.*, 2016). One perspective for research would be to develop personalized nutritional support for cancer patients, as proposed by Berard *et al.* in a pioneering study on surgical patients (Berard *et al.*, 2002).

Despite the surprising lack of either positive or negative effect of low- or high-protein intakes on nutritional status, it was still important to test their potential effects on tumour size especially since expert-group guidelines on nutritional support for cancer patients stipulate that "*Theoretical arguments that nutrients 'feed the tumour' are not supported by evidence related to clinical outcome and should not be used to refuse, diminish, or stop feeding*" (Arends *et al.*, 2017b). However, this assertion does not appear to be based on any hard data but is mainly based on expert opinion (Prado *et al.*, 2020; Ford *et al.*, 2022). Moreover, this same group of experts recommends a protein intake of 1.2 to 1.5g/kg/day. However, there are very few studies on the role of dietary protein in tumour growth. Only 'the 'low protein side' was studied, and several studies have shown a direct positive effect of low-protein diet on tumour size (Fontana *et al.*, 2013; Rubio-Patiño *et al.*, 2018). This is why, in our opinion, it was important to manage the effects of high protein diet on tumour growth.

In our model, a low protein intake had no effect on tumour size, whereas the studies cited above found that a low-protein diet decreased tumour size (Fontana et al., 2013; Rubio-Patiño et al., 2018). However, in these studies, the animals received no treatment with any real clinical relevance. The protein effect observed in these studies, i.e. decreased tumour size with low protein intake, could be too weak compared to the effect of chemotherapy, which would explain why we found no effect of protein intake levels on tumour growth size.

As discussed above, given that the diets tested here were iso-caloric (to specifically individualize the protein effect), the nitrogen–calorie ratio in the high-protein diet groups could be too low to enable meaningful assimilation of nitrogen. Further studies using high-

protein and high-energy diets would help conclude on the effect of high-protein diet on cachexia and tumour growth. A second limitation is the chemotherapy-induced anorexia, which induces a low protein intake and thus leads to a situation where nutritional intakes fail to meet nutritional needs. Furthermore, the protein composition used here is also inadequate on a qualitative level, given the differences observed for the plasma AAs. Using artificial nutrition in order to normalize caloric and nutritional goals would be an instructive way forward to confirm our results.

Conclusion

This study demonstrated, for the first time, in this realistic model of tumour-bearing rats receiving chemotherapy and different protein diets, that protein intake was unable to influence nutritional status, tumour response to chemotherapy, or immune-system response. This work must now be duplicated in other cancer models (with treatments) as a step towards order proposing realistic recommendations based on experimental data mirroring the conditions of real-world clinical nutrition management.

References

Arends, J., Baracos, V., Bertz, H., Bozzetti, F., Calder, P. C., Deutz, N., Erickson, N., Laviano, A., Lisanti, M. P., Lobo, D. N., McMillan, D. C., Muscaritoli, M., Ockenga, J., Pirlich, M., Strasser, F., de van der Schueren, M., Van Gossum, A., Vaupel, P., & Weimann, A. (2017a). ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 36*(5), 1187–1196. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2017.06.017

Arends, J., Bachmann, P., Baracos, V., Barthelemy, N., Bertz, H., Bozzetti, F., Fearon, K., Hütterer, E., Isenring, E., Kaasa, S., Krznaric, Z., Laird, B., Larsson, M., Laviano, A., Mühlebach, S., Muscaritoli, M., Oldervoll, L., Ravasco, P., Solheim, T., Strasser, F., ... Preiser, J. C. (2017b). ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *36*(1), 11–48. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2016.07.015

Arends, J., Strasser, F., Gonella, S., Solheim, T. S., Madeddu, C., Ravasco, P., Buonaccorso, L., de van der Schueren, M., Baldwin, C., Chasen, M., Ripamonti, C. I., & ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org (2021). Cancer cachexia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines^{*}. *ESMO open*, *6*(3), 100092. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.esmoop.2021.100092

Argilés, J. M., Busquets, S., Stemmler, B., & López-Soriano, F. J. (2014). Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nature reviews. Cancer*, *14*(11), 754–762. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/nrc3829

Bérard, M. P., Pelletier, A., Ollivier, J. M., Gentil, B., & Cynober, L. (2002). Qualitative manipulation of amino acid supply during total parenteral nutrition in surgical patients. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, *26*(2), 136–143. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1177/0148607102026002136

Breuillard, C., Moinard, C., Goron, A., Neveux, N., De Reviers, A., Mazurak, V. C., Cynober, L., & Baracos, V. E. (2021). Dietary citrulline does not modify rat colon tumor response to chemotherapy, but failed to improve nutritional status. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 40(7), 4560–4568. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2021.05.035

Cao, S., Rustum, Y. M., & Spector, T. (1994). 5-Ethynyluracil (776C85): modulation of 5-fluorouracil efficacy and therapeutic index in rats bearing advanced colorectal carcinoma. *Cancer research*, *54*(6), 1507–1510.

Cao, S., & Rustum, Y. M. (2000). Synergistic antitumor activity of irinotecan in combination with 5-fluorouracil in rats bearing advanced colorectal cancer: role of drug sequence and dose. *Cancer research*, *60*(14), 3717–3721.

Capitão, C., Coutinho, D., Neves, P. M., Capelas, M. L., Pimenta, N. M., Santos, T., Mäkitie, A., & Ravasco, P. (2021). Protein intake and muscle mass maintenance in patients with cancer types with high prevalence of sarcopenia: a systematic review. *Supportive care in cancer :*

official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer, 10.1007/s00520-021-06633-8. Advance online publication. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s00520-021-06633-8

Engelen, M. P., van der Meij, B. S., & Deutz, N. E. (2016). Protein anabolic resistance in cancer: does it really exist?. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *19*(1), 39–47. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/MCO.00000000000236

Fontana, L., Adelaiye, R. M., Rastelli, A. L., Miles, K. M., Ciamporcero, E., Longo, V. D., Nguyen,H., Vessella, R., & Pili, R. (2013). Dietary protein restriction inhibits tumor growth in humanxenograftmodels.Oncotarget,4(12),2451–2461.https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.18632/oncotarget.1586

Ford, K. L., Arends, J., Atherton, P. J., Engelen, M., Gonçalves, T., Laviano, A., Lobo, D. N., Phillips, S. M., Ravasco, P., Deutz, N., & Prado, C. M. (2022). The importance of protein sources to support muscle anabolism in cancer: An expert group opinion. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 41(1), 192–201. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2021.11.032

Li, P., Yin, Y. L., Li, D., Kim, S. W., & Wu, G. (2007). Amino acids and immune function. *The British journal of nutrition*, *98*(2), 237–252. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1017/S000711450769936X

Mochamat, Cuhls, H., Marinova, M., Kaasa, S., Stieber, C., Conrad, R., Radbruch, L., & Mücke, M. (2017). A systematic review on the role of vitamins, minerals, proteins, and other supplements for the treatment of cachexia in cancer: a European Palliative Care Research Centre cachexia project. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 8*(1), 25–39. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcsm.12127

Peixoto da Silva, S., Santos, J., Costa E Silva, M. P., Gil da Costa, R. M., & Medeiros, R. (2020). Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. *Journal* of cachexia, sarcopenia and muscle, 11(3), 619–635. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcsm.12528

Prado, C. M., Antoun, S., Sawyer, M. B., & Baracos, V. E. (2011). Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *14*(3), 250–254. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/MCO.0b013e3283455d45

Prado, C. M., Purcell, S. A., & Laviano, A. (2020). Nutrition interventions to treat low muscle mass in cancer. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 11*(2), 366–380. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcsm.12525

Rubio-Patiño, C., Bossowski, J. P., De Donatis, G. M., Mondragón, L., Villa, E., Aira, L. E., Chiche, J., Mhaidly, R., Lebeaupin, C., Marchetti, S., Voutetakis, K., Chatziioannou, A., Castelli, F. A., Lamourette, P., Chu-Van, E., Fenaille, F., Avril, T., Passeron, T., Patterson, J. B., Verhoeyen, E., ... Ricci, J. E. (2018). Low-Protein Diet Induces IRE1α-Dependent Anticancer

Immunosurveillance. *Cell metabolism*, 27(4), 828–842.e7. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.cmet.2018.02.009

van de Worp, W., Schols, A., Theys, J., van Helvoort, A., & Langen, R. (2020). Nutritional Interventions in Cancer Cachexia: Evidence and Perspectives From Experimental Models. *Frontiers in nutrition*, *7*, 601329. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.3389/fnut.2020.601329

van der Meij, B. S., Teleni, L., Engelen, M., & Deutz, N. (2019). Amino acid kinetics and the response to nutrition in patients with cancer. *International journal of radiation biology*, *95*(4), 480–492. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1080/09553002.2018.1466209

Xue, H., Sawyer, M. B., Field, C. J., Dieleman, L. A., Murray, D., & Baracos, V. E. (2008). Bolus oral glutamine protects rats against CPT-11-induced diarrhea and differentially activates cytoprotective mechanisms in host intestine but not tumor. *The Journal of nutrition*, *138*(4), 740–746. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1093/jn/138.4.740

Xue, H., Le Roy, S., Sawyer, M. B., Field, C. J., Dieleman, L. A., & Baracos, V. E. (2009). Single and combined supplementation of glutamine and n-3 polyunsaturated fatty acids on host tolerance and tumour response to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin (CPT-11)/5-fluorouracil chemotherapy in rats bearing Ward colon tumour. *The British journal of nutrition*, *102*(3), 434–442. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1017/S0007114508199482

Zanetti, M., Gortan Cappellari, G., Barazzoni, R., & Sanson, G. (2020). The Impact of Protein Supplementation Targeted at Improving Muscle Mass on Strength in Cancer Patients: A Scoping Review. *Nutrients*, *12*(7), 2099. https://doiorg.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.3390/nu12072099



Figure 1. Experimental design

After a 1-week acclimatization period (D-14), 70 11-week-old female Fisher rats received tumour injection (C+C rats). One week later (D-7), all the animals (n=78) received the normal-protein diet. Then, after 13 days of tumour growth (D-2), the rats received either the normal-protein diet (NP16%, n=14) or a low-protein diet with 8% protein (LP8%, n=14), a low-protein diet with 12% protein (LP12%, n=14), a high-protein diet with 24% protein (HP24%, n=14) or a high-protein diet with 32% protein (HP32%, n=14). Two days later, the first chemotherapy cycle was initiated: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg; *orange arrow*) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg; *purple arrow*) at D1. One week later, the rats received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). The rats were sacrificed at D9 for analysis.



Figure 2. Relative body weight, relative food intake, and cumulative food intake of rats.

(A) Relative body weight and (B) relative food intake compared to the first day of chemotherapy for each animal, (C) cumulative food intake at D9, (D) protein intake (g of protein/kg rat BW/day), and (E) cumulative protein intake at D9. The rats received the chemotherapy cycle of irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0 and D7 (orange arrow) and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1 and D8 (purple arrow).

Results are expressed as mean ± SEM. Significant differences are reported as (A)(B) * CTRL vs LP8%, LP12%, NP16%, HP24%, HP32%, # CTRL vs HP24%; (C) unlike letters.



Figure 3. Relative tumour size

Relative tumour size compared to the first day of chemotherapy for each animal. The rats received a first chemotherapy cycle of irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg, orange arrow) at D0 and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg, purple arrow) at D1, and a second cycle of chemotherapy (CPT-11) at D7 and (5-FU) at D8). Results are expressed as mean ± SEM. Significant differences are reported as * LP8% *vs* NP16%.

Table 1. Composition of the diets.

One week after tumor injection, rats received the standard normo-protein diet which is a nutritionally complete semi-synthetic diet (AIN93G -15.9% proteins, 7.4% lipids, 61.7% carbohydrates; SAFE, Augy, France; NP16%). Two days before the start of the chemotherapy, C+C rats were divided into 5 groups, and received the associated diet (i.e. LP8%, LP12%, NP16%, HP24% or HP32%). Control rats received the NP16% diet only.

	LP8%	LP12%	NP16% normo protein diet	HP24%	HP32%
Pregelatinized cornstarch	491.0	444.3	397.5	301.9	207.4
Casein	88	134	180	274	367
Maltodextrin	142	142	142	142	142
Sucrose	110	110	110	110	110
Soya oil	70	70	70	70	70
Crude cellulose	50	50	50	50	50
Minerals PM AIN 93M/G 3.5%	35	35	35	35	35
Vitamins PV AIN 93 M/G 1%	10	10	10	10	10
L-cystin	1.5	2.2	3.0	4.6	6.1
Bitartrate choline	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Protein %	8.0	12.0	15.9	24.0	32.0
Fat %	7.3	7.3	7.4	7.5	7.6
Minerals %	2.5	2.6	2.7	2.8	3.0
Cellulose %	3.6	3.6	3.6	3.6	3.5
Starch %	56.3	52.1	47.9	39.3	30.8
Sugars %	13.8	13.8	13.8	13.8	13.9
ENA %	71.1	67.1	63.1	55.0	46.9
ATWATER Kcal/Kg	3821.4	3824.8	3828.4	3835.5	3842.6
ATWATER MJ/kg	16.0	16.0	16.0	16.1	16.1
Calorico Nitrogen Ratio (Kcal/g)	274	174	125	75	50

Table 2. Body and organ weights.

Tumor-bearing rats have received either the normo-protein diet (NP16%, n=14) or the low-protein diet with 8% protein diet (LP8%, n=14), or the low-protein diet with 12% protein diet (LP12%, n=14), or the high-protein diet with 24% protein diet (HP24%, n=14) or the high-protein diet with 32% protein diet (LP32%, n=14). Two days after, the first chemotherapy cycle was initiated: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, the rats received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). They were euthanized at D9. Data are presented as mean ± SEM. Significant differences are grey-backgrounded. For protein diets effect, values with different superscript letters are statistically different (p<0.05).

	Cancer a	nd Chemothera	py Effect					
	CTRL	NP16%		LP8%	LP12%	NP16%	HP24%	HP32%
Body Weight (g)								
Initial (DO)	166 ± 3	165 ± 2	NS	167 ± 2	166 ± 3	165 ± 2	166 ± 2	165 ± 2
Final (D9)	172 ± 3	151 ± 2	p < 0.001	151 ± 3	153 ± 3	151 ± 2	156 ± 3	153 ± 2
Fat-Free Mass								
Organs (<i>mg</i>)								
Heart	508 ± 11	477 ± 8	p = 0.0299	481 ± 6	486 ± 9	477 ± 8	499 ± 9	469 ± 7
Kidney	562 ± 10	546 ± 8	NS	521 ± 7 ª	536 ± 10 ^{a.b}	546 ± 8 ^{a.b.c}	569 ± 11 ^{b.c}	577 ± 10 ^{b.c}
Pancreas	460 ± 58	430 ± 30	NS	379 ± 29	431 ± 38	430 ± 30	402 ± 36	424 ± 33
Adrenal Gland	29 ± 1	29 ± 1	NS	29 ± 1	28 ± 1	29 ± 1	29 ± 1	30 ± 1
Liver (g)	6.1 ± 0.2	5.6 ± 0.1	p = 0.049	5.2 ± 0.1 ^a	5.6±0.2 ^{a.b}	$5.6 \pm 0.1^{a.b}$	5.9 ± 0.2 ^b	$5.7 \pm 0.1^{a.b}$
Spleen	523 ± 13	495 ± 11	NS	476 ± 14	470 ± 20	495 ± 11	500 ± 15	490 ± 15
Thymus	313 ± 68	85 ± 7	p < 0.001	77 ± 9	76 ± 12	85 ± 7	84 ± 9	80 ±8
Muscles (<i>mg</i>)								
EDL	74 ± 1	70 ± 1	NS	70 ± 1	73 ± 1	70 ± 1	73 ± 1	72 ± 1
Tibialis	296 ± 5	286 ± 5	NS	280 ± 4	289 ± 5	286 ± 5	293 ± 5	290 ± 4
Soleus	66 ± 1	67 ± 1	NS	64 ± 2	66 ± 2	67 ± 1	67 ± 1	65 ± 1
Total Fat-Free Mass (g)	147 ± 2	135 ± 2	p < 0.001	133 ± 2	135 ± 3	135 ± 2	138 ± 2	135 ± 2
Adipose Tissue (g)								
Urogenital	5.2 ± 0.4	2.4 ± 0.2	p < 0.001	2.7 ± 0.2	3.0 ± 0.2	2.4 ± 0.2	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.2
Retro	1.2 ± 0.1	0.5 ± 0.06	p < 0.001	0.6 ± 0.03	0.6 ± 0.05	0.5 ± 0.06	0.6 ± 0.05	0.6 ± 0.06

Subcutaneous	7.2 ± 0.4	3.1 ± 0.3	p < 0.001	3.7 ± 0.3 ^{a.b}	4.3 ± 0.3 ^a	3.1 ± 0.3 ^b	$4.0 \pm 0.3^{a.b}$	3.7 ± 0.2 ^{a.b}
Total Fat mass	13.6 ± 0.7	6.0 ± 0.4	p < 0.001	7.0 ± 0.5 ^{a.b}	7.9 ± 0.4^{a}	6.0 ± 0.4 ^b	7.3 \pm 0.4 ^{a.b}	7.1 ± 0.4 ^{a.b}
Brown (<i>mg</i>)	24 ± 1	14 ± 1	p < 0.001	14 ± 1	15 ± 1	14 ± 1	13 ± 1	13 ± 1
Bowel (<i>mg</i>)								
Jejunum Mucosa	281 ± 11	271 ± 20	p = NS	262 ± 17	249 ± 15	271 ± 20	237 ± 14	250 ± 12
lleum Mucosa	270 ± 19	249 ± 16	p = NS	251 ± 11	258 ± 17	249 ± 16	236 ± 18	232 ± 13
Colon Mucosa	128 ± 17	132 ± 7	p = NS	143 ± 7	133 ± 9	132 ± 7	129 ± 7	148 ± 12

Table 3 Protein metabolism.

Tumor-bearing rats have received either the normo-protein diet (NP16%, n=14) or the low-protein diet with 8% protein diet (LP8%, n=14), or the low-protein diet with 12% protein diet (LP12%, n=14), or the high-protein diet with 24% protein diet (HP24%, n=14) or the high-protein diet with 32% protein diet (LP32%, n=14). Two days after, the first chemotherapy cycle was initiated: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, the rats received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). They were euthanized at D9. Data are presented as mean ± SEM. Significant differences are grey-backgrounded. For protein diets effect, values with different superscript letters are statistically different (p<0.05).

	Cancer an	d Chemothera	oy effect	Protein Diets Effect						
	CTRL	NP16%		LP8%	LP12%	NP16%	HP24%	HP32%		
Liver										
Protein content (mg)	600 ± 66	557 ± 25	NS	500 ± 26	583±26	557 ± 25	597 ± 29	586±34		
Protein synthesis (AU)	0.36 ± 0.17	0.19 ± 0.11	NS	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.10	0.14 ± 0.06	0.13 ± 0.04		
Tibialis										
Protein content (mg)	58.7 ± 2.4	52.6 ± 3.9	NS	47.3 ± 2.7	50.9±3.6	52.6±3.9	51.9±3.8	52.1±3.6		
Protein synthesis (AU)	0.74 ± 0.13	0.71 ± 0.16	NS	0.68 ± 0.11	0.66 ± 0.16	0.71 ± 0.16	0.61 ± 0.10	0.64 ± 0.06		
<i>mTORC1</i> activation 4EBP1 phospho (AU)	0.21 ± 0.05	0.15 ± 0.04	NS	0.14 ± 0.05	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.03		
Proteolyis										
Fbx-32 <i>(AU)</i>	0.18 ± 0.04	0.18 ± 0.03	NS	0.18 ± 0.04	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.04		
Murf-1 <i>(AU)</i>	0.20 ± 0.09	0.20 ± 0.08	NS	0.20 ± 0.09	0.16 ± 0.05	0.20 ± 0.08	0.17 ± 0.05	0.19 ± 0.07		
Jejunum			_							
Protein content (mg.10cm ⁻¹)	15.0 ± 1.5	11.6 ± 0.9	p = 0.044	12.5 ± 0.9	12.0 ± 0.6	11.6 ± 0.9	11.3 ± 0.5	11.3 ± 0.9		
Protein synthesis (AU)	0.61 ± 0.22	0.31 ± 0.18	NS	0.27 ± 0.06	0.20 ± 0.18	0.31 ± 0.18	0.89 ± 0.06	0.28 ± 0.10		
lleon										
Protein content (mg.10cm ⁻¹)	17.5 ± 2.0	15.9 ± 1.9	NS	15.5 ± 0.9	15.6 ± 1.1	15.9 ± 1.9	14.1 ± 1.3	14.2 ± 0.9		
Protein synthesis (AU)	1.03 ± 0.40	0.99 ± 0.44	NS	1.09 ± 0.32	0.81 ± 0.44	0.99 ± 0.44	0.89 ± 0.31	1.31 ± 0.74		

Table 4. Plasma amino acids concentrations.

Tumor-bearing rats have received either the normo-protein diet (NP16%, n=14) or the low-protein diet with 8% protein diet (LP8%, n=14), or the low-protein diet with 12% protein diet (LP12%, n=14), or the high-protein diet with 24% protein diet (HP24%, n=14) or the high-protein diet with 32% protein diet (LP32%, n=14). Two days after, the first chemotherapy cycle was initiated: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, the rats received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). They were euthanized at D9. Only AAs with significantly differences are represented. Data are presented as mean ± SEM. For protein diets effect, values with different superscript letters are statistically different (p<0.05).

Concentration	entration Cancer and Chemotherapy Effect			Protein Diets Effect					
(µmol/L)	CTRL	NP16%		LP8%	LP12%	NP16%	HP24%	HP32%	
Arginine	146 ± 9	125 ± 5	p = 0.05	104 ± 5 ª	120 ± 3 ^{a.b}	125 ± 5 ^b	117 ± 5 ^{a.b}	115 ± 5 ^{a.b}	
Asparagine	70 ± 5	53 ± 3	p = 0.003	59±4	59±3	53 ± 3	57±3	57±3	
Citrulline	80 ± 4	41 ± 5	p = 0.0001	46 ± 5	42 ± 5	41±5	38±3	37±4	
Cystine	40 ± 3	47 ± 1	p = 0.02	42 ± 2 ^a	50 ± 1 ^b	47 ± 1 ^{a.b}	47 ± 2 ^{a.b}	46 ± 2 ^{a.b}	
Glutamic Acid	120 ± 8	99 ± 8	NS	111 ± 5 ª	100 ± 6 ^{a.b}	99 ± 8 ^{a.b}	92 ± 4 ^{a.b}	87 ± 5 ^{bd}	
Glutamine	894 ± 44	894 ± 28	NS	1001 ± 22 ª	959 ± 25 ^{a.b}	894 ± 28 ^{b.c}	888 ± 26 ^{b.c}	844 ± 20 ^c	
Glycine	141 ± 8	228 ± 12	p = 0.0001	250 ± 10 ^a	239 ± 11 ^{a.b}	228 ± 12 ^{a.b}	207 ± 8 ^{b.c}	188 ± 4 ^c	
Isoleucine	140 ± 11	105 ± 6	p = 0.005	113±6	102 ± 4	105 ± 6	108 ± 4	119±7	
Leucine	237 ± 18	193 ± 10	p = 0.03	200 ± 9	186 ± 9	193 ± 10	196 ± 8	214 ± 13	
Methionine	61 ± 4	53 ± 2	p = 0.0585	51±2	52±1	53 ± 2	53±1	52 ± 2	
Proline	350 ± 29	172 ± 16	p = 0.0001	159 ± 17	160±12	172 ± 16	164 ± 16	190 ± 21	
Serine	253 ± 13	276 ± 11	NS	321±16ª	338 ± 14 ª	276±11 ^b	252 ± 7 ^{b,c}	227 ± 6 ^c	
Threonine	499 ± 30	351 ± 31	p = 0.005	336 ± 23 ^{a.b}	433 ± 39 ^a	351 ± 31 ^{a.b}	335 ± 23 ^{a.b}	291 ± 14 ^b	
Valine	320 ± 24	240 ± 12	p = 0.003	234 ± 10 ^{a.b}	227 ± 9 ^a	240 ± 12 ^{a.b}	246 ± 10 ^{a.b}	279 ± 16 ^b	
Total	4856 ± 275	4273 ± 158	p =0.06	4327 ± 147	4443 ± 136	4273 ± 158	4097 ± 81	4047±146	

Table 5. Tumor-bearing rats have received either the normo protein diet (NP16%, n=14) or the low protein diet with 8% protein diet (LP8%, n=14), or the low protein diet with 12% protein diet (LP12%, n=14), or the high protein diet with 24% protein diet (HP24%, n=14) or the high protein diet with 32% protein diet (LP32%, n=14).

Two days after, the first chemotherapy cycle was initiated: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, the rats received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). They were euthanized at D9. Data are presented as mean ± SEM. Significant differences are grey-backgrounded. For protein diets effect, values with different superscript letters are statistically different (p<0.05).

		Pre	otein Diets Effe	ect	
Tumor	LP8%	LP12%	NP16%	HP24%	HP32%
Weight (g)	1.9 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.3	1.9 ± 0.4
Protein content					
mg	197 ± 36	136 ± 36	140 ± 28	167 ± 37	172 ± 35
mg.g⁻¹ tissue	118 ± 4	119 ± 2	112 ± 3	112 ± 2	116 ± 2
Protein synthesis					
AU	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.06	0.18 ± 0.05	0.10 ± 0.02



Supplementary data : Immune exploration in Blood

Number of events for total leukocytes and percentage of cells for other figures of immune cells identified in Blood (*table* S1). (a) CD45+ leukocytes cells; (b) CD4+ T-Cells; (c) CD8+ T-Cells ; (d) CD4+ T-Cells regulator ; (e) CD8+ T-Cells regulator; (f) CD3+ CD161+ Natural Killer T; (g)CD45R+RT1B+ B-Cells; (h) CD3+ CD11+ monocytes; (i)CD3+ CD11+ RT1B+ Dendritic Cells; (j)

CD3- CD161 + Natural Killer. Scatter plots represent mean ± SEM. * is significant different with p = 0.05.

(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) CTRL, n = 7; NP16%, n = 14; LP8%, n = 13; LP12%, n = 13; HP24%, n = 13; HP32%, n = 13.



Supplementary data : Immune exploration in Spleen

Number of events for total leukocytes and percentage of cells for other figures of immune cells identified in Spleen (*table* S1). (a) CD45+ leukocytes cells; (b) CD4+ T-Cells; (c) CD8+ T-Cells ; (d) CD4+ T-Cells regulator ; (e) CD8+ T-Cells regulator; (f) CD3+ CD161+ Natural Killer T; (g)CD45R+RT1B+ B-Cells; (h) CD3+ CD11+ monocytes; (i)CD3+ CD11+ RT1B+ Dendritic Cells; (j)

CD3- CD161 + Natural Killer. Scatter plots represent mean ± SEM. * is significant different with p = 0.05.

(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) CTRL, n = 7; NP16%, n = 14; LP8%, n = 13; LP12%, n = 13; HP24%, n = 13; HP32%, n = 13.



Supplementary data : Immune exploration in Peyer plates

Number of events for total leukocytes and percentage of cells for other figures of immune cells identified in Peyer Plates (*table* S1). (a) CD45+ leukocytes cells; (b) CD4+ T-Cells; (c) CD8+ T-Cells ; (d) CD4+ T-Cells regulator ; (e) CD8+ T-Cells regulator; (f) CD3+ CD161+ Natural Killer T; (g)CD45R+RT1B+ B-Cells; (h) CD3+ CD11+ monocytes; (i)CD3+ CD11+ RT1B+ Dendritic Cells; (j) CD3- CD161 + Natural Killer. Scatter plots represent mean \pm SEM. * is significant different with p = 0.05. (a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) CTRL, n = 7; NP16%, n = 14; LP8%, n = 13; LP12%, n = 13; HP24%, n = 13; HP32%, n = 13.



Supplementary data : Immune exploration in Tumor

Number of events for total leukocytes and percentage of immune cells identified in tumor *table* S1). (a) CD45+ leukocytes cells; (b) CD4+ T-Cells; (c) CD8+ T-Cells ; (d) CD4+ T-Cells regulator ; (e) CD8+ T-Cells regulator; (f) CD3+ CD161+ Natural Killer T; (g)CD45R+RT1B+ B-Cells; (h) CD3+ CD11+ monocytes; (i)CD3+ CD11+ RT1B+ Dendritic Cells; (j) CD3- CD161 + Natural Killer. Scatter plots represent mean \pm SEM. * is significant different with p = 0.05. (a)

(b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i) (j) NP16%, n = 10; LP8%, n = 12; LP12%, n = 10; HP24%, n = 7; HP32%, n = 12.

Table S1. Populations analyzed for immune exploration

	CD45	CD3	CD4	CD8	CD161	CD25	CD45R	CD11	RT1B
T-Cells	+	+	+	+		+			
B-Cells	+	-	-				+	-	+
NK Lymphocytes	+	-			+				
NKT Lymphocytes	+	+			+				
Monocytes and Dentritic Cells	+	-	+				-	+	-
Monocytes	+	+	-				-	+	-
Dendritic Cells	+	+	-				-	+	+

Table S2.	Correlation	between	cumulative	prot inta	ke and	l tumor	growth	as a fu	unction of
organ we	eight								

	Cumulative F	Protein Intake		Tun	nor Growth
Kidney	r = 0.518	p < 0.001			-
Liver	r = 0.317	p = 0.007			-
Tibialis	r = 0.246	p = 0.03			-
Spleen		-	r =	0.344	p = 0.003
Intestine length		-	r =	0.262	p = 0.02
Viscera		-	r =	0.506	p < 0.001

PUBLICATION N°2

Étude numéro 2

Le CPT-11 et le 5-FU induisent la cachexie *via* une altération du métabolisme mitochondrial au niveau hépatique.

Martin BOUTIERE, Frédéric LAMARCHE, Guillaume VIAL, Cécile COTTER-ROUSSELLE, Hervé DUBOUCHAUD, Béatrice MORIO, Stéphane ATTIA, Éric FONTAINE, Charlotte BREUILLARD et Christophe MOINARD.

Introduction : La cachexie cancéreuse est caractérisée par une perte de la masse musculaire, de la masse grasse et par des perturbations du métabolisme énergétique. Les mécanismes impliqués dans ces perturbations sont encore partiellement inconnus, et les études qui explorent à la fois l'implication du cancer et de la chimiothérapie (de manière séparée ou combinée) restent à ce jour peu nombreuses. De plus, peu d'études explorent de façon translationnelle les perturbations observées au niveau cellulaire et leurs conséquences au niveau du corps entier.

But de l'étude : L'objectif de cette étude est d'évaluer le lien et les mécanismes impliqués entre la cachexie cancéreuse et les perturbations du métabolisme énergétique dans un modèle in *vivo* de cancer et de chimiothérapie, puis, de préciser ces modifications métaboliques au niveau cellulaire *via* une étude sur hépatocytes primaires.

Méthodes : Des rats Fischer sont utilisés pour l'expérience in *vivo* et randomisés en 4 groupes, un groupe sain absolu (Ct), un groupe recevant une tumeur (« *Ward colon tumor* ») qui est injectée par la voie sous-cutanée (Ca), un groupe recevant deux cycles de chimiothérapies (Ch) et un groupe où la tumeur et la chimiothérapie sont combinées (Cc). Au cours de l'expérimentation, la dépense énergétique ainsi que le quotient respiratoire et la prise alimentaire sont mesurés. A l'euthanasie, le métabolisme mitochondrial est analysé aux niveaux musculaire et hépatique (consommation d'oxygène, efficacité de la phosphorylation oxydative ou productions d'espèces réactives de l'oxygène) ainsi qu'un marqueur de la ßoxydation. Pour l'analyse in *vitro*, les hépatocytes de rats sains sont isolés puis mis en culture en milieu normal (HeCt), avec du CPT-11 (HeCPT-11), du 5-FU (He5-FU) ou avec les deux combinés (HeCPT-11+5-FU). Les paramètres analysés sont l'environnement mitochondrial (production de ROS, structure), la synthèse protéique et la respiration allouée à la synthèse protéique, au renouvellement de l'ATP ou à la ß-oxydation, ainsi que les points de contact entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (MAM, étudiés *via* la méthode des PLAs, pour « *proximity ligation assays* »).

Résultats : Au niveau du corps entier, nous avons observé une anorexie et une chute de la balance énergétique en présence de chimiothérapie seule, ou associée au cancer (respectivement des baisses de 35% et 30% par rapport aux contrôles). Une fonte de la masse grasse a également été observée, en adéquation avec une augmentation de l'expression d'un marqueur de la ß-oxydation au niveau hépatique (Ct = 21 ± 1 vs Ch = 28 ± 3 ; p=0,001). Les fonctions mitochondriales modifiées se situent essentiellement au niveau hépatique dans notre modèle et non au niveau du muscle squelettique. L'effet direct de la chimiothérapie au niveau cellulaire a montré des altérations dans le statut énergétique avec des modifications mitochondriales au niveau de la morphologie et la production d'espèces réactives à l'oxygène. De plus les points de contact entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique ont été augmentés sous l'effet de la chimiothérapie (HeCt = 40 ± 4 vs He5-FU = 124 ± 21 ; HeCPT-11 = 104 ± 27 ; He5-FU+CPT-11 = $181 \pm 22^*$). * *est significativement différent de HeCt (p<0,05).*

Conclusion : Nous avons pu proposer un mécanisme d'action de la chimiothérapie pour expliquer les perturbations énergétiques. Les chimiothérapies augmentent les MAMs qui entrainent une augmentation de l'oxydation des lipides et de la ß-oxydation et, *in fine*, une perte drastique de la masse grasse.

CPT-11 and 5-FU induce cachexia by impairment of energy metabolism in hepatic mitochondria.

Martin Boutière¹, Frédéric Lamarche¹, Guillaume Vial², Cécile Cottet-Rousselle¹, Hervé Dubouchaud¹, Béatrice Morio³, Stéphane Attia¹, Eric Fontaine¹, Charlotte Breuillard¹, Christophe Moinard¹.

¹Université Grenoble Alpes, Inserm, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics (LBFA), 38000 Grenoble, France ²Université Grenoble Alpes, Inserm, Hypoxia PathoPhysiology (HP2), 38000 Grenoble, France ³Université Lyon1, Inserm, Inra, Carmen Laboratory, Lyon France

Corresponding author: Dr Charlotte Breuillard Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U 1055 2280 rue de la piscine 38000 Grenoble charlotte.breuillard@univ-grenoble-alpes.fr

Conflict of interest:

The authors who have taken part in this study declared that they do not have anything to disclose regarding funding or conflict of interest with respect to this manuscript.

Acknowledgments:

This work was supported by the "fondation pour les maladies chroniques".

Key words: mitochondria, hepatocyte, energy metabolism, ATP, Cancer Cachexia, ROS production, respiration.

Abstract

Background & Aims : Cancer Cachexia includes a range of energy disturbances. The mechanisms involved in these phenomena are still partially unknown. The aim of this study is to evaluate the link and the mechanisms involved between cancer cachexia and energy metabolism perturbations in an *in vivo* model of cancer and chemotherapy in a first step, and then to study these implications at the cellular level.

Methods : Female Fischer rat were used for in *vivo* experiment and randomized in four groups (n=6/group): one healthy group (Ct), one with the injection of a Ward colon tumor subcutaneously (Ca), one with two cycles of chemotherapy (Ch) and one group that combines tumor and chemotherapy (Cc). During the experiment, energy expenditure, respiratory quotient and energy intake were measured. At euthanasia, mitochondrial metabolism (efficiency of oxidative phosphorylation, energy wasting or the production of reactive oxygen species (ROS)) and marker of ß-oxidation are analyzed.

For *in vitro* analysis, hepatocytes were isolated from healthy female fisher rat and incubated in four conditions: in a normal culture medium (HeCt), with CPT-11 (HeCPT-11), with 5-FU (He5-FU) and with a combination of 5-FU + CPT-11 (He5-FU+CPT-11). Parameters analyzed are mitochondrial environment (production of ROS, morphology), protein synthesis and respiration allocated to protein synthesis, to ATP renewal or to ß-oxidation, and the interaction of endoplasmic reticulum with mitochondria.

Results : Chemotherapy is responsible of a crash of energy balance (Ch= -35% and Cc= -30% as report of Ct) at the whole body level, and the decrease of fat body mass and an elevation of ß-oxidation marker at hepatic level, and an alteration of mitochondria. The direct effect of chemotherapy at the cellular level showed a decrease of respiration allocated to protein synthesis when CPT-11 is in combination with 5-FU (HeCT: $31 \pm 7\%$; He5-FU: $22 \pm 3\%$; p=0.90; HeCPT-11: $17 \pm 4\%$, p=0.26; He5-FU+CPT-11: $13 \pm 3\%$; p=0.02) but surprisingly, protein synthesis is not affected by this chemotherapy. The mitochondria associated reticulum membranes showed an increase of the number of interaction with the combination of both chemotherapy (HeCt = 40 ± 4 vs He5-FU+CPT-11 = 181 ± 22 ; p<0,05).

91

Conclusion : In our model, chemotherapy is responsible of alteration of energy metabolism, with the decrease of fat body mass and modification in mitochondria metabolism at hepatic level. At cellular level, this modifications could be link with a change in the characteristics of mitochondria, and the interaction with their environment.

Abbreviations

5-FU: 5-Fluorouracil
AA: Antimycin A
ATP/O: Efficiency of phosphorylative oxidation
Ca: Cancer group
Cc: Cancer and chemotherapy group
Ch: Chemotherapy group
CPT-11: 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin Irinotecan
CS activity: citrate synthase activity
Ct: control group
EB: Energy balance
EE: Energy Expenditure
EGTA: ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
GM: Glutamate/malate
He5-FU: Hepatocyte incubated with 5-FU
He5-FU+CPT-11: Hepatocyte incubated with 5-FU and CPT-11
HeCPT-11: Hepatocyte incubated with CPT-11
HeCt: Hepatocyte control
MTG: mito tracker green
OC: octanoyl carnitin
PC: palmitoyl-carnitin
PLA: proximity ligation assay
ROS: Reactive oxygen species
Rot: Rotenone
RQ: respiratory quotient
SEM: standard error mean
ß-HAD activity : β-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity
Succ: Succinate
TMRM: Tetramethylrhodamine, methyl ester
VCO2: Carbon dioxide production
VLCAD: very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase
VO2: Volume of oxygen consumption

WAT: White Adipose Tissue

Introduction

Cancer cachexia affects approximately between 20 to 70% of cancer patients (Arends *et al.*, 2017). This symptom of cachexia, which is characterized by involuntary weight loss (Arends *et al.*, 2017), has numerous consequences on the quality of life and survival of patients and increases toxicity related to treatment (Martin *et al.*, 2015; Prado *et al.*, 2011). It is estimated that 10 to 20% of patients dying with cancer are due to this phenomenon (Arends *et al.*, 2017). Cachexia is often accompanied by decreased food intake and anorexia, and alterations in energy metabolism, and cannot be corrected by simple nutritional intake (Fearon *et al.*, 2011). Indeed, this resistance underlines much more specific alterations in metabolism, in particular energy metabolism. This, a few isolated studies have been able to characterize through a translational approach how these changes may alter the energy balance at the whole body level (Pin *et al.*, 2015; Dodson *et al.*, 2011; de Vos-Geelen *et al.*, 2014; Pin *et al.*, 2019; Dumas *et al.*, 2011).

Moreover, the number of studies investigating the implication of chemotherapy in this phenomenon has not been as numerous (Coletti, 2018). It has been shown that many chemotherapeutic agents can contribute to the development of cachexia, exploring the mechanisms by which these therapeutic agents can aggravate/accelerate this phenomenon, (Le Bricon *et al.*, 1995) or leading to cachexia (Barreto *et al.*, 2016; Barreto *et al.*, 2016, Mahli *et al.*, 2018).

Using a representative *in vivo* model of tumor-bearing rats receiving chemotherapy, we have investigated the energy and mitochondrial metabolism at whole body level and at the hepatic plus muscular level. Since only hepatic disturbances were observed, we studied the direct effect of Irinotecan (CPT-11) and 5-Fluorouracil (5-FU) on primary hepatocytes. The goal was to identify the mechanisms by which cancer and chemotherapy may influence the development and maintenance of cachexia and the energy disturbances associated with this state of cachexia.

95
Materials and methods

Animals

All the procedures are referenced with the number APAFIS#11492-2017112715178992, approved by the ethics committee affiliated to the animal facility of the university (B3842110001) and agreed by the French Ministry of Research (9998_LBFA-U1055). Female Fischer 344 rats (10 weeks old, 130-160 g) were housed, for the acclimatization period, six per cage in a temperature ($22 \pm 2^{\circ}$ C) and on a light 12 hours light/dark cycle controlled room; water and food (3430, SERLAB, Montataire, France) were available for *ad libitum* consumption. At the end of acclimatization period of seven days (at D-16), rats were separated in different groups.

Experiment 1

Study design

Twenty four rats were randomized in four groups (n=6/group): Control group (Ct), Cancer group (Ca), Chemotherapy group (Ch) and Cancer + Chemotherapy group (Cc) (Figure 1). Ct is composed by healthy rat fed at libitum. Ca group received the tumor implantation at D-7, Ch group had two cycles of chemotherapy without tumor, and the Cancer + chemotherapy group received the tumor implantation at D-14, and two cycles of chemotherapy two weeks later. The moment of implantation of the tumour was different between the Ca group (D-7) and Cc group (D-14), because without chemotherapy, the growth and volume of the tumour would be too large and would pose a risk to Ca rats (Figure 1).

D0 for each animal was considered the baseline value for body weight and tumor volume.

Tumour injection

Tumours were implanted as described (Breuillard *et al.*, 2021). Briefly, Ward colon tumor was injected subcutaneously on the flank of the rats. Tumor volume was measured every day, in three dimensions with a calliper, the length (L, cm), width (W, cm) and the height (H, cm) and calculated as described (Cao *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2007) for ethical reasons to ensure that the tumor does not exceed the limits set for the model.

Chemotherapy

Injections of chemotherapy were performed as described (Breuillard *et al.*, 2021). Briefly, chemotherapy included 2 cycles, one week apart, each consisting of one injection of Irinotecan (7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin; CPT-11; 50 mg/kg) at D0 and D7, and of 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1 and D8 (recovered from the Centralized Cytotoxic Reconstitution Unit (URCC) of Michalon University Hospital (Grenoble, France).

Energy Expenditure

Energy Expenditure (EE) was measured using an indirect circuit open calorimeter. Oxygen consumption (VO₂), carbon dioxide production (VCO₂) and respiratory quotient (RQ) were measured as described (Goron *et al.*, 2017), using a gas analyser (LE 405, Panlab-Bioseb), a gas pump and a flow meter (Panlab-Bioseb) and an acquisition program (Metabolism Software, version 2.0.2). EE was measured according the next formula: EE = $(3.815 + 1.232 \times VO2/VCO2) \times VO2 \times 1.44$ (kcal.day⁻¹.kg⁻¹) and RQ = VCO_2/VO_2 (%). Animals were placed in the cages 24 hours (D8) before the end of the protocol (D9) and measurements were recorded after 6 hours of acclimatization and for the next 18 hours.

Locomotor Activity

Locomotor activity was monitored through a video tracking system as described (Chabert *et al.*, 2016). Ct and Ca groups were placed under observation at D6, while Ch and Cc groups were on the second day of the first cycle of chemotherapy (D1).

Euthanasia and sample collection

At D9 (Figure 1), rats were euthanized by decapitation in post-absorptive state (3 hours). *Plantaris* and a part of the liver were weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for additional analysis. The rest of the liver and *quadriceps* were weighed and used directly for the preparation of isolated mitochondria.

Body composition was determined with the weight of fat body mass (Retroperitoneal, Urogenital, Subcutaneous), brown tissue was weighed separately, and lean body mass was determined (everything without the fat body mass).

Isolation of liver and muscle mitochondria

Liver and *quadriceps* of both legs were directly transferred into the cold buffer containing sucrose 250 mM, Tris base 20 mM, EGTA 1mM. Mitochondria were prepared according to Fontaine *et al.* (Fontaine *et al.*, 1998).

Mitochondrial parameters

Mitochondrial Density

Mitochondrial density in liver and *plantaris* were determined by measurement of citrate synthase (CS) activity as described (Goron *et al.*, 2017)

Oxygen consumption

Oxygen consumption was measured as described (Vial *et al.*, 2011). Briefly, we studied the respiration linked to complex 1 (in presence of Glutamate/malate (GM)) or complex 2 (Succinate(Succ)) (Concentration and quantity of substrates and inhibitors are summarized in table 1).

Mitochondrial oxygen-free radical production

Reactive Oxygen Species (ROS) production was estimated as described (Vial *et al.*, 2011). G/M and Succ were used as substrate (Concentration and quantity of substrates and inhibitors are summarized in table 2).

Mitochondrial Energy Wasting

Mitochondrial respiration was associated to fluorescence measurement of mitochondrial membrane potential changes in non-phosphorylating condition at 37°C. The conditions for experimentation were 0.25 mg protein.mL⁻¹ for liver mitochondria and 0.20 mg protein.mL⁻¹ for *quadriceps* mitochondria; same respiration buffer of respiration; Succ (5mM); Rotenone (1 μ M); Oligomycin (1 μ g/mL); fat free acid (0.15%); nigericin (5nM); rhodamine (50nM). Procedure was measured according to membrane potential as described in Nicholls et al., (2004).

Phosphorylating oxidation efficiency (ATP/O)

The efficiency with which oxide-reduction energy is converted into chemical energy in the form of ATP had been measured with an oxygraph "Hansatech Instrument" (Hansatech Instrument Ltd, Norfolk, United Kingdom). 0.25 mg protein.mL⁻¹ for liver mitochondria, 0.1 mg protein.mL⁻¹ for *quadriceps* mitochondria. After 1 minute agitation, 4 samples of 200 μ L were taken. Each sample was repeated in 167 μ L of PCA (Pyrrolidone carboxylic acid). 30 minutes in ice and then a 5-minute centrifugation at 13000 rpm. 300 μ L of supernatant collected in 100 μ L of KOMO (a combination of MOPS (3-morpholino-1-propanesulfonic acid) and KOH (potassium hydroxide)). Samples were frozen at -20°C prior to HPLC analysis for determination of adenine nucleotides as described (Argaud *et al.*, 1993).

ß-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity (ß-HAD activity)

Measurement of ß-HAD activity on liver and *plantaris* was adapted from (Lowry *et al.,* 1978).

Western Blot analysis

Frozen Liver and *plantaris* were prepared for western blotting analysis as described(*Goron et al.*, 2017). Antibodies for very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) (1:1000) were purchased from Abcam (Paris, France).

Experiment 2

Study design

in experiment 1, we observed that the modifications observed in our model were due to the chemotherapy, in an ethical concern we kept only the control group and the group receiving the chemotherapy. 12 Female Fischer 344 rats (10 weeks old, 130-160 g) were separated in 2 groups (n=6/group), a Ct group and a Ch group in the same condition than for experiment 1 (Figure 1).

Chemotherapy

Chemotherapy was injected as the same condition than previously described (experiment 1).

Isolation of liver mitochondria

In the first experiment, the changes observed on the mitochondrial level were on the liver, so we proceeded to isolate only the hepatic mitochondria for the second experiment. Isolation of liver mitochondria followed the same procedure as described in experiment 1.

Mitochondrial parameters

Oxygen consumption

Oxygen consumption was measured as described in experiment 1. Here we studied the respiration linked to complex 1 and complex 2 at the same time, linked to long chain fatty acid (Palmitoyl-Carnitine, (PC)) and linked to short chain fatty acid ((Octanoyl-Carnitine)) (Concentration and quantity of substrates and inhibitors are summarized in table 1).

Mitochondrial oxygen-free radical production

Reactive Oxygen Species (ROS) production was estimated as described above in experiment 1. Palmitoyl-Carnitine and Octanoyl-Carnitine were used as substrate (Concentration and quantity of substrates and inhibitors are summarized in table 2).

Adipose tissue explants culture

Retroperitoneal white adipose tissue (WAT) were collected for *in vitro* experimentations as described (Joffin *et al.*, 2014). Briefly, at euthanasia, WAT was weighed and cut in fragments in a full KREBS medium (NaCl 6.3g/L, KCl 0,32g/L, CaCl₂ 0.14g/L, KH₂PO₄ 0.15g/L, MgSO₄ 0.25g/L, NaHCO₃ 2g/L, Glucose 5mM (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France)), penicillin (100 U/ml; PAN-Biotech), streptomycin (0.1 mg/ml; PAN-Biotech) and 1% of fetal calf serum (Sigma-Aldrich)). Tissues were in a 21% O₂ / 5% CO₂ chamber and incubated at 37°C. After 24h of equilibration, medium was renewed for 24h incubation. At the end of the incubation period, WAT and medium culture were conserved at -80°C for further analysis.

Fatty acids release

Fatty acids release of rat retroperitoneal WAT was measured with a free fatty acid kit (Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l, Saint-Quentin-Fallavier, France). Result were expressed as mean ± SEM.

Experiment 3

Hepatocytes isolation

Liver hepatocytes were isolated from 4 overnight-starved Female Fischer 344 rats by enzymatic digestion with collagenase according to the method of Berry et al.(Berry *et al.*, 1969) modified by Groen (Groen *et al.*, 1982). After 4 hours of incubation, hepatocytes were incubated over-night in different conditions. The first was the control group (HeCtrl), without chemotherapy. The second was incubated with 5-FU (final concentration: 20 μ M) (He5-FU), the third was incubated with CPT-11 (final concentration: 20 μ M) (HeCPT-11), and the last one was incubated with the both chemotherapy 5-FU + CPT-11 (He5-FU+CPT-11) at same concentrations. Chemotherapies were used at non-toxic doses based on literature (Mahli et al. 2018). We determined by dose effects that our conditions were not toxic (data not shown) determined.

Determination of ATP, ADP, AMP content

Hepatocytes were lysed in PCA-EDTA on ice. After addition of KOMO, the sample was centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatant was stored at -80°C until analysis by HPLC, as described (Argaud *et al.*, 1993).

Adipose Tissue explants culture

Retroperitoneal WAT were collected for *in vitro* experimentations as described (Joffin *et al.*, 2014). WAT were incubated in four conditions. One with standard culture medium, one with 5-FU (20 μ M), one with CPT-11 (20 μ M), and one with 5-FU combined to CPT-11 (20 μ M).

Fatty acids release

Fatty acids release of rat retroperitoneal WAT was measured as described in experiment 2. Results are expressed as Med [Min;Max].

Mitochondrial potential and mitochondrial mass analysis by flow cytometry After trypsination, cell suspensions from the same well were shared and incubated either in the presence of 200nM of Mitotracker Green^{FM} (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) or 200nM TMRM (Tetramethylrhodamine, methyl ester, Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) for 15 min in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C and protected from light. Cells were then immediately analyzed by FACS (BD LSR FORTESSA, Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France). Laser excitation was 488nm and 532nm for Mitotracker Green^{FM} and TMRM, respectively. Fluorescence emission was collected with a 530/30 nm band-pass filter for Mitotracker Green^{FM} and 585/15 nm band-pass filter for TMRM. In order to collapse mitochondrial membrane potential, TMRM labelled cells were incubated with 250μM of CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone, Sigma-aldrich, France) in parallel for 15min, then immediately analyzed. Mitochondrial membrane potential was obtained by the difference of TMRM fluorescence before and after addition of CCCP, and can be normalized by the mitochondrial mass obtained by Mitotracker Green^{FM} fluorescence. Triplicates were carried out for each of 3 experiments.

Mitochondrial network analysis by confocal microscopy

Cells were incubated in the presence of 200nM of TMRM (Tetramethylrhodamine, methyl ester, Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) for 15 min in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C and protected from light. Acquisition of the images were carried out with a Leica TCS CSU SP8 confocal microscope (LEICA Microsystems Heidelberg, Germany) equipped with a with a HC PL APO CS2 63x/1.40 oil objective and driven by LasX software. Laser excitation was 552nm and fluorescence emission was precisely collected between 560 to 600nm. The images were acquired through the entire cells by the mean of z-stacks with a z-step of 1 μ m, confocal pinhole (Airy units) of 1 for all channels, with at least 3 randomly chosen fields per condition from 4 independent experiments.

Images analysis and quantification were performed by ImageJ software (open source image processing program from NIH, USA) for tophat filtering (Koopman WJ et al., Am J Physiol Cell Physiol. 2005) followed by extraction of shape measurements by Icy software (open source image processing program from BioImage Analysis Lab at Pasteur Institute, France). In this approach, each object with an intensity different from zero is considered and the software can provide results for elongation (ratio of largest radius by middle radius), sphericity (values at 100% mean complete spheric objects), volume of the objects in μ m³ and surface of the objects in μ m².

102

Mitochondrial ROS (superoxide) production analysis by confocal microscopy

Cells were incubated in the presence of 1 μ M of MitoSox (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, United States) for 15 min in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C and protected from light. Nuclei were stained with 2.5 μ M Syto13 for 15 min.

Acquisition of the images were carried out with a Leica TCS CSU SP8 confocal microscope (LEICA Microsystems Heidelberg, Germany) equipped with a with a HC PL APO CS2 63x/1.40 oil objective and driven by LasX software. Laser excitation was 488nm and 552nm for Syto13 and Mitosox respectively. Fluorescence emission was precisely collected between 500 to 545nm for Syto13 and 590 to 660nm. Confocal pinhole was 1 (Arbitrary units) for all channels, with at least 5 randomly chosen fields per condition from 4 independent experiments.

Protein synthesis

Protein synthesis was detected after puromycin stimulation of cultured cells for 30 minutes followed by immunostaining as described below.

Immunofluorescence

Fixed and permeabilized cells were blocked with 3% BSA-0.1% Tween20 (blocking buffer) before incubation with primary antibodies (anti-mouse VDAC1 diluted 1:5000 ; anti-rabbit IP3R2 1:5000, abcam and mouse monoclonal anti-puromycin antibody clone12D10 1:500, Merck) freshly diluted in blocking buffer and incubation for 1,5 h at 37°C. Washed twice with PBS, secondary antibodies (anti-mouse IgG-Cy5 (Jackson, 1:200), anti-rabbit IGG Dylight 488 (Jackson, rabbit, 1:200) were added for 1h, protected from light, and coverslips with antifading mounting medium (Vectashield, Eurobio) were added overnight before image acquisition.

Protein interaction analysis by Proximation Ligation assay

In situ PLA was performed using a Duolink kit (Sigma-Aldrich, France)

Cells grown on chamber microscopy slides were fixed with 3.2% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS, blocked with a Duolink blocking agent and incubated with primary antibodies (anti-mouse VDAC1 diluted 1:5000 and anti-rabbit IP3R2 1:5000; abcam).

Hybridization, ligation, amplification, and detection using Duolink Detection Reagents Red (excitation 594 nm, emission 624 nm) were realized according to the manufacturer's protocol: PLA probes (secondary antibodies tagged with DNA oligonucleotides) were incubated in preheated humidity chamber for 1 h at 37 °C. Ligation was performed with a ligase containing solution for 30 min at 37 °C. Finally, amplification step was performed with a polymerase-containing solution for 1 h 40 min at 37°C. Nuclei were stained with 2.5 μ M Syto13 for 15 min. Acquisition of the images were carried out with a Leica TCS CSU SP8 confocal microscope (LEICA Microsystems Heidelberg, Germany) equipped with a with a HC PL APO CS2 40x/1.30 oil objective and driven by LasX software. Laser excitation was 488nm and 552nm for Syto13 and PLA probe respectively. Fluorescence emissions were precisely collected between 500 to 545nm for Syto13 and between 600 to 650nm for PLA probe. The images were acquired through the entire cells by the mean of z-stacks with a z-step of 1 μ m, Confocal pinhole (Airy units) of 1 for all channels, with at least 3 randomly chosen fields per condition.

Statistical Analysis

Statistical analysis was done with GraphPad Software (San Diego, USA) using ANOVA followed by multiple comparisons of means by Tukey post-test. (p< 0.05).

Results

Experiment 1

In vivo observation.

At D0, body weights of the animals were similar into the 4 groups (Figure 2). At D1, only a difference is observed between Ct and Cc groups (p=0.004), and from D2 to D9, body weight of the rats of Ch and Cc groups decreased between D0 and D2, increased between D2 and D7 and decreased between D7 and D9 and are statistically lower than Ct and Ca groups. The weight of Ct and Ca groups were similar throughout the experimentation.

Energy Expenditure (EE), Energy intake (EI), Energy Balance (EB) and Respiratory Quotient (RQ).

Energy Expenditure of Ch and Cc group were lower than Ct group (p=0.008 and p=0.001) (Figure 3A), and the Energy Intake is drastically decreased in this two groups (Figure 3B). The Energy Balance was thus affected with the control group around zero (-0.8 \pm 3.3 kcal.day⁻¹) and was not different to the Ca group (-6.5 \pm 2.7 kcal.day⁻¹, p=0.43 vs Ct). The EB of the Ch group (-27.8 \pm 1.2 kcal.day⁻¹, p<0.0001 vs Ct) and of the Cc group collapsed (-24.0 \pm 2.7 kcal.day⁻¹, p<0.0001 vs Ct) (Figure 3C). In resting period (Figure 3D), like in activity period (Figure 3E), Ch and Cc groups had a lower RQ than Ct and CA groups, and RQ from Cc group was lower than Ch group.

Locomotor Activity.

The locomotor activity during resting period or activity period was not affected by the cancer and/or the chemotherapy (Figure 3F and Figure 3G).

Fat body mass (figure 3H).

A significant decrease was observed between Ct and Cc groups (Ct=12.5 \pm 0.5 g vs Cc=5.4 \pm 0.6 g; p<0.0001). When we take a look on cancer and chemotherapy isolated, Ca groups has no difference with Ct (Ca=10.8 \pm 0.5 g; p=0.24 vs Ct), but Ch is lower (Ch=7.6 \pm 0.6 g; p<0.0001 vs Ct).

ß-oxidation markers

Maximal *β*-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity

Muscle

In muscle, maximal ß-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity was not changed by the cancer or the chemotherapy (Table 3).

Liver

However, at hepatic level, this activity was perturbed by the presence of chemotherapy (chemotherapy alone and associated to cancer) (Table 3).

Protein expression of very-long chain acyl-CoA dehydrogenase

The protein expression of very-long chain acyl-CoA dehydrogenase was not affected by the different experimental conditions either at the muscular or hepatic level (Table 3).

Citrate synthase activity

At hepatic level (Table 3) a decrease was observed of mitochondrial density between Ct groups and Cc groups (p < 0.05). This effect was not found at muscular level.

Mitochondrial metabolism

Respiration

Muscle

In muscle isolated mitochondria, mitochondrial respiration of complex I or II was not affected by the cancer and/or the chemotherapy (Table 3).

Liver

At hepatic level, the respiration was decreased in complex II at stage III with the cancer (Table 3).

ROS production

Muscle

The production of Ros in muscle, when glutamate was used, there was a difference between Ch group and Cc group (Table 4) with rotenone. For succinate, no difference was observed at muscular level.

Liver

In liver, with the substrate glutamate, Ros production was increased after the addition of antimycin A, with the chemotherapy alone (Table 4). In succinate condition, at basal state, ROS production was decreased in Ca, Ch and Cc group compared to Ct group. After addition of antimycin A, a decrease was also observed when the chemotherapy was used without cancer (Table 4).

Mitochondrial Energy Wasting

At hepatic or muscular level, the yield of mitochondria were not affected by cancer, chemotherapy or the combination of both (Figure 4 A and Figure 4B)

Phosphorylating oxidation efficiency (ATP/O)

The relationship between oxygen consumption and ATP synthesis was not affected by cancer, chemotherapy or the combination of both in tissues (Figure 4C and Figure 4D).

Experiment 2

Mitochondrial metabolism

In hepatic isolated mitochondria, respiration was decreased using octanoyl-carnitine at state 3 (p<0.0001) (Table 5). On the other hand, this modification was not found when using a long chain fatty acid (palmitoyl-carnitine) as substrate (Table 5).

For ROS production (Table 5), a decrease was observed in Ch group, when Palmitoyl-Carnitine was used as substrate, after add when complex III is inhibited (Antimycin A) (p=0.01).

Free Fatty acid release

Free fatty acid release was non-affected by the use of chemotherapy (Ct = $100 \pm 22 \%$ vs Ch = $111 \pm 31 \%$, p=0.7576).

Experiment 3

Respiration allocated to protein synthesis, ATP renewal and ß-oxidation Respiration allocated to protein synthesis was decreased when hepatocytes were incubated with the combination of 5-FU and CPT-11 in comparison with the hepatocyte control (p=0.04) (Table 6). For the respiration allocated to ATP renewal or from the ß-oxidation, there were no effect from the chemotherapy used alone or in combination (Table 6).

Free Fatty acid release

Free fatty acid release was non-affected by the use of chemotherapies (result were in percentage as ctrl and presented as MED [min;max] : 5-FU = 147 [110;606], CPT-11 = 197 [13;209], 5-FU+CPT-11 = 296 [248;525].

Mitochondrial Network

By analyzing the mitochondrial network (Table 7), the surface area and volume were affected by 5-FU alone (respectively 70 \pm 11% vs Ct=100 \pm 10%, p = 0.04; 61 \pm 12% vs Ct= 100 \pm 11%, p= 0.02). In contrast, elongation and roundness were not affected by the chemotherapies. The mitochondrial mass was not affected by the chemotherapy (Figure 5A). Chemotherapy didn't affect the ratio TMRM-MTG (figure 5B). The production of ROS was affected by the use of CPT-11, alone and associated to 5-FU (Figure 5C).

Protein synthesis

Protein synthesis is not affected by the use of chemotherapy.

Proximity ligation assays (PLAs) (Figure 5E) PLAs are increased significantly by using the combination of 5-FU and CPT-11.

Discussion

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome and it is essential to decipher precise mechanism that would explain the resistance of cachexia to its management. The aim of our study was to investigate using a translational approach whether cancer or chemotherapy were responsible for cachexia and the energetic disturbances observed, as well as the site where these disturbances occur, in order to precise the mechanisms at the cellular level.

The first observation is that there is an imbalance between the energy which is delivered and that which is expended, leading to a crash in energy balance in the presence of chemotherapy in our model (as observed in clinic, where energy expenditure is an important factor in the development of malnutrition in cachectic patients (Tisdale, 2002). The first visible impact on the whole body following this imbalance with chemotherapy is a loss of fat mass as it is commonly observed in the presence of cancerous cachexia (Argilés et al., 2014) and in the same model of cancerous rats undergoing chemotherapy (Ebadi et al., 2017). This decrease in fat mass could come from the increase in physical activity of our rats under chemotherapy, which is not the case in view of the results of the motricity. The decrease could therefore come from a modification of the use of substrates by the body that we could explore thanks to the respiratory quotient, animals receiving chemotherapy rely on enhanced lipid oxidation to meet ATP requirements (with a RQ between 0.7 and 0.8) compared to the Ca and Ct groups which were closer to 1, corresponding to a carbohydrate use to meet the ATP needs of the body (Weyer et al., 2000). This increased oxidation of lipids is in accordance with the decrease in fat body mass that we have observed, and found in the literature in humans and in preclinical models (Del Rio et al., 2002; Hirsch et al., 2017; Ooi et al., 2021).

Our result could be explained as follow : first possibility: an increase in the flow of fatty acids. Since fatty acids come essentially from adipose tissue, we have shown that their efflux is not modified either in *vitro* or in *vivo*. Second possibility: an increase in the primary organs (the muscle and the liver) in oxidation of fatty acids for energy purposes. Measurement of β -oxidation indicates that only liver would be involved. Hence, in *vivo* analysis clearly indicated that mitochondrial function was preserved in muscle from treated animals whereas hepatic mitochondria was affected with modification of mitochondrial density and oxygen consumption. These results are not in accordance from the majority of the studies presented in the literature, where it has been shown that at the level of skeletal muscle there are disturbances of mitochondrial metabolism. It should be noted that between these studies, the

results showing a mitochondrial disturbance in muscle are not all identical. Hence, Julienne *et al.* (2012) showed that the complex IV activity was decreased with no alteration of ATP synthesis or uncoupling observed, while Tzika *et al.* (2013) and Constantinou *et al.* (2011) observed a decrease in ATP synthesis and an uncoupling phenomenon. All these variations in the results of the mitochondrial metabolism can come from several parameters, the models used, the duration of experiments, as well as the methods employed to measure the mitochondrial parameters. But several papers are in line with our results, in particular Dumas *et al.* (2003), who showed the decrease of mitochondrial density in a model of cachexia only cancerous (Dumas *et al.*, 2003), suggesting that cachexia whether it is of cancerous origin, or chemotherapeutic, would well impact this mitochondrial density.

Moreover using in *vitro* studies on hepatocytes, we confirmed the direct ability of CPT-11 and 5-FU to affect energy metabolism. Hence, these two molecules directly impact energy homeostasis as illustrated by the decrease of ATP:ADP ratio. We could show an effect on ROS production, mitochondrial network morphology and mitochondrial respiration as observed in literature in *vivo* (Ebadi *et al.*, 2017) and in *vitro* (Mahli *et al.*, 2018). But can such changes explain the increase in fatty acid oxidation in the liver? One hypothesis is that the action of chemotherapies is linked to an increase the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAMs). MAMs are the communication between mitochondria and endoplasmic reticulum. It is known that the interactions between the endoplasmic reticulum and the mitochondria have an important role in the adaptation of hepatic metabolism (Csordás *et al.*, 2006) and in the morphology of mitochondria (Doghman-Bouguerra *et al.*, 2019).

In the literature, several studies have shown different results. In obese patients, these interactions are altered. Some studies have shown that interactions are decreased (with a decrease in the flow of calcium to the mitochondria) (See review, Morio *et al.*, 2021), while in other studies these interactions are increased (with an increase in the flow of calcium to the mitochondria) (Hotamisligil *et al.*, 2015). Indeed, in healthy fed states (with a sufficient amount of glucose) the interactions are diminished which allows the oxidation of glucose which slows down the oxidation of lipids (Theurey *et al.*, 2016). In the fasting state, it has been shown that these interactions increase, which would favor the lipid oxidation of fatty acids from adipose tissue, thanks to an enhanced calcium flow towards the mitochondria which is known to stimulate TCA and respiratory chain activity (Otto *et al.*, 1978). Our results confirmed our hypothesis, PLAs evidenced a two-fold increase in mitochondria-ER interactions in

response to chemotherapy. We can therefore propose the following association: chemotherapy (CPT-11 and 5-FU) increases the contact sites between the mitochondria and the endoplasmic reticulum, thus increasing fatty acid oxidation (which results in a decrease in the respiratory quotient) and a significant loss of adipose tissue.

The identification of a mechanism of action allows us to consider future therapeutic strategies aimed at limiting this impact of chemotherapy on hepatic MAMs.

References

Arends, J., Baracos, V., Bertz, H., Bozzetti, F., Calder, P. C., Deutz, N., Erickson, N., Laviano, A., Lisanti, M. P., Lobo, D. N., McMillan, D. C., Muscaritoli, M., Ockenga, J., Pirlich, M., Strasser, F., de van der Schueren, M., Van Gossum, A., Vaupel, P., & Weimann, A. (2017). ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *36*(5), 1187–1196. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.06.017

Argaud, D., Roth, H., Wiernsperger, N., & Leverve, X. M. (1993). Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes. *European journal of biochemistry*, *213*(3), 1341–1348. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17886.x

Argilés, J. M., Fontes-Oliveira, C. C., Toledo, M., López-Soriano, F. J., & Busquets, S. (2014). Cachexia: a problem of energetic inefficiency. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *5*(4), 279–286. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s13539-014-0154-</u><u>×</u>

Barreto, R., Mandili, G., Witzmann, F. A., Novelli, F., Zimmers, T. A., & Bonetto, A. (2016). Cancer and Chemotherapy Contribute to Muscle Loss by Activating Common Signaling Pathways. *Frontiers in physiology*, *7*, 472. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00472

Barreto, R., Waning, D. L., Gao, H., Liu, Y., Zimmers, T. A., & Bonetto, A. (2016). Chemotherapyrelated cachexia is associated with mitochondrial depletion and the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs. *Oncotarget*, 7(28), 43442–43460. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9779

Berry, M. N., & Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of cell biology*, *43*(3), 506–520. https://doi.org/10.1083/jcb.43.3.506

Breuillard, C., Moinard, C., Goron, A., Neveux, N., De Reviers, A., Mazurak, V. C., Cynober, L., & Baracos, V. E. (2021). Dietary citrulline does not modify rat colon tumor response to chemotherapy, but failed to improve nutritional status. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 40(7), 4560–4568. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.05.035

Cadoudal, T., Blouin, J. M., Collinet, M., Fouque, F., Tan, G. D., Loizon, E., Beale, E. G., Frayn, K. N., Karpe, F., Vidal, H., Benelli, C., & Forest, C. (2007). Acute and selective regulation of glyceroneogenesis and cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase in adipose tissue by thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetologia*, *50*(3), 666–675. https://doi.org/10.1007/s00125-006-0560-5

Cao, S., & Rustum, Y. M. (2000). Synergistic antitumor activity of irinotecan in combination with 5-fluorouracil in rats bearing advanced colorectal cancer: role of drug sequence and dose. Cancer research, 60(14), 3717–3721.

Chabert, C., Bottelin, P., Pison, C., & Dubouchaud, H. (2016). A low-cost system to easily measure spontaneous physical activity in rodents. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), 120*(9), 1097–1103. <u>https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00888.2015</u>

Coletti D. (2018). Chemotherapy-induced muscle wasting: an update. *European journal of translational myology*, *28*(2), 7587. https://doi.org/10.4081/ejtm.2018.7587

Constantinou, C., Fontes de Oliveira, C. C., Mintzopoulos, D., Busquets, S., He, J., Kesarwani, M., Mindrinos, M., Rahme, L. G., Argilés, J. M., & Tzika, A. A. (2011). Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. *International journal of molecular medicine*, *27*(1), 15–24. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.3892/ijmm.2010.557

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A., & Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology*, *174*(7), 915–921. https://doi.org/10.1083/jcb.200604016

Del Rio, G., Zironi, S., Valeriani, L., Menozzi, R., Bondi, M., Bertolini, M., Piccinini, L., Banzi, M. C., & Federico, M. (2002). Weight gain in women with breast cancer treated with adjuvant cyclophosphomide, methotrexate and 5-fluorouracil. Analysis of resting energy expenditure and body composition. *Breast cancer research and treatment*, *73*(3), 267–273. https://doi.org/10.1023/a:1015892714162

Doghman-Bouguerra, M., & Lalli, E. (2019). ER-mitochondria interactions: Both strength and weakness within cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*. *Molecular cell research*, *1866*(4), 650–662. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.bbamcr.2019.01.009</u>

Dumas, J. F., Simard, G., Roussel, D., Douay, O., Foussard, F., Malthiery, Y., & Ritz, P. (2003). Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *The British journal of nutrition*, *90*(5), 969–977. <u>https://doi.org/10.1079/bjn2003980</u>

Ebadi, M., Field, C. J., Lehner, R., & Mazurak, V. C. (2017). Chemotherapy diminishes lipid storage capacity of adipose tissue in a preclinical model of colon cancer. *Lipids in health and disease*, *16*(1), 247. <u>https://doi.org/10.1186/s12944-017-0638-8</u>

Fearon, K., Strasser, F., Anker, S. D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R. L., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., Davis, M., Muscaritoli, M., Ottery, F., Radbruch, L., Ravasco, P., Walsh, D., Wilcock, A., Kaasa, S., & Baracos, V. E. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. The Lancet. Oncology, 12(5), 489–495. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7.

Fontaine, E., Eriksson, O., Ichas, F., & Bernardi, P. (1998). Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the

respiratory chain complex i. *The Journal of biological chemistry*, *273*(20), 12662–12668. https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12662

Goron, A., Lamarche, F., Cunin, V., Dubouchaud, H., Hourdé, C., Noirez, P., Corne, C., Couturier, K., Sève, M., Fontaine, E., & Moinard, C. (2017). Synergistic effects of citrulline supplementation and exercise on performance in male rats: evidence for implication of protein and energy metabolisms. *Clinical science (London, England : 1979)*, *131*(8), 775–790. https://doi.org/10.1042/CS20170088

Groen, A. K., Sips, H. J., Vervoorn, R. C., & Tager, J. M. (1982). Intracellular compartmentation and control of alanine metabolism in rat liver parenchymal cells. *European journal of biochemistry*, *122*(1), 87–93. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05851.x

Hirsch, K. R., Smith-Ryan, A. E., Blue, M., Mock, M. G., & Trexler, E. T. (2017). Influence of segmental body composition and adiposity hormones on resting metabolic rate and substrate utilization in overweight and obese adults. *Journal of endocrinological investigation*, *40*(6), 635–643. <u>https://doi.org/10.1007/s40618-017-0616-z</u>

Hotamisligil, G. S., & Bernlohr, D. A. (2015). Metabolic functions of FABPs--mechanisms and therapeutic implications. *Nature reviews. Endocrinology*, *11*(10), 592–605. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/nrendo.2015.122</u>

Joffin, N., Jaubert, A. M., Durant, S., Bastin, J., De Bandt, J. P., Cynober, L., Moinard, C., Coumoul, X., Forest, C., & Noirez, P. (2014). Citrulline reduces glyceroneogenesis and induces fatty acid release in visceral adipose tissue from overweight rats. *Molecular nutrition & food research*, *58*(12), 2320–2330. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400507

Joffin, N., Jaubert, A. M., Durant, S., Bastin, J., De Bandt, J. P., Cynober, L., Moinard, C., Forest, C., & Noirez, P. (2014). Citrulline induces fatty acid release selectively in visceral adipose tissue from old rats. *Molecular nutrition & food research, 58*(9), 1765–1775. https://doi.org/10.1002/mnfr.201400053

Julienne, C. M., Dumas, J. F., Goupille, C., Pinault, M., Berri, C., Collin, A., Tesseraud, S., Couet, C., & Servais, S. (2012). Cancer cachexia is associated with a decrease in skeletal muscle mitochondrial oxidative capacities without alteration of ATP production efficiency. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 3*(4), 265–275. <u>https://doi.org/10.1007/s13539-012-0071-9</u>

Mahli, A., Saugspier, M., Koch, A., Sommer, J., Dietrich, P., Lee, S., Thasler, R., Schulze-Luehrmann, J., Luehrmann, A., Thasler, W. E., Müller, M., Bosserhoff, A., & Hellerbrand, C. (2018). ERK activation and autophagy impairment are central mediators of irinotecan-induced steatohepatitis. *Gut*, *67*(4), 746–756. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312485

Martin, L., Senesse, P., Gioulbasanis, I., Antoun, S., Bozzetti, F., Deans, C., Strasser, F., Thoresen, L., Jagoe, R. T., Chasen, M., Lundholm, K., Bosaeus, I., Fearon, K. H., & Baracos, V. E. (2015). Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(1), 90–99. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.1894

Marzo, F., Milagro, F. I., Barrenetxe, J., Díaz, M. T., & Martínez, J. A. (2021). Azoxymethane-Induced Colorectal Cancer Mice Treated with a Polyphenol-Rich Apple Extract Show Less Neoplastic Lesions and Signs of Cachexia. *Foods (Basel, Switzerland)*, *10*(4), 863. <u>https://doi.org/10.3390/foods10040863</u>

Nicholls D. G. (2004). Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging cell*, *3*(1), 35–40. https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2003.00079.x

Ooi, D., Ling, J., Ong, F. Y., Tai, E. S., Henry, C. J., Leow, M., Khoo, E., Tan, C. S., Chong, M., Khoo, C. M., & Lee, Y. S. (2021). Branched Chain Amino Acid Supplementation to a Hypocaloric Diet Does Not Affect Resting Metabolic Rate but Increases Postprandial Fat Oxidation Response in Overweight and Obese Adults after Weight Loss Intervention. *Nutrients*, *13*(12), 4245. <u>https://doi.org/10.3390/nu13124245</u>

Otto, D. A., & Ontko, J. A. (1978). Activation of mitochondrial fatty acid oxidation by calcium. Conversion to the energized state. *The Journal of biological chemistry*, *253*(3), 789–799.

Prado, C. M., Antoun, S., Sawyer, M. B., & Baracos, V. E. (2011). Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 14(3), 250–254. https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283455d45

Theurey, P., Tubbs, E., Vial, G., Jacquemetton, J., Bendridi, N., Chauvin, M. A., Alam, M. R., Le Romancer, M., Vidal, H., & Rieusset, J. (2016). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *Journal of molecular cell biology*, *8*(2), 129–143. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw004

Tisdale M. J. (2002). Cachexia in cancer patients. *Nature reviews. Cancer, 2*(11), 862–871. https://doi.org/10.1038/nrc927

Tzika, A. A., Fontes-Oliveira, C. C., Shestov, A. A., Constantinou, C., Psychogios, N., Righi, V., Mintzopoulos, D., Busquets, S., Lopez-Soriano, F. J., Milot, S., Lepine, F., Mindrinos, M. N., Rahme, L. G., & Argiles, J. M. (2013). Skeletal muscle mitochondrial uncoupling in a murine cancer cachexia model. *International journal of oncology*, *43*(3), 886–894. https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1998

Vial, G., Dubouchaud, H., Couturier, K., Cottet-Rousselle, C., Taleux, N., Athias, A., Galinier, A., Casteilla, L., & Leverve, X. M. (2011). Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *Journal of hepatology*, *54*(2), 348–356. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.044

Weyer, C., Pratley, R. E., Salbe, A. D., Bogardus, C., Ravussin, E., & Tataranni, P. A. (2000). Energy expenditure, fat oxidation, and body weight regulation: a study of metabolic adaptation to long-term weight change. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *85*(3), 1087–1094. <u>https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6447</u>

Xue, H., Sawyer, M. B., Field, C. J., Dieleman, L. A., & Baracos, V. E. (2007). Nutritional modulation of antitumor efficacy and diarrhea toxicity related to irinotecan chemotherapy in rats bearing the ward colon tumor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(23), 7146–7154. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0823



Figure 1. Experimental design.

Orange arrows were for the injection of CPT-11 (50 mg/kg) and purple arrows were for the injection of 5-FU (50 mg/kg). Control group (Ct, n=6) were healthy rat without cancer and chemotherapy. Cancer group (Ca, n=6) were rats with tumour injection but without chemotherapy. Chemotherapy group (Ch, n=6) were rats without cancer, but undergoing two cycles of chemotherapy. The Cancer + Chemotherapy groups (Cc, n=6) were rats with cancer and chemotherapy. Groups with \ddagger were used in experiment 1, and groups with \ddagger were used in experiment 2.



Figure 2. Relative body weight (%) compared to the first day of chemotherapy.

The first cycle of chemotherapy started at D0 with Irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg; \uparrow) and at D1 with 5-Fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg; \uparrow), and the second cycle of chemotherapy at D7 for CPT-11 (\uparrow), and D8 for 5-FU (\uparrow). Results are expressed in Mean ± SEM.*= significatively different (p<0.05; Ct vs Ch and Cc and Ca vs Ch and Cc). # = significatively different (p<0.05; Ct vs Cc)







Figure 3. Effects of cancer, chemotherapy, and the combination of the two on Energy Expenditure expressed in kcal.day⁻¹) (A); on Energy Intake expressed in kcal.day⁻¹ (B), on Energetic Balance (C), on Respiratory Quotient in rest period (D), in activity period (E) expressed in %, on video tracked distance during rest period (F) and during activity period (G) expressed in cm.hours⁻¹ and on fat body mass (H) expressed in *g*. Results are expressed as means \pm SEM (n=6/group). Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05; One-way Anova)





Oxygen consumption plotted against proton motive force in muscle (*quadriceps*) (n=6/group) (A). oxygen consumption plotted against proton motive force in liver (n=6/group) (B). Relationship between the ATP synthesis rate and the oxygen consumption rate in muscle (*quadriceps*) and Liver (C). Measurement were conducted with Glutamate/Malate as substrate (n=6/group). Relationship between the ATP synthesis rate and the oxygen consumption rate in muscle (*quadriceps*) and Liver (D). Measurement were conducted with Succinate as substrate (n=6/group). Values are expressed as mean ± SEM.



Figure 5. Effect of chemotherapy on mitochondrial function, protein synthesis and Proximity Ligation Assays (PLAs) at *in vitro* level.

Mitochondrial mass was assessed by flow cytometry after Mitotracker Green (MTG) (A). Mitochondrial potential is revealed by TMRM labelling either by confocal microscopy (pictures B, scale bar 10µm) or expressed as the ratio of TMRM/MTG fluorescence from flow cytometry (graph B). Data are expressed as mean± SEM (n=3, in triplicate). Mitochondrial ROS was analysed by confocal microscopy after mitosox labelling and image analysis. Data are expressed as mean± SUM/AREA of fluorescence signals of mitosox from at least 5 randomly chosen fields per condition (n=4) (C).

Protein synthesis was detected after puromycin stimulation of cultured cells for 30 minutes and immunofluorescence. Data are expressed as mean± SEM of the ratio SUM/AREA of fluorescence signals from at least 5 randomly chosen fields per condition (n=4) (D).

Interaction of mitochondria and endoplasmic reticulum (MAM complexes) was evaluated by proximation ligation assay (PLA) between VDAC1 and IPR2 proteins. Data are expressed as mean± SEM of the PLA spots/cell numbers from at least 5 randomly chosen fields per condition (n=3) (E).

Table 1. Concentrations of substrates and inhibitors used on isolated mitochondria for the measurement of respiration.

Experiment 1	Substrates/Inhibitors	Final Concentration	Stock Solution
	Giutamate/Malate	5 mivi/2.5mivi	0.5101/0.25101
	Succinate/Roteone	5mM/1µM	1M/1mM
	ADP	0.5mM	100 mM
	Oligomycin	1 μg/mL	1 mg/mL
Experiment 2	Octanoyl-Carnitine/Malate	150 μM/2.5 mM	50mM/0.25M
	Palmitoyl-Carnitine/Malate	60 µM/2.5 mM	20mM/0.25M
	ADP	0.5mM	100 mM
	Oligomycin	1 μg/mL	1mg/mL
Experiment 3	Etomoxir	40 µM	20mM
	Cycloheximid	40 µM	20mM
	Oligomycin	1 μg/mL	1mg/mL
	Antimycin A	2µM	2mM

Table 2. Concentrations of substrates and inhibitors used on isolated mitochondria for the measurement of H_2O_2 production.

Experiment 1	Substrates/Inhibitors	Final	Stock Solution
		Concentration	
	Glutamate/Malate	5 mM/2.5mM	0.5M/0.25M
	Succinate	10mM	1M
	Rotenone	3 µM	1mM
	Amplex Red	1 µM	1mM
	HRP	6 U/mL	6000 U/mL
	Antimycin A	2 µM	2mM
Experiment 2	Octanoyl-Carnitine/Malate	150 μM/2.5 mM	50mM/0.25M
	Palmitoyl-	60 µM/2.5 mM	20mM/0.25M
	Carnitine/Malate		
	Rotenone	3 µM	1mM
	Amplex Red	1 µM	1mM
	HRP	6 U/mL	6000 U/mL
	Antimycin A	2 µM	2mM

Table 3. Liver and muscle mitochondrial and energy metabolisms data in control group vs cancer, chemotherapy and cancer + chemotherapy group.

Significant differences are grey-backgrounded. Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05; One-way Anova)

		Ct	Са	Ch	Сс
Muscle mitochondrial density		21 - 53	22 4 4 3		20 + 43
Citrate Synthase Activity (µmol.min ⁻	¹ .g of tissue ⁻¹)	31±5°	32 ± 4 °	28 ± 5 °	28 ± 4 °
Muscle isolated mitochondria Re	espiration				
(nmol O ₂ .min ⁻¹ .mg prot ⁻	¹)				
Complex Perpiration	State III	573 ± 38 ª	608 ± 44 ª	540 ± 31 ª	585 ± 34 ª
complex r Respiration	State IV	35 ± 3 ª	33 ± 3 ª	41 ± 4 ª	38 ± 7 ª
Complex II Pospiration	State III	378 ± 28 ^a	434 ± 17 ^a	404 ± 17 ^a	386 ± 36 ª
	State IV	97 ± 11 ª	95 ± 17 ^a	79 ± 15 ^a	80 ± 13 ^a
Muscular ß-HAD activity (µmol.min ⁻¹ .mg of protein ⁻¹)		11 ± 1ª	10 ± 0.4^{a}	12 ± 1ª	10 ± 1 ª
Muscular VLCAD Expression (Arbitrary Unit)		0.09 ± 0.01 ª	0.09 ± 0.02^{a}	0.12 ± 0.04 ^a	0.09 ± 0.01 ª
Liver mitochondrial density					
Citrate Synthase Activity		21±1ª	17 ± 2 ^{a,b}	18 ± 1 ^{a,b}	16 ± 2^{b}
(µmol.min ⁻¹ .g of tissue ⁻¹)					
Liver isolated mitochondria respiration (nm	ol O ₂ .min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)				
Complex Perpiration	State III	101 ± 20 ª	82 ±15 ^a	100 ± 27^{a}	85 ± 20 ª
complex r Respiration	State IV	11 ± 1 ª	11 ± 2 ª	11 ± 3 ª	15 ± 3 ª
Complex II Respiration	State III	159 ± 33 ª	93 ± 32 °	129 ± 38 ^{a,c}	101 ± 30 ^{a,c}
	State IV	19 ± 4 ª	14 ^a ± 5 ^a	13 ± 4 ª	13 ± 6 ª
Hepatic ß-HAD activity (µmol.min ⁻¹ .mg of protein ⁻¹)		21 ± 1 ^{a,c}	18 ± 2 ^a	33 ± 2 ^{b,c}	28± 3 °
Hepatic VLCAD Expression (Arbitrary Unit)		0.054 ± 0.008 ª	0.051 ± 0.004 ª	0.053 ± 0.014 ª	0.062 ± 0.022 ª

Table 4. Mitochondria complexes H_2O_2 production at muscular and hepatic level

Significant differences are grey-backgrounded. Result with * are significantly different from Ct (p<0.05)

		Ct	Са	Ch	Сс		
Muscular Mitonchondr	ia complexes						
H ₂ O ₂ Production (pmol	.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)						
	Basal State	189 ± 11	112 ± 7	135 ± 23	92 ± 10		
Glutamate	Rotenone	357 ^{a,b} ± 22	319 ^{a,b} ± 39	390 ^a ± 39	279 ^b ± 24		
	Antimycin A	536 ± 40	529 ± 22	536 ± 22.1	502 ± 28		
	Basal State	4101 ± 272	3888 ± 185	3910 ± 257	3795 ± 112		
Succinate	Rotenone	493 ± 29	443 ± 18	463 ± 30	441 ± 12		
	Antimycin A	1402 ± 70	1550 ± 66	1457 ± 76	1595 ± 73		
Hepatic Mitonchondria	Hepatic Mitonchondria complexes						
H ₂ O ₂ Production (pmol	.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)						
	Basal State	160 ± 11	126 ± 10	117 ± 11	125 ± 6		
Glutamate	Rotenone	246 ± 19	203 ± 19	194 ± 20	219 ± 9		
	Antimycin A	338ª ± 26	$344^{a} \pm 44$	272 ^b ± 16	$312^{a,b} \pm 14$		
	Basal State	522ª ± 61	385 ^b ± 49	$348^{b} \pm 24$	$363^{b} \pm 14$		
Succinate	Rotenone	176 ± 12	147 ± 13	134 ± 5	154 ± 8		
	Antimycin A	$324^{a,b} \pm 28$	273 ^{a,b} ± 28	$214^{b} \pm 10.$	247 ^{a,b} ± 25		

Table 5. Respiration and Mitochondria complexes H_2O_2 production at hepatic level

Significant differences are grey-backgrounded. Result with * are significantly different from Ct (p<0.05; t-test)

Respiration		Ct	Ch
(Nmol O ₂ .min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)			
Octanov/L-C	State 3	66 ± 3	54.4 ± 2 *
Octanoyi-C	State 4	4.3 ± 0.6	4.5 ± 0.6
Palmitov/LC	State 3	68 ± 4	65 ± 7
Fainitoyi-C	State 4	6.7 ± 0.4	3.5 ± 0.7
H ₂ O ₂ production			
(pmol.min ⁻¹ .mg prot ⁻¹)			
	Basal State	391 ± 50	349 ± 33
Octanoyl-C	Rotenone	438 ± 82	383 ± 27
	Antimycine A	960 ± 126	731 ± 42*
	Basal State	470 ± 69	373 ± 41
Palmitoyl-C	Rotenone	632 ± 43	548 ± 36
	Antimycine A	1358 ± 87	1171 ± 99

Table 6. Energy allocation in percentage to proteins synthesis, ATP renewal and from ßoxidation.

Results are presented as means \pm SEM (n=4/group in duplicate).Significant differences are grey-backgrounded. Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05; One-way Anova)

% of respiration	HeCt	He5-FU	HeCPT-11	He5-FU + CPT-11
Allocated to proteins synthesis	31 ± 7 ª %	22 ± 3 ª %	17 ± 4 ª %	13 ± 3 ^b %
Allocated to ATP renewal	81±3%	79 ± 4 %	86 ±3 %	85 ± 3 %
From ß-oxidation	23±7%	28 ± 5 %	26 ± 6 %	26 ± 4 %

Table 7. Amounts of AMP, ADP, ATP and ATP/AMP and ATP/ADP Ratio.

Results are presented as means ± SEM (n=4/group, in triplicate). Significant differences are grey-backgrounded. Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05; One-way Anova)

Amount (µM)	HeCt	He5-FU	HeCPT-11	He5-FU + CPT-11
AMP	1.2±0.1	1.6±0.2	1.3±0.1	1.9±0.2
ADP	6.4±0.4	6.6±0.2	6.8±0.5	8.4±0.8
ATP	21.3±1.4 ^a	20.3±0.6 ^{a,b}	18.4±0.9 ^b	20.7±0.9 ^{a,b}
Total	29±2	28±1	27±1	31±1
Ratio				
ATP/AMP	18.9±2.3 ^a	14.1±1.2 ^a	14.4±0.9 ^a	12.3±1.5 ^b
ATP/ADP	3.4±0.1 ^a	3.1±0.1 ^a	2.8±0.2 ^b	2.7±0.3 ^b

Table 8. Mitochondrial network structure.

Results are presented as means ± SEM of % as report to HeCt (n=4/group, measure are in triplicate). Significant differences are grey-backgrounded. Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05; One-way Anova).

	HeCt	He5-FU	HeCPT-11	He5-FU + CPT-11
Surface Area	100 ± 10 ª	70 ± 11 ^b	90 ± 20 ª	84 ± 19 ª
Volume	100 ± 11^{a}	61 ± 12 ^b	90 ± 22 ^a	78 ± 18 ª
Elongation factor	100 ± 4	123 ± 13	113 ± 13	127 ± 32
Roundness	100 ± 4	114 ± 9	99 ± 7	102 ± 5

PUBLICATION N°3
Étude numéro 3

Effets de l'apport protéique et de la nutrition entérale sur la croissance tumorale et l'état nutritionnel de rats cancéreux soumis à un traitement de chimiothérapies.

Martin BOUTIERE, Benoît BOMAL, Cécile COTTET-ROUSSELLE, Hervé DUBOUCHAUD, Karine COUTURIER, Charlotte BREUILLARD et Christophe MOINARD.

Introduction

Au cours d'un cancer et d'un traitement chimio-thérapeutique, les patients sont sujets à un phénomène de cachexie, entrainant une diminution de la tolérance aux traitements et un mauvais pronostic. Les nutritions artificielles utilisées dans les conditions cliniques peuvent être un moyen de contrer l'anorexie induite par la chimiothérapie comme nous l'avons observée dans le modèle cancer et chimiothérapie nourrit de manière orale. Cependant, une question demeure : la composition du régime alimentaire, et plus particulièrement l'apport en protéines, peut-elle affecter l'état nutritionnel du patient et l'évolution de la taille de la tumeur ?

But de l'étude

Évaluer l'intérêt de nutritions entérales (normo-protéique/normo énergétique vs hyperprotéique/hyper-énergétique) dans un modèle de rat combinant une tumeur et de la chimiothérapie afin d'étudier les effets sur la croissance tumorale et le statut nutritionnel.

Méthodes

Trente-deux rats ont été randomisés en quatre groupes. Un groupe contrôle sain nourri *ad libitum*, un groupe avec cancer + chimiothérapie nourri oralement *ad libitum*, un groupe avec cancer + chimiothérapie nourri artificiellement avec un régime entérale normo-protéique et normo-calorique, et un groupe cancer + chimiothérapie nourri artificiellement avec un régime entérale hyper-protéique et hyper-calorique. La chimiothérapie comprenait 2 cycles à une semaine d'intervalle, consistant en une injection d'irinotecan (50 mg/kg) et de 5-fluorouracil (50 mg/kg) le jour suivant. Le poids corporel, la prise alimentaire et le volume de la tumeur

ont été mesurés quotidiennement. Après l'euthanasie, les organes ont été pesés et l'iléon, le jéjunum, le *tibialis*, le foie et la tumeur ont été examinés plus en détail pour mesurer la teneur en protéines et la synthèse des protéines.

Résultats

L'anorexie observée au moment des deux cycles de chimiothérapies chez les rats sous nutrition orale a été prévenue par l'utilisation de la nutrition artificielle (les animaux cancer + chimiothérapie sous nutrition orale ont eu une baisse de -6,0 \pm 0,6% de leurs poids au cours de l'expérimentation, contre 0,1 \pm 0,7% et -0,5 \pm 1,8% respectivement pour les groupes sous nutrition entérale normo-protéiques et hyper-protéiques). En revanche, l'apport de la nutrition entérale normo-protéique n'empêche pas la fonte de la masse grasse. La croissance tumorale n'est pas impactée par l'utilisation de la nutrition entérale comparée à l'effet de la nutrition orale.

Conclusion

Cette étude préliminaire est, à notre connaissance, l'une des premières étudiant l'effet de la nutrition entérale dans un modèle préclinique associant le cancer et la chimiothérapie. Les premières observations montrent que la nutrition artificielle prévient la cachexie au cours des cycles de chimiothérapies, et n'a pas d'effet sur l'évolution de la croissance tumorale. Des études complémentaires sont nécessaires pour établir des données solides sur l'utilisation de la nutrition entérale dans ce modèle ainsi que les effets sur le métabolisme nutritionnel et protéique.

Effect of protein intake and enteral nutrition on tumour growth and the nutritional status of tumor-bearing rats undergoing chemotherapy. A pioneering study.

Boutière M¹, Bomal B¹, Tellier C¹, Couturier K¹, Dubouchaud H¹, Breuillard C¹, Moinard C¹

¹Univ. Grenoble Alpes, Inserm, Laboratory of Fundamental and Applied Bioenergetics (LBFA), 38000 Grenoble, France

Corresponding author: Dr Charlotte Breuillard Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U 1055 2280 rue de la piscine 38000 Grenoble charlotte.breuillard@univ-grenoble-alpes.fr

Key words: enteral nutrition, cancer, protein metabolism, cachexia, undernutrition

Abstract

Background: During cancer chemotherapy, patients are prone to undernutrition leading to a decreased tolerance to treatment and a poor prognosis. Artificial nutrition used in clinical conditions may be a way to counteract chemotherapy-induced anorexia. Moreover, increased protein intake and energy could improve the nutritional status of the patient but affect tumour growth. In this study we investigated the effect of different enteral nutrition on tumour growth and nutritional status of tumour-bearing rats undergoing chemotherapy.

Methods: Female Fischer 344 rats (n=32) were divided into 4 groups (n=8 per group): a control group fed *ad libitum* (CTRL), and 3 cancer (Ward colon tumour) + chemotherapy groups: a CC group orally fed *ad libitum*, a EN-NEP group artificially fed with a normoprotein/normo-energy enteral diet (flow of 145 mL/kg BW/day; 14.5 g protein/kg BW/day; 290 kcal/kg BW/day), and a EN-HEP group artificially fed with a hyper-protein/hyper-energy enteral diet (flow of 181 mL/kg BW/day; 17.9 g protein/kg BW/day; 362 kcal/kg BW/day). Chemotherapy included 2 cycles one week apart, each consisting of an injection of irinotecan (50 mg/kg) and 5-fluorouracil (50 mg/kg) the day after. Body weight, food intake and tumour volume were daily measured. After euthanasia (day 9), organs were weighed, body composition was determined, and tibialis, liver, intestine (jejunum and ileum) mucosa, and tumour were further examined for protein content and protein synthesis measurements.

Results: Cancer and chemotherapy led to a decrease in body weight which was thwarted by enteral nutrition. However, normo-protein/normo-energy artificial nutrition was not effective at preventing the depletion of fat tissue related to cancer and chemotherapy and was even associated with a lower muscle mass than in orally fed tumour-bearing rats. This mitigate result illustrate the classical resistance to renutrition of these patient. It could be related to 1) intestinal malabsorption or 2) inadequacy between nutrition intake and nutritional requirements.

Conclusions: It was the first study investigating enteral nutrition on a rat model with cancer and chemotherapy. Enteral nutrition is safe in our model, well tolerated and does not promote tumor growth.

Abbreviations

5-FU: 5-fluorouracil BCA: BiCinchoninic acid Assay CC: cancer + chemotherapy rats fed ad libitum CPT-11: irinotecan CTRL: ad libidum control without cancer + chemotherapy. ddH20: Ultra-pure and sterile water DTT: Dithiothreitol EDL: Extensor Digitorum Longus EDTA: Ethylenediaminetetra-acetic acid EN-HEP: cancer + chemotherapy rats under enteral nutrition with high-protein/high-energy EN-NEP: cancer + chemotherapy rats under enteral nutrition with normo-protein/normoenergy ESPEN: European Society for Clinical Nutrition and Metabolism NaOH: Sodium Hydroxide SDS: sodium dodecyl sulfate SEM: Standard Error of the Mean

SUnSET: SUrface SEnsing of Translation

Introduction

Many factors such as undernutrition can reduce the survival of the patient with cancer. Undernutrition is due to the combined effect of cancer and chemotherapy which are both associated with inflammation and a resultant weight loss, especially muscle mass. In turn, this syndrome leads to a decreased tolerance to chemotherapy and a diminished survival rate (Prado *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2015). 50 to 80% of cancer patients are affected by cachexia (Ryan *et al.*, 2016), and it is estimated that 10 to 20% of deaths in these patients can be attributed to this phenomenon rather than to the malignancy itself (Arends *et al.*, 2017a). Thus, it is mandatory to prevent wasting in cancer patients.

Cancer nutrition is complex because nutrients both feed healthy cells and tumour cells. The latter have greater needs for nutrients, notably, their uptake of essential amino acids (Norton *et al.*, 1980; Hagmüller *et al.*, 1995) exceeds those of the heathy cells. Consequently, with a normal diet, there is a high risk of inadequacy between nutrients availability and patient requirements for its metabolism, notably for muscle protein synthesis. Thus, the current clinical practice to compensate for the risk of undernutrition is to provide the patients with a high protein diet (Arends *et al.*, 2017a). However, little is known about the possible relation between a high protein diet and an increased tumour growth.

In a previous study, the effect of a range of protein load on muscle wasting and tumour growth of orally fed tumor-bearing rats undergoing chemotherapy was investigated (Boutière *et al.*, submitted). Results did not enable the establishments of any influence of protein intakes on these parameters. However, the rats suffered from a severe anorexia (due to chemotherapy) which did not enable to fit the nutritional goal in terms of proteins intakes, especially for the high protein diet groups. Second, the caloric:nitrogen ratios for the high protein groups were too low for an optimal nitrogen uptake (Arends *et al.*, 2017b). This is why, in this study, we decided to switch from oral to enteral nutrition with a continuous flow to better control the intakes. This mode of nutrition is closer to clinical practices as it is recommended by the guidelines from European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN)(Arends *et al.*, 2017b) and will prevent the anorexia which was observed previously. It allows us to find out whether higher energy and protein intakes affect the nutritional status and tumour growth of tumor-bearing rats undergoing chemotherapy and validate artificial nutrition for clinical practices.

137

Materials and Methods

Animals

All the procedures were registered as compliant with European Directives on animal care and use for research purposes (APAFIS#11492-2017112715178992), approved by the institutional animal care and use committee affiliated to the animal facility of the Grenoble Alpes University (B3842110001), and endorsed by the French Ministry of Research (9998_LBFA-U1055). Thirty-two female Fischer 344 rats (10 - 12 weeks old, 130-160 g, Charles Rivers, Lyon, France) housed for the 5-day acclimatization period at six per cage in a temperature-controlled facility ($22 \pm 2^{\circ}$ C) on a 12h light/dark cycle. The rats received a nutritionally complete diet (54% carbohydrates, 4.5% lipids, 18.5% proteins; 3430, Kliba Nafag, Switzerland) (Table 1) and were gradually shifted into reverse cycles 12h/12h in two days.Water and food were available ad libitum (Xue *et al.*, 2009; Breuillard *et al.*, 2021; Boutière *et al.*, submitted).

Experimental design

Groups and treatments

Rats were randomized into four groups (n=8 per group). The control (CTRL) group was healthy and fed *ad libitum*. The cancer + chemotherapy (CC) group had cancer + chemotherapy and was also orally fed *ad libitum*. The normo-protein and normo-energy enteral nutrition (EN-NEP) group had cancer + chemotherapy and was enterally fed with normo-protein / normoenergy nutrition through enteral nutrition (flow of 145 mL/kg BW/day; 14.5 g protein/kg BW/day; 290 kcal/kg BW/day). The high protein and high energy enteral nutrition (EN-HEP) group had cancer + chemotherapy and was artificially fed with hyper-protein / hyper-energy nutrition through enteral nutrition (flow of 181 mL/kg BW/day; 17.9 g protein/kg BW/day; 362 kcal/kg BW/day) (Figure 1).

Tumour

After acclimatization, animals from the CC, NE-NEP and NE-HEP groups were subcutaneously injected with pieces of non-necrotic Ward colon tumour (0.1 g) on the flank to be able to follow tumour growth (Figure 1). The Ward colorectal carcinoma was provided by Dr V.E. Baracos, Cross Cancer Institute, University of Alberta (Xue H *et al.*, 2009). Tumors were

measured in three dimensions with a calliper: the length (L), width (W), and height (H) (Xue *et al*, 2009; Breuillard *et al.*, 2021; Boutière *et al.*, submitted). Then, tumour size was calculated according to the following equation: tumour volume (cm3) = 0.5 x L (cm) x W (cm) x H (cm). Tumour volume was recorded every other day prior to initiation of chemotherapy, and daily after the 1st dose of chemotherapy was administered.

Surgical procedure for enteral nutrition

Eight days after tumour injection, rats from the EN-NEP and EN-HEP groups underwent a surgical procedure to be fed with a continuous flow of enteral nutrition (Figure 1). They were then anesthetized with isoflurane (3.2% of isoflurane for anesthesia and 1.6% during surgery; Minerve, Esternay, France), and gastrostomy was performed as previously described (Osowska *et al.*, 2004). Rats received a single intraperitoneal injection of an anti-inflammatory drug (Carprofen, Rimadyl[®], Pfizer) few minutes before the end of surgery. They were then given *ad libitum* access to food and water for a 5-day recovery period. Then, the rats were divided into 2 groups depending on the nutrition: EN-NEP and EN-HEP and were progressively (50% at D-2 and 75% at D-1) artificially fed to reach the targeted final flow.

Diets

Rats from CTRL and CC groups received the oral diet (see above) throughout the study. Rats from EN-NEP and EN-HEP groups received, 2 days before chemotherapy, the enteral nutrition the "2 kcal HP" from Fresubin[®] (Kriens, Switzerland) (Table 1) (Figure 1). It was the same nutrition for both enteral group, flow was changed to ensure that EN-NEP received the required intakes for stressed rats while the EN-HEP received 125% of these intakes, which correspond respectively to (14.5 g protein/kg BW/day; 290 kcal/kg BW/day) and (17.9 g protein/kg BW/day; 362 kcal/kg BW/day) (Loï *et al*, 2005).

Food intakes were measured daily and expressed relatively to rat body weight.

Chemotherapy

At D0, 15 days after the tumour implantation and 8 days after gastrostomia, the chemotherapy cycles started (Figure 1). One cycle of chemotherapy corresponded to an intraperitoneal injection of CPT-11 (50mg/kg; Camptosar[®] 128) at D0, and the day after, an intraperitoneal injection of 5-fluorouracil (50mg/kg; 5-FU, Accord[®]) (D1) (Xue *et al*, 2009;

Breuillard *et al.*, 2021; Boutière *et al.*, submitted). Fifteen minutes before each injection of CPT-11, the rats received an injection of atropine (1 mg/kg body weight, subcutaneous) to prevent and relieve early cholinergic symptoms (Breuillard *et al.*, 2021). One week after, they received a second cycle of chemotherapy (CPT-11 on D7 and 5-FU on D8).

From one week before starting chemotherapy cycles, body weight, food intake (to obtain caloric and protein intake) and tumour size were daily measured.

Body weight and tumour volume at D0 (just before the beginning of the chemotherapy) for each animal were considered the baseline values.

Euthanasia and sample collection

At D9, in fasted state (3h), rats were euthanized by beheadly 30 minutes after an injection of puromycin to measure protein synthesis.

Spleen, thymus, pancreas, heart, kidney, adrenal gland, plantaris, gastrocnemius, Extensor Digitorum Longus (EDL), soleus, skin, carcass, head, adipose tissues (subcutaneous, retroperitoneal, uro-genital, mesenteric and brown), colon and viscera were weighed. Liver, tumour, tibialis and jejunal and ileal mucosa were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen to be stored at -80°C for analysis.

Body composition was determined as follows: fat-free mass was the summed weights of the heart, kidney, pancreas, adrenal gland, liver, spleen, thymus, muscles, viscera, skin, head and carcass; fat mass was the weight of urogenital, retroperitoneal, mesenteric and subcutaneous adipose tissue.

Protein content measurement

Protein content of liver, tibialis, tumour and jejunal and ileal mucosa were determined. Between 80 and 120 mg of the frozen organs were grounded in 10 volumes of ice-cold 10% trichloroacetic acid with 0.64 mmol/L EDTA. After centrifugation (10min, 4000rpm, 4°C), the pellets were delipidated with acetone and solubilized in NaOH 1N. After an overnight at 40°C, the protein solution was diluted to 20 and total protein content was determined by using a BC Assay (the Protein Assay Kit, FT-40840A from Interchim). The measurements were performed on the ELX800 plate reader from Biotek.

140

Protein synthesis measurements

One hundred mg of frozen organs were homogenized at 30Hz (DTT 1mM, protease inhibitor 1X, phosphatase inhibitor 1X, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) using a ball extractor at 4°C. After centrifugation, the supernatant was collected and the total protein content was dosed using a BCA kit (the Protein Assay Kit, FT-40840A, Interchim). Then, the samples were standardized to 30µg of proteins per 10µL of solution by dilution with 3X Laemmli SDS buffer containing 30% 190 glycerol, 1 M Tris (pH 6.8), 20% (wt/vol) SDS, 0.1% (wt/vol) bromophenol blue, ddH20, and 2mM β-mercaptoethanol and heated for 10 min at 95°C. Proteins were loaded onto a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (20%) and transferred on a nitrocellulose membrane (AmershamTM Protran TM; GE Healthcare, Germany). Total proteins were revealed with Ponceau Red (SigmaAldrich). After incubation in blocking buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20, 5% non-fat skimmed milk powder), the membranes were incubated overnight at 4°C with the anti-puromycin antibody clone 12D10 (Millipore, Temecula, United States). The day after, the membranes were incubated with a secondary mice antibody (1:10 000 dilution, Jackson ImmunoResearch, LABORATORIES, Baltimore, Maryland, United States) during 1h. Immunoblots were visualized on ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Bukinghamshire, UK) using the enhanced chemiluminescence (ECL Prime TM Western Blotting Detection Reagents, Amersham). The image processing was conducted on the software ImageJ and consisted in quantifying stripes intensity on the membranes.

Statistical Analysis

Results are reported as means ± SEM. ANOVA was used. Normality and homogeneity of the variance were checked prior to ANOVA to compare the different groups. If the normality test (Shapiro-Wilk) failed (at p<0.05), the ANOVA was replaced by Kruskal-Wallis one-way analysis. Differences were considered statistically significant at a p-value < 0.05.

Results

Mortality

No animals "naturally" died from D0 to D9 in any of the groups. 4 rats from the EN-NEP group and 4 from the EN-HEP group were removed from the study due to technical problems (death during the surgical procedure, cut of the catheter, exit catheter from the stomach). One EN-HEP was killed because it had a tumour that exceeded the ethically acceptable size. These animals, losses explained the lower number of rats than expected at euthanasia. However, animals removed from the study before the end of the procedure were kept for statistical analysis of variable's evolution over time (Table 2).

Nutritional status

Body weight

At D0, animal weight was lower in EN-NEP and EN-HEP groups compared to CTRL and CC groups (Table 3). The weight of the rats of the CC group decreased between D0 and D2, then increased between D2 and D7 and decreased again between D7 and D9 to fall to 95% of initial body weight (Figure 2A). No weight loss was reported for rats fed with enteral nutrition (EN-NEP and EN-HEP). The difference in body weight between CTRL-group rats and CC-group rats was significant at D2, D3, D8 and D9, and there is no difference between the EN-NEP and EN-HEP groups and the CTRL group.

Caloric and protein intakes

Caloric and protein intakes decreased by half in CC group at D1 then increased progressively until D3 to reach the same level as the control group and decreased again at D8 (Figure 2B and 2C). As expected, caloric intakes of EN-NEP and EN-HEP groups staid the same throughout the study.

Cumulative caloric intake from D0 to D9 was lower in the CC group than in the 3 others groups (Figure 3D). Cumulative caloric intake of the EN-NEP group was similar to the CTRL group and this of the EN-HEP group was higher than the CTRL and the EN-NEP groups.

Cumulative protein intake from D0 to D9 was lower in the CC group than in the CTRL and EN-HEP groups (Figure 3E). Cumulative protein intake of the EN-HEP group was higher than the EN-NEP group.

Anthropometric data

CC rats showed a lower fat mass than CTRL rats (Table 3). EN-NEP rats showed decreased fatfree mass compared to CTRL and CC groups and decreased fat mass compared to CTRL group, and EN-HEP rats had the same fat-free mass and fat mass than the CTRL, CC and EN-NEP groups.

Concerning organ weights, only thymus, plantaris, brown adipose tissue, and each parts of the white adipose tissue were lower in the CC-group rats compared to CTRL-group rats. The weight of thymus, all muscles, brown adipose tissue, and each parts of the white adipose tissue were lower in the EN-NEP-group rats compared to CTRL-group rats. In the EN-HEP group, only thymus, EDL, plantaris, gastrocnemius were lower than CTRL-group.

Tissue protein content

Protein content in the tibialis, the liver and the jejunal and ileal mucosa were not different whatever the group (Table 4).

Tissue protein synthesis

There was no modification of protein synthesis whatever the treatment, the diet and the organ (Table 4).

Tumour-response to chemotherapy

Relative tumour size

At D0, the 3 groups had a similar mean tumour volume (*Data not shown*). Tumour size decreased in each group between D0 and D2 and between D7 and D8, i.e. during the two chemotherapy cycles (Figure 3). There was no difference in tumour size between the 3 groups.

Tumour weight

There was any group effect on final tumour weight (Table 5).

Tumour protein content and tumor protein synthesis

This two parameters were unaffected whatever the group considered (Table 5).

Discussion

The management of cancer patient is still largely discussed due to the versality of nutrition (preservation of nutritional status *vs* tumor growth). Many clinicians are still cautious concerning the use of enteral nutrition in these patients, especially with hyper-energy/hyper-protein diets.

In this study, we evaluated the effect of enteral nutrition and high protein intake on cachexia and tumour growth in a tumour-bearing rat model receiving chemotherapy to validate the use the current clinical practice. Our study is of interest because very few authors have investigated the effect of a high protein/high energy diet in a cancer and chemotherapy model on cachexia and tumour growth. And to the best of our knowledge, no study investigated the additional effect of enteral nutrition in such a model. This mode of nutrition was only studied in tumour-bearing rats without chemotherapy (Cameron *et al.*, 1979; Stallion *et al.*, 1994) receiving a parenteral nutrition formula through the stomach - or in other physio pathological conditions such as head injuries (Belabed *et al.*, 2006 ; Charrueau *et al.*, 2009), intestinal resection (Osowska *et al.*, 2004), endotoxemia (Loï *et al.*, 2005). Parenteral nutrition was more largely studied with clinical trials that reported improvements of patient nutritional status (Ma *et al.*, 2021; De Cicco *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1999; Shike *et al.*, 1984), but it is only recommended for advance cancer or when enteral nutrition is not possible.

Enteral nutrition: a well-tolerated mode of nutrition that prevents anorexia

In our model of enteral nutrition, an adequate standard nutritional support allowed the correct protein intake to be achieved, thus preventing chemotherapy induced anorexia. We faced some technical issues that reduced the number of euthanized rats for analysis – coat removed, and catheter eaten– but globally enteral feeding process was well tolerated by animals as only one rat experienced diarrhoea. This result is consistent with previous studies that did not report major intestinal disorders (Charrueau *et al*, 2009; Loï *et al.*, 2005). Apart from this incident, one enteral fed rat with hyper protein regime showed an extreme weight gain (20% body weight) explained by a heavy liver and adipose tissue hypertrophy. Stallion et *al* have already observed higher liver weight in enteral fed rats compared to orally fed rats with cancer but no chemotherapy (Stallion *et al.*, 1994). But in our study this rat was an isolated case that does not allow to draw any conclusion on a potential effect of enteral nutrition especially since we know that chemotherapy itself – especially 5-FU and CPT11 – is

likely to cause liver injuries (Gangi *et al.*, 2020). Finally, mortality was very low with only one enteral fed rat was left out from the study because of a nutrition leakage outside the stomach which caused animal death.

Enteral nutrition was a valid concept to prevent anorexia and thus increase food intakes in tumour-bearing rats undergoing chemotherapy.

Enteral nutrition does not increase tumour growth

One of the main concerns associated with enteral nutrition was the potential promotion of tumour growth. For the first time we showed that there was no major interaction between chemotherapy and nutritional support on tumour size evolution. Stallion et *al.*, also reported no effect of enteral nutrition (nor parenteral) on tumour weight in a model of rats undergoing cancer, but they did not include chemotherapy in their model, and they used a parenteral diet for enteral feeding (Stallion *et al.*, 1994).

Moreover, within enteral fed rats we also reported no effect of increased protein and energy intakes on tumour growth. This result was consistent with our previous work as we showed that either low or high protein intakes did not have any influence on the course of the disease (Boutière M *et al.*, soumis). In fact, it reinforces this previous finding as we have solved the problem of low calories:nitrogen ratio encountered in this latter study thanks to the enteral nutrition formula that we used. However, despite these first encouraging results, we cannot conclude on the effects of a high protein/high energy diet given by enteral nutrition on tumour growth at this point of this study, more animals are needed.

Enteral nutrition prevents body weight loss related to chemotherapy cycles

Not surprisingly we found that cancer associated to chemotherapy was responsible for a 5% body weight loss compared to the control at the end of the study. It is consistent with the 6% weight decreased reported usually in this model (Xue *et al.*, 2009; Breuillard *et al.*, 2021; Boutière *et al.*, submitted). Body weight loss was strongly correlated to reduction of food intake. Hence, it was of particular interest to study the effect of artificial nutrition, which allows to overcome anorexia.

Charrueau *et al.*, reported no effect of enteral nutritional on body weight loss in a model of rats with head injury induced cachexia (Charrueau *et al.*, 2009). In our study, the standard and hyper protein/hyper energy nutritional support gave mixed results, and the

small number of animals involved in the study does not allow to draw any conclusions about a potential effect of enteral nutrition and diet. Nevertheless, very interestingly, we found that restoring standard food intake with nutritional support allowed to prevent the sharp body weight losses concordant with chemotherapy cycles. This result is a relevant point for further studies around the preservation of body weight with enteral nutrition.

Enteral nutrition does not prevent cancer and chemotherapy induced fat loss

In accordance with previous findings (Boutière *et al.*, submitted), cancer + chemotherapy treatment was associated with a depletion of adipose tissue. More surprisingly, an adequate standard nutritional support (i.e 290 kcal/kg/day), covering the basal nutritional requirements of rats was not effective at preventing adipose tissue depletion. So, fat loss is not only due to a reduction of food intakes - but other mechanisms may also be involved. We previously showed that the respiratory quotient was lowered by chemotherapy and close to 0.7 indicating a reliance on fats for energy production in those rats (Boutière *et al.*, submitted). A standard nutrition diet would not allow to overcome chemotherapy effect on lipid metabolism alterations. Enteral nutrition combined with high protein/high energy intakes is a clinical practice which might alleviate fat loss, but still, the level of proof is too low in our study to draw firm conclusions. Avoiding adipose tissue depletion is of interest because this phenomenon has already been observed to predispose to muscle atrophy (Das *et al.*, 2011).

Surprisingly, enteral nutrition does not improved muscle mass. We may propose 2 hypothesis: 1) A malabsorption due to impairment of intestine, essentially due to chemotherapy (as illustrated by the decrease of plasma citrulline (CTRL = $80 \pm 4 \mu mol/L vs$ CC = $41 \pm 5 \mu mol/L$, p<0.05) in a previous study in our lab (Boutière *et al.*, submitted). Similar results was observed in head injury rats and in such pathology a semi enteral diet was efficient to restore nutritional status (Moinard *et al.*, 2013). However, such strategy remains to be tested in cancerous patients. 2) Inadequacy between nutritional intake and nutritional requirement leading to metabolic spillage. But the level of evidence is too low to give safe conclusions and further exploration are still required.

Limitations of the study and perspectives.

While enteral nutrition is promising to avoid body weight loss concordant with chemotherapy cycles without promoting tumour growth, we would need a larger number of rats to draw firm and safe conclusions. More particularly, a hyper protein/hyper energy diet combined with enteral nutrition was even likely to prevent fat loss, but the level of proof is too low. The concept of enteral nutrition being validated, further experiments will need to be performed to increase the strength of our findings.

Furthermore, we can wonder whether these results obtained from rats implanted with a Ward colon tumour can be extrapolated to all types of tumours. Maybe the study could be extended to other cancer types.

Conclusion

This was the first pioneering study to investigate enteral nutrition on a model of tumour-bearing rats undergoing chemotherapy. We validated our procedure as artificial nutrition was globally well tolerated by animals allowing to avoid chemotherapy induced anorexia. Moreover, the nutritional support allowed weight losses concordant to chemotherapy cycles to be avoided without promoting tumour growth. A standard enteral nutrition failed at preventing fat loss but a combination with a hyper protein/high energy diet needs to be further investigated to find out whether cachexia could be prevented in our model.

References

Arends, J., Baracos, V., Bertz, H., Bozzetti, F., Calder, P. C., Deutz, N., Erickson, N., Laviano, A., Lisanti, M. P., Lobo, D. N., McMillan, D. C., Muscaritoli, M., Ockenga, J., Pirlich, M., Strasser, F., de van der Schueren, M., Van Gossum, A., Vaupel, P., & Weimann, A. (2017). ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 36*(5), 1187–1196. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2017.06.017</u>

Arends, J., Bachmann, P., Baracos, V., Barthelemy, N., Bertz, H., Bozzetti, F., Fearon, K., Hütterer, E., Isenring, E., Kaasa, S., Krznaric, Z., Laird, B., Larsson, M., Laviano, A., Mühlebach, S., Muscaritoli, M., Oldervoll, L., Ravasco, P., Solheim, T., Strasser, F., ... Preiser, J. C. (2017). ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *36*(1), 11–48. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2016.07.015</u>

Belabed, L., Charrueau, C., Besson, V., Gupta, S., Walrand, S., Marchand-Verrecchia, C., Richon, S., Nafziger, J., Plotkine, M., Chaumeil, J. C., Cynober, L., & Moinard, C. (2006). Impairment of lymphocyte function in head-injured rats: effects of standard and immune-enhancing diets for enteral nutrition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 25*(5), 832–841. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2006.02.003</u>

Boutière, M., Cottet-Rousselle, C., Coppard, C., Couturier, K., Feart, C., Couchet, M., Corne, C., Moinard, C. & Breuillard. C. (Submitted). Protein Intake in Cancerology: Does it improve nutritional status and/or modify tumor response to chemotherapy?

Breuillard, C., Moinard, C., Goron, A., Neveux, N., De Reviers, A., Mazurak, V. C., Cynober, L., & Baracos, V. E. (2021). Dietary citrulline does not modify rat colon tumor response to chemotherapy, but failed to improve nutritional status. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 40(7), 4560–4568. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2021.05.035</u>

Cameron, I. L., Pavlat, W. A., Stevens, M. D., & Rogers, W. (1979). Tumor-host responses to various nutritional feeding procedures in rats. *The Journal of nutrition*, *109*(4), 671–684. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1093/jn/109.4.671</u>

Charrueau, C., Belabed, L., Besson, V., Chaumeil, J. C., Cynober, L., & Moinard, C. (2009). Metabolic response and nutritional support in traumatic brain injury: evidence for resistance to renutrition. *Journal of neurotrauma*, *26*(11), 1911–1920. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1089/neu.2008.0737</u>

Das, S. K., Eder, S., Schauer, S., Diwoky, C., Temmel, H., Guertl, B., Gorkiewicz, G., Tamilarasan, K. P., Kumari, P., Trauner, M., Zimmermann, R., Vesely, P., Haemmerle, G., Zechner, R., &

Hoefler, G. (2011). Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia.Science(NewYork,N.Y.),333(6039),233–238.https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1126/science.1198973

De Cicco, M., Panarello, G., Fantin, D., Veronesi, A., Pinto, A., Zagonel, V., Monfardini, S., & Testa, V. (1993). Parenteral nutrition in cancer patients receiving chemotherapy: effects on toxicity and nutritional status. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, *17*(6), 513–518. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1177/0148607193017006513</u>

Gangi, A., & Lu, S. C. (2020). Chemotherapy-associated liver injury in colorectal cancer. *Therapeutic advances in gastroenterology*, *13*, 1756284820924194. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1177/1756284820924194</u>

Hagmüller, E., Kollmar, H. B., Günther, H. J., Holm, E., & Trede, M. (1995). Protein metabolism in human colon carcinomas: in vivo investigations using a modified tracer technique with L-[1-13C]leucine. *Cancer research*, *55*(5), 1160–1167.

Jin, D., Phillips, M., & Byles, J. E. (1999). Effects of parenteral nutrition support and chemotherapy on the phasic composition of tumor cells in gastrointestinal cancer. *JPEN*. *Journal of parenteral and enteral nutrition*, *23*(4), 237–241. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1177/0148607199023004237</u>

Loï, C., Osowska, S., Neveux, N., Darquy, S., Cynober, L., & Moinard, C. (2005). Effects of an immune-enhancing diet in endotoxemic rats. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *21*(2), 255–263. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.nut.2004.05.021</u>

Ma, C. J., Huang, C. W., Yeh, Y. S., Tsai, H. L., Su, W. C., Chang, T. K., Sun, L. C., Shih, Y. L., Yu, F. J., Wu, D. C., & Wang, J. Y. (2021). Supplemental home parenteral nutrition improved nutrition status with comparable quality of life in malnourished unresectable/metastatic gastric cancer receiving salvage chemotherapy. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer, 29*(4), 1977–1988. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s00520-020-05687-4</u>

Martin, L., Senesse, P., Gioulbasanis, I., Antoun, S., Bozzetti, F., Deans, C., Strasser, F., Thoresen, L., Jagoe, R. T., Chasen, M., Lundholm, K., Bosaeus, I., Fearon, K. H., & Baracos, V. E. (2015). Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(1), 90–99. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1200/JCO.2014.56.1894 Osowska, S., Moinard, C., Neveux, N., Loï, C., & Cynober, L. (2004). Citrulline increases arginine pools and restores nitrogen balance after massive intestinal resection. *Gut*, *53*(12), 1781–1786. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1136/gut.2004.042317

Prado, C. M., Antoun, S., Sawyer, M. B., & Baracos, V. E. (2011). Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *14*(3), 250–254. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/MCO.0b013e3283455d45</u>

Prado, C. M., Antoun, S., Sawyer, M. B., & Baracos, V. E. (2011). Two faces of drug therapy in cancer: drug-related lean tissue loss and its adverse consequences to survival and toxicity. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *14*(3), 250–254. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/MCO.0b013e3283455d45</u>

Stallion, A., Foley-Nelson, T., Chance, W. T., Zhang, F. S., & Fischer, J. E. (1994). Parenteral vs enteral nutrition in tumor-bearing rats. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, *18*(2), 148–153. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1177/0148607194018002148</u>

Xue, H., Le Roy, S., Sawyer, M. B., Field, C. J., Dieleman, L. A., & Baracos, V. E. (2009). Single and combined supplementation of glutamine and n-3 polyunsaturated fatty acids on host tolerance and tumour response to 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin (CPT-11)/5-fluorouracil chemotherapy in rats bearing Ward colon tumour. *The British journal of nutrition*, *102*(3), 434–442. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1017/S0007114508199482</u>



Figure 1. Experimental design

Control healthy rat without chemotherapy were fed ad libitum (CTRL, n=8); tumour-bearing rats receiving chemotherapy were fed ad libitum (CC, n=8); tumour-bearing rats receiving chemotherapy were fed with normo-protein and normo-energy enteral nutrition (EN-NEP, n=8); tumour-bearing rats receiving chemotherapy were fed with high-protein and high-energy enteral nutrition (EN-HEP, n=8). The CC, EN-NEP and EN-HEP rats received a first chemotherapy cycle: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg; orange arrow) at D0, and 5- fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg; purple arrow) at D1, and a second cycle with CPT11 at D7 and 5-FU at D8. The rats were sacrificed at D9 for analysis.



(A) Relative body weight and (B) relative rood intake, and cumulative rood intake of rats. (A) Relative body weight and (B) relative caloric intake compared to the first day of chemotherapy for each animal, (C) protein intake (g of protein/kg rat BW/day), (D) cumulative caloric intake at D9 compared to Ct group, and (E) cumulative protein intake at D9. The rats received the chemotherapy cycle of irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0 and D7 (*orange arrow*) and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1 and D8 (*purple arrow*).

Results are expressed as mean ± SEM. Significant differences are reported as (A) * Cc vs Ct; # Cc vs EN-HEP; § EN-NEP vs EN-HEP; (B) * Cc vs Ct, EN-NEP, EN-HEP; (D) and (E) Mean values with unlike letters were significantly different.



Figure 3: Relative tumour size

Relative tumour size compared to the first day of chemotherapy for each animal. The rats received a first chemotherapy cycle of irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0 and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1, and a second cycle of chemotherapy (CPT-11) at D7 and (5-FU) at D8). Results are expressed as mean ± SEM.

Table 1. Diets compositions

(a) Wheat, barley, soybean meal (NGMO), wheat middlings, corn (NGMO), poultry meal, wheat starch, whey powder, soybean oil, oats, brewer's dried yeast, minerals, vitamins, amino acids.

(b) Water, glucose syrup, milk protein, vegetable oils (rapeseed, sunflower), medium chain triglycerides (MCT), maltodextrin, potassium citrate, fish oil, emulsifiers (soya lecithin, E 471), acidity regulator (E 507), potassium carbonate, sodium chloride, vit. C, sodium carbonate, magnesium oxide, iron sulfate, zinc sulfate, niacin, manganese chloride, pantothenic acid, copper sulfate, sodium fluoride, vit. B2, vit. B6, vit. B1, vit. A, ß-carotene, folic acid, chromium chloride, sodium molybdate, sodium selenite, potassium iodide, vit. K1, biotin, vit. D3, vit. B12. EN-NEP and EN-HEP groups received oral nutrition until 2 days before the start of the chemotherapy cycles.

Composition	Oral Nutrition (100g)	Enteral Nutrition (100mL)
Energy (<i>kcal</i>)	380	200
Lipids (g)	4.5	10
Saturated	0.59	3.15
Mono-unsaturated	0.92	5.23
Poly-unsaturated	2.22	1.62
Omega-3	0.229	0.46
Omega-6	1.99	1.08
Carbohydrates (g)	54.2	17.5
Sugar	4.45	2.54
Starch	35	-
Fibers (g)	4.5	0
Proteins (g)	18.5	10
Salt (g)	0.3	0.15
Water (<i>mL</i>)	12	72

Table 2. Survival monitoring of rats

Control rats received the oral diet and tumor-bearing rats received either the oral diet or the normo-energy and normo-protein enteral diet, or the high-energy and high-protein enteral diet. Two days after, the tumor-bearing rats received the first chemotherapy cycle: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, they received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). All rats were euthanized at D9.

	CTRL	CC	EN-NEP	EN-HEP
D0	n=8	n=8	n=4	n=6
D1	n=8	n=8	n=4	n=6
D2	n=8	n=8	n=4	n=6
D3	n=8	n=8	n=4	n=6
D4	n=8	n=8	n=4	n=5
D5	n=8	n=8	n=4	n=4
D6	n=8	n=8	n=4	n=4
D7	n=8	n=8	n=4	n=3
D8	n=8	n=8	n=4	n=3
D9	n=8	n=8	n=4	n=3

Table 3. Body and organs weights

Control rats received the oral diet (CTRL; n=8) and tumor-bearing rats received either the oral diet (CC; n=8) or the normo-energy and normo-protein enteral diet (EN-NEP, n=4), or the highenergy and high-protein enteral diet (EN-HEP, n=3). Two days after, the tumor-bearing rats received the first chemotherapy cycle: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, they received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). All rats were euthanized at D9.

Data are presented as mean \pm SEM. Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05). Significant differences are grey-backgrounded.

	CTRL	CC	EN-NEP	EN-HEP
Body Weight				
Initial (<i>g</i>) (D0)	140 ± 1ª	142 ± 1 ^a	126 ± 2 ^b	134 ± 1 ^b
Final (<i>g</i>) (D9)	142 ± 2 ^a	136 ± 2 ^{a,b}	123 ± 4 ^b	138 ± 10 ^{a,b}
Final (% as report to D0)	101.4 ± 1.0^{a}	94.9 ± 1.5 ^b	97.7 ± 3.1 ^{a,b}	102.7 ± 5.0 ^a
Fat Free Mass				
Organs (mg)				
Heart	416 ± 9	397 ± 7	396 ± 16	429 ± 17
Kidney	475 ± 12	491 ± 10	469 ± 13	505 ± 25
Pancreas	333 ± 17	290 ± 22	294 ± 51	287 ± 12
Adrenal gland	18 ± 1ª	21 ± 1 ^{a.c}	25 ± 1 ^b	$24 \pm 0.4^{b.c}$
Liver (g)	3.9 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.2	5.2 ± 1.1
Spleen	345 ± 10	404 ± 27	369 ± 32	514 ± 140
Thymus	227 ± 12 ^a	114 ± 20 ^b	81 ± 10^{b}	69 ± 10^{b}
Muscle (<i>mg)</i>				
EDL	62 ± 2 ^a	57 ± 1 ^{a.c}	49 ± 2 ^b	54 ± 2 ^{b.c}
Tibialis	259 ± 7ª	238 ± 6 ^a	196 ± 7 ^b	232 ± 5 ^{a.b}
Soleus	58 ± 2 ^{a.b}	60 ± 1ª	53 ± 0.1 ^b	58 ± 1 ^{a.b}
Plantaris	140 ± 3ª	135 ± 8 ^b	107 ± 6 ^b	123 ± 2 ^b
Gastrocnemius	703 ± 3 ^a	663 ± 17 ^{a.c}	556 ± 17 ^b	619 ± 11 ^{b.c}
Total Fat Free Mass (g)	124 ± 3 ª	117 ± 2ª	104 ± 2^{b}	115 ± 4 ^{a,b}
Adipose Tissue (g)				
Urogenital	2.8 ± 0.2^{a}	1.6 ± 0.2^{b}	1.1 ± 0.2^{b}	$1.9 \pm 0.4^{a.b}$
Retroperitoneal	0.7 ± 0.1^{a}	0.3 ± 0.1^{b}	0.2 ± 0.04^{b}	$0.6 \pm 0.2^{a.b}$
Subcutaneous	4.9 ± 0.5^{a}	2.8 ± 0.2^{b}	2.4 ± 0.3^{b}	$4.0 \pm 0.9^{a.b}$
Mesenteric	2.1 ± 0.2^{a}	1.3 ± 0.2^{b}	$1.5 \pm 0.1^{a.b}$	$2.0 \pm 0.3^{a.b}$
Total fat mass	10.4 ± 0.9^{a}	6.0 ± 0.6^{b}	5.2 ± 0.6^{b}	$8.6 \pm 1.8^{a.b}$
Brown	0.27 ± 0.02^{a}	0.17 ± 0.01^{b}	0.17 ± 0.027^{b}	$0.24 \pm 0.08^{a.b}$
Bowel (<i>mg</i>)				
10cm Jejunum mucosa	214 ± 19	198 ± 20	204 ± 49	181 ± 59
10cm Ileum mucosa	213 ± 25	183 ± 17	209 ± 42	156 ± 5
5cm Colon mucosa	94 ± 19	66 ± 6	108 ± 16	88 ± 15

Table 4: Protein metabolism

Control rats (CTRL; n=8) and tumor-bearing rats received either the oral diet (CC; n=8) or the normo-energy and normo-protein enteral diet (EN-NEP, n=4), or the high-energy and high-protein enteral diet (EN-HEP, n=3). Two days after, the tumor-bearing rats received the first chemotherapy cycle: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, they received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). They were euthanized at D9.

Data are presented as mean \pm SEM. Data in *italics* had no SEM (n=1).Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05).

	CTRL	CC	EN-NEP	EN-HEP
Tibialis				
Protein content				
mg	24.0 ± 2.9	24.6 ± 1.0	18.6 ± 2.5	26.0±1.6
Protein synthesis				
AU	0.25 ± 0.04	0.21 ± 0.09	0.38 ± 0.11	0.35
Liver				
Protein content				
mg	408 ± 20	457 ± 22	401 ± 24	500 ± 82
Protein synthesis				
AU	0.52 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.48 ± 0.06	0.37
Jejunal mucosa				
Protein content				
mg.10cm⁻¹	12.8 ± 1.8	12.0 ± 1.4	9.6 ± 2.9	10.7 ± 3.9
Protein synthesis				
AU	0.12 ± 0.06	0.37 ± 0.23	0.21 ± 0.08	0.29 ± 0.04
Ileal mucosa				
Protein content				
mg.10cm⁻¹	13.5 ± 1.8	10.2 ± 1.2	9.8 ± 2.0	8.2 ± 1.1
Protein synthesis				
AU	0.19 ± 0.07	0.05 ± 0.02	0.13 ± 0.05	0.12 ± 0.07

Table 5. Tumor-response to chemotherapy

Tumor-bearing rats received either the oral diet (CC; n=8) or the normo-energy and normoprotein enteral diet (EN-NEP, n=4), or the high-energy and high-protein enteral diet (EN-HEP, n=3). Two days after, they received the first chemotherapy cycle: irinotecan (CPT-11; 50 mg/kg) at D0, and 5-fluorouracil (5-FU; 50 mg/kg) at D1. One week after, they received the second cycle of chemotherapy (CPT-11 at D7 and 5-FU at D8). They were euthanized at D9. Data are presented as mean ± SEM. Values with different superscript letters are statistically different (p<0.05).

Tumor	СС	EN-NEP	EN-HEP
Weight (g)	3.0 ± 0.7	1.2 ± 0.3	3.6 ± 1.6
Protein content			
mg	162 ± 41	59 ± 9	201 ± 67
mg.g⁻¹ tissue	53 ± 3	52 ± 3	62 ± 7
Protein synthesis			
AU	0.06 ± 0.04	0.27 ± 0.13	0.07 ± 0.05

DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis plusieurs années, l'étude des facteurs pouvant altérer ou favoriser le développement des tumeurs et interagir avec l'efficacité des traitements a augmenté. Le phénomène de cachexie a été de plus en plus cité, et les études portent généralement sur deux axes :

Est-ce que la modulation de l'apport nutritionnel (notamment en protéines) chez les patients peut limiter la dénutrition et quels seraient les impacts sur la croissance tumorale ?

Quels sont les mécanismes observés lors de la cachexie qui conduisent aux perturbations métaboliques présentes au cours de ce phénomène ?

Sur le premier axe, nos travaux sont partis du postulat que l'apport protéique pourrait permettre de préserver la masse maigre. Mais les données chez les patients cancéreux ne permettent pas d'apporter des conclusions significatives (Prado et al., 2020). D'un point de vue conceptuel, l'augmentation de l'apport protéique pourrait favoriser la croissance tumorale, étant donné que les cellules tumorales ont un fort turnover protéique et donc un besoin élevé en acides aminés (Li et al., 2016). De plus, les cellules cancéreuses ne sont pas les seules à avoir un fort besoin en acides aminés, les cellules du système immunitaire en ont également besoin (Holeček, 2022), et sont la première ligne de défense pour combattre la croissance tumorale. Ces recherches ne sont pas envisageables chez l'Homme (on ne peut pas priver un patient d'apports alimentaires pour des raisons éthiques). Différentes études expérimentales ont montré que l'utilisation de régimes plus faibles en protéines (des diminutions de 12%, 25% et 40% par rapport aux contrôles) dans des modèles précliniques réduisait la croissance tumorale en diminuant l'immunosurveillance de la tumeur (Rubio-Patiño et al., 2018) et en diminuant l'activation de la voie mTOR impliquée dans la synthèse protéique (Fontana et al., 2013). Mais ces études ont été menées sur des modèles uniquement cancéreux sans l'intervention de traitements (que ce soit la chimiothérapie ou autres). Or il a été mis en avant que lors d'un cancer, les patients ont une plus faible tolérance à la chimiothérapie lorsque qu'ils sont dénutris (Andreyev et al., 1998; Swenerton et al., 1979; Person et al., 2002), et la chimiothérapie peut contribuer au développement de la cachexie et à la perte musculaire, entrainant des complications supplémentaires et l'augmentation de la morbi-mortalité (Bozzetti, 2017). De plus, beaucoup de modèles utilisés dans la littérature sont parfois un peu caricaturaux sur le plan métabolique. En effet, il y a généralement un développement tumoral extrêmement rapide, et dont la taille est disproportionnée par rapport à ce qui est observé chez l'Homme. Par ailleurs, ces modèles présentent une cachexie extrême et peu comparable à ce qui est classiquement observé chez l'Homme. Nous avons décidé d'utiliser un modèle validé par l'équipe du professeur Baracos à Edmonton (Canada) qui combine le cancer et la chimiothérapie pour être au plus proche de la réalité clinique. Il nous a permis d'évaluer de manière la plus précise possible les effets de l'apport protéique sur la croissance tumorale et le phénomène de cachexie.

La modulation de l'apport en protéines n'a eu aucun effet sur le statut nutritionnel. Ce résultat peut sembler surprenant et se pose alors la question de l'extrapolation clinique. En effet, comme mentionné plus haut, en pratique on ne peut pas priver le patient cancéreux d'un apport en protéines, et les données disponibles sur ces effets sont peu nombreuses, avec dans la grande majorité des cas des régimes hyper-protéiques et hyper-énergétiques. Or dans notre étude, pour individualiser l'effet de l'apport protéique, le choix a été fait que tous les régimes soient iso-énergétiques. Ceci entraîne une balance calorico-azotée trop faible pour nos groupes hyper-protéiques, bien en dessous des recommandations (Arends et al., 2017). Ainsi nous pouvons postuler sur le fait que les régimes hypo-protéiques n'ont aucun effet sur le statut nutritionnel dans notre modèle, en revanche pour les régimes hyper-protéiques nous ne pouvons pas conclure. Des études supplémentaires sont nécessaires, notamment en utilisant des régimes hyper-protéiques et hyper-énergétiques. Pour expliquer l'absence d'effet sur le statut nutritionnel, une deuxième hypothèse peut-être émise : l'apport protéique supplémentaire ne couvre pas les besoins en acides aminés spécifiques. Comme nous l'avons vu dans l'étude 1, certains profils en acides aminés sont impactés par la présence du cancer et de la chimiothérapie, mais l'augmentation de l'apport protéique ne permet pas de restaurer ces taux en acides aminés, comme discuté par Van der Meij et al. (Van der Meij et al., 2019). Une telle hypothèse est confortée par nos résultats sur l'exploration immunitaire que nous avons réalisée. Les cellules du système immunitaire sont des cellules à renouvellement rapide, et une privation d'apports alimentaires entraîne une diminution des fonctions immunitaires (Walrand et al., 2001). Nous avons observé des altérations dues au cancer et à la chimiothérapie (comme une diminution des monocytes et des cellules dendritiques), et l'apport protéique n'a pas eu d'effet pour compenser ces diminutions. Ceci suggère que le problème pourrait ne pas être lié à la quantité de protéines apportée mais à leur qualité (*i.e* composition en acides aminés), qui mènerait au développement de supports nutritionnels personnalisés comme il a été proposé par Berard *et al.* (2002) dans une étude sur les patients chirurgicaux. De plus, le métabolisme des nutriments est détourné individuellement ou systématiquement en fonction du stade de la maladie, de la localisation de la tumeur, entrainant une hétérogénéité métabolique et augmentant les risques de résistances aux traitements. Ainsi un régime alimentaire spécifique sur mesure basé sur la spécificité métabolique de chaque patient aiderait à diminuer la résistance aux traitements ainsi que les effets indésirables (Qian *et al.*, 2021). Toutefois, il faudra prendre en compte, comme le souligne de Campos-Ferraz *et al.*, l'évaluation de la tolérance des supplémentations à moyen et long terme en plus de la recherche des effets bénéfiques sur l'état nutritionnel (de Campos-Ferraz *et al.*, 2014). A cet égard, on peut citer les *Immune Enhancing Diets* (concept développé par Alexander). Si les résultats sont certes encourageants, leur implication dans une surmortallité au cours des sepsis a suscité de nombreux débats (Cynober *et al.*, 2012 ; Heyland *et al.*, 2001).

Il était important de tester les régimes sur la croissance tumorale, en effet, les recommandations de groupes d'experts mentionnent que « *les arguments théoriques supposant que les nutriments nourrissent la tumeur ne sont pas supportés ou reliés à des résultats cliniques et ne doivent pas être utilisés pour refuser, diminuer, ou stopper l'alimentation* » (Arends *et al.*, 2017). Il y a très peu d'études sur le rôle du régime protéique sur la croissance tumorale, et la majorité utilise des régimes hypo-protéiques, montrant que de tels régimes diminuent la croissance tumorale (Rubio-Patiño *et al.*, 2018; Fontana *et al.*, 2013). Dans notre modèle, les régimes hyper-protéiques et hypo-protéiques n'ont eu aucun effet sur la croissance tumorale. La différence avec les études citées précédemment est que les animaux ne recevaient aucun traitement. L'effet observé dans ces études (la diminution de la croissance tumorale avec un régime faible en protéines) pourrait être mineur comparé à l'effet de la chimiothérapie dans notre modèle, ce qui pourrait être une explication à l'absence d'effet sur la croissance tumorale dans notre étude. Quoi qu'il en soit, notre travail est le premier à montrer, dans un modèle réaliste de cancer + chimiothérapie, que la modulation de l'apport protéique est sans influence sur la croissance tumorale.

Au terme de ce travail, nous pouvons voir deux perspectives :

1) Mieux comprendre les mécanismes physio-pathologiques sous-jascents et pouvant d'une part, contribuer au développement de la cachéxie cancéreuse, et d'autre part, favoriser la résistance à la renutrition.

162

2) Continuer à réfléchir au développement de nouvelles stratégies de prise en charge nutritionnelle.

Nous avons observé une perte importante de la masse maigre (de 8%) mais également de la masse grasse (de 56%). Différentes études (voir revue Argilés *et al.*, 2014) suggèrent un dérèglement du métabolisme énergétique pouvant expliquer cette cachexie mais également la résistance à la renutrition de celle-ci.

La première perspective nous a mené à l'étude numéro 2 de ce projet pour étudier les perturbations du métabolisme énergétique observées pendant la cachexie, en utilisant une approche translationnelle pour distinguer les effets du cancer, de la chimiothérapie et des deux associés dans notre modèle, au niveau d'abord du corps entier, puis au niveau cellulaire afin de préciser les mécanismes impliqués dans ce phénomène.

La première donnée fournie par l'étude numéro 2 est un déséquilibre entre l'énergie apportée (par l'alimentation) et celle qui est dépensée par les animaux, conduisant à un crash de la balance énergétique en présence de la chimiothérapie seule et associée au cancer. Lors de l'étude numéro 1 nous avons observé une anorexie chez nos animaux (qui n'était pas modifiée par l'utilisation des différents apports protéiques) et que nous retrouvons dans la deuxième étude. Normalement lorsque l'apport énergétique diminue, la dépense énergétique diminue aussi. Or l'étude numéro 2 a montré que nos animaux ont une dépense énergétique qui n'est pas fortement diminuée, renforçant l'hypothèse de l'intervention de perturbations métaboliques. Pour renforcer ce point, nous pouvons mettre en avant le *turnover* protéique au niveau des muscles, qui en situation de jeûne ou de dénutrition, entraîne la réduction de la synthèse protéique (Le Plénier et al., 2017). De plus, le coût de cette synthèse protéique est de l'ordre de 40% de la dépense énergétique (Goron et al., 2019), ce qui pourrait expliquer que dans notre modèle la dépense énergétique ne varie pas. Il est observé en situation clinique que la dépense énergétique est un facteur important dans le développement et l'aggravation de la malnutrition chez les patients (Tisdale, 2002). Ceci peut conduire à une perte de la masse grasse en présence de chimiothérapie comme il a été observé dans une étude avec le même modèle (Ebadi et al., 2017), ou vu généralement chez les patients cancéreux cachectiques (Argilés et al., 2014). Une perte rapide du tissu graisseux est associée à un taux de survie plus faible, une diminution de la qualité de vie, et une augmentation de la résistance aux traitements (Murphy et al., 2010). Deux possibilités pour expliquer la fonte de

163

la masse grasse sont envisageables : soit les animaux avaient une plus grande activité physique (peu probable et que l'on a pu infirmer grâce au système de vidéo tracking). Ou alors les substrats utilisés pour fournir l'ATP étaient modifiés entre nos animaux contrôles et cancers vs ceux recevant de la chimiothérapie pour couvrir les besoins énergétiques alors que la dépense énergétique est maintenue. Nos résultats rejoignent ceux observés dans d'autres modèles précliniques ou chez l'Homme (Del Rio et al., 2002 ; Hirsch et al., 2017 ; Ooi et al., 2021), où un quotient respiratoire compris entre 0,7 et 0,8 correspond à l'oxydation de substrats lipidiques, alors qu'un quotient respiratoire aux alentours de 1 correspond à l'oxydation de substrats glucidiques. Nous sommes ainsi dans une situation de déséquilibre entre deux phénomènes. Soit le flux d'acides gras libéré par le tissu adipeux augmente (ce qui n'est pas le cas dans notre modèle) soit la consommation de lipides via la β -oxydation par les organes nécessitant de forts apports énergétiques, le muscle et le foie (deux sites avec un turnover protéique essentiel), augmente. Dans notre modèle c'est le foie qui a vu sa ßoxydation augmenter, tout comme l'activité mitochondriale qui a été impactée au niveau hépatique mais pas au niveau musculaire. Ces résultats diffèrent d'une grande majorité des études sur le sujet, où des altérations des mitochondries au niveau musculaire ont été observées. Mais même dans les études où une modification au niveau du muscle a été observée les paramètres modifiées divergent selon les études (Julienne et al., 2012; Constantinou et al., 2011; Tzika et al., 2013). Toutefois, une étude dans un modèle uniquement cancéreux a observé une diminution de la densité mitochondriale au niveau hépatique, suggérant que la cachexie, qu'elle soit d'origine cancéreuse ou mitochondriale, impacte cette densité mitochondriale au niveau du foie (Dumas et al., 2003).

Par la suite, nous avons voulu étudier l'implication du 5-FU et du CPT-11 sur le métabolisme énergétique. Pour cela, le modèle animal n'était pas suffisant, c'est pourquoi nous sommes passés à un modèle *in vitro*, pour étudier les effets sur les cellules hépatocytaires. In *vitro*, nos résultats ont confirmé que la chimiothérapie altère le statut énergétique avec une diminution du ratio ATP/ADP, ainsi que le fonctionnement et la morphologie des mitochondries, renforçant les résultats présents dans la littérature (Ebadi *et al.*, 2017 ; Mahli *et al.*, 2018).

L'hypothèse émise pour expliquer, au niveau cellulaire, l'augmentation de l'oxydation des lipides est une modification sur les membranes associées aux mitochondries du réticulum endoplasmique (MAMs). Les MAMs sont connues pour avoir un rôle dans le métabolisme hépatique et dans la morphologie des mitochondries (Csordas et al., 2006; Doghman-Bouguerra et al., 2019). Nous observons dans l'étude numéro 2 que les MAMs augmentent en présence de la chimiothérapie, suggérant une association entre les deux qui entraînerait par la suite les modifications du métabolisme énergétique. L'étude de Ebadi et al. (2014) a proposé une autre explication à cette fonte du tissu adipeux : des altérations de la fonction mitochondriale du tissu adipeux et des voies métaboliques lipidiques annexes pourraient être associées à une altération de la capacité de stockage des lipides. Cela entraînerait une accumulation de graisse dans les tissus périphériques et, par conséquent, augmenterait le dérèglement du métabolisme des lipides et du glucose de l'organisme entier. Avec l'hypothèse que les diminutions de l'expression des protéines impliquées dans la fonction mitochondriale, la lipogenèse et la β-oxydation soient une conséquence du traitement par chimiothérapie, d'où l'importance de recherches futures pour plus de détails. Cette étude numéro 2 nous a donc permis d'explorer l'implication du cancer et de la chimiothérapie dans la fonte de la masse grasse (et que cela n'est pas seulement dû à une diminution de la prise alimentaire) observée lors de la première étude, au cours de laquelle on avait également mis en évidence que les apports protéiques n'étaient pas parfaitement atteints en raison de l'anorexie provoquée par les cycles de chimiothérapie. C'est pourquoi nous avons proposé d'adapter un modèle de nutrition entérale à notre modèle de cancer et de chimiothérapie pour normaliser et atteindre les objectifs nutritionnels et énergétiques.

A notre connaissance, aucune étude n'avait exploré l'impact de la nutrition entérale dans un modèle préclinique associant le cancer et la chimiothérapie. En effet la grande majorité des études se rapprochant de cet objectif ont été faites dans des modèles cancéreux uniquement, sans traitements (Cameron *et al.*, 1979; Stallion *et al.*, 1994), et au niveau clinique, avec un mode de nutrition non pas entérale mais parentérale dans la majorité des cas, alors que ce mode est recommandé pour les cancers avancés ou lorsque la nutrition entérale n'est pas possible (la nutrition entérale étant préférée lorsque cela est possible (Muscaritoli *et al.*, 2021)). Une des premières questions sur les effets de l'utilisation de la nutrition entérale concerne l'action que cela peut avoir sur la croissance tumorale. Dans notre modèle l'utilisation d'une nutrition hyper-protéique et hyper-énergétique n'a eu aucune influence sur la croissance tumorale, comparée à une nutrition entérale normo-protéique et normo-énergétique, ou encore comparée aux animaux nourris de manière orale, ce qui renforce les résultats de la première étude (où la modulation protéique mais iso-énergétique n'avait eu aucun effet sur la tumeur) car cette fois ci le rapport calorico-azoté a été atteint. Toutefois ces résultats nécessitent des études complémentaires pour augmenter le nombre d'animaux dans l'étude.

Le poids corporel étant en corrélation avec la prise protéique, il était important d'étudier si la nutrition entérale pourrait réduire la perte de poids dans notre modèle au moment des cycles de chimiothérapie. De manière intéressante, nous avons observé que maintenir l'apport alimentaire pendant la chimiothérapie *via* la nutrition artificielle permettait de prévenir la perte de poids que nous avons observé lors de l'étude 1. Ce résultat est un point intéressant, il nécessite des études complémentaires pour vraiment le confirmer de manière significative dans notre modèle. Si dans le futur ce résultat est confirmé, la question de l'efficacité de l'apport protéique et énergétique devra être prise en compte. En effet, dans les recommandations de l'ESPEN, il est recommandé d'avoir un apport protéique de 1 à 1,5 g/kg/jour (Muscaritoli *et al.*, 2021) comme chez les individus sains. Or dans notre modèle, il a fallu un apport bien supérieur à celui de nos contrôles pour réussir à conserver un poids corporel stable, ainsi avoir un apport trop faible en protéines et en énergie pourrait ne pas avoir l'effet attendu sur l'évolution du poids lors de la chimiothérapie.

La perte de masse grasse observée dans les deux premières études, n'a pas pu être compensée par la nutrition entérale avec le régime normo-protéique et normo-énergétique comblant les besoins nutritionnels standards chez le rat (290 kcal/kg/jour). Cette observation conforte nos conclusions de la seconde étude : la perte de masse grasse n'est pas seulement provoquée par une diminution de la prise alimentaire, mais par des mécanismes annexes. L'effet du régime hyper-protéique et hyper-énergétique sur la masse grasse devra être approfondi dans des études futures, pour apporter des preuves complémentaires et solides. Contrairement aux deux premières études, la masse musculaire a diminué dans nos groupes sous nutrition entérale (sans conséquence d'un régime plus ou moins riche en protéines et en énergie) et notre groupe Cancer+Chimiothérapie sous nutrition orale a montré les mêmes résultats que ceux observées dans les deux autres études, suggérant que la diminution dans les groupes sous nutrition entérale serait plutôt provoquée par l'acte chirurgical, et non par un effet néfaste de la nutrition entérale.

Cette troisième étude nécessite des expérimentations supplémentaires pour pouvoir émettre des conclusions sûres et percutantes. Toutefois, cela a permis de valider le modèle au sein du laboratoire, la nutrition entérale étant bien tolérée par les rats, et prévenant

166

l'anorexie lors des cycles de chimiothérapie. Malgré les problèmes techniques tels que les animaux qui mangeaient ou enlevaient leurs dispositifs de nutrition entérale, la grande majorité n'a pas eu de symptômes de diarrhée (seulement un a présenté des signes pendant moins de 24h) ce qui concorde avec des études précédentes qui n'avaient pas observé de troubles intestinaux chez les animaux (Charrueau *et al.*, 2009 ; Loï *et al.*, 2005). Ainsi cette étude a permis de valider le concept de nutrition entérale pour prévenir l'anorexie liée à la chimiothérapie dans notre modèle. Par ailleurs, si nous observons que la nutrition entérale et l'apport protéique et énergétique dans notre modèle semble sans impact sur la croissance tumorale, son intérêt et son impact sur le plan nutritionnel sont encore à améliorer.
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, ces travaux nous ont permis d'approcher deux aspects présents dans les projets de recherche sur la cachexie en présence de cancer et de chimiothérapie. Tout d'abord, l'impact d'un apport protéique *in vivo* de manière orale a montré que les différents apports (qu'ils soient plus faibles ou plus élevés) n'ont eu aucun impact sur la croissance tumorale, la réponse du système immunitaire ou le statut nutritionnel des animaux. La limite de ce modèle, causée par la chimiothérapie, provoquant une anorexie au moment des cycles de chimiothérapie et conduisant à une prise protéique plus faible que les besoins nutritionnels des animaux (Étude 1). Ceci a pu être supporté par la mise en place de la nutrition artificielle. Ces travaux ont permis de mettre au point le modèle d'étude associant la nutrition entérale à un modèle combinant à la fois le cancer et la chimiothérapie. C'est à notre connaissance la première étude pour étudier l'effet de la nutrition entérale chez un modèle de cancer associant la chimiothérapie. Nous avons mis en avant que la nutrition artificielle était bien tolérée par les animaux et que l'utilisation d'un régime riche en énergie et en protéines permettait de prévenir l'anorexie induite par la chimiothérapie, ceci sans impacter la croissance tumorale (Étude 3). Les bénéfices nutritionnels sont encore à préciser.

Le deuxième axe de ce travail portant sur les perturbations du métabolisme énergétique dans notre modèle et l'implication séparée ou conjointe du cancer et de la chimiothérapie, a permis d'identifier la chimiothérapie comme responsable des perturbations dans notre modèle avec une diminution de la masse grasse, et nous a permis d'émettre l'hypothèse avec l'analyse in *vitro* que les membranes mitochondriales associées au réticulum endoplasmique (MAMs) pouvaient être à l'origine de ces perturbations (Étude 2). Ces résultats doivent permettre de réfléchir à de nouvelles stratégies nutritionnelles et/ou pharmacologiques qui pourraient interagir avec les MAMs pour les diminuer.

Malgré ces résultats, des points restent à approfondir :

L'effet de l'apport protéique par nutrition orale et entérale, ces travaux doivent être menés dans d'autres modèles précliniques associant le cancer et la chimiothérapie pour pouvoir proposer de solides recommandations en s'appuyant sur des données expérimentales représentatives pour se rapprocher au maximum de ce qui peut être interprété en clinique, et refléter au mieux le paysage très diversifié de l'oncométabolisme.

Les mécanismes d'actions in *vitro* par lesquels la chimiothérapie induit dans notre modèle une modification des membranes mitochondriales associées au réticulum

169

endoplasmique en entrainant, après une succession de processus métaboliques, la perte du tissu adipeux.

Le modèle de nutrition entérale combiné au modèle de cancer + chimiothérapie ayant été validé, des expérimentations complémentaires sont nécessaire pour réellement évaluer l'impact de la nutrition entérale hyper-énergétique et hyper-protéique sur la prévention de la perte de la masse grasse ainsi que sur la synthèse et le contenu protéique, afin d'augmenter l'impact et la force de ces résultats.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aaldriks, A. A., Van der Geest, L. G., Giltay, E. J., le Cessie, S., Portielje, J. E., Tanis, B. C., Nortier, J. W., & Maartense, E. (2013). Frailty and malnutrition predictive of mortality risk in older patients with advanced colorectal cancer receiving chemotherapy. *Journal of geriatric oncology*, *4*(3),218–226. <u>https://doi-org/10.1016/j.jgo.2013.04.001</u>

André, T., Boni, C., Navarro, M., Tabernero, J., Hickish, T., Topham, C., Bonetti, A., Clingan, P., Bridgewater, J., Rivera, F., & de Gramont, A. (2009). Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 27*(19), 3109–3116. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.6771

Andreyev, H. J., Norman, A. R., Oates, J., & Cunningham, D. (1998). Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies?. *European journal of cancer* (*Oxford, England : 1990*), *34*(4), 503–509. <u>https://doi.org/10.1016/s0959-8049(97)10090-9</u>

Anker, M. S., Holcomb, R., Muscaritoli, M., von Haehling, S., Haverkamp, W., Jatoi, A., Morley, J. E., Strasser, F., Landmesser, U., Coats, A., & Anker, S. D. (2019). Orphan disease status of cancer cachexia in the USA and in the European Union: a systematic review. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 10*(1), 22–34. https://doi.org/10.1002/jcsm.12402

Arends, J., Baracos, V., Bertz, H., Bozzetti, F., Calder, P. C., Deutz, N., Erickson, N., Laviano, A., Lisanti, M. P., Lobo, D. N., McMillan, D. C., Muscaritoli, M., Ockenga, J., Pirlich, M., Strasser, F., de van der Schueren, M., Van Gossum, A., Vaupel, P., & Weimann, A. (2017). ESPEN expert group recommendations for action against cancer-related malnutrition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *36*(5), 1187–1196. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.06.017

Arends, J., Bachmann, P., Baracos, V., Barthelemy, N., Bertz, H., Bozzetti, F., Fearon, K., Hütterer, E., Isenring, E., Kaasa, S., Krznaric, Z., Laird, B., Larsson, M., Laviano, A., Mühlebach, S., Muscaritoli, M., Oldervoll, L., Ravasco, P., Solheim, T., Strasser, F., ... Preiser, J. C. (2017). ESPEN guidelines on nutrition in cancer patients. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *36*(1), 11–48. <u>https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.07.015</u>

Argilés, J. M., Busquets, S., Stemmler, B., & López-Soriano, F. J. (2014). Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nature reviews. Cancer*, *14*(11), 754–762. <u>https://doi.org/10.1038/nrc3829</u>

Argilés, J. M., Fontes-Oliveira, C. C., Toledo, M., López-Soriano, F. J., & Busquets, S. (2014). Cachexia: a problem of energetic inefficiency. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 5*(4), 279–286. https://doi.org/10.1007/s13539-014-0154-x

Argilés, J. M., & López-Soriano, F. J. (1996). The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states. *Trends in pharmacological sciences*, 17(6), 223–226. <u>https://doi.org/10.1016/0165-6147(96)10021-3</u>

Argilés, J. M., López-Soriano, F. J., & Busquets, S. (2015). Muscle wasting in cancer: the role of mitochondria. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, *18*(3), 221–225. <u>https://doi.org/10.1097/MCO.00000000000164</u>

Argilés, J. M., López-Soriano, F. J., & Busquets, S. (2019). Mediators of cachexia in cancer patients. Nutrition(Burbank,LosAngelesCounty,Calif.),66,11–15.https://doi-11-15.

Α

org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.nut.2019.03.012

Armand, J. P., Ducreux, M., Mahjoubi, M., Abigerges, D., Bugat, R., Chabot, G., Herait, P., de Forni, M., & Rougier, P. (1995). CPT-11 (irinotecan) in the treatment of colorectal cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *31A*(7-8), 1283–1287. <u>https://doi.org/10.1016/0959-8049(95)00212-2</u>

Arnold, M., & Soerjomataram, I. (2019). Global chemotherapy demands: a prelude to equal access. *The Lancet. Oncology*, *20*(6), 742–743. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30284-0

Arthur, S. T., Noone, J. M., Van Doren, B. A., Roy, D., & Blanchette, C. M. (2014). One-year prevalence, comorbidities and cost of cachexia-related inpatient admissions in the USA. *Drugs in context*, *3*, 212265. https://doi.org/10.7573/dic.212265

В

Bailly C. (2019). Irinotecan: 25 years of cancer treatment. *Pharmacological research*, *148*, 104398. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104398

Ballarò, R., Costelli, P., & Penna, F. (2016). Animal models for cancer cachexia. *Current opinion in supportive and palliative care*, *10*(4), 281–287. https://doi.org/10.1097/SPC.00000000000233

Baracos, V. E., DeVivo, C., Hoyle, D. H., & Goldberg, A. L. (1995). Activation of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *The American journal of physiology*, *268*(5 Pt 1), E996–E1006. <u>https://doi.org/10.1152/ajpendo.1995.268.5.E996</u>

Baracos, V. E., and T. Le Bricon. (2000). Animal Models for Nutrition in Cancer. *Cancer and Nutrition* 4: 167–82. https://doi.org/10.1159/000061827.

Baracos, V. E., & Mackenzie, M. L. (2006). Investigations of branched-chain amino acids and their metabolites in animal models of cancer. *The Journal of nutrition*, *136*(1 Suppl), 237S–42S. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1093/jn/136.1.237S</u>

Baracos, V., & Kazemi-Bajestani, S. M. (2013). Clinical outcomes related to muscle mass in humans with cancer and catabolic illnesses. *The international journal of biochemistry & cell biology*, *45*(10), 2302–2308. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.biocel.2013.06.016</u>

Barreto, R., Waning, D. L., Gao, H., Liu, Y., Zimmers, T. A., & Bonetto, A. (2016). Chemotherapy-related cachexia is associated with mitochondrial depletion and the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs. *Oncotarget*, 7(28), 43442–43460. <u>https://doi.org/10.18632/oncotarget.9779</u>

Beck, S. A., & Tisdale, M. J. (1989). Nitrogen excretion in cancer cachexia and its modification by a high fat diet in mice. *Cancer research*, *49*(14), 3800–3804.

Beluzi, M., Peres, S. B., Henriques, F. S., Sertié, R. A., Franco, F. O., Santos, K. B., Knobl, P., Andreotti, S., Shida, C. S., Neves, R. X., Farmer, S. R., Seelaender, M., Lima, F. B., & Batista, M. L., Jr (2015). Pioglitazone treatment increases survival and prevents body weight loss in tumor-bearing animals: possible anti-cachectic effect. *PloS one*, *10*(3), e0122660. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122660

Bérard, M. P., Pelletier, A., Ollivier, J. M., Gentil, B., & Cynober, L. (2002). Qualitative manipulation of amino acid supply during total parenteral nutrition in surgical patients. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*,

26(2), 136–143. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1177/0148607102026002136

Berk, L., James, J., Schwartz, A., Hug, E., Mahadevan, A., Samuels, M., Kachnic, L., & RTOG (2008). A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a beta-hydroxyl beta-methyl butyrate, glutamine, and arginine mixture for the treatment of cancer cachexia (RTOG 0122). *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, *16*(10), 1179–1188. <u>https://doi.org/10.1007/s00520-008-0403-7</u>

Bezuidenhout, N., & Shoshan, M. (2019). A Shifty Target: Tumor-Initiating Cells and Their Metabolism. *International journal of molecular sciences*, *20*(21), 5370. <u>https://doi.org/10.3390/ijms20215370</u>

Bosaeus, I., Daneryd, P., Svanberg, E., & Lundholm, K. (2001). Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *International journal of cancer*, *93*(3), 380–383. https://doi.org/10.1002/ijc.1332

Bozzetti F. (2017). Forcing the vicious circle: sarcopenia increases toxicity, decreases response to chemotherapy and worsens with chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(9), 2107–2118. <u>https://doi.org/10.1093/annonc/mdx271</u>

Breuillard, C., Moinard, C., Goron, A., Neveux, N., De Reviers, A., Mazurak, V. C., Cynober, L., & Baracos, V. E. (2021). Dietary citrulline does not modify rat colon tumor response to chemotherapy, but failed to improve nutritional status. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 40*(7), 4560–4568. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2021.05.035</u>

Brocco, D., Di Marino, P., & Grassadonia, A. (2019). From cachexia to obesity: the role of host metabolism in cancer immunotherapy. *Current opinion in supportive and palliative care*, *13*(4), 305–310. https://doi.org/10.1097/SPC.00000000000457

Busquets, S., Serpe, R., Toledo, M., Betancourt, A., Marmonti, E., Orpí, M., Pin, F., Capdevila, E., Madeddu, C., López-Soriano, F. J., Mantovani, G., Macciò, A., & Argilés, J. M. (2012). L-Carnitine: an adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 31*(6), 889–895. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2012.03.005

Busquets, S., Pérez-Peiró, M., Salazar-Degracia, A., Argilés, J. M., Serpe, R., Rojano-Toimil, A., López-Soriano, F. J., & Barreiro, E. (2020). Differential structural features in soleus and gastrocnemius of carnitine-treated cancer cachectic rats. *Journal of cellular physiology*, *235*(1), 526–537. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcp.28992</u>

С

Cala, M. P., Agulló-Ortuño, M. T., Prieto-García, E., González-Riano, C., Parrilla-Rubio, L., Barbas, C., Díaz-García, C. V., García, A., Pernaut, C., Adeva, J., Riesco, M. C., Rupérez, F. J., & Lopez-Martin, J. A. (2018). Multiplatform plasma fingerprinting in cancer cachexia: a pilot observational and translational study. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *9*(2), 348–357. <u>https://doi.org/10.1002/jcsm.12270</u>

Cameron, I. L., W. A. Pavlat, M. D. Stevens, and W. Rogers. 1979. 'Tumor-Host Responses to Various Nutritional Feeding Procedures in Rats'. *The Journal of Nutrition* 109 (4): 671–84. <u>https://doi.org/10.1093/jn/109.4.671</u>.

de Campos-Ferraz, P. L., Andrade, I., das Neves, W., Hangai, I., Alves, C. R., & Lancha, A. H., Jr (2014). An overview of amines as nutritional supplements to counteract cancer cachexia. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*,

5(2), 105–110. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s13539-014-0138-x

Cangiano, C., Laviano, A., Meguid, M. M., Mulieri, M., Conversano, L., Preziosa, I., & Rossi-Fanelli, F. (1996). Effects of administration of oral branched-chain amino acids on anorexia and caloric intake in cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, *88*(8), 550–552. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1093/jnci/88.8.550</u>

Cao, S., Rustum, Y. M., & Spector, T. (1994). 5-Ethynyluracil (776C85): modulation of 5-fluorouracil efficacy and therapeutic index in rats bearing advanced colorectal carcinoma. *Cancer research*, *54*(6), 1507–1510.

Cederholm, T., & Jensen, G. L. (2017a). To Create a Consensus on Malnutrition Diagnostic Criteria. JPEN. Journalofparenteralandenteralnutrition,41(3),311–314.https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1177/0148607116686293

Cederholm, T., Barazzoni, R., Austin, P., Ballmer, P., Biolo, G., Bischoff, S. C., Compher, C., Correia, I., Higashiguchi, T., Holst, M., Jensen, G. L., Malone, A., Muscaritoli, M., Nyulasi, I., Pirlich, M., Rothenberg, E., Schindler, K., Schneider, S. M., de van der Schueren, M. A., Sieber, C., ... Singer, P. (2017b). ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *36*(1), 49–64. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2016.09.004</u>

Cederholm, T., Jensen, G. L., Correia, M., Gonzalez, M. C., Fukushima, R., Higashiguchi, T., Baptista, G., Barazzoni, R., Blaauw, R., Coats, A., Crivelli, A., Evans, D. C., Gramlich, L., Fuchs-Tarlovsky, V., Keller, H., Llido, L., Malone, A., Mogensen, K. M., Morley, J. E., Muscaritoli, M., ... GLIM Working Group (2019). GLIM criteria for the diagnosis of malnutrition - A consensus report from the global clinical nutrition community. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *38*(1), 1–9. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2018.08.002</u>

Cerchietti, L. C., Navigante, A. H., Lutteral, M. A., Castro, M. A., Kirchuk, R., Bonomi, M., Cabalar, M. E., Roth, B., Negretti, G., Sheinker, B., & Uchima, P. (2006). Double-blinded, placebo-controlled trial on intravenous L-alanyl-L-glutamine in the incidence of oral mucositis following chemoradiotherapy in patients with head-and-neck cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, *65*(5), 1330–1337. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.ijrobp.2006.03.042</u>

Chen, J. A., Splenser, A., Guillory, B., Luo, J., Mendiratta, M., Belinova, B., Halder, T., Zhang, G., Li, Y. P., & Garcia, J. M. (2015). Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting: characterization of multiple mechanisms involved. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *6*(2), 132–143. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcsm.12023</u>

Chen, R., & Chen, L. (2021). Solute carrier transporters: emerging central players in tumour immunotherapy. *Trends in cell biology*, S0962-8924(21)00163-X. Advance online publication. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.tcb.2021.08.002</u>

Chowdhry, S. M., & Chowdhry, V. K. (2019). Cancer cachexia and treatment toxicity. *Current opinion in supportive and palliative care*, *13*(4), 292–297. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/SPC.00000000000450</u>

Constantinou, C., Fontes de Oliveira, C. C., Mintzopoulos, D., Busquets, S., He, J., Kesarwani, M., Mindrinos, M., Rahme, L. G., Argilés, J. M., & Tzika, A. A. (2011). Nuclear magnetic resonance in conjunction with functional genomics suggests mitochondrial dysfunction in a murine model of cancer cachexia. *International journal of molecular medicine*, *27*(1), 15–24. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.3892/ijmm.2010.557</u>

Cynober L. A. (1999). The use of alpha-ketoglutarate salts in clinical nutrition and metabolic care. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2*(1), 33–37. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/00075197-199901000-00007</u>

Cynober, L., Moinard, C., & Charrueau, C. (2012). If the soup tastes bad, it doesn't mean the potatoes are the culprit. *Critical* care medicine, 40(8), 2540–2542. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/CCM.0b013e318256b800</u>

Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., & Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *The New England journal of medicine*, *360*(15), 1509–1517. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMoa0810780</u>

Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K. F., Balla, T., Mannella, C. A., & Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology*, *174*(7), 915–921. <u>https://doi.org/10.1083/jcb.200604016</u>

D

Damrauer, J. S., Stadler, M. E., Acharyya, S., Baldwin, A. S., Couch, M. E., & Guttridge, D. C. (2018). Chemotherapyinduced muscle wasting: association with NF-kB and cancer cachexia. *European journal of translational myology*, *28*(2), 7590. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.4081/ejtm.2018.7590</u>

Das, S. K., Eder, S., Schauer, S., Diwoky, C., Temmel, H., Guertl, B., Gorkiewicz, G., Tamilarasan, K. P., Kumari, P., Trauner, M., Zimmermann, R., Vesely, P., Haemmerle, G., Zechner, R., & Hoefler, G. (2011). Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6039), 233–238. https://doi.org/10.1126/science.1198973

Davidson, W., Ash, S., Capra, S., Bauer, J., & Cancer Cachexia Study Group (2004). Weight stabilisation is associated with improved survival duration and quality of life in unresectable pancreatic cancer. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *23*(2), 239–247. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2003.07.001</u>

Davis, L. E., Lenkinski, R. E., Shinkwin, M. A., Kressel, H. Y., & Daly, J. M. (1993). The effect of dietary protein depletion on hepatic 5-fluorouracil metabolism. *Cancer*, 72(12), 3715–3722. <u>https://doi.org/10.1002/1097-0142(19931215)72:12<3715::aid-cncr2820721225>3.0.co;2-w</u>

Davis, M. P., & Panikkar, R. (2019). Sarcopenia associated with chemotherapy and targeted agents for cancertherapy.Annalsofpalliativemedicine,8(1),86–101.https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.21037/apm.2018.08.02

Der-Torossian, H., Asher, S.A., Winnike, J.H. *et al.* Cancer cachexia's metabolic signature in a murine model confirms a distinct entity. *Metabolomics* **9**, 730–739 (2013). <u>https://doi.org/10.1007/s11306-012-0485-6</u>

Di Biase, S., Ma, X., Wang, X., Yu, J., Wang, Y. C., Smith, D. J., Zhou, Y., Li, Z., Kim, Y. J., Clarke, N., To, A., & Yang, L. (2019). Creatine uptake regulates CD8 T cell antitumor immunity. *The Journal of experimental medicine*, *216*(12), 2869–2882. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1084/jem.20182044</u>

Dodson, S., Baracos, V. E., Jatoi, A., Evans, W. J., Cella, D., Dalton, J. T., & Steiner, M. S. (2011). Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annual review of*

medicine, 62, 265–279. https://doi.org/10.1146/annurev-med-061509-131248

Doghman-Bouguerra, M., & Lalli, E. (2019). ER-mitochondria interactions: Both strength and weakness within cancer cells. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, *1866*(4), 650–662. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.bbamcr.2019.01.009</u>

Douillard, J. Y., Cunningham, D., Roth, A. D., Navarro, M., James, R. D., Karasek, P., Jandik, P., Iveson, T., Carmichael, J., Alakl, M., Gruia, G., Awad, L., & Rougier, P. (2000). Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet (London, England)*, *355*(9209), 1041–1047. <u>https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02034-1</u>

Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, *82*(1), 47–95. <u>https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001</u>

Du, T., & Han, J. (2021). Arginine Metabolism and Its Potential in Treatment of Colorectal Cancer. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 658861. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.3389/fcell.2021.658861</u>

Dumas, J. F., Goupille, C., Julienne, C. M., Pinault, M., Chevalier, S., Bougnoux, P., Servais, S., & Couet, C. (2011). Efficiency of oxidative phosphorylation in liver mitochondria is decreased in a rat model of peritoneal carcinosis. *Journal of hepatology*, *54*(2), 320–327. <u>https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.08.012</u>

Ε

Ebadi, M., Field, C. J., Lehner, R., & Mazurak, V. C. (2017). Chemotherapy diminishes lipid storage capacity of adipose tissue in a preclinical model of colon cancer. *Lipids in health and disease*, *16*(1), 247. https://doi.org/10.1186/s12944-017-0638-8

F

Farkas, J., von Haehling, S., Kalantar-Zadeh, K., Morley, J. E., Anker, S. D., & Lainscak, M. (2013). Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *4*(3), 173–178. <u>https://doi.org/10.1007/s13539-013-0105-y</u>

Fearon, K., Arends, J., & Baracos, V. (2013). Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia. *Nature reviews. Clinical oncology*, *10*(2), 90–99. <u>https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.209</u>

Fearon, K. C., Glass, D. J., & Guttridge, D. C. (2012). Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell metabolism*, *16*(2), 153–166. <u>https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.011</u>

Fearon, K., Strasser, F., Anker, S. D., Bosaeus, I., Bruera, E., Fainsinger, R. L., Jatoi, A., Loprinzi, C., MacDonald, N., Mantovani, G., Davis, M., Muscaritoli, M., Ottery, F., Radbruch, L., Ravasco, P., Walsh, D., Wilcock, A., Kaasa, S., & Baracos, V. E. (2011). Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *The Lancet*. *Oncology*, *12*(5), 489–495. <u>https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70218-7</u>

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 10.1002/ijc.33588. Advance online

publication. https://doi.org/10.1002/ijc.33588

Fonseca, G., Farkas, J., Dora, E., von Haehling, S., & Lainscak, M. (2020). Cancer Cachexia and Related Metabolic Dysfunction. *International journal of molecular sciences*, *21*(7), 2321. <u>https://doi.org/10.3390/ijms21072321</u>

Fontana, L., Adelaiye, R. M., Rastelli, A. L., Miles, K. M., Ciamporcero, E., Longo, V. D., Nguyen, H., Vessella, R., & Pili, R. (2013). Dietary protein restriction inhibits tumor growth in human xenograft models. *Oncotarget*, *4*(12), 2451–2461. <u>https://doi.org/10.18632/oncotarget.1586</u>

Fouladiun, M., Körner, U., Bosaeus, I., Daneryd, P., Hyltander, A., & Lundholm, K. G. (2005). Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care--correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones. *Cancer*, *103*(10), 2189–2198. https://doi.org/10.1002/cncr.21013

G

García-de-Lorenzo, A., Zarazaga, A., García-Luna, P. P., Gonzalez-Huix, F., López-Martínez, J., Miján, A., Quecedo, L., Casimiro, C., Usán, L., & del Llano, J. (2003). Clinical evidence for enteral nutritional support with glutamine: a systematic review. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 19*(9), 805–811. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/s0899-9007(03)00103-5</u>

Gaurav, K., Goel, R. K., Shukla, M., & Pandey, M. (2012). Glutamine: A novel approach to chemotherapy-induced toxicity. *Indian journal of medical and paediatric oncology : official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology*, 33(1), 13–20. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.4103/0971-5851.96962</u>

Giacchetti, S., Perpoint, B., Zidani, R., Le Bail, N., Faggiuolo, R., Focan, C., Chollet, P., Llory, J. F., Letourneau, Y., Coudert, B., Bertheaut-Cvitkovic, F., Larregain-Fournier, D., Le Rol, A., Walter, S., Adam, R., Misset, J. L., & Lévi, F. (2000). Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *18*(1), 136–147. <u>https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.1.136</u>

Gomes-Marcondes, M. C., Honma, H. N., Areas, M. A., & Cury, L. (1998). Effect of Walker 256 tumor growth on intestinal absorption of leucine, methionine and glucose in newly weaned and mature rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, *31*(10), 1345–1348. https://doi.org/10.1590/s0100-879x1998001000017

Gomes-Marcondes, M. C., Ventrucci, G., Toledo, M. T., Cury, L., & Cooper, J. C. (2003). A leucine-supplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young tumor-bearing rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, *36*(11), 1589–1594. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1590/s0100-879x2003001100017</u>

Goron, A., Lamarche, F., Blanchet, S., Delangle, P., Schlattner, U., Fontaine, E., & Moinard, C. (2019). Citrulline stimulates muscle protein synthesis, by reallocating ATP consumption to muscle protein synthesis. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 10*(4), 919–928. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcsm.12435</u>

Gramignano, G., Lusso, M. R., Madeddu, C., Massa, E., Serpe, R., Deiana, L., Lamonica, G., Dessì, M., Spiga, C., Astara, G., Macciò, A., & Mantovani, G. (2006). Efficacy of l-carnitine administration on fatigue, nutritional status, oxidative stress, and related quality of life in 12 advanced cancer patients undergoing anticancer

therapy. *Nutrition* (*Burbank, Los Angeles County, Calif.*), 22(2), 136–145. https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.06.003

Green D. R. (2018). Eating the Beast: Dietary Protein and Anticancer Immunity. *Cell metabolism*, 27(4), 703–705. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.006

Grossberg, Aaron J., Jarrad M. Scarlett, and Daniel L. Marks. 2010. 'Hypothalamic Mechanisms in Cachexia'. *Physiology & Behavior*, Proceedings from the 2009 Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior, 100 (5): 478–89. <u>https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.03.011</u>.

Gualano, B., Artioli, G. G., Poortmans, J. R., & Lancha Junior, A. H. (2010). Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino* acids, 38(1), 31–44. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s00726-009-0263-6</u>

Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2007). Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell*, 12(1), 9–22. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.008

Н

Hébuterne, X., Lemarié, E., Michallet, M., de Montreuil, C. B., Schneider, S. M., & Goldwasser, F. (2014). Prevalence of malnutrition and current use of nutrition support in patients with cancer. JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition, 38(2), 196–204. <u>https://doi.org/10.1177/0148607113502674</u>

Heyland, D. K., Novak, F., Drover, J. W., Jain, M., Su, X., & Suchner, U. (2001). Should immunonutrition become routine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA*, *286*(8), 944–953. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1001/jama.286.8.944</u>

Hochwald, S. N., Harrison, L. E., Port, J. L., Blumberg, D., Brennan, M. F., & Burt, M. (1996). Depletion of high energy phosphate compouds in the tumor-bearing state and reversal after tumor resection. *Surgery*, *120*(3), 534–541. <u>https://doi.org/10.1016/s0039-6060(96)80074-2</u>

Holeček M. (2022). Side effects of amino acid supplements. *Physiological research*, Advance online publication.

J

Jahani, M., Azadbakht, M., Norooznezhad, F., & Mansouri, K. (2017). I-arginine alters the effect of 5-fluorouracil on breast cancer cells in favor of apoptosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *88*, 114–123. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.biopha.2017.01.047</u>

Jatoi, A., Steen, P. D., Atherton, P. J., Moore, D. F., Rowland, K. M., Le-Lindqwister, N. A., Adonizio, C. S., Jaslowski, A. J., Sloan, J., & Loprinzi, C. (2017). A double-blind, placebo-controlled randomized trial of creatine for the cancer anorexia/weight loss syndrome (N02C4): an Alliance trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 28*(8), 1957–1963. <u>https://doi.org/10.1093/annonc/mdx232</u>

Jones, J. A., Avritscher, E. B., Cooksley, C. D., Michelet, M., Bekele, B. N., & Elting, L. S. (2006). Epidemiology of treatment-associated mucosal injury after treatment with newer regimens for lymphoma, breast, lung, or colorectal cancer. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 14(6), 505–515. <u>https://doi.org/10.1007/s00520-006-0055-4</u>

Julienne, Cloé M., Jean-François Dumas, Caroline Goupille, Michelle Pinault, Cécile Berri, Anne Collin, Sophie Tesseraud, Charles Couet, and Stephane Servais. 2012. 'Cancer Cachexia Is Associated with a Decrease in Skeletal Muscle Mitochondrial Oxidative Capacities without Alteration of ATP Production Efficiency'. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 3 (4): 265–75. <u>https://doi.org/10.1007/s13539-012-0071-9</u>.

К

Kang, Y. J., Feng, Y., & Hatcher, E. L. (1994). Glutathione stimulates A549 cell proliferation in glutamine-deficient culture: the effect of glutamate supplementation. *Journal of cellular physiology*, *161*(3), 589–596. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcp.1041610323</u>

King, D., Smith, M. L., Chapman, T. J., Stockdale, H. R., & Lye, M. (1996). Fat malabsorption in elderly patients with cardiac cachexia. *Age and ageing*, *25*(2), 144–149. <u>https://doi.org/10.1093/ageing/25.2.144</u>

Kraft, M., Kraft, K., Gärtner, S., Mayerle, J., Simon, P., Weber, E., Schütte, K., Stieler, J., Koula-Jenik, H., Holzhauer, P., Gröber, U., Engel, G., Müller, C., Feng, Y. S., Aghdassi, A., Nitsche, C., Malfertheiner, P., Patrzyk, M., Kohlmann, T., & Lerch, M. M. (2012). L-Carnitine-supplementation in advanced pancreatic cancer (CARPAN)--a randomized multicentre trial. *Nutrition journal*, *11*, 52. <u>https://doi.org/10.1186/1475-2891-11-52</u>

Kristensen, C. A., Askenasy, N., Jain, R. K., & Koretsky, A. P. (1999). Creatine and cyclocreatine treatment of human colon adenocarcinoma xenografts: 31P and 1H magnetic resonance spectroscopic studies. *British journal of cancer*, *79*(2), 278–285. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/sj.bjc.6690045</u>

Kulig, J., Popiela, T., Richter, P., & Klek, S. (2007). Evaluation of adjuvant chemotherapy irinotecan + 5-fluorouracil + leucovorine in advanced colorectal cancer. *Acta chirurgica Belgica*, *107*(3), 297–301. https://doi.org/10.1080/00015458.2007.11680060

L

Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274–293. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017

Lazo P. A. (1985). Tumour-host metabolic interaction and cachexia. *FEBS letters*, *187*(2), 189–192. https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)81239-4

Le Bricon, T., Cynober, L., & Baracos, V. E. (1994). Ornithine alpha-ketoglutarate limits muscle protein breakdown without stimulating tumor growth in rats bearing Yoshida ascites hepatoma. *Metabolism: clinical and experimental*, *43*(7), 899–905. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/0026-0495(94)90274-7</u>

Le Bricon, T., Gugins, S., Cynober, L., & Baracos, V. E. (1995). Negative impact of cancer chemotherapy on protein metabolism in healthy and tumor-bearing rats. *Metabolism: clinical and experimental*, *44*(10), 1340–1348. https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90040-3

Le Plénier, S., Goron, A., Sotiropoulos, A., Archambault, E., Guihenneuc, C., Walrand, S., Salles, J., Jourdan, M., Neveux, N., Cynober, L., & Moinard, C. (2017). Citrulline directly modulates muscle protein synthesis via the PI3K/MAPK/4E-BP1 pathway in a malnourished state: evidence from in vivo, ex vivo, and in vitro studies. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, *312*(1), E27–E36. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1152/ajpendo.00203.2016</u>

Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical journal*, 441(2), 523–540. <u>https://doi.org/10.1042/BJ20111451</u>

Li, Z., & Zhang, H. (2016). Reprogramming of glucose, fatty acid and amino acid metabolism for cancer progression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(2), 377–392. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s00018-015-2070-4</u>

Lieffers, J. R., Mourtzakis, M., Hall, K. D., McCargar, L. J., Prado, C. M., & Baracos, V. E. (2009). A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to wholebody energy demands. *The American journal of clinical nutrition*, *89*(4), 1173–1179. https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27273

Lillie, J. W., O'Keefe, M., Valinski, H., Hamlin, H. A., Jr, Varban, M. L., & Kaddurah-Daouk, R. (1993). Cyclocreatine (1-carboxymethyl-2-iminoimidazolidine) inhibits growth of a broad spectrum of cancer cells derived from solid tumors. *Cancer research*, *53*(13), 3172–3178.

Lim, H. J., Crowe, P., & Yang, J. L. (2015). Current clinical regulation of PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalling in treatment of human cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *141*(4), 671–689. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s00432-014-1803-3</u>

Logan, R. M., Stringer, A. M., Bowen, J. M., Gibson, R. J., Sonis, S. T., & Keefe, D. M. (2009). Is the pathobiology of chemotherapy-induced alimentary tract mucositis influenced by the type of mucotoxic drug administered?. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *63*(2), 239–251. <u>https://doi.org/10.1007/s00280-008-0732-8</u>

Lønbro, S., Dalgas, U., Primdahl, H., Overgaard, J., & Overgaard, K. (2013). Feasibility and efficacy of progressive resistance training and dietary supplements in radiotherapy treated head and neck cancer patients--the DAHANCA 25A study. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, *52*(2), 310–318. https://doi.org/10.3109/0284186X.2012.741325

Longley, Daniel B., D. Paul Harkin, and Patrick G. Johnston. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature Reviews Cancer* 3 (5): 330–38. https://doi.org/10.1038/nrc1074.

Loo, J. M., Scherl, A., Nguyen, A., Man, F. Y., Weinberg, E., Zeng, Z., Saltz, L., Paty, P. B., & Tavazoie, S. F. (2015). Extracellular metabolic energetics can promote cancer progression. *Cell*, *160*(3), 393–406. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.cell.2014.12.018</u>

López-Soriano, J., Argilés, J. M., & López-Soriano, F. J. (1996). Lipid metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Molecular and cellular biochemistry*, *165*(1), 17–23. <u>https://doi.org/10.1007/BF00229741</u>

Μ

Muscaritoli, M., Arends, J., Bachmann, P., Baracos, V., Barthelemy, N., Bertz, H., Bozzetti, F., Hütterer, E., Isenring, E., Kaasa, S., Krznaric, Z., Laird, B., Larsson, M., Laviano, A., Mühlebach, S., Oldervoll, L., Ravasco, P., Solheim, T. S., Strasser, F., de van der Schueren, M., ... Bischoff, S. C. (2021). ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in cancer. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 40(5), 2898–2913. https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.02.005

Maasberg, S., Knappe-Drzikova, B., Vonderbeck, D., Jann, H., Weylandt, K. H., Grieser, C., Pascher, A., Schefold, J. C., Pavel, M., Wiedenmann, B., Sturm, A., & Pape, U. F. (2017). Malnutrition Predicts Clinical Outcome in

Patients with Neuroendocrine https://doi.org/10.1159/000442983

de Man, F. M., Goey, A., van Schaik, R., Mathijssen, R., & Bins, S. (2018). Individualization of Irinotecan Treatment: A Review of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Pharmacogenetics. *Clinical pharmacokinetics*, *57*(10), 1229–1254. <u>https://doi.org/10.1007/s40262-018-0644-7</u>

Martin, L., Senesse, P., Gioulbasanis, I., Antoun, S., Bozzetti, F., Deans, C., Strasser, F., Thoresen, L., Jagoe, R. T., Chasen, M., Lundholm, K., Bosaeus, I., Fearon, K. H., & Baracos, V. E. (2015). Diagnostic criteria for the classification of cancer-associated weight loss. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(1), 90–99. <u>https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.1894</u>

Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2021). Cancer metabolism: looking forward. Nature reviews. Cancer, 21(10), 669–680. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/s41568-021-00378-6</u>

Masuda, N., Kudoh, S., & Fukuoka, M. (1996). Irinotecan (CPT-11): pharmacology and clinical applications. *Critical reviews in oncology/hematology*, 24(1), 3–26. <u>https://doi.org/10.1016/1040-8428(96)00201-6</u>

Mathupala, S. P., Rempel, A., & Pedersen, P. L. (2001). Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *The Journal of biological chemistry*, *276*(46), 43407–43412. <u>https://doi.org/10.1074/jbc.M108181200</u>

Mattox T. W. (2017). Cancer Cachexia: Cause, Diagnosis, and Treatment. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, *32*(5), 599–606. <u>https://doi.org/10.1177/0884533617722986</u>

Matsuyama, T., Ishikawa, T., Okayama, T., Oka, K., Adachi, S., Mizushima, K., Kimura, R., Okajima, M., Sakai, H., Sakamoto, N., Katada, K., Kamada, K., Uchiyama, K., Handa, O., Takagi, T., Kokura, S., Naito, Y., & Itoh, Y. (2015). Tumor inoculation site affects the development of cancer cachexia and muscle wasting. *International journal of cancer*, *137*(11), 2558–2565. <u>https://doi.org/10.1002/ijc.29620</u>

May, P. E., Barber, A., D'Olimpio, J. T., Hourihane, A., & Abumrad, N. N. (2002). Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *American journal of surgery*, *183*(4), 471–479. <u>https://doi.org/10.1016/s0002-9610(02)00823-1</u>

Millward, D. J., & Garlick, P. J. (1976). The energy cost of growth. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *35*(3), 339–349. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1079/pns19760054</u>

Mirza, K. A., & Tisdale, M. J. (2014). Functional identity of receptors for proteolysis-inducing factor on human and murine skeletal muscle. *British journal of cancer*, *111*(5), 903–908. <u>https://doi.org/10.1038/bjc.2014.379</u>

Moinard, C., Delpierre, E., Loï, C., Neveux, N., Butel, M. J., Cynober, L., & Charrueau, C. (2013). An oligomeric diet limits the response to injury in traumatic brain-injured rats. *Journal of neurotrauma*, *30*(11), 975–980. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1089/neu.2012.2707

Murphy, R. A., Wilke, M. S., Perrine, M., Pawlowicz, M., Mourtzakis, M., Lieffers, J. R., Maneshgar, M., Bruera, E., Clandinin, M. T., Baracos, V. E., & Mazurak, V. C. (2010). Loss of adipose tissue and plasma phospholipids: relationship to survival in advanced cancer patients. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 29*(4), 482–487. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2009.11.006 Muscaritoli, M., Anker, S. D., Argilés, J., Aversa, Z., Bauer, J. M., Biolo, G., Boirie, Y., Bosaeus, I., Cederholm, T., Costelli, P., Fearon, K. C., Laviano, A., Maggio, M., Rossi Fanelli, F., Schneider, S. M., Schols, A., & Sieber, C. C. (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". *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 29*(2), 154–159. <u>https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.12.004</u>

Muscaritoli, M., Arends, J., Bachmann, P., Baracos, V., Barthelemy, N., Bertz, H., Bozzetti, F., Hütterer, E., Isenring, E., Kaasa, S., Krznaric, Z., Laird, B., Larsson, M., Laviano, A., Mühlebach, S., Oldervoll, L., Ravasco, P., Solheim, T. S., Strasser, F., de van der Schueren, M., ... Bischoff, S. C. (2021). ESPEN practical guideline: Clinical Nutrition in cancer. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 40*(5), 2898–2913. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2021.02.005</u>

Ν

Nelson, K. A., Walsh, D., & Sheehan, F. A. (1994). The cancer anorexia-cachexia syndrome. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *12*(1), 213–225. https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.1.213

Nissen, S. L., & Abumrad, N. N. (1997). Nutritional role of the leucine metabolite β-hydroxy β-methylbutyrate (HMB). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *8*(6), 300-311. <u>https://doi.org/10.1016/S0955-2863(97)00048-X</u>

Noguchi, Y., Vydelingum, N. A., Younes, R. N., Fried, S. K., & Brennan, M. F. (1991). Tumor-induced alterations in tissue lipoprotein lipase activity and mRNA levels. *Cancer research*, *51*(3), 863–869.

Nunes, E. A., Kuczera, D., Brito, G. A., Bonatto, S. J., Yamazaki, R. K., Tanhoffer, R. A., Mund, R. C., Kryczyk, M., & Fernandes, L. C. (2008). Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor-kappaB expression. *Nutrition research (New York, N.Y.), 28*(7), 487–493. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.nutres.2008.04.006</u>

0

O'Connell, T. M., Pin, F., Couch, M. E., & Bonetto, A. (2019). Treatment with Soluble Activin Receptor Type IIB Alters Metabolic Response in Chemotherapy-Induced Cachexia. *Cancers*, *11*(9), 1222. https://doi.org/10.3390/cancers11091222

Op den Kamp, C. M., De Ruysscher, D. K., van den Heuvel, M., Elferink, M., Houben, R. M., Oberije, C. J., Bootsma, G. P., Geraedts, W. H., Pitz, C. C., Langen, R. C., Wouters, E. F., Schols, A. M., & Dingemans, A. M. (2014). Early body weight loss during concurrent chemo-radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *5*(2), 127–137. <u>https://doi.org/10.1007/s13539-013-0127-5</u>

OrganisationmondialedelaSanté(OMS)(2018b),Assessingnationalcapacityforthepreventionandcontrolofnoncommunicablediseases:report of the 2019global survey.Geneva:World Health Organization;2020.Licence:CC BY-NC-SA 3.0IGO.

Ottery F. D. (1996). Definition of standardized nutritional assessment and interventional pathways in oncology. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 12*(1 Suppl), S15–S19. <u>https://doi.org/10.1016/0899-9007(96)90011-8</u>

Padoan, A., Plebani, M., & Basso, D. (2019). Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity. *International journal of molecular sciences*, *20*(3), 676. https://doi.org/10.3390/ijms20030676

Papalazarou, V., Zhang, T., Paul, N.R. *et al.* The creatine–phosphagen system is mechanoresponsive in pancreatic adenocarcinoma and fuels invasion and metastasis. *Nat Metab* **2**, 62–80 (2020). <u>https://doi.org/10.1038/s42255-019-0159-z</u>

Penna, F., Bonetto, A., Aversa, Z., Minero, V. G., Rossi Fanelli, F., Costelli, P., & Muscaritoli, M. (2016). Effect of the specific proteasome inhibitor bortezomib on cancer-related muscle wasting. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *7*(3), 345–354. <u>https://doi.org/10.1002/jcsm.12050</u>

Penna, F., Busquets, S., & Argilés, J. M. (2016). Experimental cancer cachexia: Evolving strategies for getting closer to the human scenario. *Seminars in cell & developmental biology*, *54*, 20–27. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.09.002

Persson, C., & Glimelius, B. (2002). The relevance of weight loss for survival and quality of life in patients with advanced gastrointestinal cancer treated with palliative chemotherapy. *Anticancer research*, *22*(6B), 3661–3668.

Perumal, S. S., Shanthi, P., & Sachdanandam, P. (2005). Energy-modulating vitamins--a new combinatorial therapy prevents cancer cachexia in rat mammary carcinoma. *The British journal of nutrition*, *93*(6), 901–909. <u>https://doi.org/10.1079/bjn20051439</u>

Peters, S. J., van Helvoort, A., Kegler, D., Argilès, J. M., Luiking, Y. C., Laviano, A., van Bergenhenegouwen, J., Deutz, N. E., Haagsman, H. P., Gorselink, M., & van Norren, K. (2011). Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice. *Oncology reports*, *26*(1), 247–254. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.3892/or.2011.1269

Peterson, D. E., Jones, J. B., & Petit, R. G., 2nd (2007). Randomized, placebo-controlled trial of Saforis for prevention and treatment of oral mucositis in breast cancer patients receiving anthracycline-based chemotherapy. *Cancer*, *109*(2), 322–331. <u>https://doi.org/10.1002/cncr.22384</u>

Petho, G., & Reeh, P. W. (2012). Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiological reviews*, *92*(4), 1699–1775. https://doi.org/10.1152/physrev.00048.2010

Petruzzelli, M., Schweiger, M., Schreiber, R., Campos-Olivas, R., Tsoli, M., Allen, J., Swarbrick, M., Rose-John, S., Rincon, M., Robertson, G., Zechner, R., & Wagner, E. F. (2014). A switch from white to brown fat increases energy expenditure in cancer-associated cachexia. *Cell metabolism*, *20*(3), 433–447. <u>https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.06.011</u>

Pin, F., Barreto, R., Couch, M. E., Bonetto, A., & O'Connell, T. M. (2019). Cachexia induced by cancer and chemotherapy yield distinct perturbations to energy metabolism. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *10*(1), 140–154. <u>https://doi.org/10.1002/jcsm.12360</u>

Pin, F., Busquets, S., Toledo, M., Camperi, A., Lopez-Soriano, F. J., Costelli, P., Argilés, J. M., & Penna, F. (2015).

Combination of exercise training and erythropoietin prevents cancer-induced muscle alterations. *Oncotarget*, *6*(41), 43202–43215. <u>https://doi.org/10.18632/oncotarget.6439</u>

Prado, C. M., Birdsell, L. A., & Baracos, V. E. (2009). The emerging role of computerized tomography in assessing cancer cachexia. *Current opinion in supportive and palliative care*, *3*(4), 269–275. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1097/SPC.0b013e328331124a</u>

Prado, C. M., Purcell, S. A., & Laviano, A. (2020). Nutrition interventions to treat low muscle mass in cancer. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle, 11*(2), 366–380. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/jcsm.12525</u>

Pronzato, P., & Rondini, M. (2005). Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 16 Suppl 4,* iv80–iv84. https://doi.org/10.1093/annonc/mdi913

Q

Qian, L., Zhang, F., Yin, M., & Lei, Q. (2021). Cancer metabolism and dietary interventions. Cancer biology &medicine,19(2),163–174.Advanceonlinepublication.https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.20892/j.issn.2095-3941.2021.0461

R

Ramesh, M., Ahlawat, P., & Srinivas, N. R. (2010). Irinotecan and its active metabolite, SN-38: review of bioanalytical methods and recent update from clinical pharmacology perspectives. *Biomedical chromatography* : *BMC*, *24*(1), 104–123. <u>https://doi.org/10.1002/bmc.1345</u>

Ringseis, R., Keller, J., & Eder, K. (2013). Mechanisms underlying the anti-wasting effect of L-carnitine supplementation under pathologic conditions: evidence from experimental and clinical studies. *European journal of nutrition*, *52*(5), 1421–1442. <u>https://doi.org/10.1007/s00394-013-0511-0</u>

Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., & Ochoa, A. C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, *109*(4), 1568–1573. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1182/blood-2006-06-031856</u>

Rolfe, D. F., and G. C. Brown. (1997). Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals. *Physiological Reviews* 77 (3): 731–58. <u>https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731</u>.

Rosca, M. G., Vazquez, E. J., Chen, Q., Kerner, J., Kern, T. S., & Hoppel, C. L. (2012). Oxidation of fatty acids is the source of increased mitochondrial reactive oxygen species production in kidney cortical tubules in early diabetes. *Diabetes*, *61*(8), 2074–2083. <u>https://doi.org/10.2337/db11-1437</u>

Rubio-Patiño, C., Bossowski, J. P., De Donatis, G. M., Mondragón, L., Villa, E., Aira, L. E., Chiche, J., Mhaidly, R., Lebeaupin, C., Marchetti, S., Voutetakis, K., Chatziioannou, A., Castelli, F. A., Lamourette, P., Chu-Van, E., Fenaille, F., Avril, T., Passeron, T., Patterson, J. B., Verhoeyen, E., ... Ricci, J. E. (2018). Low-Protein Diet Induces IRE1α-Dependent Anticancer Immunosurveillance. *Cell metabolism*, *27*(4), 828–842.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.02.009 Ryan, A. M., Power, D. G., Daly, L., Cushen, S. J., Ní Bhuachalla, Ē., & Prado, C. M. (2016). Cancer-associated malnutrition, cachexia and sarcopenia: the skeleton in the hospital closet 40 years later. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *75*(2), 199–211. <u>https://doi.org/10.1017/S002966511500419X</u>

S

Saltz, L. B., J. V. Cox, C. Blanke, L. S. Rosen, L. Fehrenbacher, M. J. Moore, J. A. Maroun, et al. (2000). Irinotecan plus Fluorouracil and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. Irinotecan Study Group. *The New England Journal of Medicine* 343 (13): 905–14. <u>https://doi.org/10.1056/NEJM200009283431302</u>.

Sanders, K. J., Hendriks, L. E., Troost, E. G., Bootsma, G. P., Houben, R. M., Schols, A. M., & Dingemans, A. M. (2016). Early Weight Loss during Chemoradiotherapy Has a Detrimental Impact on Outcome in NSCLC. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(6), 873–879. <u>https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.02.013</u>

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S. H., & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, *117*(3), 399–412. <u>https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00400-3</u>

Schiessel, D. L., Yamazaki, R. K., Kryczyk, M., Coelho, I., Yamaguchi, A. A., Pequito, D. C., Brito, G. A., Borghetti, G., & Fernandes, L. C. (2015). α-Linolenic Fatty Acid Supplementation Decreases Tumor Growth and Cachexia Parameters in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. *Nutrition and cancer*, *67*(5), 839–846. https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1043021

Segaud, F., Combaret, L., Neveux, N., Attaix, D., Cynober, L., & Moinard, C. (2007). Effects of ornithine alphaketoglutarate on protein metabolism in Yoshida sarcoma-bearing rats. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, *26*(5), 624–630. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1016/j.clnu.2007.05.001</u>

Selvi, I., Basar, H., Baydilli, N., Murat, K., & Kaymaz, O. (2019). The importance of plasma arginine level and its downstream metabolites in diagnosing prostate cancer. *International urology and nephrology*, *51*(11), 1975–1983. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1007/s11255-019-02261-8</u>

Springer, J., Tschirner, A., Hartman, K., Palus, S., Wirth, E. K., Ruis, S. B., Möller, N., von Haehling, S., Argiles, J. M., Köhrle, J., Adams, V., Anker, S. D., & Doehner, W. (2012). Inhibition of xanthine oxidase reduces wasting and improves outcome in a rat model of cancer cachexia. *International journal of cancer*, *131*(9), 2187–2196. https://doi.org/10.1002/ijc.27494

Stallion, A., Foley-Nelson, T., Chance, W. T., Zhang, F. S., & Fischer, J. E. (1994). Parenteral vs enteral nutrition in tumor-bearing rats. *JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition*, *18*(2), 148–153. https://doi.org/10.1177/0148607194018002148

Stein, T. P., Oram-Smith, J. C., Leskiw, M. J., Wallace, H. W., & Miller, E. E. (1976). Tumor-caused changes in host protein synthesis under different dietary situations. *Cancer research*, *36*(11 Pt 1), 3936–3940.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, *71*(3), 209–249. <u>https://doi.org/10.3322/caac.21660</u>

Swenerton, K. D., Legha, S. S., Smith, T., Hortobagyi, G. N., Gehan, E. A., Yap, H. Y., Gutterman, J. U., &

Blumenschein, G. R. (1979). Prognostic factors in metastatic breast cancer treated with combination chemotherapy. *Cancer research*, *39*(5), 1552–1562.

Т

Tayek, J. A., Bistrian, B. R., Hehir, D. J., Martin, R., Moldawer, L. L., & Blackburn, G. L. (1986). Improved protein kinetics and albumin synthesis by branched chain amino acid-enriched total parenteral nutrition in cancer cachexia. A prospective randomized crossover trial. *Cancer*, *58*(1), 147–157. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1002/1097-0142(19860701)58:1<147::aid-cncr2820580126>3.0.co;2-i</u>

Tisdale M. J. (2002). Cachexia in cancer patients. *Nature reviews. Cancer*, 2(11), 862–871. https://doi.org/10.1038/nrc927

Toledo, M., Penna, F., Busquets, S., López-Soriano, F. J., & Argilés, J. M. (2014). Distinct behaviour of sorafenib in experimental cachexia-inducing tumours: the role of STAT3. *PloS one*, *9*(12), e113931. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113931</u>

Toledo, M., Penna, F., Oliva, F., Luque, M., Betancourt, A., Marmonti, E., López-Soriano, F. J., Argilés, J. M., & Busquets, S. (2016). A multifactorial anti-cachectic approach for cancer cachexia in a rat model undergoing chemotherapy. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, *7*(1), 48–59. <u>https://doi.org/10.1002/jcsm.12035</u>

Torosian, M. H., Jalali, S., & Nguyen, H. Q. (1990). Protein intake and 5-fluorouracil toxicity in tumor-bearing animals. *The Journal of surgical research*, *49*(4), 298–301. <u>https://doi.org/10.1016/0022-4804(90)90024-v</u>

Tsuburaya, A., Blumberg, D., Burt, M., & Brennan, M. F. (1995). Energy depletion in the liver and in isolated hepatocytes of tumor-bearing animals. *The Journal of surgical research*, *59*(4), 421–427. <u>https://doi.org/10.1006/jsre.1995.1185</u>

Turner, D. C., Kondic, A. G., Anderson, K. M., Robinson, A. G., Garon, E. B., Riess, J. W., Jain, L., Mayawala, K., Kang, J., Ebbinghaus, S. W., Sinha, V., de Alwis, D. P., & Stone, J. A. (2018). Pembrolizumab Exposure-Response Assessments Challenged by Association of Cancer Cachexia and Catabolic Clearance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 24*(23), 5841–5849. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0415

Tzika, A. A., Fontes-Oliveira, C. C., Shestov, A. A., Constantinou, C., Psychogios, N., Righi, V., Mintzopoulos, D., Busquets, S., Lopez-Soriano, F. J., Milot, S., Lepine, F., Mindrinos, M. N., Rahme, L. G., Argiles, J. M. "Skeletal muscle mitochondrial uncoupling in a murine cancer cachexia model". International Journal of Oncology 43, no. 3 (2013): 886-894. https://doi.org/10.3892/ijo.2013.199

V

van de Worp, W., Schols, A., Theys, J., van Helvoort, A., & Langen, R. (2020). Nutritional Interventions in Cancer Cachexia: Evidence and Perspectives From Experimental Models. *Frontiers in nutrition*, 7, 601329. https://doi.org/10.3389/fnut.2020.601329

van der Meij, B. S., Teleni, L., Engelen, M., & Deutz, N. (2019). Amino acid kinetics and the response to nutrition in patients with cancer. *International journal of radiation biology*, *95*(4), 480–492. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1080/09553002.2018.1466209</u>

Ventrucci, G., Mello, M. A., & Gomes-Marcondes, M. C. (2007). Leucine-rich diet alters the eukaryotic translation initiation factors expression in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *BMC cancer*, *7*, 42. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1186/1471-2407-7-42</u>

Virtanen K. A. (2014). BAT thermogenesis: Linking shivering to exercise. *Cell metabolism*, *19*(3), 352–354. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.02.013

W

Walrand, S., Moreau, K., Caldefie, F., Tridon, A., Chassagne, J., Portefaix, G., Cynober, L., Beaufrère, B., Vasson, M. P., & Boirie, Y. (2001). Specific and nonspecific immune responses to fasting and refeeding differ in healthy young adult and elderly persons. *The American journal of clinical nutrition*, 74(5), 670–678. <u>https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1093/ajcn/74.5.670</u>

Wang, X., Pickrell, A. M., Zimmers, T. A., & Moraes, C. T. (2012). Increase in muscle mitochondrial biogenesis does not prevent muscle loss but increased tumor size in a mouse model of acute cancer-induced cachexia. *PloS one*, *7*(3), e33426. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033426</u>

Wareen S., The immediate causes of death in cancer. *The American Journal of the Medical Sciences*. Vol. 184(5):610-615. DOI: 10.1097/00000441-193211000-00002

Wyld, L., Audisio, R. A., & Poston, G. J. (2015). The evolution of cancer surgery and future perspectives. Naturereviews.Clinicaloncology, 12(2),115–124.https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1038/nrclinonc.2014.191

Х

Xie, P., Mo, J. L., Liu, J. H., Li, X., Tan, L. M., Zhang, W., Zhou, H. H., & Liu, Z. Q. (2020). Pharmacogenomics of 5-fluorouracil in colorectal cancer: review and update. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 43(6), 989–1001. https://doi.org/10.1007/s13402-020-00529-1

Xue, H., Sawyer, M. B., Field, C. J., Dieleman, L. A., Murray, D., & Baracos, V. E. (2008). Bolus oral glutamine protects rats against CPT-11-induced diarrhea and differentially activates cytoprotective mechanisms in host intestine but not tumor. *The Journal of nutrition*, *138*(4), 740–746. <u>https://doi.org/10.1093/in/138.4.740</u>

Υ

Yachimovich-Cohen, N., Even-Ram, S., Shufaro, Y., Rachmilewitz, J., & Reubinoff, B. (2010). Human embryonic stem cells suppress T cell responses via arginase I-dependent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 184*(3), 1300–1308. https://doi-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.4049/jimmunol.0804261

Yamanaka, H., Kanemaki, T., Tsuji, M., Kise, Y., Hatano, T., Hioki, K., & Yamamoto, M. (1990). Branched-chain amino acid-supplemented nutritional support after gastrectomy for gastric cancer with special reference to plasma amino acid profiles. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *6*(3), 241–245.

Yoshizawa F. (2004). Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, *313*(2), 417–422. <u>https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.07.013</u>