



Muscle, nutrition et tumeurs primitives hépatiques : de la prise en charge médico chirurgicale à l'optimisation pronostique

Laurence Lacaze

► To cite this version:

Laurence Lacaze. Muscle, nutrition et tumeurs primitives hépatiques : de la prise en charge médico chirurgicale à l'optimisation pronostique. Médecine humaine et pathologie. Université de Rennes, 2021. Français. NNT : 2021REN1B057 . tel-04318332

HAL Id: tel-04318332

<https://theses.hal.science/tel-04318332>

Submitted on 1 Dec 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Nutrition et Pathologies métaboliques

Par **Laurence LACAZE**

« Muscle, nutrition, tumeurs primitives hépatiques : de la prise en charge médico-chirurgicale à l'optimisation pronostique »

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 16 décembre 2021

Unité de recherche : Institut NuMeCan, INRAE 1341, INSERM 1241, Univ Rennes, CHU Rennes

Rapporteurs avant soutenance :

Isabelle Savary-Auzeloux

Chargée de Recherche, INRAE, Université Clermont- Ferrand

Mouna Hanachi

Praticien Hospitalier, INRAE, Université Paris Saclay

Composition du Jury :

Président

Pierre Déchelotte

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, INSERM 1073, Université de Rouen

Examineurs

Jamila Faivre

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, INSERM 1193, Université Paris Saclay

Isabelle Savary-Auzeloux

Chargée de Recherche, INRAE, Université Clermont- Ferrand

Mouna Hanachi

Praticien Hospitalier, INRAE, Université Paris Saclay

Directeur de thèse

Ronan Thibault

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, NuMeCan, INRAE 1341, INSERM 1241, Université Rennes 1

Co-directeur de thèse

David Val-Laillet

Directeur de Recherche, NuMeCan, INRAE 1341, INSERM 1241, Université Rennes 1

Muscle, Nutrition et Tumeurs primitives hépatiques : de l'évaluation pronostique à l'optimisation de la prise en charge médico chirurgicale.

Table des matières

I. PRIX ET BOURSES DE RECHERCHE	7
II. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	7
A. Communications orales	7
B. Communications affichées.....	8
III. LISTE DES ABBREVIATIONS.....	10
IV. LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	16
V. AVANT-PROPOS.....	18
VI. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	20
VII. INTRODUCTION	22
A. Dénutrition	22
1. Définition	22
2. Mécanismes physiopathologiques d'adaptation au jeûne	23
3. La glycogénolyse et la néoglucogenèse.....	25
B. Critères diagnostiques de dénutrition	26
C. Le muscle	30
1. Structure du muscle strié squelettique	30
2. Les différents types de fibres musculaires	31
3. Les substrats énergétiques du muscle	33
4. Les mécanismes de régulation de la masse musculaire	35
5. Les facteurs de régulation de la masse musculaire	44
6. Les effets de la dénutrition sur le phénotype musculaire.....	48
D. Tumeurs hépatiques et dénutrition	49
1. Tumeurs hépatiques	49
2. Dénutrition et tumeurs hépatiques	51
E. La sarcopénie.....	53
1. Définition	53
2. L'obésité sarcopénique	53
3. La cachexie cancéreuse.....	56
F. Méthodes d'évaluation de la composition corporelle.....	58
1. Absorptiométrie biphotonique aux rayons X (DEXA)	58
2. La bioimpédancemétrie corporelle	59
3. Composition corporelle par tomодensitométrie (scanner) ou imagerie par résonance magnétique (IRM).....	59
4. Composition corporelle et tumeurs hépatiques.....	62
G. Modèles animaux de dénutrition/sarcopénie	67
H. Intérêt du modèle miniporc Yucatan.....	68
VIII. Méthodologie générale	71
A. Méthode commune d'évaluation de la composition corporelle utilisée dans les articles 1 et article 2 : la tomодensitométrie	71
A. Mise au point d'un modèle préclinique de dénutrition chez le miniporc Yucatan normopondéral (Sarcopig 1) et obèse (Sarcopig 2)	72
1. Les différentes alimentations restrictives pour obtenir la dénutrition	72
2. Mesure de la force musculaire par électromyogramme (twitch)	73
3. L'échographie musculaire.....	75
B. Le microbiote intestinal.....	75

C. Histologie et phénotypage musculaire.....	76
D. Modèle de dénutrition marasmique chez le miniporc Sarcopig 1 : les difficultés	76
<i>IX. Article 1: High visceral fat is associated with worse survival after curative liver resection for intrahepatic cholangiocarcinoma</i>	<i>77</i>
A. Introduction.....	79
B. Patients and methods	81
C. Results	84
D. Discussion	86
<i>X. Article 2 (Sarcopig1): The Yucatan minipig model: A new preclinical model of malnutrition induced by a low-calorie/low-protein diet.....</i>	<i>102</i>
A. Introduction.....	105
B. Materials and methods	106
C. Results	110
D. Discussion	111
<i>XI. Discussion et perspectives</i>	<i>124</i>
<i>XII. ANNEXES</i>	<i>135</i>
<i>XIII. Bibliographie</i>	<i>137</i>

Remerciements

Je remercie d'abord tout particulièrement le Professeur Ronan Thibault d'avoir accepté de diriger ma thèse et surtout de m'avoir accueillie dans le monde de la nutrition et sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui. Je tiens à te témoigner ma profonde gratitude. Encore une fois merci.

Je tiens également à remercier le Docteur David Val-Laillet pour son accueil à l'INRAE mais encore plus pour avoir accepté de prendre la co-direction de ma thèse en cours de route. Merci de ta patience et d'avoir toujours trouvé du temps pour m'aider. J'ai adoré travailler avec toi.

Mes remerciements vont également au Docteur Frédéric Derbré grâce à qui j'ai repris espoir ! Si je ne t'avais pas rencontré, je crois que je serais loin d'en être à écrire les remerciements de ma thèse. Merci de ta patience et de ton aide très précieuse.

Je remercie profondément le Professeur Pierre Déchelotte d'avoir accepté de juger mon travail et de présider mon jury de thèse. Je mesure aujourd'hui le chemin parcouru depuis que j'ai suivi vos cours pendant mes études à Rouen.

Je remercie le Professeur Karim Boudjema, de m'avoir accueillie pendant mes deux années de chef de clinique-assistante et encore plus de m'avoir toujours soutenue dans le projet de la nutrition. J'admire profondément votre excellence à la fois chirurgicale et dans le domaine de la recherche.

Je remercie le Docteur Savary-Auzeloux d'avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteur et de m'apporter son expertise précieuse.

Je remercie le Docteur Mouna Hanachi d'avoir accepté de rapporter mon travail. Mais surtout merci de m'accueillir dans ton service. Je suis vraiment très heureuse !

Je tiens également à remercier le Professeur Jamila Faivre d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci de m'avoir accueillie dans le monde de la recherche au cours de mon année de Master 2 qui m'a donné envie d'aller plus loin.

Mes remerciements vont également au Docteur Moïse Coëffier qui m'a apporté ses conseils et son expertise scientifique au cours des comités de mi-parcours.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai travaillé à INRAE. Merci notamment à Julien George, Josselin Delamarre, Francis Le Gouevet, Alain Chauvin, Serge Dubois d'avoir pris soin des animaux et également à Armelle Cahu, Laurence Le Normand, Isabelle Nogret, Gwenaëlle Randuineau, Régis Janvier pour leur aide précieuse.

Un grand merci également au Docteur Charles-Henri Malbert pour son aide et notamment pour le temps précieux qu'il m'a consacré.

Je tiens à remercier toute l'équipe de nutrition du CHU Rennes notamment Mylène, Mickaël, Charlotte et Robin ainsi que l'équipe TCA. Vous me manquez.

Merci à toute l'équipe de Mantes de m'avoir permis de prendre du temps pour travailler ma thèse et tout particulièrement au Docteur Keilani qui m'a accueillie dans son service.

Je remercie l'équipe de nutrition de Paul Brousse pour leur accueil et leur gentillesse, notamment Maeva et Nadja.

Je remercie le Professeur Catherine Arvieux de son indéfectible soutien.

Je remercie mes amies qui m'ont soutenue dans la vie et dans ce projet. Vivaldine, Charlotte, Joséphine, ne vous inquiétez pas, je ne ferai pas de 3ème thèse. Enfin, je pense ! Merci également à Elisabeth pour ton soutien, notamment lors de ces heures de bibliothèque. Et félicitations pour cette nouvelle expérience New-Yorkaise !

Je remercie également Xavier pour son soutien précieux.

Je remercie surtout profondément toute ma famille et surtout mes parents et mon frère, à qui je dédie ce travail.

I. PRIX ET BOURSES DE RECHERCHE

Prix de recherche Société Française de Nutrition Clinique et Métabolisme 2018 : 30 000 euros

Bourse de l'Association Française de Chirurgie Hépatobiliaire et Transplantation Hépatique
2017 : 10000 euros

Appel d'offre CORECT 2018 : Influence du statut nutritionnel du donneur sur le statut
nutritionnel du receveur : étude prospective en transplantation hépatique TransplanNut :
40 000 euros

II. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

A. Communications orales

1) Congrès de L'European Society of Parenteral and Enteral Nutrition 2020

Lacaze L, Touboulis S, Georges J, Le Gouevic F, Chauvin A, Boudjema K, Thibault
R, Val-Laillet D A minipig model of marasmus malnutrition: molecular phenotyping
and microbiota analysis

2) Congrès Journées Française de Nutrition 2020

Rochdi S, **Lacaze L**, Georges J, Delamarre J, Le Gouevic F, Chauvin A, Val-laillet D,
Derbé F, Thibault R. Le mini porc, un potentiel nouveau modèle expérimental pour
étudier la plasticité musculaire en condition de dénutrition

3) Congrès Journées Française de Nutrition 2019

Lacaze L, Bergeat D, Rousseau C, Sulpice L, Boudjema K, Thibault R.
L'augmentation de la graisse viscérale mesurée par une tomodensitométrie

abdominale est associée à une baisse de la survie globale et de la survie sans récurrence après résection hépatique curative du cholangiocarcinome intrahépatique.

B. Communications affichées

1) Congrès de L'European Society of Parenteral and Enteral Nutrition 2020

Rochdi S, **Lacaze L**, Couvert A, Touboul S, Delamarre J, Georges J, Le Gouevic F, Chauvin A, Malbert C-H, Val-laillet D, Derbé F, Thibault R. Muscle phenotyping of a minipig model of malnutrition.

2) Congrès de L'European Society of Parenteral and Enteral Nutrition 2019

Lacaze L, Bergeat D, Rousseau C, Sulpice L, Boudjema K, Thibault R. Visceral fat assessed by third lumbar vertebra (L3) targeted ct affects survival and recurrence after curative liver resection cholangiocarcinoma (ICC)

3) Congrès Journées Française de Nutrition Clinique 2019

Lacaze L, Touboul S, Georges J, Le Gouevic F, Chauvin A, Boudjema K, Thibault R, Val-Laillet D et bourse de recherche SFCM 2018. Modèle de dénutrition chez le miniporc Yucatan : composition corporelle, phénotypage moléculaire et analyse du microbiote.

4) Congrès Journées Française de Nutrition Clinique 2018

Lacaze L, Boudjema K, Georges J, Delamarre J, Le-Gouevic F, Chauvin A, Val-Laillet D, Thibault R Le miniporc Yucatan comme futur modèle d'études précliniques en dénutrition et obésité sarcopénique

5) Congrès de la Société Française de Chirurgie Digestive et de l'Association Française de chirurgie hépato-bilio-pancréatique 2018

Lacaze L, Boudjema K, Georges J, Delamarre J, Le-Gouevéc F, Chauvin A, Val-Laillet D, Thibault R. Mise en place du modèle de mini-porcs Yucatan dénutris avant étude de la régénération hépatique après embolisation portale

6) Congrès de L'European Society of Parenteral and Enteral Nutrition 2017

Lacaze L, Boudjema K, Georges J, Delamarre J, Le-Gouevéc F, Chauvin A, Val-Laillet D, Thibault R The Yucatan minipig as a future model for preclinical studies in malnutrition and sarcopenic obesity.

III. LISTE DES ABBREVIATIONS

ActRIIB : récepteur II Activin Receptor IIB

ADN (ou DNA) : Acide desoxyribonucléique

AG : Acides gras

AGGC : Acides gras à chaînes courtes

AIF : Apoptotic Inducing Factor

ALAT : Alanine aminotransférase

ALK : Activin type I receptor

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : AMP-activated protein kinase

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'évaluation en santé

APAF-1 : Apoptosis Protease Activating Factor-1

ASA : American Society of Anesthesiologists

ASAT : Aspartate aminotransférase

ATG : Autophagy-related gene

ATGL : Adipocyte triglycéride lipase

ATG 13 : Autophagy-related protein 13

ATP: Adénosine triphosphate

BAG-1: Bcl-2-associated gene product-1

BC : Body composition

Bcl-2: B-cell lymphoma-2

BIA : Bioimpédancemétrie

BMI :Body mass index

BMP : Bone morphogenetic protein

CAPNS1 : Calpain Small Subunit 1

CAPN1 : Calpain-1 catalytic subunit

CCI : Cholangiocarcinome intrahépatique

CDC : Dindo-Clavien classification

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CHU : Centre hospitalier universitaire

COX : Cytochrome c oxydase

CPT1 : Carnitine palmitoyltransferase 1

CPT2 : Carnitine palmitoyltransferase 1

CRP : Protéine C réactive

CSA : Cross-sectional area

CT: Computed tomography

DEXA : absorptiométrie biphotonique aux rayons X

DFS : disease-free survival

DISC : Death-inducing signaling complex

DSS : Dextran Sodium Sulfate

EASL : European Association for the Study of the Liver

EIF2 : Eukaryotic Initiation factor 2

ESPEN : Société Européenne de Nutrition clinique et métabolisme

EWGSOP : European Working Group on Sarcopenia in Older People

FABPpm : Fatty acid binding protein

FAS : Fatty acid synthase

FATP1: Fatty acid transport protein 1

FATP4 : Fatty acid transport protein 1

FADD : FAS-associated death domain

FADH2 : Flavine adenine dinucleotide réduite

FIP : Family integrating protein

FoxO : Forkhead box O

GAP : Guanosine triphosphate Activating Protein

G Rheb : G Ras homolog enriched in brain

GLIM : Global Leadership Initiative on Malnutrition

GLUT : glucose transporter

GTP : Guanosine triphosphate

G5K3 beta : Glycogen synthase Kinase 3 beta

HAS : Haute Autorité en Santé

Hz : Hertz

HGF : Hepatocyte growth factor

HH : Hypocalorique/hypoprotidique

HN : hypocalorique/normoprotidique

HSL : Lipase hormono-sensible

HSC70 : Heat Shock protein 70

HR : Hazard ratio

ICC : Intrahepatic cholangiocarcinoma

IGF : Insulin-like growth factor

IL-1 : Interleukine-1

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

IL-10 : Interleukine-10

IMC : Indice de Masse corporelle

IMFA : Intramuscular fat area

IMF I: Intramuscular fat index

IRS-1 : Insulin Receptor Substrate 1

LAMP-2A : Lysosom-associated membrane protein type 2A

LC/LP : Low calorie/low protein diet

LPL : Lipoprotéine lipase

LW : Live weight

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MAFbx : Muscle atrophy F-box

MELD : Model for end-stage liver disease

MJ : Mégajoule

MGL : Monoglyceride lipase

MHC : Heavy myosin chain

MHCCR : Métastases hépatiques de cancer colorectal

MM : Muscle mass

MPC : Mitochondrial pyruvate carrier

Murf1 : Muscle RING finger 1

mTOR : Mammalian target of rapamycin

MW : Metabolic weight

NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé

NADH : Hydrure de nicotinamide adénine dinucléotide

NASH : stéatose hépatique non alcoolique

NF- κ B : Facteur Nucléaire- κ B

OS : Overall survival

PCR : Amplification en chaîne par polymérase

PDC : Pyruvate déshydrogénase

PFA : Paraformaldehyde

PGC-1 : Peroxysome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1

PI3K : Phospho-inositide 3-kinase

PINK1: PTEN-induced putative kinase protein 1

4EB-P1: Eukaryotic initiation factor 4E binding protein

ROC : Receiver Operating Characteristic

SARMs : Modulateurs sélectifs des récepteurs à Androgènes

SCFA : Subcutaneous fat area

SCF I : Subcutaneous fat index

SD : Standard deviation

SFA : Short Fatty Acid

S6K/P70S6K : p70 ribosomal S6 Kinase

SG : Survie globale

SSR : Survie sans récidence

SMA : Abdominal skeletal muscle area

SMI : Skeletal muscle index

Smad : Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic

SIRT1: Sirtuine 1

ST: Standard diet

SODD : Silencer of Death Domain

TDM : tomodensitométrie

TDM L3 : tomodensitométrie passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire

TGFβ : Transforming Growth Factor β

TGFβ1 : Transforming Growth Factor β 1

TH : transplantation hépatique

TSC1 : Tuberous Sclerosis complex 1

TSC2 : Tuberous Sclerosis complex 2

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

TNF12A : Tumor necrosis factor 12A

TNFR : Tumor necrosis factor receptor

TRADD : TNF-R-Associated Death Domain

TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

TWEAK : TNF-like weak inducer of apoptosis

UBC :Ubiquitin-conjugating enzymes

UCP1 : Uncoupling Protein 1

UH : unités Hounsfield

ULK1 : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VFA : Visceral fat area

VFI : Visceral

VLDL : Very low density protein

VSR : visceral-to- subcutaneous tissue area ratio

IV. LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1- Composition d'une fibre musculaire

Figure 2 - Les principaux systèmes protéolytiques impliqués dans l'atrophie musculaire

Figure 3 - Le rôle clé d' IGF-1 dans la régulation de la masse musculaire

Figure 4 - Les mécanismes conduisant à l'atrophie musculaire chez les patients obèses sarcopéniques

Figure 5 - Les différents mécanismes aboutissant à la cachexie cancéreuse sous-tendus par des interactions entre tumeur, tissu adipeux et muscle

Figure 6 - La stimulation du nerf tibial pour mesurer la force musculaire par électromyogramme (twitch) chez le miniporc Yucatan.

Figure 7 - Overall survival according to visceral fat index between the 3 groups: VFI < 50 cm/m² (blue line), [50-100 cm/m²] (green line), and $\geq$ 100 cm/m² (red line) after liver resection with curative intent in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma.

Figure 8 - Disease-free survival according to visceral fat index between the 3 groups: VFI < 50 cm/m² (blue line), [50-100 cm/m²] (green line), and $\geq$ 100 cm/m² (red line) after liver resection with curative intent in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma.

Figure 9 - Body weight and body composition of minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks

Figure 10 - Muscle fiber size in minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks

Figure 11 - Energy metabolism and atrophy signaling pathways in skeletal muscle of minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks.

Figure 12- Expression of genes coding for myostatin, MurF1 and MAFbx in the *trapezius* (A) and *biceps femoris* (B) muscles in minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks.

Figure 13 - Les différents types d'hépatectomies chez le porc

Tableaux

Tableau 1 - Critères phénotypiques permettant d'évaluer la sévérité de la dénutrition

Tableau 2 -Seuils permettant de diagnostiquer une réduction de la masse ou de la fonction musculaires dans le cadre des recommandations de diagnostic de la dénutrition chez l'adulte de moins de 70 ans proposées par l'HAS (Alexandre 2019)

Tableau 3 - Les différentes caractéristiques des fibres musculaires chez l'homme

Tableau 4 - Preoperative patient characteristics.

Tableau 5 - Operative and postoperative patient characteristics

Tableau 6 - Postoperative course of the 93 patients.

Tableau 7 - Body composition data of the 93 included patients

Tableau 8 - Univariate and multivariate analysis of preoperative, intraoperative and postoperative variables associated with overall survival

Tableau 9 - Univariate and multivariate analysis of preoperative, intraoperative and postoperative variables associated with disease-free survival

Tableau 10 - Composition and nutritional values of the two isocaloric feeds used in the experiments to feed the minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks

Tableau 11 - Sequences of primers (5'-3') used for RT-qPCR

Tableau 12 - List of primary antibodies used for Western blotting

Tableau 13 - Biological analysis in plasma of minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks.

V. AVANT-PROPOS

La dénutrition est un problème de santé publique en France et dans le monde. Elle atteint plus de 2 millions de personnes en France. Parmi les patients hospitalisés, un tiers est dénutri ou à risque de dénutrition en cours d'hospitalisation (Schuetz et al. 2021). La dénutrition augmente la morbi-mortalité des patients, leur durée d'hospitalisation (Evans et al. 2014; Schuetz et al. 2021). Elle est également associée à une augmentation des infections nosocomiales, des complications post-opératoires, des escarres, des troubles de la cicatrisation et des pneumopathies (Heymsfield et al. 1979; Schneider et al. 2004). Une des maladies fréquemment associées à la dénutrition est le cancer, notamment au niveau hépatique, qu'il s'agisse d'une tumeur primitive (carcinome hépatocellulaire ou cholangiocarcinome intrahépatique) ou d'une tumeur secondaire (en particulier métastases hépatiques de cancer colorectal). Le traitement curatif des cancers du foie est principalement représenté par la résection hépatique (ou hépatectomie) dont l'importance est variable en fonction de la taille tumorale. Lors des hépatectomies majeures, il est parfois nécessaire d'utiliser des techniques (embolisation ou ligature portale) afin d'obtenir une régénération du foie préopératoire. Dans certains cas, le foie restant ne parvient pas à régénérer après hépatectomie ou après ligature/embolisation portale. L'impact de la dénutrition sur la régénération du foie est mal connu. La forme de dénutrition rencontrée au cours des cancers a été nommée par un consensus d'expert 'cachexie' (Kenneth C. H. Fearon 2011), et sa physiopathologie est celle d'une forme marasmique de dénutrition en lien avec un déficit d'apports protéino-énergétiques oraux (anorexie) couplée à un syndrome inflammatoire chronique. La perte de la masse musculaire complique très souvent la dénutrition, et elle peut être accompagnée d'une perte de la fonction musculaire, constituant alors une 'sarcopénie' (Cruz-Jentoft et al. 2019). La dénutrition représente un facteur pronostique péjoratif de nombreux cancers. Dans les nouvelles recommandations de diagnostic de la dénutrition de la Haute Autorité de Santé

(HAS) publiées en 2019 (Delarue et al. 2021), la mesure de la composition corporelle par scanner (appelé aussi tomodensitométrie, TDM) est recommandée pour évaluer la masse musculaire. Le muscle est le principal réservoir de protéines de l'organisme. L'amyotrophie survient en raison d'un déficit protéino-énergétique et/ou d'un hypercatabolisme : il est donc crucial d'analyser le phénotype musculaire. Au cours d'une restriction calorique, une modification du phénotype musculaire a été décrite chez le rongeur (Dumitriu et al. 2018). Les fibres musculaires de type II sont principalement affectées par la dénutrition (Dumitriu et al. 2018).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de modèle animal de dénutrition aux caractères physiologiques proches de l'Homme. Nous souhaitons développer un modèle animal préclinique proche de l'Homme. Le miniporc Yucatan convient, notamment en raison de sa proximité avec l'Homme en termes d'anatomie et de physiologie nutritionnelle. De plus, le miniporc, du fait de sa plus petite taille, permet des explorations similaires à celles réalisées chez l'Homme, notamment en termes de composition corporelle mais aussi de volumétrie hépatique pour étudier la régénération du foie. Ce modèle serait la base solide pour mener des études métaboliques, mécanistiques ou pharmacologiques, pour mieux comprendre la physiopathologie et tester de nouveaux traitements de la dénutrition.

VI. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

La prévalence de la dénutrition chez les patients atteints de cancer est très élevée, jusqu'à 70% dans les cancers digestifs ou oto-rhino-laryngés (Schneider and Correia 2020). Le muscle est actuellement l'organe le plus étudié dans le cadre de la dénutrition. En effet, une des propriétés du muscle est sa plasticité et ses mécanismes d'adaptation à diverses situations dont la dénutrition. En situation de déficit protéino-énergétique, la réponse musculaire est une atrophie. La mesure de la composition corporelle musculaire squelettique par TDM est devenue une méthode reconnue dans le diagnostic de la dénutrition. De nombreuses publications ont mis en évidence l'impact négatif d'une baisse de la surface musculaire totale sur une coupe TDM sur le pronostic des cancers notamment du carcinome hépatocellulaire. L'impact de la composition corporelle n'a été que très peu étudié chez les patients atteints de cholangiocarcinomes intra-hépatiques alors qu'il s'agit du 2^{ème} type de tumeur hépatique primitive le plus fréquent. Nous avons donc fait l'hypothèse que la prévalence de la dénutrition était élevée chez les patients atteints de cholangiocarcinome intrahépatique dont le caractère peu symptomatique peut conduire à un diagnostic tardif.

L'objectif premier de ce travail de thèse était donc de déterminer la prévalence de la dénutrition chez les patients opérés de cholangiocarcinome intrahépatique, d'évaluer l'impact de la composition corporelle musculaire squelettique et adipeuse, mesurées sur une coupe scannographique passant par L3, sur la survie globale, sur la survie sans récurrence et les complications post opératoires.

La deuxième partie de ce travail de thèse a consisté en la mise au point d'un modèle de dénutrition préclinique chez le miniporc Yucatan ainsi que sa caractérisation phénotypique musculaire.

Il n'existe pas à notre connaissance de modèle préclinique de dénutrition de type marasmique réellement proche de l'Homme. Il existe presque autant de modèles de dénutrition chez le

rongeur que de publications et surtout les rongeurs sont, à la différence de l'Homme, n'ont pas le même comportement alimentaire, ils sont nourris *ad libitum* et n'ont pas non plus le même cycle nycthémal. En l'absence de modèle animal standardisé de dénutrition marasmique, nous avons voulu mettre au point un modèle de miniporc Yucatan, animal proche de l'Homme pour l'étude de la nutrition et surtout permettant une étude de la composition corporelle par TDM, comme cela est fait chez l'Homme. A l'avenir, ce modèle préclinique permettrait l'étude des modifications métaboliques et comportementales, des dysfonctions d'organes, et du dialogue inter-organes au cours de la dénutrition, ainsi que de l'adaptation musculaire à la restriction protéino-énergétique.

VII. INTRODUCTION

A. Dénutrition

1. Définition

Il n'existe pas de définition consensuelle de la dénutrition. Elle est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme due à « une ration alimentaire continuellement insuffisante par rapport aux besoins énergétiques, à une malabsorption et/ou une utilisation biologique insuffisante des nutriments consommés ». La dénutrition protéino-énergétique a également été définie en 2003 par l'ANAES (Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé) comme « résultant d'un déséquilibre entre les apports et les besoins protéino-énergétiques de l'organisme. Ce déséquilibre entraîne des pertes tissulaires ayant des conséquences fonctionnelles délétères. Il s'agit d'une perte tissulaire involontaire. L'amaigrissement se différencie de la dénutrition par le caractère non délétère de la perte pondérale. Il peut être volontaire ou non » (Delarue et al. 2021). La Société Européenne de Nutrition clinique et métabolisme (ESPEN) la définit comme « un état résultant d'un manque d'apport ou d'absorption conduisant à une perte de la masse musculaire et de la masse cellulaire entraînant une altération des fonctions physiques et mentale ainsi qu'une altération du pronostic des maladies » (Cederholm et al. 2015; Cederholm et al. 2017a).

Deux formes de dénutrition sont observées : le kwashiorkor et le marasme. Le kwashiorkor, ou forme hypoalbuminémique de dénutrition, est observé en cas de déficit protéique important dans un contexte de syndrome inflammatoire aigu. Il s'ensuit une hypoalbuminémie responsable de l'apparition d'œdèmes prenant le godet touchant les zones déclives (membres inférieurs ou lombes), mais pouvant atteindre également les membres supérieurs et la face. Les œdèmes peuvent s'associer à une ascite ou un épanchement pleural, pouvant aller jusqu'à l'anasarque. Les autres signes cliniques du kwashiorkor associent une apathie ou une décoloration des cheveux. On observe également un déficit immunitaire, et sur

le plan biologique, une hypoalbuminémie et une hypotransferrinémie. Dans les formes historiques décrites en Afrique de l'Ouest, le kwashiorkor peut se compliquer d'une hépatomégalie secondaire à une stéatose hépatique. Dans nos hôpitaux, le kwashiorkor peut s'observer chez le patient de réanimation.

Le marasme est une forme de dénutrition secondaire à une diminution progressive des apports protéino-énergétiques oraux permettant une adaptation métabolique. La perte de masse grasse est prédominante et progressive. L'adaptation métabolique de l'organisme vise à maintenir la masse musculaire squelettique, mais qui malgré tout diminue progressivement (Emery 2005). Le marasme s'observe par exemple au cours de l'anorexie mentale ou accompagné d'un syndrome inflammatoire dans le cancer. Il existe un continuum entre ces deux formes de dénutrition. Chez les patients hospitalisés, on trouve souvent des formes mixtes à type de marasme décompensé sous forme hypoalbuminémique, pouvant s'associer à des œdèmes.

2. Mécanismes physiopathologiques d'adaptation au jeûne

En cas d'apports énergétiques et protéiques insuffisants, des mécanismes d'adaptation physiologiques se mettent en place afin d'assurer un apport de glucose au cerveau et afin de limiter la perte de masse musculaire squelettique (Emery 2005). En cas de dénutrition, le métabolisme basal diminue avec une diminution de l'activité métabolique des cellules. Ceci avait été bien montré dans « l'expérience du Minnesota ». L'expérience du Minnesota est une étude longitudinale conduite chez 32 hommes jeunes volontaires qui ont subi 24 semaines de semi-jeûne, puis 20 semaines de renutrition (Keys A, Henschel A, Mickelsen O, Taylor HL. The Biology of Human Starvation.1–2 Minneapolis, MN: University of Minnesota Press; 1950.). Il a été observé dans cette expérience une diminution de 15% de l'activité métabolique des tissus (en kcal/jour/unité de masse tissulaire active) (Emery 2005).

L'étude CALERIE (Comprehensive Assessment of the Long-term Effects of Reducing Energy Intake) est une étude prospective randomisée innovante publiée en 2011. Elle a inclus 220 patients avec un ratio de 2:1 soumis soit à une restriction calorique de 25% pendant 2 ans, soit à aucune restriction calorique. Elle comporte 2 parties. CALERIE 1 est une étude ancillaire étudiant les effets d'un an de restriction calorique chez 51 patients sur la fonction mitochondriale musculaire (Sparks et al. 2017). Celle-ci n'a pas mis en évidence d'effet sur la fonction mitochondriale. L'étude CALERIE 2 a inclus tous les patients. Cette étude a mis en évidence une perte de poids de 9,9% à 6 mois, 11,5% à 12 mois et 10,4% à 24 mois. La perte de poids survenait dans les 60 semaines après le début de la restriction calorique, puis le poids restait stable signant l'adaptation métabolique. La perte de poids était principalement une perte de masse grasse (5,4kg) associé à une plus faible perte de masse musculaire 2 kg (Dorling et al. 2020). Une réduction de la densité osseuse était également observée à 12 mois, puis celle-ci était stabilisée (Dorling et al. 2020).

L'adaptation du corps au jeûne passe par plusieurs phases en fonction de la durée de celui-ci. Le corps possède des réserves en lipides et en glucides pour faire face au jeûne. Alors que les glucides représentent un substrat indispensable pour le cerveau, le stockage des lipides est bien plus important dans l'organisme que celui des glucides (Quillot D 2016). Les lipides sont stockés dans le tissu adipeux, alors que les glucides sont stockés dans le foie et le muscle sous forme de glycogène. Le muscle est quant à lui un lieu de réserve des acides aminés, mais sans que l'on ne puisse parler de stockage comme pour les graisses dans le tissu adipeux. La dégradation des lipides permettra d'obtenir 9 kcal/g, alors que celle des glucides ne permettra d'obtenir que 4 kcal/g.

En cas de jeûne, trois principales voies métaboliques permettent l'adaptation métabolique et la survie de l'organisme : la lipolyse, la glycogénolyse et la néoglucogenèse.

a) Lipolyse et oxydation des acides gras

En cas de restriction calorique ou de jeûne, les acides gras des triglycérides situés dans le tissu adipeux sont mobilisés. Les triglycérides sont hydrolysés dans le tissu adipeux pour donner 3 acides gras et 1 molécule de glycérol. Trois enzymes vont intervenir : la triglycéride lipase adipocytaire, la lipase hormonosensible et la monoglycéride lipase. Au cours du jeûne, la triglycéride lipase adipocytaire va augmenter permettant de libérer plus d'acides gras.

L'oxydation des acides gras va permettre la production d'acétyl CoA et d'équivalents réduits NADH et FADH₂ qui pourront rentrer dans le cycle de Krebs. L'oxydation des acides gras est différente dans le foie et dans le muscle. L'oxydation des acides gras dans le foie va permettre la synthèse de corps cétoniques : acéto-acétate et β -hydroxybutirate. Les corps cétoniques peuvent être utilisés par le muscle et par le cerveau comme source d'énergie. L'oxydation hépatique des acides gras va aussi permettre de fournir de l'ATP pour la néoglucogenèse. L'oxydation des acides gras dans le muscle ne va pas conduire à la production de corps cétoniques, mais va permettre la diminution de l'utilisation du glucose par le muscle (Quillot D 2016)

3. La glycogénolyse et la néoglucogenèse

Au bout de 48h de jeûne, le contenu en glycogène hépatique chute de 75% (Eriksson et al. 2017). La glycogénolyse n'aura lieu que dans les quelques heures suivant le début du jeûne, ensuite la néoglucogenèse sera nécessaire avec comme principal objectif de fournir du glucose au cerveau. Les principaux substrats utilisés sont l'alanine (60%), l'acide lactique (30%) et le glycérol (10%). Le glycérol provient notamment de la lipolyse. Le cycle alanine-glucose permettra la production de glucose. Le cycle glucose/lactate permettra surtout d'épargner la néoglucogenèse d'origine protidique, donc de limiter la protéolyse musculaire.

Le rôle du muscle en situation de jeûne ou de dénutrition sera précisé plus loin. Avant cela, nous nous intéresserons nous aux modalités de diagnostic de la dénutrition.

B. Critères diagnostiques de dénutrition

En 2018, sous l'égide du Global Leadership Initiative on Malnutrition (GLIM), de nouveaux critères diagnostiques de dénutrition ont été publiés (Cederholm et al. 2019). Le diagnostic de dénutrition repose sur l'association entre un critère phénotypique parmi la perte de poids involontaire, l'indice de masse corporelle (IMC) bas ou une réduction de la masse musculaire, et un critère étiologique parmi la réduction des apports ou de leur absorption ou une maladie aiguë ou chronique et/ou inflammatoire. La sévérité de la dénutrition est déterminée par les critères phénotypiques (Cederholm et al. 2019).

Les critères phénotypiques sont les suivants (Cederholm et al. 2019) :

- Perte de poids $> 5\%$ dans les 6 derniers mois ou $> 10\%$ au-delà de 6 mois ;
- $IMC < 20 \text{ kg/m}^2$ si l'âge est inférieur à 70 ans ou $IMC < 22 \text{ kg/m}^2$ si l'âge est supérieur à 70 ans (pour l'Asie : $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ si l'âge est inférieur à 70 ans ou $IMC < 20 \text{ kg/m}^2$ si l'âge est supérieur à 70 ans) ;
- Réduction de la masse musculaire évaluée par absorptiométrie biphotonique aux rayons X ou Dual-Energy X-ray absorptiometry (DEXA), bioimpédancemétrie ou Bioimpedance analysis (BIA), Scannographie (mesure de la surface musculaire totale sur une coupe axiale passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire) ou Imagerie par résonnance magnétique (mesure de la surface musculaire totale sur une coupe axiale passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire) ou mesures anthropométriques cliniques (ex : circonférence brachiale, circonférence du mollet) ou réduction de la force musculaire (ex : mesure de la force de préhension (serrement, ou 'handgrip') à l'aide d'un dynamomètre à main).

Les critères étiologiques sont les suivants :

- Baisse des ingesta de plus de 50% pendant plus d'une semaine, ou toute baisse des ingesta supérieure à 2 semaines, ou toute atteinte digestive altérant la prise alimentaire (par exemple, dysphagie, dysgueusie, nausées, vomissements, diarrhée, douleur abdominale, syndrome de grêle court, sténose digestive, gastroparésie, chirurgie bariatrique, insuffisance pancréatique, occlusion, pseudo-obstruction intestinale chronique) ;
- Inflammation aiguë (par exemple : brûlures, choc septique, polytraumatisme) ou chronique (par exemple : cancer, maladie inflammatoire chronique de l'intestin, cirrhose).

Ces recommandations distinguent ensuite deux grades de sévérité de la dénutrition qui sont détaillés dans le tableau 1 (Cederholm et al. 2019):

Tableau 1 - Critères phénotypiques permettant d'évaluer la sévérité de la dénutrition
(Cederholm et al. 2019)

	Critères Phénotypiques		
	Perte de poids	IMC	Réduction masse musculaire
Grade 1 dénutrition modérée	5%-10% en moins de 6 mois	< 20 kg/m ² si âge > 70 ans	Moyenne à modérée
	10%-20% au-delà de 6 mois	< 22 kg/m ² si âge > 70 ans	
Grade 2 dénutrition sévère	>10% dans les 6 derniers mois	< 18.5 kg/m ² si âge > 70 ans	Sévère
	>20% au-delà de 6 mois	< 20kg/m ² si âge > 70 ans	

En 2019, la Haute Autorité en Santé (HAS) a émis des recommandations françaises de diagnostic de la dénutrition pour les adultes de moins de 70 ans proches de celles du GLIM (Delarue et al. 2021) et associant également un critère de diagnostic phénotypique et un critère de diagnostic étiologique.

Les critères phénotypiques sont un peu différents :

- Perte de poids $\geq 5\%$ en 1 mois ou $\geq 10\%$ en 6 mois ou $\geq 10\%$ par rapport au poids
- IMC < 18,5 kg/m²
- Réduction de la masse ou de la fonction musculaire.

Les seuils permettant d'établir ce dernier critère phénotypique ont été publiés dans ces recommandations (Delarue et al. 2021)(Tableau 2). Il est important de noter que l'indice de masse musculaire mesuré par scanner ou IRM fait maintenant partie des méthodes diagnostiques de la dénutrition.

Tableau 2 - Seuils permettant de diagnostiquer une réduction de la masse ou de la fonction musculaires dans le cadre des recommandations de diagnostic de la dénutrition chez l'adulte de moins de 70 ans proposées par l'HAS (Delarue et al. 2021).

Méthodes	Homme	Femme
Force de préhension (kg)	<26	<16
Vitesse de marche (m/s)	< 0,8	< 0,8
Index de surface musculaire totale sur une coupe en L3 (TDM ou IRM) (cm ² /m ²)	52,4	38,5
Impédancemétrie : index de masse musculaire (kg/m ²)	7,0	5,7
Impédancemétrie : index de masse non grasse (kg/m ²)	<17	<15
Masse musculaire appendiculaire (DEXA)	7.23	5.67

Par rapport au GLIM, la HAS a aussi modifié la définition des grades de sévérité de la dénutrition. Les critères de dénutrition modérée selon l'HAS sont :

- IMC entre 17 et 18,5 kg/m² ;
- Perte de poids $\geq 5\%$ en 1 mois ou $\geq 10\%$ en 6 mois ou $\geq 10\%$ par rapport au poids habituel avant la maladie ;
- albuminémie comprise entre 30 g/l et 35 g/l (mesure par immunonéphélémétrie ou immunoturbidimétrie).

Les critères de dénutrition sévère selon l'HAS sont :

- IMC ≤ 17 kg/m² ;
- Perte de poids $\geq 10\%$ en 1 mois ou $\geq 15\%$ en 6 mois ou $\geq 15\%$ par rapport au poids habituel avant la maladie ;
- albuminémie comprise < 30 g/l (mesure par immunonéphélémétrie ou immunoturbidimétrie).

Il est intéressant de noter que les normes d'IMC ne sont pas exactement les mêmes entre les recommandations du GLIM et celles de l'HAS. De même, alors que le dosage de l'albumine

apparaît comme un critère de gravité selon l'HAS, celui-ci n'apparaît dans les recommandations du GLIM que comme un critère étiologique permettant d'identifier l'inflammation.

Une des caractéristiques de la dénutrition est une modification du phénotype musculaire à type d'atrophie et de perte de la fonction musculaire appelée sarcopénie (Cruz-Jentoft et al. 2010). Nous nous sommes donc focalisés sur le muscle.

C. Le muscle

1. Structure du muscle strié squelettique

Le muscle est composé de cellules musculaires appelées fibres musculaires. Ces cellules sont les 2^{èmes} plus grandes du corps humain après les cellules neuronales. Le diamètre des fibres musculaires varie entre 10 et 100 μm . Elles peuvent mesurer jusqu'à 15 cm dans les muscles les plus longs. Chaque fibre musculaire a plusieurs noyaux qui sont situés sous la membrane cellulaire appelée sarcolemme. Chaque fibre musculaire contient : le sarcoplasme (cytoplasme), des mitochondries, de la myoglobine et des myofibrilles. Chaque myofibrille est divisée en compartiments appelés sarcomère. Ces compartiments mesurent 2 μm et sont séparés par les disques Z. A l'intérieur de ceux-ci, on trouve 2 types de myofilaments contractiles : les myofilaments épais sont la myosine et les myofilaments minces : l'actine. Les filaments d'actine sont traversés en leur milieu par la ligne Z. A proximité de la ligne Z se trouve la bande I qui est constituée exclusivement de filaments d'actine. La bande A correspond à une zone de chevauchement entre les filaments d'actine et de myosine. La zone H contient exclusivement des filaments de myosine. Ceux-ci s'épaississent au centre du sarcomère pour déterminer la ligne M (Figure 1).

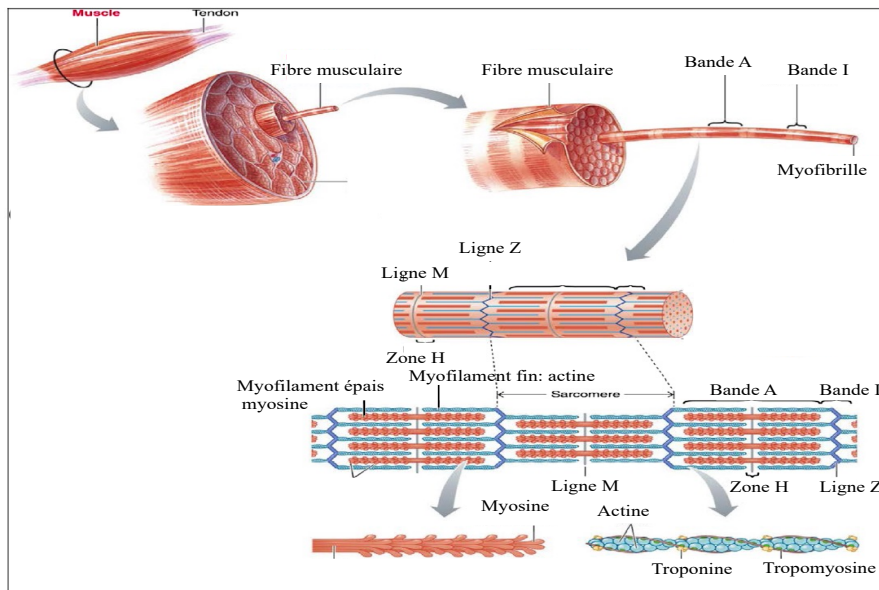


Figure 1 - Composition d'une fibre musculaire (d'après Frontera and Ochala 2015 et d'après Raven, PB et al. 2013, et original de Sherwood L 2010)

2. Les différents types de fibres musculaires

Chaque muscle est composé de différents types de fibres musculaires. Il existe trois principaux types de fibres musculaires ayant chacune des propriétés métaboliques et contractiles propres : lentes et oxydatives, rapides glycolytiques et rapides oxydo-glycolytiques (Galpin et al. 2012; Schiaffino et al. 2013). Leur type est déterminé en fonction de leur composition en différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC) dont il existe 3 types : I, IIA et IIX. Chaque muscle peut contenir soit une isoforme de MHC soit plusieurs. Il existe chez l'Homme cinq combinaisons principales de fibres musculaires : I, I/IIA, IIA, IIA/IIX, IIX (Galpin et al. 2012).

Les fibres de type I sont des fibres lentes et oxydatives. Elles sont aussi appelées « fibres rouges ». Elles sont très vascularisées et riches en myoglobine. Elles contiennent un nombre élevé de myofibrilles, de nombreuses mitochondries mais peu de glycogène. Elles produisent leur ATP par une phosphorylation oxydative. Elles contiennent principalement des isoformes

de myosine de type I (MHC-I). Ce type de fibre musculaire est utilisé principalement pour des efforts peu intenses et prolongés de type maintien de posture.

Les fibres de type IIB ou IIX sont rapides et glycolytiques. Elles contiennent peu de mitochondries mais beaucoup de glycogène. Elles sont peu vascularisées contrairement aux fibres de types I. Elles ont un métabolisme glycolytique. Ce type de fibres musculaires est adapté aux efforts intenses et rapides.

Les fibres de type IIA contiennent un nombre moins élevé de myofibrilles que les fibres de type IIB. Elles ont un fonctionnement mixte oxydo-glycolytique permettant une meilleure résistance à la fatigue que les fibres de type IIB.

Les différentes caractéristiques des types de fibres ont été résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 - Les différentes caractéristiques des fibres musculaires chez l'homme (d'après Traité de Nutrition Clinique, chapitre muscle, Charles Couet, Didier Attaix (Quillot D 2016)).

Propriétés	Fibres I	Fibres IIA	Fibres IIB
Diamètre des fibres	-	+	++
Vitesse de contraction	-	++	+++
Fatigabilité	++	+	-
Force	-	++	+++
Capacité oxydative	++	++	-
Capacité glycolytique	-	++	++
Myoglobine	++	++	-
Mitochondries	++	++	-
Vascularisation	++	+	-
Source principale d'énergie	Triglycérides	Phosphocréatine Glycogène	Phosphocréatine Glycogène

Le muscle est doté d'un pouvoir de plasticité important en fonction des différentes conditions dans lesquelles il se trouve et donc son phénotype musculaire peut changer en fonction des différents types de MHC exprimés.

3. Les substrats énergétiques du muscle

Dans le muscle au repos, les lipides contribuent pour 50 à 80% et les glucides pour 20 à 50% au métabolisme oxydatif. L'ATP est la seule source d'énergie immédiatement utilisable pour la contraction musculaire. L'obtention d'ATP peut se faire soit par le métabolisme oxydatif soit par le métabolisme glycolytique.

a) Le métabolisme lipidique

Les triglycérides sont transportés dans le sang par les lipoprotéines. Les chylomicrons et les VLDL (very low density protein) sont des lipoprotéines riches en triglycérides. La LPL (lipoprotéine lipase) se trouvant au niveau du muscle strié squelettique permet d'hydrolyser les chylomicrons ainsi que les VLDL entraînant la libération d'acides gras (AG). L'hydrolyse des triglycérides nécessite l'intervention de trois enzymes : l'adipose triglycéride lipase (ATGL), la lipase hormonosensible (HSL), et la monoglycéride lipase (MGL).

La LPL est l'étape limitante de l'hydrolyse des triglycérides et du captage des AG issus de celle-ci. Des AG provenant du tissu adipeux peuvent également être transportés par l'albumine jusqu'au muscle squelettique. Les acides gras sont ensuite pris en charge par les FABPpm (protéines de liaison aux acides gras) présentes au niveau de la membrane externe de la cellule musculaire. L'entrée des acides gras dans la cellule musculaire est ensuite permise par les transporteurs membranaires CD36 et FATP1 et FATP4. Les acides gras peuvent directement être utilisés par la cellule pour produire de l'énergie ou bien être stockés

sous forme de triglycérides eux-mêmes stockés sous forme de gouttelettes lipidiques à proximité des mitochondries. Le processus de lipolyse permet ensuite de transformer les acides gras ou triglycérides en Acyl-CoA via l'Acyl-CoA synthétase. L'Acyl-CoA se lie ensuite à la carnitine sous l'effet des carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) et carnitine palmitoyltransferase 2 (CPT2). Cette liaison est nécessaire pour que l'acyl-CoA franchisse les membranes mitochondriales et soit transporté au sein de la matrice. L'Acyl-CoA pourra entrer dans le cycle de la β -Oxydation, aboutissant à la production d'Acétyl-CoA. Les Acétyl-CoA entrent ensuite dans le cycle de Krebs, ce qui aboutit à la production de composés NADH et FADH₂ permettant le transport des ions H⁺ jusqu'à la chaîne respiratoire, pour permettre la production d'ATP (Fritzen et al. 2020).

b) Le métabolisme glucidique

Le glucose transporter (GLUT) 4 représente 90% de la totalité des transporteurs membranaires de glucose au sein de la cellule musculaire. La distribution de GLUT 4 est variable en fonction du type de fibres musculaires. Les fibres musculaires de type 1 (oxydatives) expriment 4 fois plus GLUT 4 que les fibres musculaires de type 2 (glycolytiques) (Goodyear et al. 1991). L'insuline produite en réponse à une hyperglycémie va se fixer sur son récepteur ce qui va permettre la translocation de GLUT4 vers la membrane cellulaire. Une fois dans le cytoplasme, le glucose est transformé en glucose-6-phosphate sous l'action de l'hexokinase. Ce dernier est ensuite soit stocké sous forme de glycogène constituant ainsi une réserve d'énergie pour les cellules musculaires, soit directement oxydé, transformé en pyruvate *via* la glycolyse. En fonction des besoins énergétiques cellulaires, soit le pyruvate sera transformé en acide lactique, lui-même se dissociant en ions H⁺ et en lactate sous l'action de la LDH, soit il rejoindra la matrice mitochondriale via le MPC (mitochondrial pyruvate carrier) et intégrera la voie oxydative. Son passage dans le complexe pyruvate

déshydrogénase (PDC) aboutira à la production d'Acétyl-CoA qui lui-même pourra entrer dans le cycle de Krebs (Fritzen et al. 2020) .

4. Les mécanismes de régulation de la masse musculaire

Le muscle représente 40 % à 50% du poids corporel d'un individu (Biolo et al. 2014). C'est le plus grand réservoir de protéines de l'organisme humain. Il a un rôle important dans de nombreuses fonctions comme le métabolisme des acides aminés, l'homéostasie énergétique, la régulation de la température et la sensibilité à l'insuline. Le muscle est défini comme un organe endocrine. Il permet également le stockage des glucides et des lipides. En cas de jeûne, il va permettre la libération d'acides aminés. Il présente une grande plasticité, lui permettant de s'hypertrophier ou de s'atrophier en fonction de diverses situations (Schiaffino et al. 2013). Il est capable de s'hypertrophier en cas d'activité importante. Il s'atrophie en situation de dénutrition, d'immobilisation prolongée ou de dénervation. En cas de dénutrition, de pathologie inflammatoire de type cancer, ou d'insuffisance chronique d'organe, il est observé une diminution de la masse musculaire squelettique, ainsi qu'une diminution de la section transversale des fibres musculaires (Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B. un Nisa, et al. 2021). L'adaptation du métabolisme musculaire est possible grâce à la présence de protéines telle que l'AMP activate protein Kinase (AMPK), mammalian Target of Rapamycin (mTOR) ou Sirtuin1 (SIRT1). La réponse métabolique du muscle squelettique à la modification de son environnement (dénutrition, hypoxie, exercice physique) va se produire à l'aide de facteurs hormonaux qui vont induire des modifications des facteurs de transcription comme SIRT1. AMPK et SIRT1 sont des senseurs énergétiques au sein du muscle. En cas de dénutrition, donc de déficit énergétique, AMPK va être activée par l'augmentation du ratio Adénosine Mono Phosphate (AMP)/ATP et l'activation d'AMPK va activer SIRT 1 par l'augmentation de Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé (NAD⁺) (Fulco and Sartorelli 2008; Cantó et

al. 2009; Cantó et al. 2010). L'augmentation de l'AMPK va conduire au déclenchement des mécanismes permettant une augmentation du taux d'ATP : oxydation des lipides, oxydation des glucides, activation de l'autophagie et du complexe ubiquitine-protéasome (Yoshida and Delafontaine 2020). AMPK a deux cibles : mTOR et Forkhead box O (FoxO). Elle va agir à la fois sur la voie Akt (Protéine Kinase B) /mTor par activation de mTORC1, mais aussi sur FoxO par l'activation de FoxO 1 et FoxO 3 (Figure 2). Ceci sera détaillé plus bas (paragraphe a), page 31). SIRT 1 est une déacétylase. En cas de dénutrition, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de SIRT1 au sein du muscle. L'augmentation de l'activité de SIRT1 va permettre une augmentation des capacités oxydatives du muscle. Lorsqu'au contraire la présence d'insuline ou d'IGF1 augmente, la voie proanabolique Akt/mTOR est activée.

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'atrophie musculaire :

- ◇ La réduction de la synthèse protéique par l'intermédiaire de la voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/Akt/mTOR
- ◇ L'augmentation de la protéolyse musculaire par l'intermédiaire du système ubiquitine/protéasome, de l'autophagie, du système calpaïne/caspases et de l'apoptose.

a) La synthèse protéique : la voie PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR joue un rôle clé dans la synthèse protéique. Elle régule la traduction des protéines, l'élongation de la traduction des protéines et la biogénèse ribosomale. En contexte d'atrophie musculaire, celle-ci se trouve inhibée.

Sous l'action de l'insuline, le facteur de croissance IGF-1 active l'enzyme Phospho-inositide 3-kinase (PI3K). La fixation de l'IGF-1 sur son récepteur IGF-1R va entraîner la

phosphorylation de l'Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1) (Figure 2). Ceci va ensuite activer PI3K par phosphorylation, puis celui-ci va alors activer la serine/thréonine AKT (Yoshida and Delafontaine 2020). Cette dernière va inhiber l'action du complexe Tuberous Sclerosis complex (TSC)1/TSC2 en phosphorylant TSC2 sur ses résidus Ser⁹³⁹ et Thr¹⁴⁶². L'activité GAP (Guanosine triphosphate Activating Protein) de ce complexe va ensuite inhiber l'activité de la protéine G Rheb (Ras homolog enriched in brain). Il va en découler une augmentation de la forme Rheb-GTP, ce qui va permettre l'activation de mTORC1. mTORC1 est un complexe protéique avec raptor. mTORC1 va alors phosphoryler S6K1 et 4EBP1 qui vont déclencher la synthèse protéique en activant la protéine 6S ribosomal et en libérant le facteur de transcription eIF-4E (Yoon 2017a). Akt joue un rôle majeur dans la synthèse protéique. Il permet l'activation de mTOR en favorisant sa phosphorylation, mais il peut également favoriser la synthèse protéique sans passer par l'activation de mTOR, mais en phosphorylant directement le facteur Glycogen Synthesis Kinase 3(GSK3). L'action de celui-ci va être inhibée et cela va permettre l'initiation de la traduction *via* le facteur Eukaryotic Initiation factor 2 (EIF2) (Welsh et al. 1998).

En cas de déficit énergétique, il y a une augmentation de l'AMPK. L'AMPK va alors phosphoryler TSC2 sur ses résidus Thr¹²²⁷ et Ser¹³⁸⁷ ainsi que raptor (protéine de régulation associée à mTOR), ce qui aboutit à une inhibition de mTORC1, donc une inhibition de la synthèse protéique. L'AMPK peut également directement inhiber mTORC1 en phosphorylant son résidu Ser¹³⁸⁷. L'inhibition de mTORC1 va entraîner l'activation de ULK1. ULK1 va ensuite phosphoryler ATG13 et FIP2000, ce qui va activer l'autophagie (Hosokawa et al. 2009; Jung et al. 2009; Lee et al. 2010; Kim et al. 2011; Viollet and Foretz 2011; Sartori et al. 2021).

Cependant, même si mTORC1 joue un rôle crucial dans l'homéostasie musculaire et l'autophagie, plusieurs études suggèrent que l'autophagie peut également être déclenchée indépendamment de l'inhibition de mTORC1 (Sartori et al. 2021) .

b) La protéolyse musculaire

La protéolyse musculaire peut être réalisée par trois différents systèmes : le système ubiquitine-protéasome, l'autophagie et les calpaïnes (Figure 2).

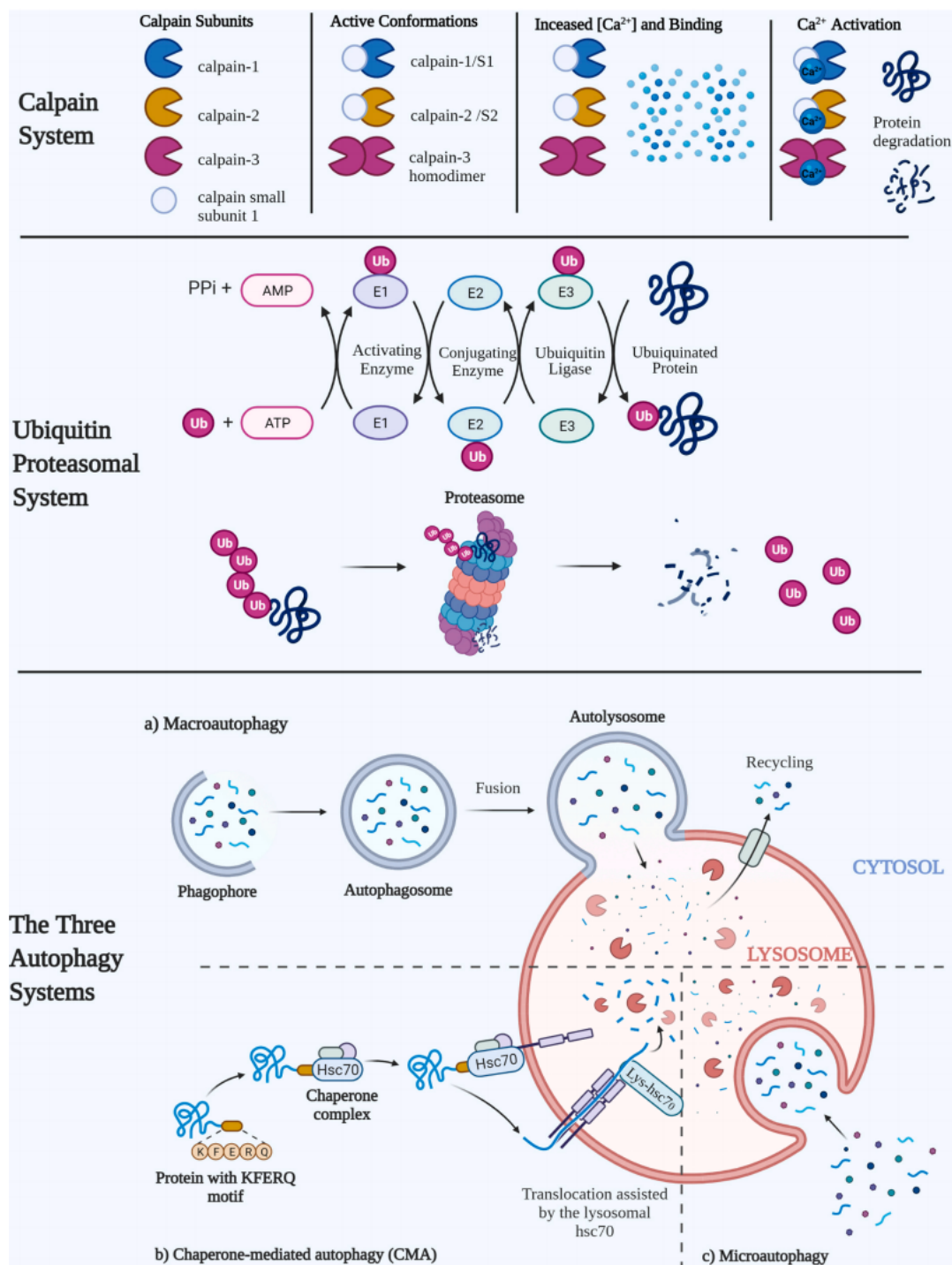


Figure 2 - Les principaux systèmes protéolytiques impliqués dans l'atrophie musculaire (Wilburn et al. 2021)

(1) Le système ubiquitine/protéasome

Il fonctionne en deux temps : il marque d'abord les protéines myofibrillaires avec une queue polyubiquitine, puis ces protéines marquées seront détruites par le protéasome 26S.

L'ubiquitine est une petite protéine contenant 76 acides aminés, elle est très conservée.

Le protéasome 26S assure la reconnaissance et la destruction des protéines polyubiquitinylées ; il est formé par un complexe protéolytique de 2000 kDa (Coux and Piechaczyk 2000).

L'ubiquitinylation se fait en trois temps (Kleiger and Mayor 2014) :

- L'enzyme E1 est une enzyme d'activation appelée Ubiquitin activating enzym ou E1. Elle forme une liaison thioester avec l'ubiquitine (Kleiger and Mayor 2014; Hann et al. 2019) ;
- La famille d'enzyme E2, appelée Ubiquitin-conjugating enzymes (UBC) va recevoir l'ubiquitine par une autre liaison thioester. Certaines enzymes E2 peuvent directement transférer l'ubiquitine sur les protéines myofibrillaires cibles. Cependant, la plupart du temps une 3^{ème} enzyme est nécessaire ;
- L'enzyme E3 ou Ubiquitine ligase permet la reconnaissance des protéines à marquer et leur ubiquitinylation.
- Un complexe enzymatique E4 a été mis en évidence et sert à allonger les queues d'ubiquitine de certains substrats (Coux and Piechaczyk 2000).

Dans le muscle, ont été identifiées les Ubiquitine ligases E3 Muscle RING finger 1 (Murf1) et Muscle atrophy F-box (MAFbx)/atrogin1. Une augmentation de Murf1 et de MAFbx a été bien mise en évidence dans plusieurs situations différentes conduisant à l'atrophie musculaire : dénervation, immobilisation, cachexie induite par l'interleukine-1, atrophie musculaire induite par la dexaméthasone (Bodine et al. 2001).

La diminution de l'activité PI3K/AKT va activer les facteurs de transcription Forkhead box O (FoxO). Il existe 3 facteurs de transcription FoxO chez les mammifères : FoxO1, FoxO3 et

FoxO4 (Sandri et al. 2004). La phosphorylation d'AKT va entraîner le transfert de tous les facteurs de transcription FoxO du noyau vers le cytoplasme de la cellule musculaire (Brunet et al. 1999). L'augmentation des facteurs de transcription FoxO va entraîner une augmentation de l'expression de l'atrogin 1 et de Murf1. Ces trois facteurs de transcription FoxO sont les régulateurs de l'expression de l'atrogin-1 (Milan et al. 2015). FoxO régule les deux principaux systèmes conduisant à l'atrophie musculaire : le système ubiquitine protéasome mais aussi l'autophagie (Masiero et al. 2009).

(2) Le système autophagie/lysosome

Il s'agit d'un système complémentaire au système ubiquitine/protéasome. Les lysosomes sont des petites vésicules renfermant des hydrolases acides permettant la dégradation des protéines et des organites. L'autophagie est le seul processus capable de dégrader les substrats de grande taille et d'éliminer les substances endommagées de type mitochondries ou organelles (Glick et al. 2010). Le processus d'autophagie comporte trois systèmes distincts : la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par des molécules chaperonnes (Bonaldo and Sandri 2013). La macrophagie commence par la création d'une membrane appelée phagopore qui va emporter les protéines et organelles à dégrader (Glick et al. 2010), puis une double membrane appelée autophagosome va se créer. Cet autophagosome va fusionner avec un lysosome et le contenu va ainsi être dégradé par les protéines lysosomales (Glick et al. 2010). Dans la micro-autophagie, les vacuoles vont se constituer directement à partir du lysosome pour emporter les différents organelles à détruire (Oku and Sakai 2018).

Lors de l'autophagie médiée par les molécules chaperonnes, les protéines à dégrader portent une séquence spécifique de 5 acides aminés : KFERQ. Elles vont être prises en charge par un complexe formé par la protéine chaperonne de 71 kDa Heat Shock protein (HSC70), et ses co-chaperonne (hip, hop, hsp40, hsp 90 et bag 1). Elles vont ensuite être dirigées jusqu'au

lysosome où le récepteur Lysosom-associated membrane protein type 2A (LAMP-2A) va les reconnaître et permettre leur translocation à l'intérieur de celui-ci (Kaushik and Cuervo 2018). Si la présence de la protéine HSC70 est indispensable, le facteur limitant de l'autophagie médiée par les molécules chaperonnes est la présence du récepteur membranaire LAMP-2A. Celui-ci peut être synthétisé *de novo* en cas de jeûne, d'hypoxie, de stress modéré ou d'atteinte de l'ADN (Kaushik and Cuervo 2018).

Les rôles de la micro-autophagie et de l'autophagie médiée par des molécules chaperonnes dans l'atrophie musculaire est mal connu (Bonaldo and Sandri 2013).

(3) Les calpaïnes

Les calpaïnes sont des cystéines protéases dépendantes du calcium intracellulaire. Elles appartiennent à la super famille des papaïnes. Il existe 3 types de calpaïnes dans le muscle : la calpaïne 1 (ou μ calpaïne), la calpaïne 2 (ou m calpaïne) et la calpaïne 3 (Wilburn et al. 2021). Les calpaïnes 1 et 2 sont ubiquitaires, alors que la calpaïne 3 est spécifique du muscle. Les calpaïnes 1 et 2 sont formées par une grosse sous-unité catalytique similaire mais distincte de 80 kDa (CAPN1 et CAPN2). Pour être activées, la calpaïne 1 et la calpaïne 2 doivent former un hétérodimère avec une petite sous-unité commune dite régulatrice (CAPNS1) de 30 kDa (Ono and Sorimachi 2012; Wilburn et al. 2021).

La calpaïne 3 est une cystéine protéase non lysosomale de 94 kDa et est dépendante du calcium. Il s'agit d'un homodimère composé de deux sous-unités CAPN3. CAPN3 interagit avec le complexe connectine/titine entre les lignes M et Z du muscle.

Les calpaïnes sont activées allostériquement par une augmentation de la concentration en calcium à l'intérieur du cytosol de la myofibrille. Cette augmentation du calcium peut être liée à une atteinte du tubule t ou du réticulum endoplasmique (Wilburn et al. 2021). Elles

peuvent dégrader des protéines kinases A et C et des phosphatases, mais aussi des protéines comme l'actine et la myosine (Goll et al. 2008; Wilburn et al. 2021).

(4) L'apoptose

L'apoptose (mort cellulaire) est aussi impliquée dans l'atrophie musculaire. Il a été mis en évidence que dans certaines conditions comme l'atteinte de la moelle épinière, la suspension d'un membre, la dénervation d'un muscle ou l'insuffisance cardiaque chronique il existait une augmentation de l'apoptose dans les muscles concernés (Dupont-Versteegden 2006).

Dans le cas de la dénutrition, le rôle de l'apoptose dans le muscle n'a pas été décrit.

Il existe deux voies susceptibles d'activer l'apoptose : la voie intrinsèque qui met en jeu la mitochondrie, et la voie extrinsèque.

La voie intrinsèque peut être caspase dépendante ou caspase indépendante. Dans la voie caspase indépendante, l'apoptose peut être activée directement par le facteur pro-apoptotique AIF (Apoptotic Inducing Factor) et par l'endonucléase G.

Les caspases sont les enzymes protéolytiques impliquées dans l'apoptose. On distingue les caspases qui initient l'apoptose : il s'agit des caspases 8, 9 et 12 et les caspases qui vont réaliser l'apoptose : il s'agit des caspases 3, 6 et 7 (Dupont-Versteegden 2006; Wilburn et al. 2021). Deux protéines sont impliquées dans l'apoptose : B-cell lymphoma (Bcl)-2 et Bcl-2-associated X (Bax) et c'est le ratio entre ces 2 protéines qui va déclencher l'activation des caspases. Bcl-2 est une protéine anti-apoptotique, alors que Bax est une protéine pro-apoptotique (Singh et al. 2019). Une augmentation du taux intracellulaire de calcium va activer Bax. Celui-ci va alors augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale et va permettre le déclenchement de l'apoptose *via* la libération du cytochrome c (Garrido et al. 2006; Wilburn et al. 2021). Une fois dans le cytoplasme, le cytochrome c se lie à APAF-1 (Apoptosis Protease Activating Factor-1) et la pro-caspase 9, formant ainsi un complexe

nommé apoptosome. Celui-ci va induire l'activation de la caspase-9 dans le complexe. Elle va activer la caspase-3 et conduire à la destruction des protéines.

La voie extrinsèque va être déclenchée par un ligand qui va se lier aux récepteurs de mort cellulaire. Ces récepteurs appartiennent à la superfamille des TNFR (tumor necrosis factor receptor). Ces récepteurs ont en commun une région conservée de 80 acides aminés permettant la transmission du signal de mort. Cette portion est intracellulaire. Parmi les ligands de ces récepteurs, on peut citer Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), Fatty acid synthase (FAS) ou tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL). Ces ligands vont former avec leur récepteur un complexe qui va activer des facteurs tels que la caspase 8 *via* FAS-associated death domain (FADD) qui est une molécule adaptatrice. Ceci va former un complexe de mort appelé Death-inducing signaling complex (DISC) (Elmore 2007). La caspase 8 active les capases-3 et 7 conduisant ainsi à la dégradation de la cellule.

Alors qu'il était initialement imaginé qu'au cours de l'atrophie (liée à l'immobilisation, la dénutrition etc.) que l'apoptose concernait les noyaux des cellules musculaires, il a été finalement admis qu'elle concernait les cellules autour des cellules musculaires (cellules endothéliales, cellules satellites) (Schwartz 2019).

5. Les facteurs de régulation de la masse musculaire

L'**IGF-1** est un acteur clé de la régulation de la masse musculaire (Figure 3). Il est impliqué à la fois dans la synthèse protéique mais aussi dans les voies protéolytiques. IGF-1 contrôle la synthèse protéique à deux niveaux : *via* l'activation de mTORC1 (comme vu plus haut) avec en aval l'activation de la protéine ribosomale S6 et l'activation de eIF4E, mais aussi *via* l'inhibition de GSK3 β permettant l'activation de la β caténine et de eIF2B. En effet, il a été mis en évidence chez des rats traités à la dexaméthasone que l'ajout d'IGF-1 va augmenter le

taux de β caténine en inhibant GSK3 β et prévenir l'amyotrophie (Schakman et al. 2008; Yoshida and Delafontaine 2020).

La **myostatine** est une protéine de la famille Transforming Growth Factor β (TGF β). Elle joue un rôle majeur dans l'inhibition de la croissance musculaire et de la différenciation cellulaire (Yoon 2017a). En effet, il a été mis en évidence dans de nombreuses études qu'en cas de manipulation génétique conduisant soit à des animaux *knock-out* pour la myostatine, soit rendant inactif son récepteur ActRIIB, les animaux présentaient une hypertrophie musculaire (McPherron and Lee 1997; Schuelke et al. 2004; Clop et al. 2006; Mosher et al. 2007). La myostatine va permettre l'activation du complexe ubiquitine-proteasome. La fixation de la myostatine sur son récepteur II Activin Receptor IIB (ActRIIB) entraîne une activation des récepteurs Activin Type I Receptor (ALK) 4 et 5. Ceci va entraîner l'activation par phosphorylation des facteurs de transcription Smad2 et Smad 3. Smad 2 et Smad 3 vont former un complexe avec Smad 4 et activer le complexe ubiquitine-protéasome.

De plus, la fixation de la myostatine diminue la présence d'Akt phosphorylée, ce qui va être induire une activation de la voie ubiquitine/proteasome et de la synthèse de Murf1 et Mafbox (Lokireddy et al. 2011; Yoon 2017a). Cette régulation de la voie mTOR par la myostatine a bien été mise en évidence par Amirouche et al. (2009). L'augmentation de la myostatine a entraîné une diminution à la fois d'Akt mais aussi de P70S6K1, S6 et 4EBP1 (Amirouche et al. 2009; Yoon 2017a). Cela a donc comme conséquence de réduire la synthèse protéique musculaire.

La myostatine régule donc la synthèse protéique par deux mécanisme : par l'intermédiaire de la voie Akt/mTORC1/ P70S6K1/S6 mais par une voie mTOR indépendante dont les acteurs ne sont pas connus (Yoon 2017a). Ceci a été mis en évidence par (Welle et al. 2009). Dans cette étude, l'administration de Rapamycin (un inhibiteur de la voie mTOR) chez des souris

recevant des anticorps antimyostatine ne modifiait pas la synthèse myofibrillaire (Welle et al. 2009).

Bone Morphogenetic Protein (BMP) est une cytokine de la famille Tumor Necrosis Factor β . BMP va se lier à son récepteur spécifique BMPRIIB entraînant une activation d'ALK3. Ceci va activer par phosphorylation les facteurs de transcription Smad 1, 5 et 8 autorisant la formation d'un complexe avec Smad4, puis sa translocation dans le noyau, déclenchant la transcription des gènes cibles pour activer la protéolyse via l'activation du système ubiquitine/proteasome (Sartori et al. 2013). Le rôle de BMP dans la régulation de la masse musculaire a été confirmé par plusieurs études. En effet, la création de souris *knock-out* smad4 n'entraîne pas d'hypertrophie musculaire mais au contraire plutôt une atrophie. L'atrophie était encore plus importante chez les souris *knock-out* Smad 4 chez qui une dénervation était ajoutée (Sartori et al. 2013). Plus intéressant encore, il n'existe pas d'hypertrophie musculaire chez des souris *knock-out* myostatine chez lesquelles un blocage de BMP par Noggin, un antagoniste de BMP, a été effectué. Lorsque le taux de myostatine diminue, Smad 4 est plus disponible pour interagir avec la voie BMP (Sartori et al. 2013). Ceci met en évidence les liens étroits entre la myostatine et BMP et permet de suggérer que la voie BMP semble dominante par rapport à la voie de la myostatine (Sartori et al. 2013).

Le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), une cytokine pro-inflammatoire, altère également la synthèse protéique musculaire. Il a été mis en évidence que TNF α était particulièrement impliqué dans l'atrophie musculaire et la cachexie. Le facteur de transcription Facteur Nucléaire- κ B (NF- κ B) est normalement retenu inactif dans le cytoplasme par une famille de protéines inhibitrices I κ B. En présence de TNF α , I κ B Kinase (IKK β) va phosphoryler I κ B ce qui va conduire à son ubiquitinylation et sa dégradation par le système ubiquitine-proteasome. NF- κ B va ainsi pouvoir être transloqué dans le noyau et va

activer des facteurs de transcriptions médiés par NF- κ B (Bonaldo and Sandri 2013). Afin d'activer la protéolyse, TNF α va induire la synthèse de MuRF1 par l'intermédiaire de la voie NF- κ B (Wu et al. 2014)

TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis) est un membre de la superfamille TNF et va se lier au récepteur membranaire de la superfamille TNF12A. Il joue également un rôle dans l'atrophie musculaire. TWEAK va se lier à son récepteur facteur de croissance fibroblastique 14 (fibroblast growth factor 14 ou fn14). Il va ensuite activer la voie NF- κ B dans le muscle squelettique ce qui va déclencher la protéolyse *via* l'activation du complexe ubiquitine/proteasome (Siff et al. 2021)

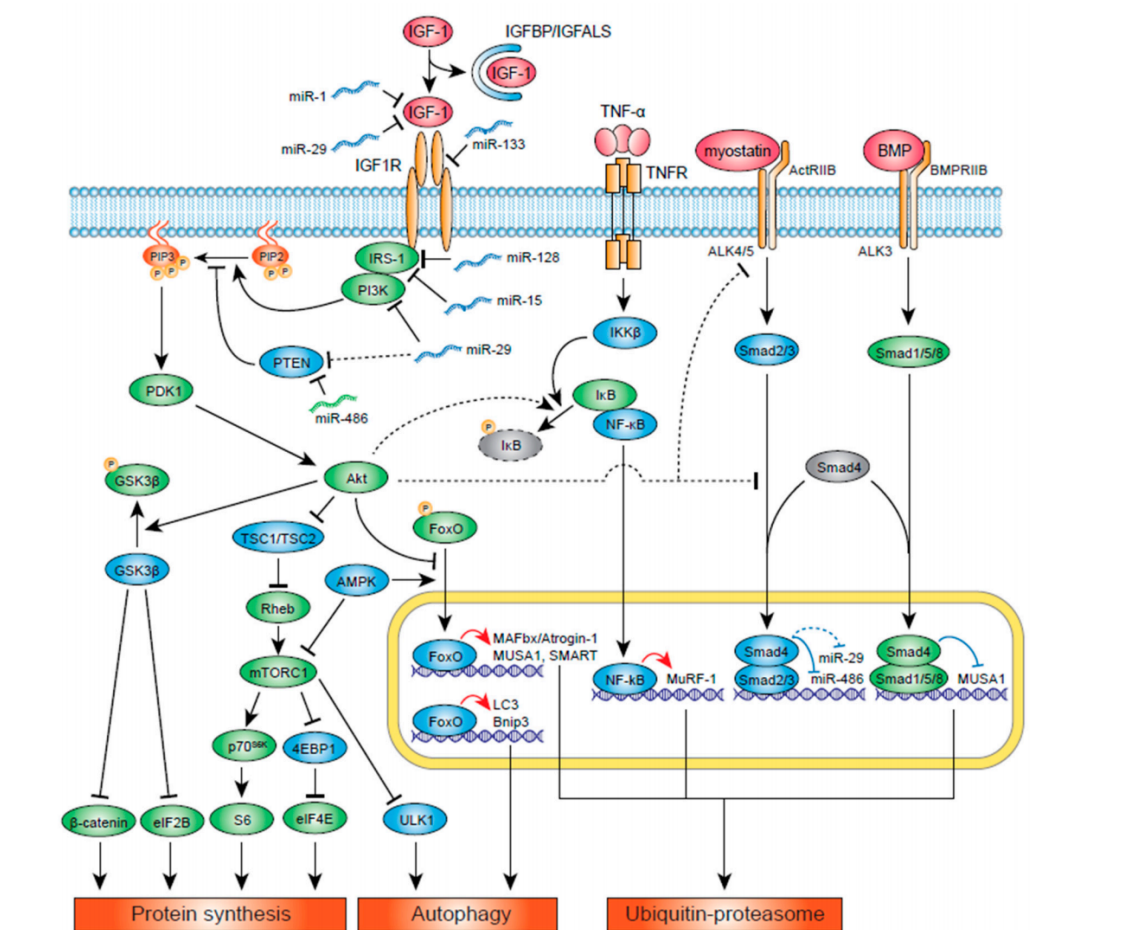


Figure 3 - Le rôle clé d' IGF-1 dans la régulation de la masse musculaire (Yoshida and Delafontaine 2020).

6. Les effets de la dénutrition sur le phénotype musculaire

La dénutrition va impacter le phénotype musculaire en entraînant une diminution de la masse musculaire, de la surface des fibres musculaires, mais aussi une augmentation de la fatigabilité musculaire (Kim 2013; Ruiz-Rosado et al. 2013; Salles et al. 2014; Alaverdashvili et al. 2015; Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B. un Nisa, et al. 2021). Il a également été mis en évidence une modification du type de fibres musculaires avec une diminution des fibres de type rapide par rapport aux fibres lentes (Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B. un Nisa, et al. 2021). Chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive, il a été mis en évidence un switch des fibres de type I vers des fibres de type II. Ceci était d'ailleurs associé à une augmentation de la mortalité (Patel et al. 2014). Il a été récemment découvert chez des rats en situation de dénutrition protéino-énergétique une perte de la masse musculaire liée à une diminution des fibres de types II sans atteinte des fibres de type I, une augmentation du stress oxydatif dans le sang et le muscle. On observait également une inhibition de SIRT-1 dans tous les types de muscles, indépendamment de AMPK. Ceci suggérant qu'en cas de dénutrition avec augmentation du stress oxydatif SIRT-1 est inhibé et ceci de façon indépendante par rapport à AMPK (Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B. un Nisa, et al. 2021). L'inhibition de SIRT-1 va entraîner une altération de l'homéostasie mitochondriale par l'intermédiaire d'une diminution de Peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1- α (PGC1- α) et de PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK1), aboutissant à une réduction de l'activité métabolique mais sans atrophie des fibres musculaires lentes (Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B. un Nisa, et al. 2021). PGC1- α est une protéine nucléaire de 91kDa qui appartient à la famille des co-activateurs transcriptionnels. Elle a un rôle important dans la biogénèse mitochondriale mais aussi dans le métabolisme

oxydatif et dans la formation des fibres musculaires de type lent (Wang and Pessin 2013). PGC1- α protège les fibres musculaires lentes de l'atrophie (Wang and Pessin 2013). Elle semble également protéger le muscle en inhibant le facteur de transcription FOXo (Wing et al. 2011). PINK1 est une protéine induite par le stress oxydatif et initie la mitophagie (Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B. un Nisa, et al. 2021).

AMPK va également augmenter l'oxydation des lipides dans le muscle. En effet, AMPK inhibe l'Acetyl-CoA carboxylase. Ceci va activer par phosphorylation la Malonyl-CoA décarboxylase. La diminution du Malonyl-CoA va permettre l'augmentation d'Acyl-CoA dans les mitochondries, donc l'oxydation des lipides (Tomas et al. 2002).

En cas de dénutrition, la baisse du taux d'acides aminés sanguins va pouvoir directement inhiber la baisse de mTOR. La baisse concomitante du taux d'insuline et d'IGF-1 avec une diminution de l'arrivée des nutriments dans le muscle va amplifier l'inhibition de mTOR. mTOR est donc régulé à la fois par la voie IGF1/PIK3/Akt et par le contenu en nutriments (substrats) (Wing et al. 2011).

Nous avons vu les mécanismes de régulation de la masse musculaire en cas de dénutrition ou de restriction énergétique. Les patients ayant un cancer du foie sont des patients à risque de dénutrition, donc d'atrophie musculaire. Nous allons maintenant expliquer pourquoi nous avons voulu nous intéresser plus spécifiquement à ces patients.

D. Tumeurs hépatiques et dénutrition

1. Tumeurs hépatiques

Il existe deux principaux types de tumeurs hépatiques : les tumeurs primitives et les tumeurs secondaires. Les tumeurs hépatiques primitives sont principalement représentées par le carcinome hépatocellulaire (CHC) et le cholangiocarcinome intrahépatique (CCI), tandis que les tumeurs hépatiques secondaires le sont par les métastases hépatiques. Les cancers du foie

représentaient en 2020, avec 830'180 décès, la 3^{ème} cause de décès par cancer dans le monde selon les données de l'International Agency for Research on Cancer (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Cancer today). Les cancers du foie occupent le 6^{ème} rang en termes d'incidence avec 905'677 nouveaux cas en 2020 (International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Cancer today). L'Organisation Mondiale pour la santé estime qu'en 2030 plus d'un million de patients décèderont d'un cancer du foie (Villanueva 2019). Aux États-Unis, le taux de décès par cancer hépatique a augmenté de 43% entre 2000 et 2016 (Villanueva 2019).

Le CHC est la tumeur primitive hépatique la plus fréquente (environ 90% des cas). Les facteurs de risque de développer un CHC sont : la cirrhose (quelle que soit son origine), le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C, mais aussi avec une incidence croissante la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). Les patients atteints de cirrhose doivent être impérativement surveillés car le risque annuel d'apparition d'un CHC est estimé entre 2 et 4% (Villanueva 2019). Aux États-Unis, une explosion de l'incidence des CHC sur NASH est attendue, avec une augmentation de 122% entre 2016 et 2030. Les modalités de traitement sont différentes en fonction de l'état du foie sous-jacent, le caractère unique ou multiple du CHC, l'atteinte vasculaire, l'âge du patient. Les différents traitements pouvant être proposés aux patients sont : la résection hépatique, la destruction par radiofréquence, la transplantation hépatique, la chimio-embolisation intra-artérielle, la chimiothérapie systémique (Villanueva 2019; Machairas et al. 2021). Les différentes indications de chaque traitement ne seront pas détaillées.

Le CCI est la seconde tumeur hépatique la plus fréquente et son incidence augmente actuellement en Europe et en Amérique du Nord (Mavros et al. 2014; Blehacz 2017). Le CCI est plus fréquent en Asie. Les hommes sont plus atteints que les femmes et il est important de noter que trois-quarts des patients ont plus de 65 ans lors du diagnostic (Buettner et al. 2017).

Les principaux facteurs de risque du cholangiocarcinome sont la cholangite sclérosante, la cirrhose biliaire primitive, la maladie de Caroli, les lithiases intrahépatiques, le tabac mais aussi les mêmes facteurs de risque que le CHC : les virus de l'hépatite B et de l'hépatite C, et la cirrhose (Blechacz 2017; Buettner et al. 2017). En Asie, les parasites *Opisthorchis viverrini* et *Clonorchis sinensis* représentent des facteurs de risque importants (Buettner et al. 2017; Valle et al. 2021). Le diagnostic du CCI est souvent tardif. Le pronostic est sombre avec une survie à 5 ans inférieure à 40% et un taux de récurrence dans les 2 ans supérieur à 50% (Blechacz 2017; Zanetto et al. 2021). Le traitement curatif est la résection hépatique lorsque celle-ci est possible. L'obésité est un facteur de risque démontré commun aux CHC et aux CCI (Lauby-Secretan et al. 2016).

Parmi les tumeurs hépatiques secondaires, les métastases hépatiques les plus fréquentes sont les métastases hépatiques de cancer colorectal (MHCCR) et sont observées jusqu'à chez 50% des patients atteints de cancer colorectal. Dans près de 50% des cas, les MHCCR sont synchrones, c'est-à-dire qu'elles sont découvertes en même temps que le cancer primitif. Le traitement est chirurgical dès lors qu'il est techniquement possible, et il permet une survie à 5 ans entre 20 et 40% (Nordlinger et al. 2013; Tsilimigras et al. 2021). En termes de fréquence, les MHCCR sont suivies par les métastases de cancer pancréatique, puis de cancer du sein, des mélanomes, des cancers pulmonaires, puis des autres cancers (Tsilimigras et al. 2021).

2. Dénutrition et tumeurs hépatiques

Comme nous l'avons vu précédemment, les patients atteints de tumeurs primitives hépatiques présentent fréquemment une cirrhose. Un point important est que le traitement curatif que ce soit du CHC, du CCI ou des MHCR est le traitement chirurgical par résection hépatique (ou hépatectomie). Il a bien été mis en évidence dans la littérature que la dénutrition était un

facteur de risque indépendant de complications post-opératoires (Bozzetti et al. 2007; M. Schiesser et al. 2008; Marc Schiesser et al. 2008; Loh et al. 2012; Huang et al. 2019).

La survenue de complications post-opératoires chez les patients opérés de MHCR diminue à la fois leur survie sans récurrence mais aussi leur survie globale (M. Schiesser et al. 2008). Une étude américaine récente comportant 2531 patients dénutris ayant été opérés d'une hépatectomie ont été appariés par score de propension 1:1 avec des patients non dénutris opérés (Lee et al. 2021). Ce travail a mis en évidence en analyse multivariée qu'il existait chez les patients dénutris une augmentation de la mortalité post-opératoire, de la durée d'hospitalisation et du coût d'hospitalisation (Lee et al. 2021). La cirrhose est un facteur de risque de CHC et de CCI. Elle est associée à un risque 30 fois plus élevé de CHC et 10 à 20 fois plus élevé de CCI (Massarweh and El-Serag 2017).

La prévalence de la dénutrition chez les patients cirrhotiques est élevée mais très variable dans la littérature, probablement en rapport avec des difficultés d'évaluation de celle-ci. La prévalence est probablement entre 65 et 100% des patients atteints de cirrhose (Siddiqui et al. 2021). La dénutrition protéino-énergétique est multifactorielle chez les patients cirrhotiques résultant de la conjonction entre l'inflammation chronique, l'insuffisance hépatique, l'altération du métabolisme des macro- et micronutriments, la diminution des apports en lien avec l'ascite et la gastroparésie notamment. Il existe chez les patients cirrhotiques un hypercatabolisme (Cheung et al. 2012). L'altération du métabolisme des acides biliaires entraîne une mauvaise absorption des lipides. Le métabolisme du glucose est également altéré. Les réserves de glycogène intrahépatique sont basses en raison d'une difficulté de stockage au sein des hépatocytes. La néoglucogenèse est augmentée et elle nécessite une modification de l'utilisation des substrats avec augmentation de l'utilisation des acides gras et acides aminés, alors que ceux-ci sont déjà diminués. Il a été mis en évidence qu'après une nuit de jeûne le catabolisme des acides gras et des acides aminés était équivalent

à deux à trois nuits de jeûne chez un adulte non cirrhotique (Owen et al. 1981). La synthèse protéique est diminuée.

La dénutrition protéino-énergétique est également présente chez les patients présentant des MHCR et sa prévalence est estimée dans la littérature entre 20 et 55% (Ciuni et al. 2011; Lee et al. 2021).

E. La sarcopénie

1. Définition

Le terme a été défini pour la 1^{ère} fois en 1989 par une perte de masse musculaire (Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. Proceedings of a conference. Albuquerque, New Mexico, October 19-21, 1988 1989). Le terme sarcopénie vient du grec “sarx” qui signifie chair et « penia » qui signifie pauvreté. La définition de la sarcopénie a évolué au cours du temps et s’est affinée. Elle a été définie en 2010 par l’European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) comme une perte progressive et généralisée de la masse musculaire squelettique et de la force musculaire avec un risque de conséquences délétères à type d’incapacité physique, d’altération de la qualité de vie et de décès (Cruz-Jentoft et al. 2010). La définition a été revue en 2018 dans un consensus Européen et confirme que la diminution de la force musculaire est un élément capital de la définition (Cruz-Jentoft et al. 2019). La sarcopénie est une des conséquences de la dénutrition protéino-énergétique.

2. L’obésité sarcopénique

La prévalence de l’obésité est actuellement en augmentation en France et dans le monde. Une nouvelle entité clinique a émergé, l’obésité sarcopénique. En l’absence de consensus concernant la définition de l’obésité sarcopénique, on peut dire qu’elle associe les critères de définition de la sarcopénie et la définition de l’obésité c’est-à-dire un IMC $\geq 30\text{kg/m}^2$. La

prévalence de l'obésité sarcopénique est très variable dans la littérature compte tenu de l'absence de critères standardisés. Elle était estimée aux Etats-Unis à 31,5% entre 2003 et 2004 contre 38,1% entre 2011 et 2012 (Cauley 2015).

Plusieurs mécanismes sont à l'origine de l'atrophie musculaire chez les patients présentant une obésité sarcopénique (Figure 4).

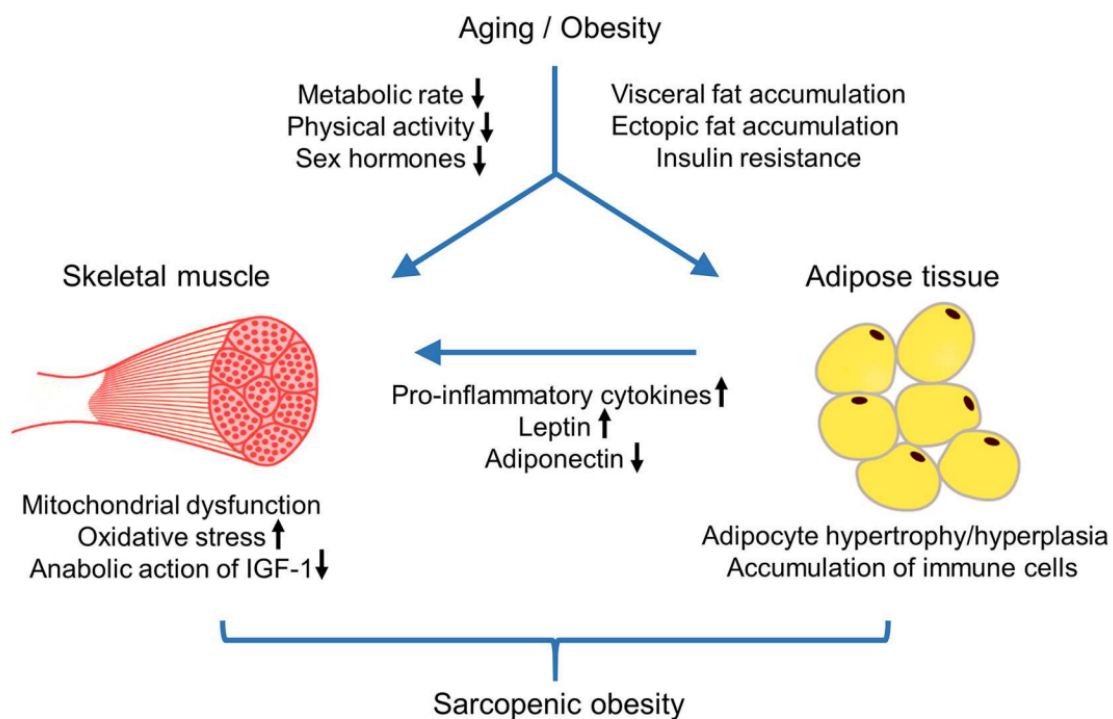


Figure 4 - Les mécanismes conduisant à l'atrophie musculaire chez les patients obèses sarcopéniques (Roh and Choi 2020).

L'obésité est caractérisée non seulement par une augmentation des acides gras qui vont être stockés dans la graisse viscérale mais aussi entre les muscles et à l'intérieur des muscles. Ces lipides sont soit du triacylglycérol soit des dérivés des acides gras tels que les céramides, des chaînes longues d'acylCoA ou du diacylglycérol (Adams et al. 2004; Coen and Goodpaster 2012; Kalinkovich and Livshits 2017).

L'augmentation de la graisse viscérale au cours de l'obésité va entraîner une augmentation des adipokines, qui sont des cytokines inflammatoires sécrétées par le tissu adipeux, et va favoriser le stockage des lipides dans le muscle. Elle va aussi conduire à l'accumulation de macrophages, mastocytes et lymphocytes T qui sont également pro-inflammatoires. La sécrétion de leptine est augmentée et favorise la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$ et d'interleukine 1- β . Comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe 5 p.40), $\text{TNF}\alpha$ inhibe la biogénèse mitochondriale et la croissance musculaire.

L'augmentation de l'adiposité musculaire va conduire à une altération de l'oxydation mitochondriale des acides gras en raison de l'accumulation des lipides dans les mitochondries, à une augmentation de la lipolyse et à une augmentation du stress oxydatif (Roh and Choi 2020). Ceci va déclencher l'apoptose et l'autophagie au niveau des cellules musculaires (Marzetti et al. 2013). Finalement, la lipotoxicité, l'inflammation et l'insulinorésistance vont conduire à la fois à une diminution de la masse musculaire, mais aussi à une atrophie des fibres musculaires (Roh and Choi 2020).

Une revue de la littérature a mis en évidence le rôle de l'obésité sarcopénique à la fois dans les maladies cardiovasculaires mais aussi dans les cancers (Silveira et al. 2021). Elle péjore le pronostic de nombreux cancers (Silveira et al. 2021). Il a été mis en évidence que les patients obèses sarcopéniques atteints de cancer du tractus respiratoire ou digestif ont une survie globale inférieure aux patients obèses non sarcopéniques (Prado et al. 2008). Il a par exemple été mis en évidence chez des patients opérés d'un CHC, une baisse de la survie globale et de la survie sans récurrence chez des patients présentant une obésité sarcopénique comparés à des patients obèses non sarcopéniques. L'obésité sarcopénique était un facteur à la fois de décès mais aussi de récurrence (Kobayashi et al. 2019).

Nous allons maintenant décrire plus précisément la dénutrition du patient atteint de cancer, incluant celui du foie.

3. La cachexie cancéreuse

Un consensus international a défini la cachexie cancéreuse comme un syndrome multifactoriel caractérisé par la survenue d'une perte de masse musculaire (avec ou sans perte de masse grasse) et ne pouvant pas être complètement inversée par un support nutritionnel (Fearon et al. 2011). Les mécanismes physiopathologiques conduisant à la perte de masse musculaire associent une réponse centrale du muscle à l'hypercatabolisme, mais aussi une action adaptative du muscle lui-même à la restriction secondaire à l'anorexie liée au cancer. Trois stades ont été décrits : la pré-cachexie, la cachexie et la cachexie réfractaire.

La cachexie cancéreuse est définie par

- une perte de poids $\geq 5\%$ en moins de 6 mois ;
- un IMC $< 20 \text{ kg/m}^2$ et une perte de poids $> 2\%$ en moins de 6 mois ;
- une sarcopénie et une perte de poids $> 2\%$ en moins de 6 mois, le plus souvent associées à une réduction des ingesta et à un syndrome inflammatoire (Fearon et al. 2011).

Dans ce consensus, la sarcopénie est définie comme une baisse de l'index musculaire squelettique évalué par DEXA avec un seuil $< 7,26 \text{ kg/m}^2$ chez l'homme et $< 5,45 \text{ kg/m}^2$ chez la femme. La précachexie est définie par une perte de poids $\leq 5\%$ en moins de 6 mois associée à une anorexie et l'apparition d'anomalies métaboliques. La cachexie réfractaire est définie par une cachexie associée une absence de réponse aux traitements. Les performances physiques sont diminuées et l'espérance de vie est inférieure à 3 mois (Fearon et al. 2011).

Les mécanismes physiopathologiques sous-tendant la cachexie cancéreuse sont encore mal connus. Le métabolisme basal est augmenté chez les patients atteints de cancer entraînant une altérant le métabolisme énergétique : la protéolyse devient supérieure à la synthèse protéique si bien que le patient est en situation d'hypercatabolisme (Siff et al. 2021). La tumeur va sécréter de multiples cytokines pro-inflammatoires qui vont conduire à la lipolyse et à la

protéolyse musculaire, donc à l'atrophie musculaire. Parmi ces cytokines, on peut citer IL-6 (dont on connaît le rôle clé dans la régulation musculaire), IL-1, $\text{TNF}\alpha$, TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis) (Baracos et al. 2018). $\text{TNF}\alpha$ inhibe la différenciation des myocytes.

La tumeur va également sécréter d'autres médiateurs comme l'Activin A qui, comme la myostatine, joue un rôle dans la survenue de l'atrophie musculaire. Il a été mis en évidence qu'il existait un dialogue entre le muscle et le tissu adipeux conduisant à l'atrophie musculaire (Kenneth C.H. Fearon 2011). La lipolyse semble en effet avoir un rôle clé dans la survenue de l'atrophie musculaire. Das et al. (2011) ont mis en évidence dans un modèle de souris cancéreuses *knock-out* pour le gène de l'adipocyte triglycéride lipase (ATGL), une absence de réduction de la masse grasse et de la masse musculaire contrairement à ce qui était observé chez les souris exprimant l'ATGL. Plusieurs phénomènes ont été décrits au sein du compartiment adipeux : l'activation du tissu adipeux avec lipolyse mais aussi la transformation du tissu adipeux blanc en tissu adipeux beige appelé *browning* (Argilés et al. 2019). Le tissu adipeux beige possède les mêmes propriétés que le tissu adipeux brun notamment la présence de la protéine mitochondriale UCP1 (Uncoupling Protein 1) (Argilés et al. 2019). Il a été mis en évidence le rôle du tissu adipeux beige dans la progression de la cachexie cancéreuse mais aussi dans l'augmentation de la dépense énergétique, *via* celle liée à la thermogénèse (Molfino et al. 2021).

Les mécanismes aboutissant à la cachexie cancéreuse sont résumés dans la figure 5.

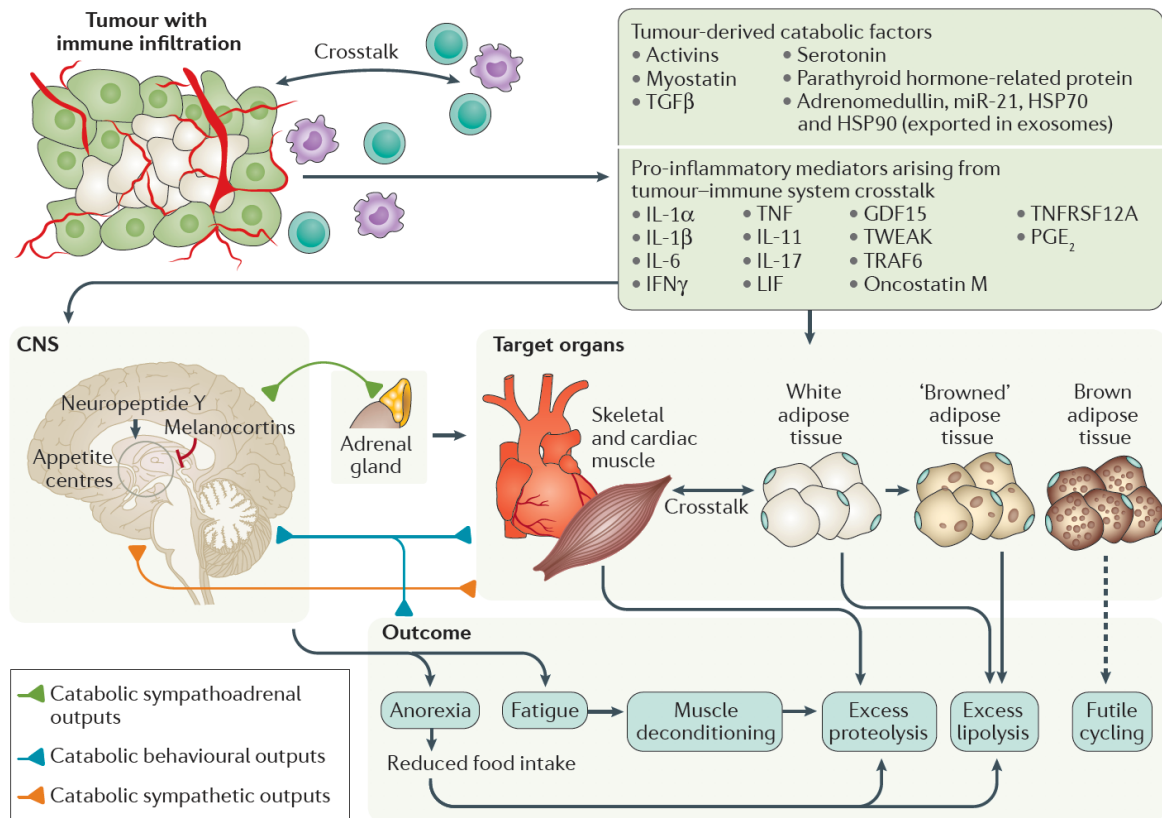


Figure 5 - Les différents mécanismes aboutissant à la cachexie cancéreuse sous-tendus par des interactions entre tumeur, tissu adipeux et muscle (Baracos et al. 2018).

Nous avons vu que la cachexie cancéreuse était définie par une diminution de la masse musculaire en lien avec une atrophie musculaire qui a une origine multifactorielle. Nous allons maintenant nous intéresser aux méthodes d'évaluation de la composition corporelle, et en particulier de la masse musculaire et des différents compartiments du tissu adipeux.

F. Méthodes d'évaluation de la composition corporelle

Plusieurs méthodes d'évaluation de la composition corporelle ont été décrites.

1. Absorptiométrie biphotonique aux rayons X (DEXA)

Il s'agit d'une méthode non invasive qui permet de mesurer la masse grasse, la masse musculaire squelettique et la masse osseuse. Il s'agit de la méthode de référence. Elle irradie

l'ensemble du corps avec deux faisceaux de photons à deux énergies (44 keV et 100 keV) ce qui va permettre de distinguer très précisément les différents compartiments corporels grâce à l'atténuation différentielle des deux rayonnements. La calibration est effectuée sur des fantômes contenant des triglycérides et du calcium. L'irradiation est faible, entre 0,05 et 0,1 µGy. L'avantage de cette technique est de pouvoir nous donner par un seul examen simple, rapide, peu irradiant, la composition des tissus mous (muscle et tissu adipeux) et de l'os. Cette méthode est très fiable. Elle est cependant peu utilisée en routine du fait notamment de son accessibilité limitée et de son coût. De plus, elle ne peut pas être réalisée chez les patients hospitalisés alités (Thibault et al. 2012).

2. La bioimpédancemétrie corporelle

Il s'agit d'une méthode d'évaluation de la composition corporelle basée sur la capacité des tissus hydratés à conduire le courant électrique. Elle va permettre une estimation du volume de l'eau corporelle totale puis une évaluation indirecte de la masse musculaire squelettique. Il existe des équations de prédictions différentes en fonction des différentes situations cliniques (Thibault et al. 2012). La bioimpédancemétrie est réalisée, dans sa méthode la plus classique, en plaçant deux électrodes sur chaque membre d'un même hémicorps. Cette méthode est peu coûteuse et peut être réalisée sur patient alité. Elle permet le suivi longitudinal des patients. Pour cela, elle doit être réalisée avec le même appareil car les équations varient en fonction des appareils et si l'état d'hydratation est constant. De plus, il n'existe pas d'équation validée pour les patients avec des IMC extrêmes ou qui présentent une déshydratation ou au contraire une inflation hydrique (œdèmes).

3. Composition corporelle par tomodensitométrie (scanner) ou imagerie par résonance magnétique (IRM)

La tomodensitométrie (TDM) est une technique d'imagerie qui mesure l'absorption des rayons X par les différents tissus. La densité des tissus est mesurée en Unités Hounsfield, elle

va de -1000, correspondant à la densité de l'air, à +1000 correspondant à la densité de l'os. Il s'agit donc d'une technique irradiante. L'imagerie par résonnance magnétique (IRM) n'utilise pas les rayons X, il s'agit donc d'une technique qui a l'avantage d'être non irradiante.

La composition corporelle peut être évaluée par mesure scannographique sur une coupe axiale passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire (L3). La surface musculaire totale en L3 est la somme des surfaces du muscle psoas, muscle oblique interne, muscle oblique externe, muscle transverse, muscle grands droits et des muscles paravertébraux. Cette surface musculaire totale est ensuite rapportée à la taille au carré pour représenter l'index de masse musculaire (Mourtzakis et al. 2008; Thibault et al. 2012; Cornet et al. 2015). La densité musculaire est connue, elle est comprise entre - 29 et + 150 unités Hounsfield (UH) (Schneider et al. 2012a). Cependant, certains auteurs utilisent des seuils compris entre -30 et - 110 UH (Kroh et al. 2019).

Il a également été décrit d'autres méthodes d'évaluation de la surface musculaire squelettique par la mesure uniquement de la surface des deux psoas normalisée ou non par la taille au carré (Englesbe et al. 2010; Durand et al. 2014; Golse et al. 2017; Huguet et al. 2018). Sur cette même coupe de scanner, il est possible de mesurer la surface de la graisse sous-cutanée, de la graisse viscérale et de la graisse intramusculaire. La densité de la graisse est comprise entre - 90 et - 30 UH (Yoshizumi et al. 1999). Certains auteurs distinguent un seuil différent pour la graisse viscérale avec une densité entre - 150 et - 50 UH (Okumura et al. 2016) ou - 30 UH (Miller et al. 1998). Ces mesures de composition corporelle peuvent également être réalisées sur une IRM et ont la même validité que le scanner sur la mesure de la composition corporelle (Mitsiopoulos et al. 1998).

La mesure de la surface corporelle par scanner (ou IRM) est une méthode simple et reproductible. Elle permet une bonne extrapolation de la masse musculaire squelettique et de la masse grasse (Shen et al. 2004a). Elle est très intéressante notamment en oncologie ou dans

le cadre de la transplantation hépatique où l'imagerie abdominale est réalisée en routine. Elle permet un suivi régulier des patients, avec des mesures répétées et comparables. Un des principaux biais de cette méthode est l'absence de seuils reconnus dans la littérature permettant de définir un index musculaire bas. Prado et al. (2008) ont publié en 2008 un travail confirmant l'impact pronostique péjoratif de la sarcopénie chez les patients obèses avec un index de surface musculaire faible. Les seuils de cette publication ont été validés pour porter le diagnostic de dénutrition notamment dans les nouvelles recommandations de l'HAS : $IMS \leq 38.5 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ pour les femmes et $IMS \leq 52.4 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ pour les hommes. La seule mesure des surfaces musculaire du psoas n'est pas reconnue comme standard. Dans la littérature, les seuils de surface musculaire basse divergent en fonction des articles : soit le calcul du seuil est fait par les auteurs avec leur propre population d'étude, soit le 1^{er} quartile est le seuil, soit les seuils de Prado et al 2008 ($52,4 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ pour les hommes, $38,4 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ pour les femmes), soit les seuils de Martin et al (Martin et al. 2013) ($53 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ pour les hommes avec un $IMC \geq 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ ou $43 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ pour les hommes avec un $IMC < 25 \text{ kg}/\text{m}^2$ ou $41 \text{ cm}^2/\text{m}^2$ pour les femmes) sont utilisés (McGovern et al. 2021). Il n'existe aucun seuil validé dans la littérature concernant les surfaces de graisse viscérale, sous-cutanée ou intramusculaire. Les auteurs utilisent les seuils les plus discriminants dans les populations qu'ils ont étudiées (voir paragraphe 5) : seuils de surface ou de surface rapportée à la taille au carré, ou ratios entre la graisse sous-cutanée et la graisse intramusculaire par exemple. Les seuils sont établis à partir de courbes ROC ou correspondent au 1^{er} quartile (Miyamoto et al. 2015; Cho et al. 2017).

4. Composition corporelle et tumeurs hépatiques

L'impact de la composition corporelle chez les patients atteints de tumeurs hépatiques a été étudié dans la littérature. Dans la cohorte américaine du « Liver Cancer Pooling Project » a été évalué l'impact du périmètre abdominal et du périmètre glutéo-fémoral (tour de hanches) sur le risque de cancer hépatique (CHC et CCI). L'augmentation du périmètre abdominal de 5 cm augmentait de 11% le risque de cancer hépatique (Florio et al. 2019) confirmant que l'obésité était un facteur de risque de survenue de ces cancers.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la sarcopénie se définit par une baisse de la masse et de la fonction musculaire. Hors dans la littérature le vocable 'sarcopénie' est très souvent improprement utilisé comme synonyme de perte de masse musculaire alors que la fonction musculaire n'a pas été étudiée. Ici, dans ce cas, nous utiliserons le terme 'surface musculaire squelettique abaissée', 'surface musculaire abaissée' ou 'baisse de la surface musculaire'.

L'impact pronostique de la surface musculaire squelettique a été mis en évidence dans de nombreuses tumeurs (McGovern et al. 2021) notamment le CHC et à un moindre degré le CCI. Comme nous l'avons vu précédemment, le CHC se développe préférentiellement sur un foie cirrhotique. Une surface musculaire squelettique abaissée est également un facteur pronostique péjoratif chez les patients cirrhotiques. De même, nous pouvons souligner que la baisse de la surface musculaire squelettique est associée à un plus mauvais pronostic des patients après transplantation hépatique qui est également un traitement de référence des CHC (van Vugt et al. 2016)

Les résultats concernant l'impact d'une surface musculaire abaissée sur le pronostic du CHC sont discordants dans la littérature. Certains auteurs mettent en évidence cette baisse de surface musculaire comme étant un facteur diminuant la survie globale (SG) et la survie sans

récidive (Harimoto et al. 2013a; Voron et al. 2015; Hamaguchi et al. 2019). Parfois, certaines études mettent en évidence que la baisse de la surface musculaire péjorait la survie globale uniquement (Takagi et al. 2016). D'autres mettent en évidence un impact négatif d'un index de masse musculaire squelettique bas sur la survie sans récidive uniquement chez les patients avec un IMC ≥ 22 kg/m² (Yabusaki et al. 2016). Plus récemment, Koch et al (2019) n'ont mis en évidence aucun impact de la baisse de la surface musculaire chez les patients opérés d'un CHC (Kroh et al. 2019). En 2020, une méta-analyse a été publiée incluant six études ayant analysé le lien entre surface musculaire abaissée et le pronostic des CHC (Xu et al. 2020). Cette méta-analyse a permis de confirmer l'impact négatif de la baisse de surface musculaire pré-opératoire chez les patients opérés que ce soit sur la SG ou sur la SSR. Elle est également associée à une taille tumorale plus importante. Cependant, il est important de souligner un biais : alors que toutes les études incluses dans cette méta-analyse évaluent la surface musculaire sur une coupe de TDM L3, aucune des études n'utilise les mêmes seuils de définition de surface musculaire abaissée (Harimoto et al. 2013a; Voron et al. 2015; Takagi et al. 2016; Yabusaki et al. 2016; Hamaguchi et al. 2019; Kroh et al. 2019).

La masse grasse joue également un rôle pronostique chez les patients atteints de cancer. Comme nous l'avons vu précédemment, la mesure de la composition corporelle par scanner permet de déterminer la masse musculaire squelettique, mais aussi d'évaluer la graisse viscérale, la graisse sous-cutanée et la graisse intramusculaire.

L'impact négatif d'une surface de graisse viscérale élevée sur le pronostic (SG et SSR) des CHC a été étudié pour la première fois par Itoh et al, (2014). Ces résultats ont été confirmés sur la survie sans récidive dans une autre publication (Imai et al. 2018).

Il est aussi possible de déterminer l'adiposité viscérale par le ratio surface de la graisse viscérale/ surface de la graisse sous-cutanée appelée dans la littérature VSR (*visceral-to-subcutaneous tissue area ratio*). Cet index, s'il est élevé, est associé à une moins bonne survie

dans plusieurs études : dans les cancers digestifs (Okamura et al. 2018), le mélanome (Grignol et al. 2015), les tumeurs pancréatiques (Okumura et al. 2015), ou les tumeurs hépatiques (Fujiwara et al. 2015; Hamaguchi et al. 2019).

L'index de qualité musculaire (ou IMAC) est défini comme le rapport entre la densité musculaire (UH) sur la densité de la graisse sous-cutanée (UH). Il a été mis en évidence un lien entre IMAC élevé et baisse de la force musculaire. Certains auteurs proposent donc de considérer l'IMAC comme un critère d'évaluation indirect de la fonction musculaire (Hamaguchi et al. 2015). L'IMAC est un facteur de risque de complications post-opératoires en particulier infectieuses (Hamaguchi et al. 2016). Par ailleurs, Ebadi et al (2017) ont mis en évidence qu'un index de graisse sous-cutanée bas augmentait significativement la mortalité dans plusieurs cancers (Ebadi et al. 2017). Les patients sarcopéniques qui avaient un index de graisse sous-cutanée plus bas avaient un moins bon pronostic. Chez les patients présentant un CHC, il n'a pas été mis en évidence d'impact pronostique de l'index de graisse sous-cutanée (Imai et al. 2018; von Hessen et al. 2021). Cependant, Von Hessen et al (2021) ont mis en évidence une baisse de la survie globale chez les patient présentant une densité adipeuse sous-cutanée élevée (von Hessen et al. 2021).

Globalement, au regard de la littérature, la composition corporelle semble un outil intéressant pour l'évaluation pronostique du patient atteint de CHC malgré le biais important concernant l'absence de valeurs seuils standardisées.

L'impact de la composition corporelle chez les patients atteints de CCI a été moins étudié que dans le CHC. Dans une étude rétrospective chez des patients atteints de CCI secondaires à des lithiases intra-hépatiques, la baisse de surface musculaire était un facteur de baisse de la SG et de la SSR (Zhou et al. 2015). Deng et al (2021) ont également mis en évidence un effet négatif de la baisse de la surface musculaire des deux psoas sur la SG et la SSR. Une autre

étude évaluant seulement la surface des deux psoas en L3 (et non la surface musculaire totale comme dans les autres études (Zhou et al. 2015; Okumura et al. 2016)) confirme qu'une baisse de celle-ci est corrélée à la diminution de la SG et la SSR (Yugawa et al. 2019).

Une publication de Okumura et al. (2016) a mis en évidence qu'une surface musculaire basse et une moindre densité musculaire étaient des facteurs de mauvais pronostic chez les patients atteints de CCI de stade I à III (Okumura et al. 2016). Cependant, l'impact de l'augmentation de la graisse viscérale sur le pronostic oncologique des CCI n'a pas été étudié. Seule une publication met en évidence un effet péjoratif sur la SG et SSR chez les patients avec un VSR élevé (Okumura et al. 2016). L'association entre index de graisse sous-cutanée et pronostic n'a pas non plus été étudiée chez les patients présentant un CCI.

L'impact de la composition corporelle chez les patients atteints de CCI a été peu étudié. La surface musculaire abaissée semble être un facteur associé à une baisse de la SG et de la SSR.

L'impact de la composition corporelle sur le pronostic des MHCR a aussi été étudié. Une méta-analyse récente publiée en 2021, incluant 11 études, a confirmé que la baisse de la surface musculaire, mais aussi une faible densité musculaire, étaient des facteurs pronostiques péjoratifs sur la SG (Waalboer et al. 2021). En revanche, celle-ci n'influe pas sur la SSR. Cependant, là encore, la définition de la baisse de la surface musculaire reposait sur des seuils différents en fonction des études ce qui est un biais majeur. De même, certaines études (van Vledder et al. 2012; Lodewick et al. 2015; Eriksson et al. 2017; Kobayashi et al. 2018; van Dijk et al. 2019; Lv et al. 2019; Shiozawa et al. 2020) ont pris en compte l'index de masse musculaire totale sur une coupe en L3, alors que d'autres uniquement la surface musculaire des psoas (Peng et al. 2011; Horii et al. 2020). Runkel et al. 2021 ont mis en évidence une augmentation des complications post-opératoires chez les patients opérés de MHCR ayant un niveau de masse grasse viscérale plus élevé, sans qu'une étude sur le pronostic oncologique

ne soit réalisée. L'index de graisse viscérale n'était pas un facteur pronostique (van Vledder et al. 2012). Il n'a pas été retrouvé d'études évaluant les effets de la composition en graisse sous-cutanée sur la SG et la SSR des MHCR.

Pour résumer, vu le faible nombre d'études, l'impact de la composition corporelle chez les patients présentant des MHCR a été étudié surtout pour la masse musculaire squelettique. La présence d'une baisse de la surface musculaire semble impacter négativement la survie globale des patients. L'impact du niveau de masse grasse n'a pas été évalué.

La cirrhose étant un facteur de risque majeur de survenue de tumeurs primitives hépatiques, nous préciserons aussi les données de la composition corporelle dans ce cadre-là. La baisse de la surface musculaire est un facteur pronostique péjoratif sur la survie des patients cirrhotiques (Durand et al. 2014; Montano-Loza et al. 2016; Ebadi et al. 2020). L'augmentation de la surface de graisse viscérale augmente la mortalité chez les patients présentant une diminution de la surface musculaire (Ishizu et al. 2021). Dans le domaine de la transplantation hépatique (TH), une méta-analyse incluant 19 études a confirmé que la baisse de la surface musculaire était associée à une augmentation de la mortalité post-TH et à une augmentation de la mortalité chez les patients en attente de TH (van Vugt et al. 2016). Huguet et al avait également mis en évidence que le diamètre du psoas était prédictif de la mortalité chez les patients cirrhotiques en attente de TH (Huguet et al. 2018)

Devant l'importance de l'impact de la composition corporelle dans le pronostic des patients transplantés hépatiques, Hamaguchi et al. (2020) ont créé un score incluant la composition corporelle (masse musculaire et graisse viscérale) qu'ils ont appelé le BC-MELD et qui permet de prédire plus précisément que le MELD seul le risque de mortalité sur la liste d'attente pour TH (Hamaguchi et al. 2020). La *European Association for the Study of the Liver* recommande la mesure de la masse musculaire par scanner chez les patients

cirrhotiques à risque élevé de dénutrition (EASL Clinical Practice Guidelines on nutrition in chronic liver disease 2019).

La baisse de surface musculaire squelettique a un impact majeur chez les patients cirrhotiques notamment ceux en attente de TH et chez les patients transplantés hépatiques, car elle est associée à une augmentation de la mortalité. Il semble donc exister un intérêt certain à évaluer systématiquement la composition corporelle comme outil pronostique chez le patient cirrhotique.

En conclusion, la surface musculaire a une influence majeure sur la survie des patients atteints d'une tumeur hépatique associée ou non à une cirrhose. Le rôle pronostique de la composition en tissu adipeux est encore trop peu étudié, raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à celle-ci dans la première partie de ce travail.

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons voulu développer un modèle de dénutrition préclinique chez le miniporc Yucatan et caractériser son phénotypique musculaire et son microbiote.

G. Modèles animaux de dénutrition/sarcopénie

Il n'existe pas dans la littérature de modèle animal standardisé de dénutrition ou de sarcopénie. Les modèles sont nombreux et diffèrent en fonction des publications. Les différents modèles animaux de dénutrition utilisent soit la restriction calorique, soit la restriction protéino-énergétique, soit le jeûne. Il a été décrit des restrictions caloriques de 15% (Park et al. 2017), de 25% (Núñez et al. 2013), de 30% (Pan et al. 2018). On peut aussi obtenir une dénutrition avec un régime hypocalorique/hypoprotéique avec des compositions en protéines entre 0 et 7% (Salameh et al. 2019). Il a également été décrit un modèle mimant certains symptômes somatiques de l'anorexie mentale chez la souris appelé *activity-based*

anorexia et qui associe une restriction alimentaire à une hyperactivité physique (Belmonte et al. 2007; Spadini et al. 2021).

Les modèles animaux de sarcopénie sont nombreux et non standardisés. La sarcopénie a été étudiée chez les rongeurs, la *Drosophila*, le ver *Caenorhabditis elegans*, le poisson zèbre (Christian and Benian 2020). Le modèle murin est probablement le modèle le plus utilisé. Une revue récente de la littérature répertorie les différents modèles murins (Xie et al. 2021).

Parmi les modèles de sarcopénie chez la souris, on distingue :

- modèles liés à l'âge avec soit des souris âgées, ou avec une sarcopénie liée à l'âge accélérée par un régime hypercalorique ou par le modèle de lignée de souris *Senescence-accelerated prone* (SAMP) ;
- modèles de souris génétiquement modifiées pour induire une sarcopénie (par exemple souris *knock-out* pour l'interleukine 10) ;
- modèle de souris avec administration de glucocorticoïdes ou du D-galactose ou de Dextran Sodium Sulfate (DSS) induisant une colite ;
- modèle de suspension d'un membre ;
- modèle d'immobilisation ;
- modèle de dénervation.

Le modèle rat est également utilisé (Ruiz-Rosado et al. 2013).

H. Intérêt du modèle miniporc Yucatan

Le miniporc est un animal proche de l'Homme à la fois sur le plan génétique, anatomique et physiologique (Miller and Ullrey 1987a; Litten-Brown et al. 2010). Il est utilisé depuis plusieurs années dans la recherche biomédicale (Vodicka et al. 2005), notamment en nutrition (Miller and Ullrey 1987a). Le miniporc Yucatan est une race de miniporc qui est utilisée comme modèle préclinique dans l'obésité, la chirurgie de l'obésité, la transplantation

d'organe mais aussi le comportement alimentaire (Val-Laillet et al. 2011; Ochoa et al. 2016; Polakof et al. 2018a; Mohamed et al. 2019; Alix et al. 2020; Bergeat et al. 2021). Dans le domaine de la nutrition, des modèles de miniporcs obèses et des modèles de miniporcs atteints de syndrome métabolique ont été développés (Spurlock and Gabler 2008). Cependant, il est important de souligner qu'en fonction de la race de miniporc utilisée les modèles peuvent différer. Par exemple concernant le syndrome métabolique, le miniporc Yucatan n'est pas un bon modèle, car il n'est pas possible d'obtenir un syndrome métabolique contrairement au miniporc de race Ossabaw (Spurlock and Gabler 2008). Il a également été démontré que malgré une alimentation riche en graisse prolongée, les miniporcs Yucatan ne développent pas de stéatose ou de fibrose hépatiques probablement parce que le foie n'est pas un lieu de lipogenèse chez cet animal (Pedersen et al. 2020). Cependant, il a été récemment développé un modèle de stéatose hépatique chez des miniporcs de race Göttingen à l'aide d'un régime pauvre en choline et riche en graisses (Pedersen et al. 2020).

Le miniporc Yucatan est un bon modèle d'étude de l'obésité et est également un modèle de chirurgie de l'obésité (Val-Laillet et al. 2011; Ochoa et al. 2016; Bergeat et al. 2021). Par ailleurs, l'étude de la composition corporelle peut être réalisée de façon identique à l'Homme à l'aide du scanner (Val-Laillet et al. 2010)

Il a également bien été démontré que le modèle miniporc Yucatan était un bon modèle préclinique pour l'étude de la barrière intestinale et du microbiote (Roura et al. 2016). Le microbiote du miniporc Yucatan diffère du microbiote de l'Homme. Alors que *Bacteroides* représente le genre majoritaire, entre 9 et 42% des bactéries, chez le miniporc Yucatan, le genre majoritaire est *Prevotella* à plus de 20% de toutes les bactéries (Roura et al. 2016). L'avantage du miniporc Yucatan est le possible transfert de microbiote humain permettant une transplantation efficace avec une évolution du microbiote similaire à l'Homme (Pang et al. 2007).

Il n'existe pas à notre connaissance de modèle de miniporc avec une dénutrition de type marasmique. Le modèle murin est très utilisé dans la littérature en raison de son moindre coût, des facilités à le manipuler génétiquement ou à le moduler par l'administration de diverses substances (glucocorticoïdes, *etc.*). Cependant, le modèle porcin en général est un excellent modèle pour l'étude de la physiologie en raison de sa proximité avec l'Homme (Miller and Ullrey 1987a; Roura et al. 2016). Seul un modèle de porc dénutri a été décrit afin de mimer un modèle de dénutrition de type Kwashiorkor. Les porcs étaient âgés de 2 semaines et ont été nourris pendant 8 semaines avec une alimentation hypoprotéique contenant 3% de protéines. Ils ont été comparés à des porcs alimentés avec une alimentation normoprotéique (20%) (Wykes et al. 1996a). Ce modèle permettait d'obtenir les signes cliniques observés dans le Kwashiorkor chez l'Homme, notamment des œdèmes, une altération des phanères (poils) et de la peau. Il existait également une diminution de la synthèse protéique dans la peau, le foie et l'intestin (Wykes et al. 1996). La plupart des modèles de porcs dénutris étudient en fait le porcelet né d'une mère dénutrie (Zijlstra et al. 1999; Lykke et al. 2013; Cao et al. 2014; Chang et al. 2021).

Le miniporc Yucatan est donc le gros mammifère idéal pour établir un modèle de dénutrition proche de celui obtenu chez l'homme adulte. A fortiori, pour notre objectif de mesurer la composition corporelle, à l'âge adulte, le poids et la taille du miniporc Yucatan permettent d'utiliser le scanner et l'IRM selon les modalités proches que chez l'Homme (Ochoa et al. 2016), ce qui n'est pas possible avec l'utilisation de porcs « fermiers ».

VIII. Méthodologie générale

A. Méthode commune d'évaluation de la composition corporelle utilisée dans les articles 1 et article 2 : la tomodensitométrie

Cette thèse comporte un volet d'étude de la composition corporelle (musculaire squelettique et adipeuse) chez l'Homme et un volet chez l'animal. Chez l'Homme, il s'agit d'une étude rétrospective sur l'impact de la composition corporelle musculaire squelettique et adipeuse chez des patients opérés de CCI dans un but curatif (article 1). L'étude de la composition corporelle a été réalisée selon une des méthodes proposées par les critères de dénutrition de l'HAS 2019, la coupe scannographique passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire (TDM L3). Dans l'article 2, nous avons réalisé une étude de la composition corporelle musculaire et adipeuse par tomodensitométrie chez des miniporcs Yucatan selon la même méthode. Elle a été réalisée sur une coupe axiale passant par la 13^{ème} vertèbre thoracique. La technique de mesure de la composition corporelle adipeuse chez le miniporc Yucatan a déjà été décrite dans la littérature (Val-Laillet et al. 2010).

La mesure de la surface corporelle a été réalisée de façon semi-automatique à l'aide du logiciel ImageJ ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Le seuil de densité retenu était pour le muscle entre -29 et +150 UH et pour la graisse entre -190 et -30 UH. Chez l'Homme, la surface musculaire squelettique totale était dite abaissée si l'index musculaire squelettique était inférieur à 52,4 cm²/m² chez l'homme et inférieur à 38,5 cm²/m² chez la femme. Il n'existe aucun index ou seuil reconnu pour évaluer la surface de graisse viscérale, sous-cutanée ou intramusculaire chez l'Homme. Nous avons donc décidé de calculer l'index de surface grasseuse en rapportant la surface de graisse mesurée (viscérale, sous-cutanée ou intramusculaire) à la taille en mètre au carré. En l'absence de seuils validés connus dans la littérature pour les surfaces grasseuses, nous avons considéré les valeurs quantitatives au cours de l'analyse statistique.

Chez le miniporc Yucatan ou autre, il n'existe pas à notre connaissance d'études sur la composition corporelle musculaire squelettique donc il n'existe aucun seuil validé. Nous avons pour l'analyse statistique comparé les surfaces musculaires et graisseuses entre les différents groupes d'alimentations expérimentales et le groupe avec alimentation standard.

A. Mise au point d'un modèle préclinique de dénutrition chez le miniporc Yucatan normopondéral (Sarcopig 1) et obèse (Sarcopig 2)

Le projet Sarcopig a été conçu afin de mettre au point un modèle animal préclinique de dénutrition de type marasmique. Ce modèle se voulait proche de l'Homme sur le plan de la physiologie nutritionnelle. Nous avons donc choisi le miniporc Yucatan chez lequel les explorations, notamment de la composition corporelle, pouvaient être effectuées avec la même technique que chez l'Homme. Afin de pouvoir disposer aussi d'un modèle de dénutrition chez l'obèse, proche de l'obésité sarcopénique observée chez l'Homme, nous avons appliqué le même protocole à des miniporcs Yucatan obèses. Ce projet, intitulé Sarcopig 2 n'est pas présenté dans ce travail de thèse. Les résultats sont actuellement en cours d'analyses.

Les déroulements des études Sarcopig 1 et Sarcopig 2 sont joints en annexe 1.

1. Les différentes alimentations restrictives pour obtenir la dénutrition

Dans ce projet Sarcopig, nous voulions obtenir un modèle animal de dénutrition protéino-énergétique afin d'obtenir un modèle préclinique de dénutrition de type marasme comme observé chez l'Homme. En l'absence de modèle existant dans la littérature, nous avons décidé de réaliser une restriction d'apport protéino-énergétique de deux manières différentes : un groupe de 6 miniporcs Yucatan a reçu une alimentation hypocalorique/hypoprotidique (HH) et un groupe de 5 miniporcs Yucatan a reçu une alimentation hypocalorique/normoprotidique (HN). Ces deux groupes étaient comparés à un groupe de miniporcs nourris avec une ration

standard, calculée à partir de leur poids métabolique et adaptée à leurs besoins énergétiques et à la composition énergétique de l'aliment (10,33 MJ/Kg, 15% de protéines). Le poids métabolique était calculé selon la formule poids vif ^{0,75} pour adapter les apports au métabolisme basal. Les apports journaliers chez le miniporc Yucatan adulte sont de 0,307 MJ/kg de poids métabolique. L'apport en aliment standard était donc de 41,5g/kg^{0,75}. Le groupe HN a reçu une ration équivalente à 50% de celle qu'il aurait dû recevoir pour être adaptée à ses besoins, l'aliment étant le même que le groupe standard (10,33 MJ/Kg, 15% de protéines). Le groupe HH a reçu un aliment spécialement composé pour le projet Sarcopig, cet aliment étant hypocalorique et hypoprotéique (10,37MJ/Kg, 8,6% de protéines). La ration a été calculée à partir du poids métabolique des animaux soit 41,5 g/kg ^{0,75}. La composition des différents types d'aliments est en annexe 2. Les différents types de régime ont été donnés pendant une durée totale de 8 semaines dans le projet Sarcopig 1. Au préalable, les animaux avaient été répartis en 3 groupes avec une moyenne de poids équivalente entre les groupes afin de ne pas avoir de déséquilibre initialement. Les animaux étaient nourris avec 2 repas par jour, 1 repas le matin et 1 repas le soir. L'eau était distribuée *ad libitum*.

Dans le projet Sarcopig 2, les animaux ont également été répartis en 3 groupes de 6 animaux avec des moyennes de poids initialement équivalentes entre les groupes. Puis le régime obésogène a été débuté dans les 3 groupes afin d'obtenir des miniporcs Yucatan obèses. Celui-ci a consisté à donner pendant deux mois l'aliment standard *ad libitum*. Le poids maximal atteint a été de 90 kg.

2. Mesure de la force musculaire par électromyogramme (twitch)

Dans le projet Sarcopig, nous avons voulu tester la force musculaire au début de l'expérimentation, à 4 semaines puis à 8 semaines afin d'étudier l'effet des différents régimes de dénutrition sur la force musculaire. Comme nous l'avons vu précédemment, la sarcopénie

se définit par à la fois une baisse de la masse musculaire mais aussi de la force musculaire. Nous avons reproduit la technique validée chez le chien par Childers et al. (2011). Un électromyogramme a été réalisé sous anesthésie générale par électrostimulation du nerf tibial puis du nerf fibulaire. Les miniporcs Yucatan étaient positionnés sur le dos, le fémur était perpendiculaire à la table et le tibia parallèle à la table. Le membre était immobilisé avec le pied sur la pédale (Figure 6). Les électrodes étaient insérées par voie percutanée, toujours au niveau du membre postérieur droit. La contraction basale puis la contraction après stimulation électrique a été enregistrée. Dans un premier temps, nous avons étudié le nerf fibulaire. Afin d'obtenir la contraction isométrique, après désinfection à l'alcool, le nerf fibulaire était repéré à la palpation au niveau de l'extrémité proximale de la fibula. La cathode était introduite sous la peau jusqu'au périoste. L'anode était placée un peu plus distalement. Les électrodes sont reliées au générateur électrique. La stimulation est alors réalisée à 1 Hertz (Hz). Pour réaliser la contraction tétanique, les électrodes ne sont pas déplacées. La stimulation est réalisée à 50 Hz pendant 1,5 secondes.

Dans un second temps, on étudie le nerf tibial. Pour obtenir la contraction isométrique, les électrodes sont déplacées pour cette fois être introduites perpendiculairement à la peau, près du genou. La stimulation est alors réalisée à 1 Hertz (Hz). Pour obtenir la contraction tétanique, la méthode est identique à celle réalisée pour le nerf fibulaire.

Les données ont ensuite été analysées à l'aide d'un logiciel ReadForce crée par le Dr Malbert. Les résultats n'ont pour l'instant pas pu être exploités ni pour Sarcopig 1, ni pour Sarcopig 2 en raison de difficultés techniques avec une grande variabilité des mesures qui doivent être vérifiées.

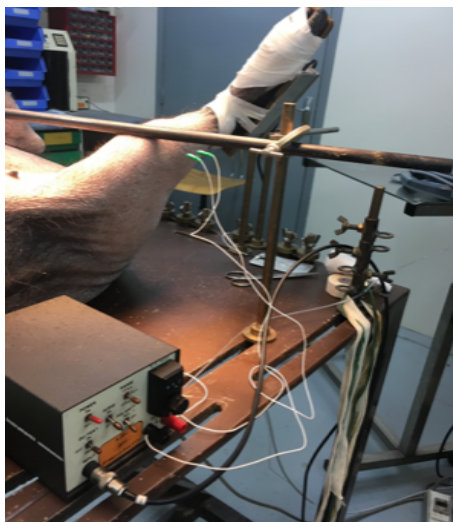


Figure 6 : La stimulation du nerf tibial pour mesurer la force musculaire par électromyogramme (twitch) chez le miniporc Yucatan.

3. L'échographie musculaire

La réalisation d'un scanner chez le miniporc Yucatan nécessite une anesthésie générale. Nous avons donc voulu essayer de simplifier la mesure de la composition corporelle par une mesure échographique musculaire du muscle long dorsal. Malheureusement, cette mesure est très variable et surtout difficile à réaliser, les poils et la desquamation de la peau gênant l'analyse. Elle s'est même révélée impossible chez les miniporcs mâles notamment au cours de la phase de dénutrition en raison d'artefacts trop importants, probablement liés à l'épaisseur de la peau et à la surface de graisse sous-cutanée quasi-inexistante. Les résultats ne sont donc pas présentés dans ce travail de thèse. Nous concluons que l'échographie musculaire ne peut pas être proposée en remplacement de l'étude de la composition corporelle par tomодensitométrie.

B. Le microbiote intestinal

Les résultats concernant le microbiote intestinal sont présentés partiellement dans l'article 2 mais ils nécessitent un complément d'analyse.

C. Histologie et phénotypage musculaire

Les méthodes utilisées pour l'histologie et le phénotypage musculaire sont décrites dans l'article 2.

D. Modèle de dénutrition marasmique chez le miniporc Sarcopig 1 : les difficultés

Au cours de ce travail de thèse, plusieurs difficultés expérimentales ont été rencontrées. Dans le groupe HN, un miniporc Yucatan mâle a dû être euthanasié pour des raisons éthiques en raison d'un état de maigreur extrême deux semaines avant la fin de l'expérimentation. Une autre difficulté de ce travail expérimental est que, pour des raisons de nécessité liées à l'élevage, nous avons dû étudier ce modèle à la fois chez les mâles et les femelles. Or, il est apparu que, tout comme chez l'Homme, la composition corporelle est différente selon le sexe. L'analyse de la composition corporelle a donc été rendue plus difficile, notamment chez les mâles chez qui, même au début de l'expérimentation animale, la mesure de la graisse sous-cutanée était impossible du fait de sa très faible surface. Cette difficulté n'a pas été rencontrée chez les miniporcs Yucatan femelles.

Dans le cadre de l'article 2 concernant Sarcopig 1, nous n'avons pas pris en compte le groupe HN en raison du faible effectif de ce groupe en lien avec l'euthanasie précoce d'un animal mâle présentant une dénutrition très sévère non compatible éthiquement avec une poursuite de l'expérimentation. L'article 2 présente donc les résultats comparatifs entre le groupe alimentation standard et le groupe alimentaire restrictive (HN et HP réunis).

IX. Article 1: High visceral fat is associated with worse survival after curative liver resection for intrahepatic cholangiocarcinoma

Article Original

High visceral fat is associated with worse survival after curative liver resection for intrahepatic cholangiocarcinoma

Laurence Lacaze,^{1,5} Damien Bergeat,^{1,2} Chloé Rousseau,^{3,4} Laurent Sulpice,¹⁻³ David Val-Laillet,² Ronan Thibault,^{2,5*} Karim Boudjema^{1-3*}

* Both authors contributed equally as last author

1 Service de Chirurgie Hépatobiliaire et Digestive, CHU Rennes, Univ Rennes, Rennes, France

2 INRAE, INSERM, Univ Rennes, Nutrition Metabolisms and Cancer, NuMeCan, Rennes, France

3 INSERM-CIC 1414, Univ Rennes, Rennes, France

4 Unité de biostatistiques, CIC 1414, Univ Rennes, Rennes, France

5 Unité de Nutrition, service Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition, CHU Rennes, Rennes, France

Short title: body composition and resected cholangiocarcinoma

Corresponding authors:

Prof. Ronan THIBAUT

Centre labellisé de nutrition parentérale au domicile

CHU Rennes

2, rue Henri Le Guilloux

35000 Rennes

France

Tél. +33 2 99 28 96 46

Fax +33 2 99 28 24 34

E-mail ronan.thibault@chu-rennes.fr

Prof. Karim Boudjema

Service de Chirurgie Hépatobiliaire et Digestive

CHU Rennes

2, rue Henri Le Guilloux

35000 Rennes

France

Phone: (33) 299-289-008

Fax: (33) 299-284-129

e-mail: karim.boudjema@chu-rennes.fr

Abstract:

The impact of body composition (BC) on the prognosis of resected intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) has been poorly studied. Aims: i) to evaluate the prevalence of low muscle mass (MM) in patients ; ii) to assess the impact of BC on patient overall survival (OS) and disease-free survival (DFS), and iii) on the incidence of postoperative complications.

All consecutive patients who underwent liver resection for ICC between 2004 and 2016 and who had preoperative CT scans were included.

Ninety-three patients were included. Sixty percent (55/91) had low total MM. On multivariable analysis, high visceral fat (HR 2.48, CI95% [1.63; 3.77], $p < 0.0001$), nodules >1 (HR 3.15 [1.67; 5.93], $p = 0.0004$), involvement adjacent organ (HR 6.67 [1.88; 23.69], $p = 0.003$), and postoperative sepsis (HR 3.04 [1.54; 5.99], $p = 0.0013$) were independently associated with OS. High visceral fat (HR 2.10 [1.31; 3.38], $p = 0.002$), nodules >1 (HR 3.01, [1.49; 6.10], $p = 0.002$), postoperative sepsis (HR 5.16 [2.24; 11.89], $p = 0.0001$), ASA score ($p = 0.02$) and perineural invasion (HR 3.30 [1.62; 6.76], $p = 0.001$) were independently associated with lower DFS.

Conclusion: 60% of ICC patients had low MM before surgery. High visceral fat, but not muscle mass, was an independent prognostic factor for poor OS and DFS in European patients with resected ICC.

Keywords: fat-free mass; malnutrition; adipose tissue; sarcopenia; cancer.

A. Introduction

Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is the second most frequent primary malignant liver tumor (Patel 2001; Witjes et al. 2012). Its incidence is increasing in Europe and North America (Mavros et al. 2014; Blechacz 2017). The only potentially curative treatment for ICC

remains surgical resection with complete removal of tumoral tissue (Sulpice et al. 2012). However, prognosis remains poor with overall 5-year survival of 30% to 35% (de Jong et al. 2011) and high rates of local and distant recurrence.

Tumoral factors, such as tumor size and number of nodule, nodal or vascular invasion, have been shown to impact overall survival of patients undergoing curative resection for ICC (Mavros et al. 2014). However, there is little information regarding the impact of preoperative malnutrition and body composition on ICC patient survival (Zhou et al. 2015; Okumura et al. 2016). Indeed, sarcopenia (i.e., a loss of skeletal muscle mass and function) is associated with worse prognosis in patients with primary or secondary liver cancers (van Vledder et al. 2012; Fujiwara et al. 2015; Voron et al. 2015; Cornet et al. 2015). High visceral fat was independently associated with poor prognosis in gastrointestinal (Clark et al. 2013; Grignol et al. 2015; Okamura et al. 2018) and female genital cancers (Iwase et al. 2016; Mauland et al. 2017). Body composition measured on abdominal CT scan at the transversal level of the third lumbar vertebra (L3) has a prognostic value in cancer patients (Prado et al. 2008).

The aims of the present study were to assess: i) the prevalence of low muscle mass in patients who underwent liver resection for ICC, ii) the impact of BC, i.e. muscle mass, visceral, subcutaneous and intramuscular fat tissues, measured at L3 on CT-scan, on patient overall survival (OS) and disease-free survival (DFS), and iii) the association of body composition with the incidence of postoperative complications.

B. Patients and methods

Patient selection

A monocentric retrospective study was conducted in the Department of Hepatobiliary and Digestive Surgery at Rennes University Hospital (CHU Rennes), Rennes, France. The study population included all of the patients who underwent liver resection with curative intent for ICC between January 1, 2004 and November 30, 2016, and who had analyzable abdominal CT scan within the three months before surgery. Patients with hepato-cholangiocarcinoma, gall-bladder cholangiocarcinoma, perihilar and extrahepatic cholangiocarcinoma were excluded from the analysis.

Clinical data and ICC treatment

Clinical data were collected retrospectively from a prospective maintained database and included age, gender, comorbidities, body mass index (BMI), preoperative treatments, American Society of Anesthesiologists (ASA) score, peroperative blood transfusion, postoperative complications as described by Dindo-Clavien classification (CDC) with CDC >IIIa being considered severe. Pathological data, such as tumor size, number of nodules, lymph nodes, perineural invasion, vascular invasion, and surgical margin status were collected.

Portal vein embolization was indicated when the liver remnant/total liver volume ratio was <35%. When necessary, induction chemotherapy or intra-arterial Yttrium 90 radioembolization was indicated after a multidisciplinary discussion in order to reduce tumor volume and get complete R0 tumor resection. During surgery, vascular or biliary reconstructions were performed when necessary to get complete R0 tumor resection. Major hepatectomy was defined by hepatectomy with more than 3 segments.

Body composition assessment

Body composition parameters were measured at L3 level on abdominal CT scans performed within the most recent scanner available (median: 26.5 days before surgery, maximum 151 days). This was made in a semi-automated way using the ImageJ[®] software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Schneider et al. 2012b). The density threshold was set between -29 and +150 Hounsfield Units (HU) (Schneider et al. 2012b) for muscle, and between -190 and -30 HU for fat (Yoshizumi et al. 1999). Measurements were performed by a single observer (LL). Two measurements were made on two successive slices of CT scan at the level of L3 and the average of the two areas was considered for analysis. Abdominal skeletal muscle area (SMA) was measured as the sum of psoas muscle, external and internal oblique muscles, transverse muscle and paravertebral muscles areas. Skeletal muscle index (SMI) (cm^2/m^2) was calculated as $\text{SMA}/\text{height} (\text{m})^2$. Intramuscular fat was measured in the same area and distinguished from the muscle by the difference of density. Visceral fat area (VFA), subcutaneous fat area (SCFA), and intramuscular fat area (IMFA). Total fat area was calculated as the sum of VFA, SCFA and IMFA. The respective fat indexes (cm^2/m^2) (visceral (VFI), subcutaneous (SCFI), intramuscular (IMFI), total fat) were calculated as normalized by height, as for SMI calculation.

Survival Analysis

Overall survival (OS) was calculated from the date of surgery to the death of the patient. The survival data were obtained by contact with the patient or, in the event of failure, by phone calling the civil status office of the municipality of birth. Survival data were collected until May 2017. Deaths during the 30 days following the surgery were not taken into account for survival analysis. Survival analysis was censored at 5 years due to the low number of patients

beyond.

Disease free survival (DFS) was calculated from the date of surgery to the diagnosis of recurrence. A new lesion on imaging was considered to be a recurrence, without pathological confirmation.

The primary endpoint was overall survival (OS). Secondary endpoints were disease-free survival (DFS) and major postoperative complications (Dindo-Clavien classification ≥ 3) (Dindo et al. 2004).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SAS version 9.4. Continuous variables were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Means were compared with Student *t* or Wilcoxon test when appropriate. Categorical variables were reported as number with percentage and were compared with either the Pearson χ^2 test or Fischer's exact test as appropriate. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) rates were calculated using the Kaplan–Meier method, and differences between curves were evaluated using the log-rank test.

Univariate analysis was performed by Cox proportional hazard model. A multivariable logistic regression adjusted for the factors with a *p*-value of <0.2 in the univariate analysis was performed with a backward stepwise elimination process eliminating all variables that did not contribute (*P* value ≥ 0.05). Results of the multivariate analysis are shown as hazard ratio [HR] [95% confidence interval]. A *p*-value of less than 0.05 was considered significant.

For the variables VFI, IMFI, SCFI and total fat index (adipose tissues), the adjusted hazard ratio was expressed for 50 cm²/m² increase. To define low muscle mass, the cut-offs previously shown as associated with cancer mortality by Prado et al (Prado et al. 2008) were chosen: SMI < 38.5 cm²/m² in females and SMI < 52.4 cm²/m² in males.

C. Results

Patient characteristics

Among the 159 eligible patients, 60 patients were excluded because of non-exploitable CT scans. Thus 93 patients were included for descriptive analysis. The preoperative, operative, and postoperative data of the 93 included patients are shown in Tables 4, 5 and 6, respectively. Because body composition differs according to gender (Shen et al. 2004b), all the patient characteristics (Tables 1 to 4) were presented according to gender. Twenty percent (n=19) of the patients had neoadjuvant chemotherapy, 1% (n=1) had neoadjuvant radiotherapy, and 11% (n=11) had neoadjuvant radioembolization.

Body composition

Body composition of patients is reported in Table 4. Sixty percent of the patients (55/91, missing data=2 because patient's height for index calculation was missing) had low SMI. Male patients had a significantly higher BMI than female patients (27.3 ± 4.3 vs. 23.8 ± 5.0 kg/m², $p < 0.001$) (Table 7). VFI was significantly higher in male than in female ($p < 0.0001$). Male had higher total fat than female ($p = 0.0022$). No difference was found between male and female regarding IMFI and SCFI.

Patient survival

Actuarial overall survival rates of female patients at 1, 3 and 5 years were 74%, 52% and 26%, respectively, and OS of male patients at 1, 3 and 5 years were 74%, 37% and 17%, respectively. Female OS was significantly better than male OS ($p = 0.02$). Actuarial overall survival was lower in patients with low SMI ($p = 0.02$). Higher VFI, low SMI, gender, peroperative transfusion, occurrence of post-operative complications, post-operative sepsis, and >1 tumor, were associated with lower OS in the univariate analysis (Table 8).

In the multivariable analysis, high VFI, the occurrence of postoperative sepsis, >1 tumor and involvement of adjacent organ were independently associated with lower OS (Table 8). Figure 1 showed the difference of OS survival curves for each variation of 50 cm²/m² of visceral fat, groups: VFI < 50 cm²/m², [50-100 cm²/m² [, and ≥ 100 cm²/m² (log rank test p=0.02) (fig.7).

DFS of female patients at 1, 3 and 5 years were 56%, 35% and 9%, respectively, and DFS of male patients at 1, 3 and 5 years were 53%, 20% and 11%, respectively. DFS was not different between male and female (p= 0.8).

Adjuvant chemotherapy, arterial resection, postoperative complications, the occurrence of postoperative sepsis, >1 tumor, arterial invasion, portal invasion, lymph node involvement, perineural invasion, high VFI were associated with lower DFS in the univariate analysis (Table 9). In the multivariate analysis, higher VFI, the occurrence of postoperative sepsis, >1 tumor perineural invasion and ASA score were independently associated with lower DFS (Table 9). Figure 8 showed the difference of DFS survival curves for each variation of 50 cm²/m² of visceral fat: VFI < 50 cm²/m², [50-100 cm²/m² [, ≥ 100 cm²/m² (log rank test p=0.02) (fig 8).

D. Discussion

In this retrospective study, preoperative high visceral fat measured on abdominal CT scan is associated with worse OS and DFS in patients with resected intrahepatic cholangiocarcinoma. The other fat tissue areas, i.e. subcutaneous and intramuscular, were not. Unless observed in 61% of patients, preoperative low muscle mass according to validated cut-offs (Prado et al. 2008) was associated with patient survival only in univariate analysis but not in multivariate analysis. Body composition was not associated with postoperative complications.

In the literature, the impact of body composition, especially fat tissue composition, on the prognosis of ICC has been poorly studied. Only one study evaluated the impact of body composition including fat composition on the prognosis of ICC (Okumura et al. 2016). We found different findings regarding visceral fat. Indeed this retrospective study (Okumura et al. 2016) of 109 patients found that visceral adiposity was not associated with worse patient survival after resection of ICC ($p=0.557$). However, the authors calculated the ratio of visceral fat tissue/subcutaneous fat tissue (VSR) to determine visceral adiposity, and used a cut-off of VSR resulting from their findings in the studied population. Whereas the method of abdominal fat measurement from a L3-targeted-CT-scan is well standardized (Yoshizumi et al. 1999), the cut-offs to define high visceral fat have never been established, whereas they are for low muscle mass (Prado et al. 2008). Thus, in our study, we chose to consider quantitative values of VFI rather than determining a cut-off based on our study population. Another bias to compare the cancer studies between each other is that VFA could be measured at the umbilicus level (Dai et al. 2007; Nault et al. 2015), or, as we did, at the L3-level (Chakedis et al. 2018).

Our results regarding VFI were in accordance with Imai et al. (Imai et al. 2018) who found that the increase in visceral fat volume increased the risk for recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment. Schlesinger et al. (Schlesinger et al. 2013) published a

study on a European prospective cohort about the risk factors for liver and biliary tract cancer, and found visceral fat as a factor of liver carcinogenesis. High visceral fat increased the risk of recurrence of HCC after curative treatment (Imai et al. 2018), and high visceral fat was an independent factor of post-operative complications in patients with HCC (Hamaguchi et al. 2019).

Obesity is a well-known risk factor for many cancers including ICC (Petrick et al.). It is now well established that muscle mass loss and increase of VFA are better prognosis factors than body mass index (Martin et al. 2013). Increased VFA is correlated with lower survival in many cancers such as hepatocellular carcinoma (Fujiwara et al. 2015), rectal cancer (Clark et al. 2013), melanoma (Grignol et al. 2015), esophagus (Okamura et al. 2018), endometrial (Mauland et al. 2017) and breast cancers (Iwase et al. 2016). The fact that we found a different prognostic value between the subcutaneous and visceral fat compartments could be explained by their different functions. Visceral fat is considered as an endocrine organ and releases adipokines, leptin and cytokines, e.g. tumor necrosis alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) (McGown et al. 2014). Visceral fat contains more cells and is more vascularized than subcutaneous fat, and also, have more inflammatory and immune cells (Ibrahim 2010). Adipose tissue is a reserve of adipose-derived stem cells (Freese et al. 2015). Ong et al (Ong et al. 2014) identified specific cell-surface markers of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat. High level of visceral fat leads to the increase in the pro-inflammatory cytokine and adipokine secretion. Moreover, adipose-derived stem cells secrete numerous growth factors or cytokines (insulin-like growth factor (IGF), hepatocyte growth factor (HGF), TGF β 1, VEGF, IL8, Bcl-2, and IL10) (Freese et al. 2015). These factors are linked to cancer progression (Freese et al. 2015). Adipose-derived stem cells interact with peritumoral adipocytes and cancer cells and increase aggressiveness of the tumor (Freese et al. 2015). Adipose-derived stem cells play a role in tumor microenvironment through the

increase of angiogenesis and peritumoral inflammation (Freese et al. 2015). Adipose tissue has also immune properties. In obese patients, there is evidence that NK cells are depleted and replaced by proinflammatory cells such as macrophages (Apostolopoulos et al. 2016). Finally, visceral fat, but not subcutaneous fat, drains into the portal vein transporting the proinflammatory cytokines into the liver and the general circulation (Florio et al. 2019). Further studies are needed to better understand the different roles of subcutaneous and visceral fat in carcinogenesis of liver and biliary tract cancer.

In our study, we did not find any impact on prognosis (OS and DFS) of SCFA or IMFA. Our results are in contrast with the study of Ebadi and al. (Ebadi et al. 2017) who found that the subcutaneous fat was an independent predictor of mortality in cancer patients. But the authors determined their own cut-off index based on their study findings. In accordance with our findings, Imai et al (Imai et al. 2018) did not find any effect of SCFI on HCC recurrence.

Unless the prevalence of low SMI was high (60%), the multivariable analysis did not show that preoperative low SMI was independently associated with OS or DFS. Low TMI had negative impact on postoperative outcome and survival in many cancers, such as pancreatic cancer (Joglekar et al. 2015; Okumura et al. 2015), colorectal liver metastases (Peng et al. 2011; van Vledder et al. 2012; Lodewick et al. 2015) and HCC (Harimoto et al. 2013b; Voron et al. 2015). Our results are in contrast with Okumura et al. (Okumura et al. 2016) who found decreased survival in patients with low SMI after resection of stage I-III ICC, and with Zhou et al. (Zhou et al. 2015). In the later, the authors studied younger patients with hepatolithiasis-associated ICC, and reported a strong correlation between low muscle mass and OS. In our study, the proportion of patients with low SMI was similar than in previous studies where the prevalence of low muscle mass was 50% to 63% (Zhou et al. 2015; Okumura et al. 2016). The high proportion of patients with low muscle mass in our study could be explained by the fact

that, as our center is a tertiary referral center, the most severe patients are referred to us, and often at a more advanced stage of the disease.

Among other factors than body composition, sepsis, involvement of adjacent organ, per operative transfusion, and >1 tumor were associated with worse OS. These results are in accordance with previous reports (Hyder et al. 2014; Mavros et al. 2014). Sepsis, >1 tumor, and perineural invasion were associated with worse DFS after curative liver resection for ICC. These factors are well known predictive factors for poor DFS (Wang et al. 2013; Mavros et al. 2014).

This study has several limitations. One limitation is that this is a retrospective single-center study. However, our center is a referral center for the treatment of cholangiocarcinoma, which is a rare tumor. This could explain the high overall five-year mortality rate and recurrence in our patients. Another limitation is the missing CT scan due to a lack of availability of images because they were performed in a private center or because images were not available in a digital format.

In conclusion, high visceral fat was associated with worse OS and DFS after curative liver resection for ICC, whereas muscle mass was not. Visceral fat should be considered as a prognostic marker of mortality and recurrence in ICC. Future prospective studies would also aim at determining, as for muscle mass, a standardized and validated cut-off, as well as the mechanisms underlying the impact of high VFA on ICC prognosis.

Statement of authorship

All authors have made substantial contributions: LL, KB and RT conceived, and designed the study, analyzed, interpreted the data, and drafted the article; LL, DB and LS collected the data; LL, CR analyzed the data; DVL drafted the article. All authors contributed to and approved the final version.

Conflict of interest statement

Authors declare no conflict of interest related to this article.

Funding:

No specific funding was received for this work.

Acknowledgements

None

Number of words

5769

Table 4 - Preoperative patient characteristics.

Variables	All (n=93)	Male (n=70)	Female (n=23)	P-value
Age >65 (years) [#]	56 (60)	42 (60)	14 (61)	0.94
BMI (kg/m ²) ^{#,*}	26.4 ± 4.6	27.3 ± 4.3	23.5± 4.5	<0.0001
ASA score [†]	92	69	23	0.06
1	16 (17)	8 (12)	8 (30)	
2	51 (55)	40 (58)	14(54)	
3	22 (24)	19 (27.5)	3 (11)	
4	3 (3)	2 (3)	1(4)	
Type 1 diabetes [†]	7 (7)	5 (7)	2 (8)	1.00
Type 2 diabetes [†]	10 (11)	10 (14)	0 (0)	0.06
Ischemic heart disease [†]	6 (6)	6 (9)	0 (0)	0.33
COPD [†]	8 (9)	6 (9)	2 (9)	1.00
CRI [†]	4 (4)	3 (4)	1 (4)	1.00
History of cancer [†]	19 (20)	16 (23)	3 (13)	0.38
Cirrhosis	20 (21)	19 (27)	1 (4)	0.02

Data are expressed as n (%) except # mean ± SD

ASA, American Society of Anesthesiology; BMI, body mass index; CI, confidence interval; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CRI, chronic renal insufficiency.

Missing data * n=3; † n=1

Table 5 - Operative and postoperative patient characteristics (N=93).

Variables	All (n=93)	Male (n=70)	Female (n=23)	P-value
Hepatectomy major	75 (81)	58 (80)	19 (83)	1.00
Peroperative transfusion	20 (21.5)	14 (20)	6 (26)	0.56
Tumor size (cm) ^{#, §}	6.5 ± 2.9	6.4 ± 3.0	6.8 ± 2.5	0.57
Number of tumors ^{#, *}	1.4 ± 0.9	1.4 ± 1.0	1.3 ± 0.7	0.73
Microvascular invasion [§]	36 (39)	30 (43)	6 (27)	0.19
Involvement adjacent organ	4 (4)	2 (3)	2 (9)	0.25
Tumor necrosis [‡]	34 (37)	28 (40)	6 (29)	0.34
Satellite nodules	25 (27)	21 (30)	4 (17)	0.24
Lymph node involvement	18 (19)	11 (16)	7 (30)	0.14
Perineural invasion [‡]	24 (26)	14 (21)	10 (43.5)	0.03
Type R0/R1/R2				0.51
0	75 (81%)	58 (83%)	17 (74%)	
1	17 (18%)	11 (16%)	6 (26%)	
2	1 (1%)	1 (1%)	0 (0%)	
Adjuvant chemotherapy	14 (15)	9 (13)	5 (22)	0.32

Data are expressed as number (%) except [#] mean ± SD

Missing data § n=1; ‡ n=2; * n=6

Table 6 - Postoperative course of the 93 patients

Variables	All (n=93)	Male (n=70)	Female (n=23)	P-value
Length of hospital stay (days) [#]	14.1 ± 9.4	14.9 ± 10.2	11.9 ± 5.9	0.37
Postoperative complications	50 (54)	37 (53)	13 (56.5)	0.76
Biliary complications	13 (14)	9 (13)	4 (17)	0.73
Liver failure	5 (5)	5 (7)	0 (0)	0.33
Sepsis	14 (15)	12 (17)	2 (9)	0.50
Pulmonary complications*	3 (3)	3 (4)	0 (0)	0.57
Postoperative haemorrhage*	3 (3)	1 (1)	2 (9)	0.15
Postoperative complications Clavien-Dindo ≥ 3	19 (20)	13 (19)	6 (26)	0.55

Data are expressed as number (%) except [#] mean ± SD

Missing data * n=1

Table 7 - Body composition data of the 93 included patients

Variables	All (n=93)	Male (n=70)	Female (n=23)	<i>P</i> -value
SMI (cm ² /m ²) *	47.1 ± 9.3	49.9 ± 8.5	38.2 ± 5.7	< 0.0001
Low SMI *	55 (60)	43 (62)	13 (54)	0.51
SCFI (cm ² /m ²) †	55.2 ± 28.9	55.4 ± 27.3	54.6 ± 34.2	0.68
VFI (cm ² /m ²) *	57.3 ± 28.9	67.7 ± 33.1	24.5 ± 16.8	< 0.0001
IMFI (cm ² /m ²) *	8.6 ± 5.0	8.9 ± 5.3	7.7 ± 3.7	0.32
Total fat index (cm ² /m ²) †	121.8 ± 56.6	133.1 ± 54.5	86.6 ± 49.2	0.0008

Data are expressed as number (%) except # mean ± SD

IMFI, intramuscular fat index; SCFI, subcutaneous fat index; SMI, skeletal muscle index;

VFI, visceral fat index

Missing data * n=2; † n=7

Table 8 - Univariate and multivariate analysis of preoperative, intraoperative and postoperative variables associated with overall survival

Variables	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	Hazard Ratio [95%CI]	P-value	Hazard Ratio [95% CI]	P-value
Gender	2.43 [1.10; 5.40]	0.029		
Age > 65 years	1.16 [0.70; 2.02]	0.6		
BMI	1.04[0.98; 1.10]	0.19		
Score ASA		0.47		
1	1			
2	1.18 [0.53; 2.61]			
3	1.80 [0.76; 4.26]			
4	1.72 [0.36; 8.19]			
Neoadjuvant treatment	1.10 [0.57; 2.15]	0.77		
Peroperative transfusion	1.91 [1.06; 3.45]	0.03		
Major hepatectomy	2.19 [0.98; 4.86]	0.05		
Arterial resection	1.00 [0.24; 4.10]	0.99		
Postoperative complications	2.10 [1.18; 3.74]	0.01		
Postoperative complications (Clavien-Dindo ≥ 3)	1.28 [0.68; 2.40]	0.44		
Postoperative sepsis	2.63 [1.39; 4.94]	0.003	3.04 [1.54; 5.99]	0.001
>1 tumor	2.70 [1.50; 4.83]	0.0009	3.15 [1.67; 5.93]	0.0004
Arterial invasion	1.43 [0.35; 5.93]	0.62		
Portal invasion	1.66 [0.74; 3.71]	0.21		
Adjacent organ involvement	2.19 [0.68; 4.86]	0.2	6.67[1.88; 23.69]	0.003
Lymph node involvement	1.64 [0.87; 3.08]	0.12		
Perineural invasion	1.33 [0.73; 2.41]	0.35		
Cirrhosis	1.59 [0.85; 2.95]	0.14		
Type R0/R1/R2		0.69		
0	1			
1	0.71 [0.32; 1.57]			
2	1.12 [0.15; 8.20]			
Adjuvant chemotherapy	1.70 [0.87; 3.34]	0.12		
SMI (cm ² /m ²)		0.04		
>38,5 cm ² /m ² (F) or >52.4 cm ² /m ² (M)	1			
$\leq 38,5$ cm ² /m ² (F) or ≤ 52.4 cm ² /m ² (M)	0.56 [0.32; 0.99]			
IMFI (50 cm ² /m ²)	6.56 [0.54; 79.54]	0.14		

VFI (50 cm ² /m ²)	1.97 [1.30; 2.99]	0.0013	2.48 [1.63; 3.77]	<0.0001
SCFI (50 cm ² /m ²)	1.02[0.66; 1.60]	0.9		
Total Fat index (50 cm ² /m ²)	1.60 [1.02; 2.52]	0.04		

BMI, body mass index; CI, confidence interval; IMFI: intramuscular fat index; SCFI: subcutaneous fat index; SMI, Skeletal muscle index; VFI, visceral fat index

* HR is expressed for a 50-point increase

Table 9 - Univariate and multivariate analysis of preoperative, intraoperative and postoperative variables associated with disease-free survival (n=99).

Variables	Univariate Analysis		Multivariate analysis	
	Hazard Ratio [95%CI]	P-value	Hazard Ratio [95%CI]	P-value
Gender	1.08 [0.59; 1.99]	0.80		
Age > 65 years	0.88 [0.52; 1.51]	0.65		
BMI	1.02 [0.96; 1.08]	0.57		
Score ASA		0.16		
1	1			0.02
2	0.49 [0.25; 0.94]		0.31 [0.14; 0.65]	
3	0.61 [0.29; 1.30]		0.55 [0.22; 1.41]	
4	0.29 [0.04; 2.19]		0.24 [0.03; 2.02]	
Neoadjuvant treatment	1.08 [0.54; 2.16]	0.83		
Peroperative transfusion	1.32 [0.69; 2.51]	0.40		
Major hepatectomy	1.82 [0.89; 3.75]	0.10		
Arterial resection	5.37 [1.60; 18.02]	0.006		
Postoperative complications	2.30 [1.31; 4.04]	0.0036		
Postoperative complications (Clavien-Dindo $\geq$ 3)	1.54 [0.84; 2.84]	0.17		
Postoperative sepsis	3.08 [1.60; 5.90]	0.0007	5.16 [2.24; 11.89]	0.0001
> 1 tumor	2.81 [1.55; 5.08]	0.0006	3.01 [1.49; 6.10]	0.002
Arterial invasion	5.42 [1.61; 18.23]	0.006		
Portal invasion	2.25 [1.01; 5.03]	0.047		
Lymph node involvement	3.64 [1.99; 6.64]	<0.0001		
Perineural invasion	2.71 [1.53; 4.79]	0.0006	3.30 [1.62; 6.76]	0.001
Cirrhosis	0.90 [0.45; 1.80]	0.77		
Type R0/R1/R2		0.46		
0	1			
1	1.22 [0.63; 2.37]			
2	3.25 [0.44; 24.15]			
Adjuvant chemotherapy	3.06 [1.62; 5.77]	0.0005		
SMI (cm ² /m ²)		0.9		
$\leq 38,5$ cm ² /m ² (F) or ≤ 52.4 cm ² /m ² (M)	1.04 [0.59; 1.83]			
>38,5 cm ² /m ² (F) or >52.4 cm ² /m ² (M)	1			
IMFI (50 cm ² /m ²)	4.09 [0.29; 57.74]	0.30		

VFI (50 cm ² /m ²)	2.10 [1.31; 3.38]	0.03	2.25 [1.45; 3.51]	0.002
SCFI (50 cm ² /m ²)	0.95 [0.6; 1.51]	0.83		
Total fat index (50 cm ² /m ²)	1.35 [0.83; 2.18]	0.23		

BMI, body mass index; CI, confidence interval; IMFI, intra muscle fat index; SCFI, subcutaneous fat index TMI, total muscle index VFI, visceral fat index

Figure legends

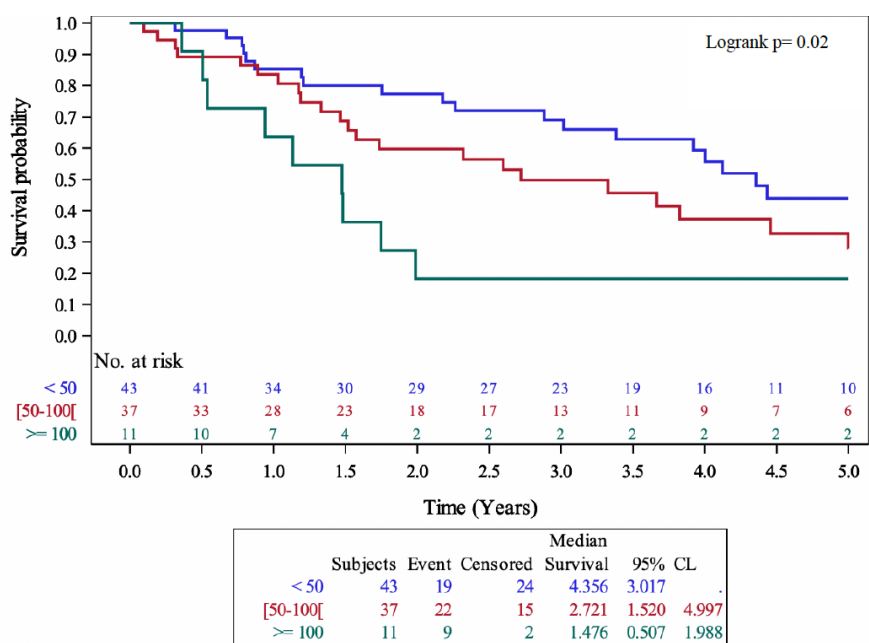


Figure 7 - Overall survival according to visceral fat index between the 3 groups: VFI < 50 cm/m² (blue line), [50-100 cm/m²] (green line), and ≥ 100 cm/m² (red line) after liver resection with curative intent in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. Log rank test, $p=0.03$.

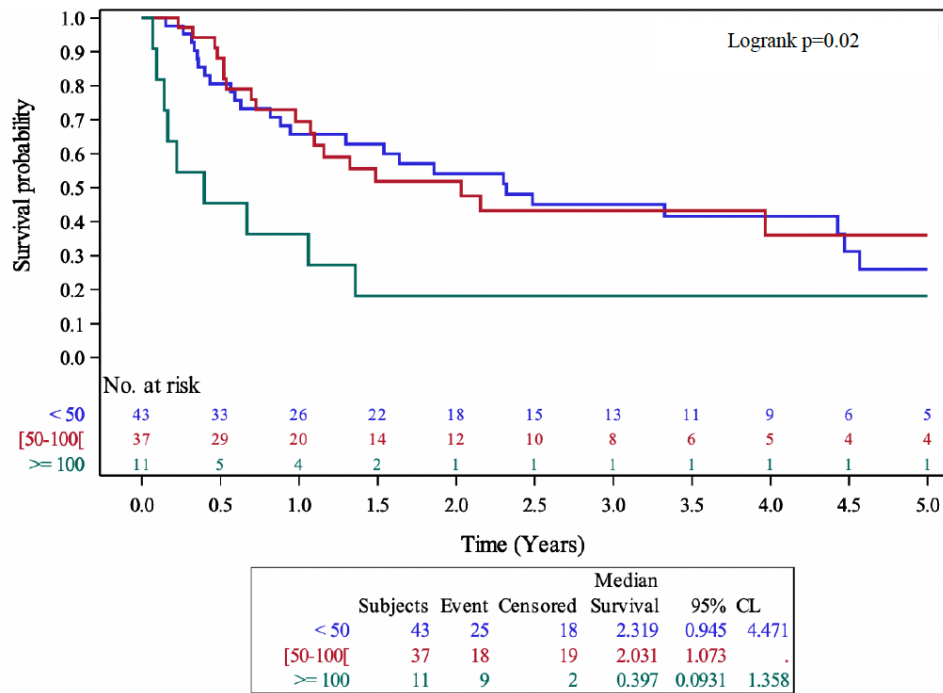


Figure 8 - Disease-free survival according to visceral fat index between the 3 groups: VFI < 50 cm/m² (blue line), [50-100 cm/m²] (green line), and ≥ 100 cm/m² (red line) after liver resection with curative intent in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. Log rank test, $p=0.02$.

Cette première partie du travail de thèse a permis de mettre en lumière le rôle crucial de la composition corporelle sur le pronostic du CIH. Il a pu mettre en évidence le rôle, non pas de la masse musculaire abaissée comme dans d'autres études (Zhou et al. 2015; Okumura et al. 2016), mais de l'augmentation de la graisse viscérale sur la survie des patients. Il est très probable qu'il existe chez le patient atteint de CIH un dialogue entre le muscle, le tissu adipeux et la tumeur (Baracos et al. 2018). Cependant celui-ci est actuellement incomplètement connu. La composition corporelle pourrait également influencer la réponse au traitement médical des cancers. Notre travail suggère que l'évaluation de la composition corporelle devrait être intégrée systématiquement à l'évaluation préthérapeutique (chirurgie ou chimiothérapie) globale de tout patient atteint de cancer, et notamment de cancer du foie.

Les modèles animaux de sarcopénie ou de dénutrition sont nombreux parmi les rongeurs. A notre connaissance, il n'existe pas de modèle de dénutrition par restriction protéino-énergétique proche du marasme observé chez l'Homme chez le gros mammifère, donc chez le miniporc. La deuxième partie du travail de recherche a donc consisté en la mise au point d'un modèle de dénutrition marasmique chez le miniporc Yucatan à l'aide d'une alimentation hypocalorique et hypoprotéique en le caractérisant sur les plans de la composition corporelle et du phénotype musculaire. Au cours du travail de recherche, nous avons également voulu tester un autre type d'alimentation restrictive : hypocalorique/normoprotéique. Les résultats ne sont pas présentés dans l'article 2 en raison du faible effectif de ce groupe en lien avec l'euthanasie précoce d'un animal mâle présentant une dénutrition très sévère non compatible éthiquement avec une poursuite de l'expérimentation. La troisième partie de ce travail de thèse a consisté en la mise au point d'un modèle d'obésité sarcopénique chez le miniporc Yucatan obèse. Les résultats ne sont pas présentés dans ce travail de thèse car ils sont en cours d'analyse mais feront également l'objet d'une publication.

X. Article 2 (Sarcopig1): The Yucatan minipig model: A new preclinical model of malnutrition induced by a low-calorie/low-protein diet

The Yucatan minipig model: A new preclinical model of malnutrition induced by a low-calorie/low-protein diet

Laurence Lacaze^{1,2}, Sarah Rochdi², Annaëlle Couvert³, Steve Touboul², Sylvie Guérin², Gwénaëlle Randuineau², Véronique Romé², Charles-Henri Malbert⁴, Frédéric Derbré^{3,*}, David Val-Laillet^{2,*}, Ronan Thibault^{1,2,*}

** These authors contributed equally as last author*

¹ Unité de Nutrition, service Endocrinologie-Diabétologie-Nutrition, CHU Rennes, Rennes, France

² INRAE, INSERM, Univ Rennes, Nutrition Metabolisms and Cancer, NuMeCan, Rennes, France

³ Laboratoire M2S, Univ Rennes 2, ENS, Rennes

⁴ INRAE, PRISM Ani-Scans, St Gilles, Rennes, France

Keywords: malnutrition, marasmus, swine, body composition, muscle phenotype

Co-corresponding authors:

Frédéric DERBRÉ

Laboratory “Movement, Sport and Health Sciences” EA 7470

University of Rennes, ENS Rennes, Bruz

35170 France

Email: frederic.derbre@univ-rennes2.fr

Prof. Ronan THIBAUT

Centre labellisé de nutrition parentérale au domicile

CHU Rennes

2, rue Henri Le Guilloux

35000 Rennes

France

Tél. +33 2 99 28 96 46

Fax +33 2 99 28 24 34

E-mail ronan.thibault@chu-rennes.fr

ABSTRACT

Introduction. Severe malnutrition promotes sarcopenia exposing patients to adverse outcomes and a higher mortality risk. The Yucatan minipig, closest to human physiology than the rodent model, could be a pertinent and innovative experimental model for studying the physiopathology and consequences of severe malnutrition.

Aim: To determine if a low calorie/low protein diet (LC/LP) can reproduce marasmus malnutrition in Yucatan minipigs.

Methods. 11 Yucatan minipigs were subjected to two different diets for 8 weeks: a standard control diet (ST) (10.33 MJ/kg and 15% protein, n=5) and a low-calorie / low-protein diet (LC/LP) (5.18 MJ/kg and 8.6% protein, n=6). Body composition was measured by CT-scan before (T0) and after 8 weeks of diet (T8). *Trapezius* and *biceps femoris* muscles were harvested at the end of protocol to perform histological and molecular analyses. Short-chain Fatty Acids (SFA) and gut microbiota diversity were analyzed at T0 and T8.

Results. 8 weeks of LC/LP diet significantly reduces body weight compared to baseline (-12.3%, $P=0.03$). After 8 weeks, LC/LP animals exhibit a significant reduction of retroperitoneal fat and skeletal muscle surface areas ($P=0.03$ and $P=0.047$, respectively), whereas these parameters remain unchanged in ST animals. These reductions are associated to lower fiber CSA in *trapezius* and *biceps femoris* of LC/LP animals compared to ST ($P<0.001$ and $P=0.003$, respectively). LC/LP diet promotes an increase of AMPK phosphorylation in *trapezius* and *biceps femoris* ($P=0.05$), but does not affect cytochrome c and COX IV protein content, markers of mitochondrial content. SFA remained unchanged after 8 weeks of LC/LP diet but Chao 1 index showed a decreased alpha diversity.

Gene and proteins involved in ubiquitin-proteasome system (i.e. ubiquitinated proteins, MAFbx, MuRF1) and apoptosis (i.e. Bcl2, Bax) remain unchanged after 8 weeks of LC/LP diet both in *trapezius* and *biceps femoris*. Akt phosphorylation increases in LC/LP group compared to ST group in *trapezius* ($P=0.05$) and *biceps femoris* ($P=0.009$), whereas 4EPB1 and P70S6K protein content remain unaffected.

Conclusions. All these findings support that this experimental minipig model of severe malnutrition is valid to mimic changes in body weight, body composition and muscle mass occurring in human protein-energy marasmus malnutrition.

A. Introduction

The medical costs due to diseases associated with malnutrition are evaluated at more than 31 billion dollars in Europe and 9.5 billion dollars in the United States of America (Inotai et al. 2012; Snider et al. 2014). Among the different forms of malnutrition, the protein-energy malnutrition is observed in several clinical situations including anorexia nervosa, cancers, cirrhosis, inflammatory bowel disease, chronic renal failure, but also in some forms of obesity (Barazzoni and Gortan Cappellari 2020; Risi et al. 2021). Malnourished patients frequently exhibit sarcopenia, defined as a loss of muscle mass and strength and physical performance, exposing them to adverse outcomes and a higher mortality risk (Cederholm et al. 2017b; Sieber 2019).

The cellular mechanisms involved in the loss of muscle mass have been extensively explored in sarcopenia related to aging, cancer or immobilization (Brioché and Lemoine-Morel 2016; Pierre et al. 2016a; Miyamoto et al. 2016). The loss of muscle mass results from an imbalance of myofibrillar protein turnover, both due to an exacerbation of proteolysis and/or a reduction of protein synthesis in muscle fibers. On one hand, proteolysis can be exacerbated due to an activation of calpains, cathepsins, caspases, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems, which act synergistically to stimulate protein breakdown (Bechet et al. 2005; Pierre et al. 2016b). On the other hand, an alteration in the activity of the PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathway is identified as playing a key role in the reduction of protein fractional synthesis rate (FSR) in atrophied skeletal muscle (Guillet et al. 2004; Paddon-Jones et al. 2006; White et al. 2011). Muscle apoptosis is also likely to play an important role in the reduction of protein synthesis in atrophied skeletal muscles, even if a debate still exists about the muscle cell population where it occurs (*i.e.* myofibers, satellite cell, endothelial cells) (Allen et al. 1996; Gundersen and Bruusgaard 2008; Wang et al. 2014). In undernourished patients, these cellular mechanisms could be activated both by a protein-energy deficit (*e.g.* anorexia nervosa) or/and to the hypermetabolism related to diseases (*e.g.* liver cirrhosis, cancer, inflammatory bowel disease, critical illness). Interestingly, gut microbiota dysbiosis is reported in anorexia nervosa patients with marasmus malnutrition (Hanachi et al. 2019a), but also in mice and patients exposed to low protein diet (Smith et al. 2013a; Masuoka et al. 2020). Such dysbiosis has been recently proposed as playing a potential role in sarcopenia development (Zhao et al. 2021a).

During the last decade, several experimental models have been developed, essentially in rodents, to better understand the cellular mechanisms involved in sarcopenia related to

undernutrition. Some of these rodent models reproduce the hypermetabolism related to chronic diseases (Campos et al. 2018; Dong et al. 2021), others induce a drastic protein-energy restriction to mimic marasmus or kwashiorkor syndrome (van den Hoek et al. 2019; Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B.U. Nisa, et al. 2021). Though, the rodent models present several limitations related to their phylogenetic distance and significant differences compared to humans in terms of eating behavior, circadian rhythm and general anatomy. These discrepancies can make the transposition and analogy to humans difficult when studying the physiopathological mechanisms of malnutrition. The minipig has recently emerged as an alternative and innovative experimental model to explore physiological mechanisms related to malnutrition, including amino acids metabolism or eating behavior (Polakof et al. 2018b; Val-Laillet 2019). Except for the non-human primates, the pig presents the advantage to be the experimental model the closest from human physiology among all the animal models used in nutrition research (Miller and Ullrey 1987b). Finally, minipigs are smaller than the standard pigs and offer the possibility to explore at the adult age the body composition with the same devices as in humans, such as the computed tomography (CT scan) (Val-Laillet et al. 2010).

A dysbiosis of the gut microbiota has been demonstrated with malnutrition especially in anorexia nervosa patients with marasmus malnutrition (Hanachi et al. 2019b). In a study performed in mice, a dysbiosis was observed in mice fed with low protein diet (Masuoka et al. 2020). Another study showed the key role of microbiota in malnutrition type Kwashiorkor and suggested the gut microbiota should be the causal factor of Kwashiorkor syndrome (Smith et al. 2013). Sarcopenia is also known to be associated with altered gut microbiota (Zhao et al. 2021).

Therefore, the purpose of the present study was to develop with the minipig an innovative diet-induced preclinical animal model of malnutrition. To validate this experimental model, and to mimic the human marasmus malnutrition, we determined in Yucatan minipigs the effects of a low calorie/low protein (LC/LP) diet on body composition, gut microbiota, blood clinical markers of malnutrition and skeletal muscle phenotype. We hypothesized that LC/LP diet can mimic a protein-energy undernutrition close to human marasmus, as especially observed in anorexia nervosa.

B. Materials and methods

Animal experiments were approved by The Regional Ethics Committee in Animal Experiment of Brittany (APAFIS # 16413-2018080711214660 v2) and validated by the French Ministry of

Research in accordance with the current ethical standards of the European Community ([Directive 2010/63/EU](#) as amended by Regulation (EU) 2019/1010). All experiments were performed at the INRAE UE3P experimental facilities for pig physiology and phenotyping, under Agreement No. C35-275-32 and individual Authorization No. 35-88 (DVL).

Animals and diet. Eleven 30-month-old Yucatan minipigs were randomly distributed into two experimental groups: a standard diet group (ST, n=5) and a low calorie/low protein diet (LC/LP, n=6). Two types of isocaloric diets were used for the experiments: a standard diet (10.33 MJ/Kg, 15% protein) and a low-protein diet (10.37 MJ/kg, 8.6% protein). The composition of the 2 types of feed is detailed in Table 10. ST ration was calculated on the basis of the metabolic weight ($MW=LW^{0.75}$, where LW is the live weight in kg) of the animals, energy requirements and the energy composition of the feed. The normal energetic ration for a normal-weight adult Yucatan minipig is 0.3017 MJ/kg of MW. LC/LP diet consisted in half of this daily ration, that is to say 0.1508 MJ/kg. The feed ration for each animal was calculated and corrected on individual weight every 2 weeks. All animals were housed in individual pens (120 cm x 85 cm) with standard conditions for temperature (22-23°C), light/dark cycle (12h/12h) and a free access to tap water. The animals were weighed at the beginning, and then every two weeks until the end of the experiment. After 8 weeks of diet, minipigs were sacrificed with electronarcosis followed by immediate exsanguination. Skeletal muscles (*i.e.* *Biceps Femoris*, *Trapezius*) were harvested immediately after euthanasia, weighed and frozen in liquid nitrogen or fixed in 4% paraformaldehyde (PFA). Blood was centrifuged (1500g for 10 min) for plasma collection. Stool samples were collected at T0 and at the end of the protocol.

Computed tomography-scan (CT scan) body composition measurement. CT-scan were performed under general anesthesia at the beginning of the experiment (T0) and after 8 weeks of diet (T8) as previously described (Val-Laillet et al. 2010, p.). Briefly, cross-sectional scans were acquired at the thoracic vertebra T13 to determine adipose tissue and muscle (*i.e.* *Longissimus dorsi*, *Psoas major* and *large muscle*) cross-sectional area (CSA). As described by Val-Laillet et al 2010, intra-abdominal fat can be distinguished into two compartments: visceral fat and retroperitoneal fat. Visceral fat is known for its metabolic properties. In our study, retroperitoneal fat was only considered because of major feces artefacts and the thinness of some pig which represents a bias. CSA were measured using ImageJ software

(National Institutes of Health, Rockville, MD, USA). As in humans, a muscle density range for CT-scan was considered between -29 and +150 Hounsfield units (HU) and a fat density range was considered between -190 and -30 HU.

Plasma analyses. C-Reactive Protein (CRP) levels were determined using ELISA kit purchased from Immunology Consultant Laboratory (Portland, USA). Alanine aminotransferase (ALAT), aspartate aminotransferase (ASAT), urea, creatinine, glucose, and albumin were measured using a Konelab automated system and specific detections kits for each parameter purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France).

Gut microbiota. Microbial DNA from the feces of the minipigs was extracted using the ZR Fecal DNA MiniPrep™ Kit (ZymoResearch) following the manufacturer's recommendations. We then measured the concentration of DNA extracted by reading the optical density of samples at 260 nm using a nanospectrophotometer (Denovix). The 16S ribosomal DNA was then amplified by PCR using the V3 and V4 primers specific for the gene encoding bacterial 16S rRNA. The integrity of this amplification was verified by electrophoresis. The samples were then sent to the Genotoul platform in Toulouse for sequencing. Bacterial sequences were analyzed using Frogs software available on the Galaxy server. The indexes used were Chao1 (to analyze the richness of the microbiota according to the number of Operational Taxonomic Units (OTU)) and the Shannon index (to assess the homogeneity of the microbiota by taking into account the richness and diversity)

Measurement of Short Chain Fatty Acids (SCFA):

The SCFA assay was carried out from part of the feces samples using the gas chromatographic separation technique described by Jouany et al. 1981. The different SCFA that were assessed are: acetic acid (C2), propionic acid (C3), isobutyric acid (IC4), isovaleric acid (IC5), valeric acid (C5), isocaproic acid (IC6) and caproic acid (C6).

Histological analyses. *Biceps femoris* and *trapezius* muscle samples were fixed in formalin, embedded in paraffin and then sectioned into serial 10-μm-thick sections using a LEICA microtome. These sections were then stained with hematoxylin-eosin. Image acquisitions were performed at x10 magnification using a microscope (Nikon Eclipse 80i) and analyzed using ImageJ software (Schneider et al. 2012a). Six muscle fields per animal were analyzed, and all muscle fibers in each group were pooled for statistical analysis (600-900 fibers/group).

RNA extraction and RT-qPCR. Total RNA from *trapezius* and *biceps femoris* were extracted using Qiagen RNeasy Plus Universal Mini Kit according to the manufacturer's protocol. RNA amounts were determined by Denovix spectrophotometer, and RNA quality was controlled using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Reverse transcription reaction (RT) was carried out on 1 µg of total RNA (IScript reverse transcription, 170-8840). Then, real-time PCR experiments were performed on RT products in a final volume of 12.5 µl containing: 2.5 µl of cDNA (diluted at 1/40), 0.75 µl of primers (5 µM) and 6.25 µl of SYBR® Green Supermix (1725271, Biorad) and 3 µl of ultrapure water. Experiments were monitored in CFX Real-Time machine (Biorad). The expression of target genes was normalized to reference genes and the relative expression was calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. Primer sequences are listed in Table 11. The reference genes were TATABox Binding Protein1 (*Tbp1*), ribosomal protein L4 (*Rpl4*) and hypoxanthine phosphoribosyltransferase1 (*Hprt1*).

Cytosolic protein extraction. Skeletal muscles were grounded in liquid nitrogen and the obtained powder was used to perform extraction. Cytosolic protein extraction was performed from *trapezius* and *biceps femoris* in cold lysis buffer containing 10.0 mM Tris·HCl, pH 7.4, 0.5 M sucrose, 50.0 mM NaCl, 5.0 mM EDTA, 30.0 mM Na₄P₂O₇, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 50.0 mM NaF, 100.0M sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail (5l/ml, P8340; Sigma, St. Louis, MO). The samples were homogenized using a Polytron homogenizer at 4°C. Each sample was then incubated on ice for 30 min followed by 10 s of sonication. The homogenates were then transferred to microcentrifugation tubes and centrifuged at 12,000g for 12 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined by a Lowry assay using bovine serum albumin as a standard.

Western blotting. Samples were diluted in SDS-PAGE sample buffer (50 mM Tris·HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5%-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue) and heated 5 min at 95°C until analyses. Samples containing 50 µg of proteins were resolved on 10% or 12.5% SDS-PAGE. The proteins were transferred at 240 mA for 90 min onto a 0.2-µm nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 5% BSA or non-fat dry milk in Tris-buffered saline/0.05% Tween-20 (TBST) for 1h at room temperature. Membranes were incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibodies (Table 12). Thereafter, membranes were washed with TBST and incubated for 1h at room temperature with infrared dye-conjugated secondary antibodies (LI-COR, Lincoln, NE). After being washed, blots were captured using the Odyssey Imaging System (LI-COR). All blots were scanned, and

densitometry analysis of the bands was conducted using GS-800 imaging densitometer and Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Inc.). All blots were corrected for loading based on the HSC70 expression.

Statistical analyses. All data are presented as the mean $\pm$ standard deviation (SD). Mann-Whitney test was performed to explore the effects of low-calorie/low-protein diet compared to standard diet on histological and biological parameters. A Wilcoxon signed-rank test was performed to explore the same effects on body weight and data obtained with CT-scan. For all statistical analyses, the significance level was set at 0.05. Data were analyzed using the statistical package GraphPad Prism version 8.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California).

C. Results

Effects of LC/LP diet on body weight and body composition. Body weight and body composition variations before and after 8 weeks of standard or LC/LP diet are shown in Figure 9. While the ST diet had no effect on body weight, we report a significant weight loss after 8 weeks of LC/LP diet (-12.3%, $p=0.03$, Fig. 9A). We observed a significant decrease in muscle CSA determined by CT-scan after 8 weeks of LC/LP diet (-4.8%, $P=0.03$, Fig. 9E), whereas this parameter remained unchanged in the ST group (Fig. 2B). Similarly, a significant reduction in retroperitoneal fat area occurred after 8 weeks of LC/LP diet (-48%, $P=0.03$, Fig. 9F), while this parameter remained unaffected in the ST group (Fig. 9C).

Effects of LC/LP diet on muscle fiber size. Muscle fiber cross-sectional area (CSA) histological analyses were performed both in *biceps femoris* and *trapezius* muscles. These results are shown in Figure 10. We observed that muscle fiber CSA was significantly lower in the LC/LP group compared to the ST group both in *trapezius* ($P<0.001$, Fig. 10A-C) and in *biceps femoris* muscles ($P<0.001$, Fig. 10D-F).

Effects of LC/LP diet on plasma biochemical parameters. The data of plasma biochemical analysis is presented in Table 13. Urea plasma level significantly decreased in the LC/LP compared to the ST group (- 30.5%, $p=0.008$), while the plasma creatinine level significantly increased (+14.5 %, $p=0.017$). Plasma albumin and glucose levels did not differ between LC/LP and ST groups. ASAT levels were significantly lower in the LC/LP group compared to the ST group (-48.3%, $P=0.016$), whereas LC/LP diet decreased plasma ALAT levels (-

29.4%, $P=0.05$). Plasma CRP levels remained unchanged in LC/LP compared to ST groups after 8 weeks of diet.

Effects of LC/LP diet on signaling pathways involved in energy metabolism and muscle atrophy. LC/LP diet significantly increased the phosphorylation of AMPK both in *trapezius* and *biceps femoris* ($p=0.051$, Figure 11B and D). COXIV and cytochrome c protein levels remained unchanged after 8 weeks of LC/LP diet both in *trapezius* and *biceps femoris* (Figure 11B and D). After 8 weeks diet, protein ubiquitination, as well as MuRF1 and MAFbx mRNA and protein levels, did not differ between ST and LC/LP groups (Figure 11B and D, Figure 12). Whereas phosphorylation of 4EBP1 and P70S6K protein remained unaffected after 8 weeks of LC/LP diet, we observed a significant increase of Akt phosphorylation levels both in *trapezius* and *biceps femoris* ($P=0.05$ and $P=0.0087$, respectively, Figure 11B and D). Protein expression of *Bax* and *Bcl-2* apoptotic factors did not differ between ST and LC/LP groups whatever the skeletal muscle explored (Figure 11B and D). mRNA levels of myostatin tended to decrease in *trapezius* muscle (Figure 12A), whereas no significant changes were reported in *biceps femoris* (Figure 12B).

Effects of LC/LP diet on gut microbiota. The Chao 1 alpha diversity index was not significantly different between ST group and LC/LP group. At T8, a significant decrease in the Chao 1 index was observed in the LC/LP group. Statistically, no significant difference was observed between the two groups regarding the Shannon index.

D. Discussion

The objective of the present study was to develop an experimental and innovative preclinical preclinical model of protein-energy malnutrition, i.e. marasmus, in the Yucatan minipig, and to characterize the skeletal muscle phenotype and the cellular mechanisms involved. We observed that the LC/LP diet decreased body weight, abdominal fat mass and muscle mass determined by CT-scan, as well as hypercreatinemia and hyporurea, supporting the validity of our model to mimic the clinical picture of malnourished patients. The concomitant reduction of muscle fiber CSA reported in both *biceps femoris* and *trapezius*, combined with CT-scan data also support that our malnutrition model causes sarcopenia. To comfort this hypothesis, we also aimed to measure muscle strength using the twitch technique (Childers et al. 2011). Unfortunately, the results could not be correctly analyzed due to artifacts responsible for important measure variability.

The recent GLIM (Global Leadership Initiative on Malnutrition) consensus report defined that a severe malnutrition occurs when a patient exhibit a body weight loss higher than 10% in the last 6 months (Cederholm et al. 2019). In the present study, we observed a weight loss higher than 10% in minipigs after 8 weeks of LC/LP diet, which supports a severe malnutrition state. The longitudinal exploration of body composition by CT-scan also showed reductions both in abdominal fat mass and in muscle CSA in LC/LP animals, which confirms this state of severe malnutrition. In parallel, we measured the evolution of muscle fiber CSA in *biceps femoris* and *trapezius*, two skeletal muscles with distinct contractile phenotypes. The *trapezius* possesses indeed a majority of slow twitch fibers, whereas *biceps femoris* expresses a majority of fast twitch fibers (Petersen et al. 1998). Here, we report that LC/LP animals exhibited smaller muscle fiber CSA in both *biceps femoris* and *trapezius*, which is in agreement with our CT-scan data. These results confirm that our malnutrition model leads to muscle alterations compatible with sarcopenia. Our objective was to measure muscle strength using the twitch technique (Childers et al. 2011). Unfortunately, the results are not presented here due to artifacts responsible for important differences that did not allow interpretation of the results.

We measured in plasma samples from minipigs the standard blood biomarkers commonly used for diagnosing malnutrition during hospital stays. We first observed that LC/LP animals displayed low plasma urea levels. Protein restriction is well known to affect urea-cycle enzymes, and our results are in accordance with low levels of plasma urea reported in children suffering from kwashiorkor (Srikantia et al. 1964; Taiwo and Thomas 1992), but also with kinetics of plasma urea levels determined in rodent or pig models of low-protein diet (Madeira et al. 2016; Masuoka et al. 2020). Loss of muscle mass is generally associated to decrease in plasma creatinine levels in undernourished children and patients (Hari et al. 2007), bedridden patients (Bilancio et al. 2014) or sarcopenic older adults (Kameda et al. 2021). Contrary to these data, we observed an increase of plasma creatinine levels in samples from animals exposed to 8 weeks of LC/LP diet. Such an increase could be explained by a renal dysfunction concomitant to muscle mass loss. Indeed, renal dysfunction is generally reported in different forms of protein-energy malnutrition (Paniagua et al. 1980; Riva et al. 2021). We also observed that plasma albumin levels remained unchanged in LC/LP minipigs, similarly to previous studies in malnourished animals with a low-protein diet (Hubert et al. 2000; Wada et al. 2018; Masuoka et al. 2020). All these data associated with the lack of

change in plasma CRP levels support that our experimental model is a severe malnutrition model close to marasmus, with no systemic inflammation.

Few scientific data are currently available concerning the cellular mechanisms involved in sarcopenia related to protein-energy malnutrition. Deficit in cellular energy is associated with an activation of the energy sensor AMP kinase (AMPK). In the present study, we first observed an activation of AMPK both in *biceps femoris* and *trapezius*. These results demonstrate that skeletal muscle is sensitive to the protein-energy deficit induced by our experimental model, which is coherent with a recent study reporting also an activation of this energy sensor in malnourished rats (Hirabayashi, Nakanishi, Tanaka, B.U. Nisa, et al. 2021). In physiological situations like physical exercise, the transient energy deficit and concomitant activation of AMPK promotes muscle adaptations to stimulate mitochondrial activity and oxidative metabolism (Jäger et al. 2007). Under protein-energy malnutrition and chronic energy deficit in skeletal muscle, we observed that both cytochrome c and COX IV protein content, markers of mitochondrial density, remain unchanged in *biceps femoris* and *trapezius*. The fact that the energy deficit is chronic, and not followed by substantial nutrient intake conversely to exercise, probably contributes to explain this inability of skeletal muscles to promote mitochondrial biogenesis under severe malnutrition. These results are finally in accordance with the fact that marasmic patients (e.g. anorexia nervosa) exhibit clear reductions of resting energy expenditure to adapt themselves to chronic underfeeding and physical hyperactivity (de Zwaan et al. 2002; Marra et al. 2005).

The muscle atrophy we observed in minipigs after 8 weeks of LC/CP diet can be explained both by reduced protein synthesis and/or increased proteolysis. Protein synthesis is mainly regulated by the Akt/mTORC1 signaling pathway that promotes translation initiation and ribosomal protein synthesis respectively through the activation of 4EBP1 and p70S6K (Yoon 2017b). In the present study, we did not report any changes in activation of 4EBP1 and p70S6K both in *biceps femoris* and *trapezius*. However, protein FSR is known to be reduced in skeletal muscle of malnourished animals (Wykes et al. 1996b; Salles et al. 2017). The fact that we explored 4EBP1 and p70S6K activation in basal state, and not challenged by insulin, could in part explain the lack of changes we report in the present study. We cannot also exclude that exploring these signaling pathways after 8 weeks of energy-protein restriction could be too late to observe significant changes in skeletal muscles. Akt activation is known to stimulate mTORC1 to activate protein synthesis in response to insulin (Yoon 2017b). Here, we observed an activation of Akt in *biceps femoris* and *trapezius* in malnourished minipigs. The trends for downregulation of muscle mRNA myostatin levels we report in muscle of

malnourished minipigs may play a role in Akt activation since this transforming growth factor is recognized to negatively regulate the activity of Akt (Rodriguez et al. 2014). Even if previous studies observed a similar activation of Akt in energy-restricted rodents (Gavete et al. 2005; van den Hoek et al. 2019), this result should have impacted mTORC1 signaling pathways, and especially 4EBP1 and p70S6K. The activation of Akt in skeletal muscle from undernourished minipigs suggest that muscle insulin sensitivity may be improved to allow a better muscle glucose uptake *via* the action of Akt on GLUT4 translocation (Gavete et al. 2005). The lack of impact of Akt on protein synthesis could be explained by the concomitant activation of AMPK, recognized as an inhibitor of muscle protein synthesis through the down-regulation of mTOR signaling, and this downstream of the action of Akt (Bolster et al. 2002). Several mechanisms also contribute to proteolysis in atrophied skeletal muscle, including the activation of calpains, caspases, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems (Pierre et al. 2016a). In the present study, we did not observe changes of ubiquitinated proteins and the ubiquitinase ligase MuRF1 in undernourished minipigs. Similarly to protein synthesis markers, we cannot exclude that proteolysis is mainly activated during the first day and weeks of energy-protein restriction, and that exploring these signaling pathways is too late after 8 weeks to observe this phenomenon.

In summary, our results support that our experimental minipig model of severe malnutrition is valid to mimic changes in body weight, body composition and muscle mass occurring in human protein-energy malnutrition. The standard blood biomarkers we measured suggest that our model is close to marasmus and severe malnutrition observed in anorexia nervosa. This study opens new perspectives to improve the understanding of sarcopenia occurring in severe malnutrition, and improve the management of malnourished patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

Laurence Lacaze received in the context of this project two research grants from the Société Francophone de Nutrition Clinique et Métabolisme (SFNCM) and the Association de Chirurgie Hépato-Bilio-Pancréatique et Transplantation Hépatique (ACHBT). Part of the project was also funded by INRAE. We thank all the staff from the Rennes pig experimental facilities (UE3P), and especially Julien George, Josselin Delamarre, Francis Le Gouevéc, Alain Chauvin and Serge Dubois, for taking care of the animals and helping during the experimental period. We also thank all the staff from the NuMeCan research department who

was involved in the biological sampling and treatment, and especially Armelle Cahu, Laurence Le Normand, Isabelle Nogret and Régis Janvier.

Table 10 - Composition and nutritional values of the two isocaloric feeds used in the experiments to feed the minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks

	Standard feed	Low-protein feed
Soft Wheat (%)	10	30,77
Barley (%)	33	10
Soft wheat bran (%)	25	25
Soybean hulls (%)	12	12
Dry beet pulp (%)	/	5
Soybean meal 48 (%)	6	/
Unshelled sunflower meal (%)	10	/
Molasses (%)	1	1
Corn starch	/	8,14
Sugar	/	/
Cellulose	/	5
Sodium chlorure	0.6	0.6
Calcium carbonate	1.3	1.1
Dicalcium phosphate	0.6	0.89
Mineral vitaminic complement	0.5	0.5
Total	100	100
EM (MJ/kg)	10.33	10.37
EM (kcal/kg)	2470	2479
MAD/EN	15	8,63

EM: Metabolisable energy, MAD: Digestible Nitrogenous Matter, EN: Net energy

Table 11 - Sequences of primers (5'–3') used for RT-qPCR

Gene	Forward	Reverse
<i>MAFbx</i>	TCACAGCTCACATCCCTGAG	GACTTGCCGACTCTCTGGAC
<i>Mstn</i>	TCACGCTACGACGGAAACG	AAGCAGCATTTGGGTTTTTCCT
<i>Murf1</i>	TGCGGTTACTCAGCTCAGTC	AGCACGAAGACGAGAAAATC
<i>Rpl 4</i>	AGGAGGCTGTTCTGCTTCTG	TCCAGGGATGTTTCTGAAGG
<i>Hprt1</i>	TACCTAATCATTATGCCGAGGATT	AGCCGTTCAAGTCCTGTCCAT
<i>Tbp1</i>	AACAGTTCAGTAGTTATGAGCCAGA	AGATGTTCTCAAACGCTTCG

Table 12 - List of primary antibodies used for Western blotting

Protein	Weight (kDa)	Reference	Source	Dilution
4EBP1	15-20	Cell Signaling, 9644	Rabbit	1:1000
Akt	60	Cell signaling, 4685	Rabbit	1:5000
AMPK	60	Cell Signaling, 5832	Rabbit	1:1000
Bax	20	Cell Signaling, 5023	Rabbit	1:1000
Bcl-2	25	Abcam, Ab7973	Rabbit	1:1000
COX IV	17	Cell Signaling, 4844	Rabbit	1:1000
Cytochrome c	14	Santa Cruz, sc13156	Mouse	1:5000
HSC70	70	Santa Cruz, sc7298	Mouse	1:5000
MurF1	40	Abcam, ab172479	Rabbit	1:1000
p-4EBP1 ^{Thr37/46}	20	Cell Signaling, 2855	Rabbit	1:1000
P62	62	Cell Signaling, 5114	Rabbit	1:1000
p-70S6K ^{Thr389}	70,85	Cell Signaling, 9234	Rabbit	1:1000
p-Akt ^{Ser473}	60	Cell Signaling, 9271	Rabbit	1:1000
p-AMPK ^{Thr172}	62	Cell Signaling, 2535	Rabbit	1:1000
Ubiquitine	8	Cell Signaling, 3933	Rabbit	1:1000

Table 13 - Biological analysis in plasma of minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks. Values are mean $\pm$ SD. Significance was checked using Mann-Whitney test.

VARIABLES	ST group	LC/LP group	<i>P-value</i>
UREA (MG/L)	338.6 $\pm$ 88.2	235.2 $\pm$ 40.7	<i>0.008</i>
CREATININ (MG/L)	15.55 $\pm$ 0.9	18.18 $\pm$ 1.5	<i>0.017</i>
GLUCOSE (G/L)	0.65 $\pm$ 0.15	0.74 $\pm$ 0.08	<i>0.34</i>
ALBUMINE (G/L)	46.39 $\pm$ 3.2	44.72 $\pm$ 5.7	<i>0.77</i>
ASAT (UI/L)	79.34 $\pm$ 19.7	41.04 $\pm$ 11.9	<i>0.02</i>
ALAT (UI/L)	55.2 $\pm$ 13	38.97 $\pm$ 7.4	<i>0.05</i>
CRP (μG/ML)	38.2 $\pm$ 26.8	32.8 $\pm$ 24.6	<i>0.79</i>

FIGURE LEGENDS

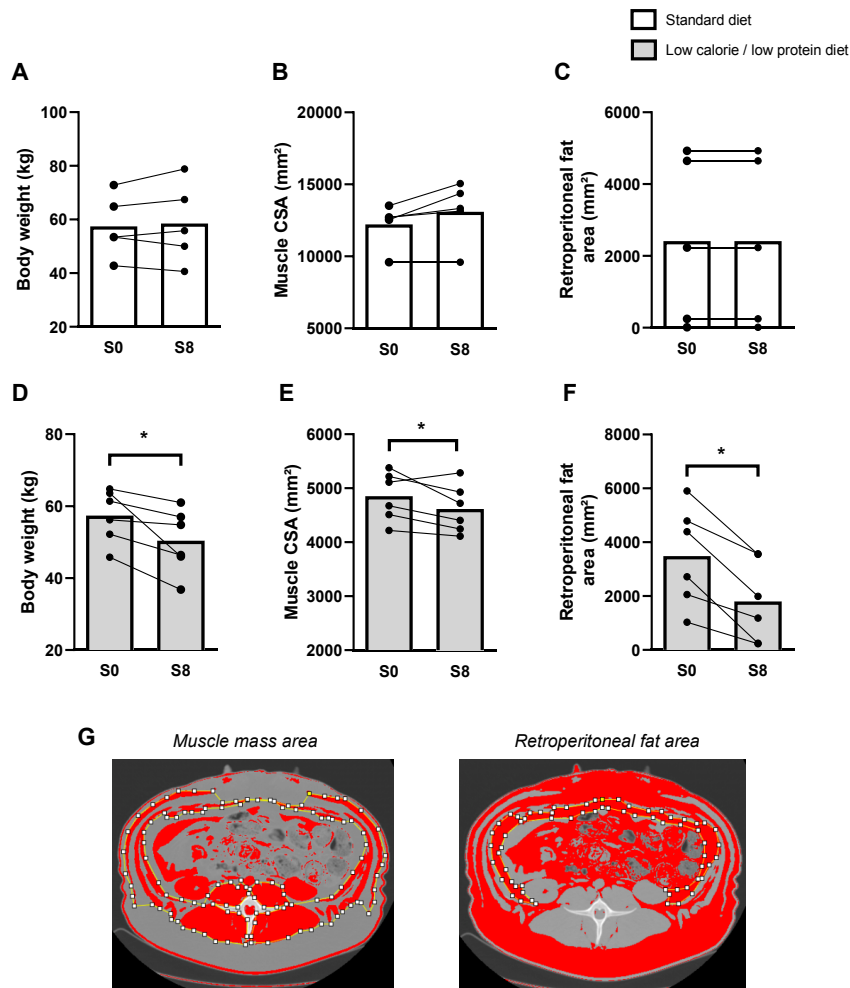


Figure 9 - Body weight and body composition of minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks. *A-C*: evolution of body weight, muscle and retroperitoneal fat cross-sectional area (CSA) in ST animals (n=5). *D-F*: evolution of body weight, muscle and retroperitoneal fat cross-sectional area (CSA) in LC/LP animals (n=6). *G*: representative picture of CT-scan slices with in red, either the threshold for muscle (from -29 to +150 HU) or fat (from -190 to -30 HU). The yellow delineations include *Longissimus dorsi*, *Psoas major* and *large muscle* as well as abdominal muscles on the left panel, and the retroperitoneal fat tissue on the right panel. Values are shown as paired individual values and mean. Significance was checked using Wilcoxon test. *: significant differences between S0 and S8 ($p < 0.05$).

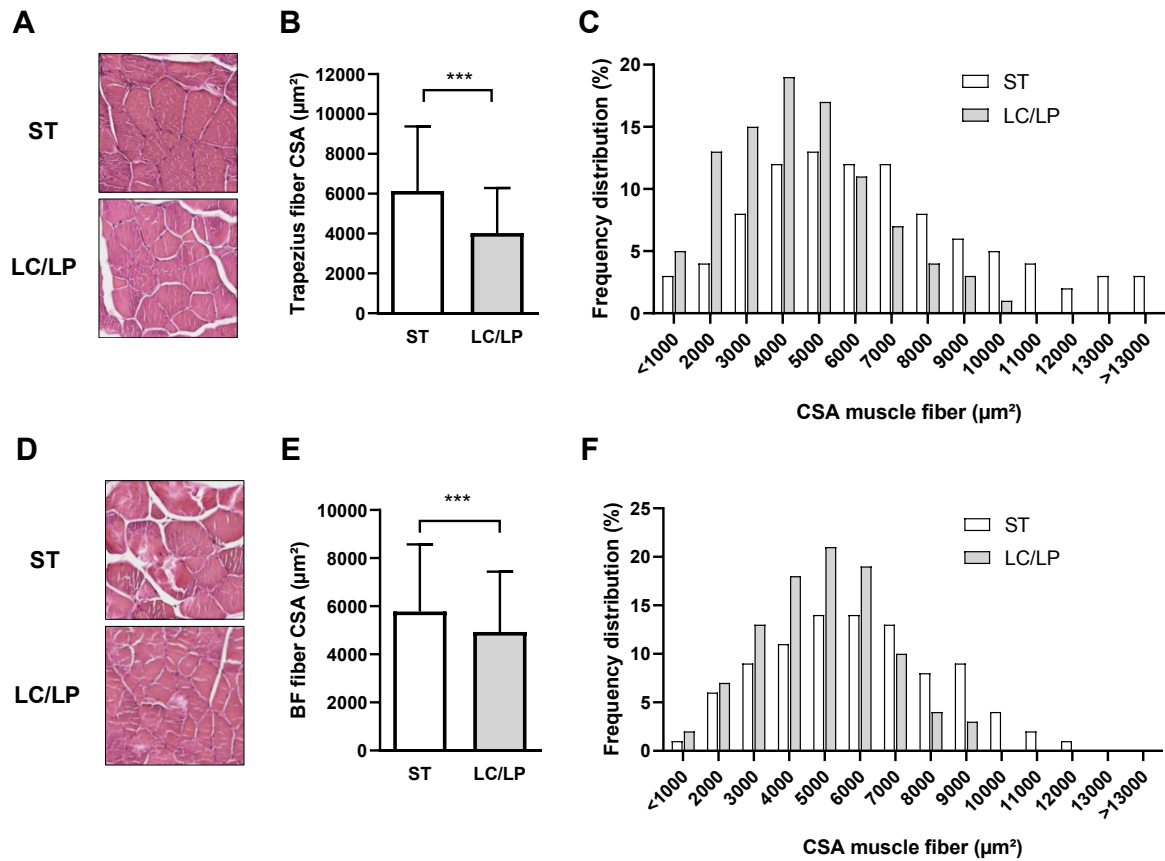


Figure 10 - Muscle fiber size in minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks. *A-C*: muscle fiber cross-sectional area (CSA) histological analyses and frequency distribution of muscle CSA in the *trapezius* after 8 weeks of standard (n=5) or low-calorie/low-protein diet (n=6). *D-F*: muscle fiber cross-sectional area (CSA) histological analyses in the *biceps femoris* after 8 weeks of standard (n=5) or low-calorie/low-protein diet (n=6). Values are mean $\pm$ SD. Significance was checked using Mann-Whitney test. ***: significant differences between ST and LC/LP groups (p<0.001).

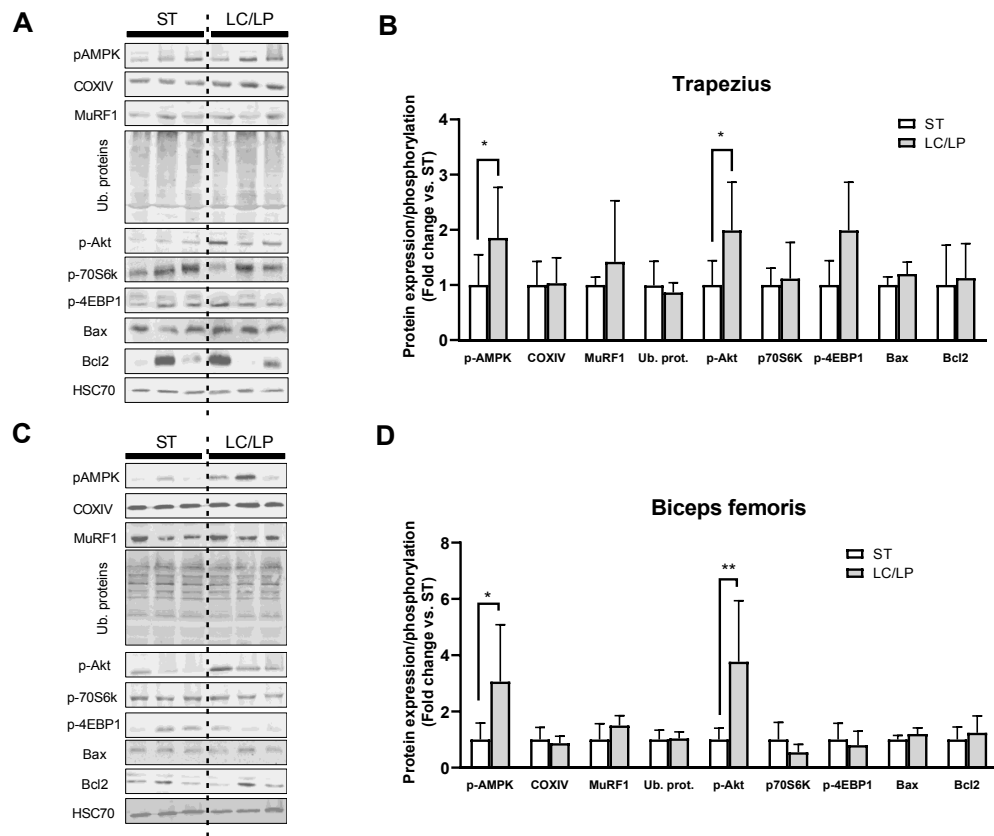


Figure 11 - Energy metabolism and atrophy signaling pathways in skeletal muscle of minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks. Representative images of Western Blot performed in *trapezius* (A) and *biceps femoris* (C). Total content or phosphorylation of signaling proteins involved in energy metabolism and atrophy in *trapezius* (B) and *biceps femoris* (D). Data are presented as fold change in LC/LP compared to ST group (mean $\pm$ SD, n=5-6). Significance was checked using Mann-Whitney test. *: significant differences between ST and LC/LP groups (p<0.05).

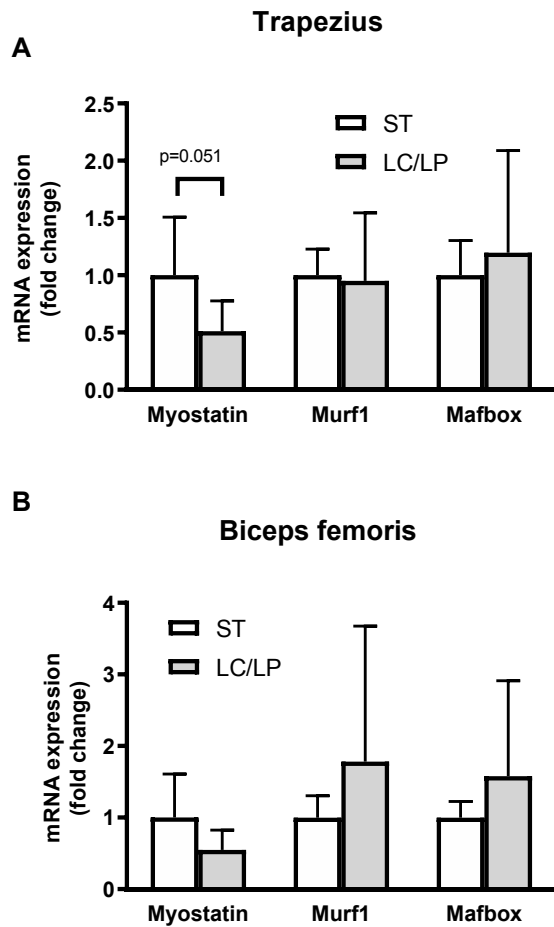


Figure 12- Expression of genes coding for myostatin, MurF1 and MAFbx in the *trapezius* (A) and *biceps femoris* (B) muscles in minipigs subjected to a standard diet (ST) or low-calorie/low-protein (LC/LP) for 8 weeks. Data are presented as fold change in LC/LP compared to ST group (mean $\pm$ SD, n=5-6). Significance was checked using Mann-Whitney test.

XI. Discussion et perspectives

Dans la 1^{ère} partie de ce travail, nous avons réalisé une étude clinique rétrospective mettant en évidence une prévalence élevée de la dénutrition chez les patients atteints de CIH (article soumis). Ces sujets ont probablement un hypercatabolisme en lien avec la tumeur comme il est mis en évidence chez les patients cancéreux (Fearon et al. 2011; Vazeille et al. 2017). Le mécanisme conduisant à la cachexie cancéreuse est donc en lien avec un mécanisme central responsable d'une anorexie et une augmentation du stress oxydatif secondaire au cancer. Il s'agit donc d'un mécanisme différent de celui observé dans notre modèle miniporc Yucatan de dénutrition (Sarcopig) chez lequel l'atrophie musculaire est secondaire uniquement à un déficit d'apport protéino-énergétique. Le modèle Sarcopig 1 est celui d'une dénutrition de type marasmique similaire à celle qui est observée en contexte d'anorexie restrictive par exemple.

L'étude de la composition corporelle chez nos patients n'a cependant pas mis en évidence d'impact négatif de la masse musculaire abaissée sur le pronostic contrairement à ce que nous aurions pu attendre au vu de la littérature abondante sur l'effet pronostique péjoratif de la masse musculaire abaissée sur la survie dans de nombreux cancers. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, un biais majeur est l'absence de seuil d'index de surface musculaire standardisé, ce qui rend les publications peu comparables entre elles (Amini et al. 2019). L'instauration d'un seuil dans les nouvelles recommandations HAS de diagnostic de la dénutrition est important et devrait permettre d'harmoniser les pratiques en France. Il est important d'harmoniser les seuils au niveau international. Une revue récente de la littérature a confirmé que malgré la diversité des index utilisés, la prévalence d'une surface musculaire abaissée était élevée et existait dans de nombreux cancers (œsophagien, colorectal, gastrique, hépatobiliaire, pancréatique, pulmonaire, mammaire) (McGovern et al. 2021). Nous avons utilisé les seuils actuellement reconnus par l'HAS (Delarue et al. 2021).

Nous avons également mis en évidence que l'augmentation de la graisse viscérale est un facteur pronostique péjoratif à la fois sur la survie globale et sur la survie sans récurrence. A nouveau, il n'existe pas d'index standardisé de surface adipeuse. Il nous apparaît indispensable de pouvoir en établir un afin d'étudier précisément l'effet du compartiment graisseux sur le pronostic des cancers. La graisse viscérale et la graisse sous-cutanée ont donc un impact pronostique différent. Contrairement à la graisse sous-cutanée, la graisse viscérale est considérée, comme le muscle, comme un organe endocrine. Elle est capable de sécréter des cytokines, des adipokines et la leptine. Elle est plus richement vascularisée que la graisse sous cutanée et son drainage veineux s'effectue dans la veine porte. Elle est également une réserve de cellules souches graisseuses qui vont augmenter l'agressivité de la tumeur en interagissant avec les adipocytes péri-tumoraux et les cellules tumorales. De plus, il a été mis en évidence que les cellules NK étaient remplacées par des macrophages. Le rôle de la graisse viscérale semble donc tout aussi important dans le pronostic des cancers que celui du muscle squelettique. Le développement d'un modèle préclinique proche de l'Homme apparaît donc crucial pour approfondir la compréhension de ces mécanismes.

L'analyse pré-opératoire de la composition corporelle semble donc indispensable quel que soit le type de tumeur. Elle n'est cependant pas réalisée de manière systématique. Plusieurs logiciels permettent d'établir une composition corporelle tomodynamométrique et ils apparaissent fiables avec une faible variabilité inter-observateur et intra-observateur (van Vugt et al. 2016). Il s'agit cependant de logiciel semi-automatique comme celui que nous avons utilisé dans ce travail de thèse (ImageJ®). L'analyse de la composition corporelle grâce à l'intelligence artificielle, rapide et fiable, permettra probablement de généraliser celle-ci (Greco and Mallio 2021; Zou et al.).

Une réflexion plus générale peut être faite quant à l'utilisation du terme 'sarcopénie' dans la littérature. La plupart des publications mentionne le rôle pronostique péjoratif de la « sarcopénie » sur la survie. Mais dans celles-ci la fonction musculaire n'est quasiment jamais évaluée. Finalement, il est plus juste de dire que c'est la présence d'une surface musculaire abaissée qui est en lien avec une baisse de la survie. Il est également probable que l'atrophie musculaire dans le cadre d'une dénutrition aiguë n'ait pas le même impact que la présence d'une l'atrophie musculaire chronique. De même, les mécanismes de la sarcopénie dite primaire, c'est-à-dire liée à l'âge, diffèrent des mécanismes de la sarcopénie dans le cadre de l'anorexie ou du cancer, dite secondaire. Les traitements de celles-ci ne seront donc pas forcément les mêmes. Ceci est donc à évaluer plus précisément.

La finalité est une optimisation de la prise en charge médico-chirurgicale des patients avec notamment une prise en charge précoce personnalisée dès le diagnostic de dénutrition et de sarcopénie. Les différentes options thérapeutiques peuvent inclure un support nutritionnel mais aussi la mise en œuvre d'un programme d'activité physique adaptée. Les inhibiteurs de la myostatine sont actuellement en cours d'étude pour le traitement de la sarcopénie secondaire à l'âge (Kwak and Kwon 2019). Ils pourraient, si leur efficacité est reconnue, être utilisés comme traitement dès le diagnostic posé. Des études prospectives randomisées devront être conduites.

Dans la 2^{ème} partie de ce travail de thèse, notre objectif était de mettre au point deux modèles de dénutrition chez le miniporc Yucatan, l'un chez des animaux initialement normopondéraux, l'autre chez des miniporcs initialement obèses. Nos modèles pourront permettre d'étudier notamment les conséquences de la dénutrition sur les différents organes comme le foie. Au cours de Sarcopig 1 (état normopondéral) et de Sarcopig 2 (état obèse), des

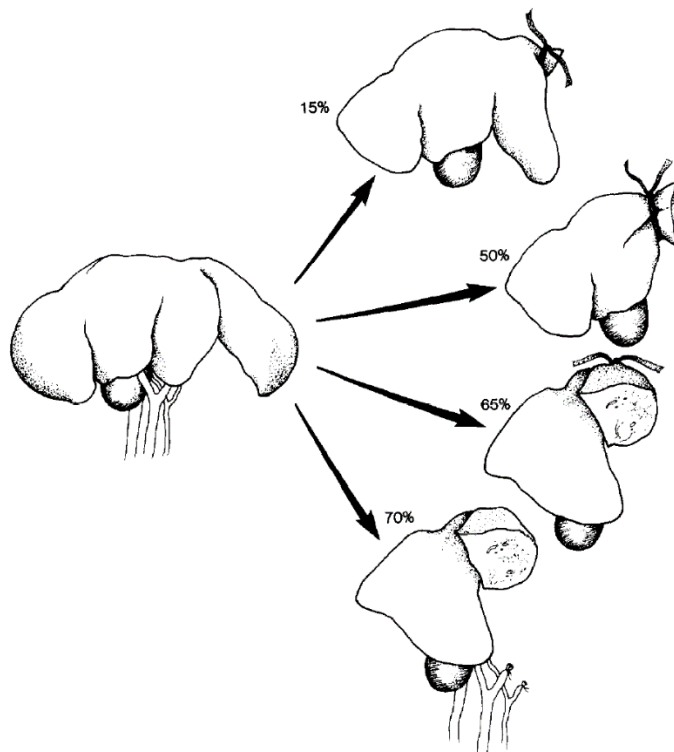
prélèvements de foie, d'iléon, de jéjunum et de colon ont été effectués. Ces prélèvements sont en cours d'analyse afin de compléter la caractérisation des modèles.

Un des traitements curatifs des tumeurs hépatiques consiste en la résection chirurgicale, ou hépatectomie. La limite de ce traitement est notamment le volume de foie restant estimé après hépatectomie. Celui-ci doit être supérieur ou égal à 20% chez les patients avec un foie sain, à 30% chez les patients ayant eu un traitement par chimiothérapie prolongée, ou 40% chez les patients cirrhotiques afin d'éviter une défaillance hépatique post-opératoire (Abdalla et al. 2006). Plusieurs techniques permettent d'augmenter le volume du futur foie restant : l'embolisation portale, qui est une technique de radiologie interventionnelle et la ligature de la veine porte, qui est une technique chirurgicale (Madoff et al. 2005). L'embolisation portale a été décrite pour la première fois par Kinoshita dans les années 80 (Kinoshita et al. 1986). L'occlusion sélective d'une branche portale entraîne une apoptose du côté homolatéral ce qui va engendrer une régénération dans le foie controlatéral. Par exemple, une occlusion de la branche portale droite (par embolisation ou par ligature) entraînera une régénération controlatérale. La ligature portale par voie chirurgicale sera uniquement réalisée de façon concomitante à un autre traitement chirurgical sinon l'embolisation portale par voie radiologique sera privilégiée du fait de son caractère non invasif.

Cependant, alors que la régénération du foie est connue depuis Prométhée, ses mécanismes physiologiques restent encore méconnus. Parfois, le foie, après une hépatectomie, une embolisation portale ou une ligature porte, sans que la raison en soit connue, n'arrive pas à régénérer. Une récente méta-analyse a mis en évidence la survenue d'une insuffisance hépatocellulaire post-opératoire dans 4,5% des cas malgré l'hypertrophie obtenue par l'embolisation portale (Wajswol et al. 2018). Le rôle de la dénutrition dans la régénération est mal connu. Certaines études suggèrent qu'elle impacterait négativement la régénération du foie. Il est donc apparu nécessaire d'avoir un modèle animal préclinique permettant à la fois

d'étudier les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dénutrition mais aussi permettant d'étudier la régénération du foie dans une situation de dénutrition. L'anatomie du foie du porc est connue. La régénération du foie chez le porc a été étudiée notamment après hépatectomie de 15%, 50%, 65% et 70% (figure 7) (Kahn et al. 1988).

Figure 13 - Les différents types d'hépatectomies chez le porc (Kahn et al. 1988).



La régénération du foie chez le porc se déroule de façon similaire aux autres modèles animaux, mais le pic de mitose hépatocytaire est obtenu à 72h chez le porc contre 24h chez le rat (Kahn et al. 1988). La technique d'hépatectomie chez le porc est donc bien décrite, sûre et reproductible.

Le modèle miniporc Yucatan serait donc tout à fait intéressant pour l'étude de la régénération du foie chez des miniporcs dénutris et des miniporcs obèses dénutris notamment en raison de sa proximité avec l'Homme sur le plan physiologique. Ce modèle préclinique de dénutrition

pourrait permettre de mieux étudier les conséquences métaboliques de la dénutrition, mais aussi la régénération du foie en situation de dénutrition, ainsi que les interactions entre foie et muscle. Chez l'Homme, le rôle de la dénutrition dans l'altération de la régénération du foie a été suggéré dans quelques études.

Le foie a une propriété qui n'est connue chez aucun autre organe, celle de maintenir un ratio volume du foie/ poids total du corps à 100% de ce qui est requis pour l'homéostasie du corps (Michalopoulos and Bhushan 2021). Cette propriété du foie à maintenir un volume constant adapté à chaque individu a été appelée hépatostat. Le concept de l'hépatostat est connu depuis plus d'une dizaine d'années, mais les mécanismes sous-tendant celui-ci ne sont pas connus précisément (Michalopoulos 2010). Il a été bien mis en évidence qu'après hépatectomie partielle, le foie retrouve après régénération exactement le même volume qu'avant la chirurgie (Michalopoulos 2010; Michalopoulos 2014). De même, après la transplantation hépatique d'un greffon plus volumineux que le foie natif, celui-ci va revenir exactement au volume du foie natif. Il en est de même en cas de transplantation d'un foie plus petit que le foie natif, celui-ci va augmenter son volume pour atteindre le volume du foie natif (Kam et al. 1987; Van Thiel et al. 1987; Francavilla et al. 1994). Il a également été mis en évidence que le foie diminuait de taille en cas de dénutrition (cachexie ou perte de poids sévère), mais là encore nous ne connaissons pas les mécanismes régissant cela (Michalopoulos and Bhushan 2021).

Le compartiment de l'organisme avec lequel interagit le foie pour ajuster à 100% son volume après hépatectomie ou transplantation hépatique n'est à l'heure actuelle pas connu (Michalopoulos 2017). La régénération hépatique est un processus anabolique qui nécessite de l'énergie, ce d'autant qu'en même temps qu'il régénère, le foie continue son fonctionnement normal.

La composition corporelle en masse musculaire ou en masse grasse a-t-elle un rôle dans la régénération du foie et dans l'hépatostat ? Il existe quelques éléments dans la littérature pouvant suggérer cela. Une étude chez les patients transplantés hépatiques a montré que la présence d'une masse musculaire abaissée en préopératoire diminuait la régénération du greffon à 1 mois (Pravisani et al. 2020). Dello et al. (2013) avaient mis en évidence une diminution du volume fonctionnel du foie chez des patients avec masse musculaire abaissée, mais ces résultats n'ont pas été confirmés par d'autres études. Une autre étude réalisée chez des souris *knock-out* pour la myostatine n'a pas mis en évidence d'augmentation de la régénération hépatique. Malgré l'augmentation de la masse musculaire, il existait une diminution du ratio entre le volume du foie et le poids du corps. Le compartiment musculaire ne semblait donc pas être l'interlocuteur du foie pour l'hépatostat. En revanche, ces animaux *knock-out* pour la myostatine avaient le même niveau de masse grasse que le groupe contrôle (Huang et al. 2012).

Plusieurs mécanismes surviennent après une hépatectomie partielle. Il a été notamment mis en évidence une hypoglycémie puis la survenue d'une stéatose hépatique concomitante du pic de mitose chez la souris, c'est-à-dire 24h après une hépatectomie partielle de 70%. La suppression de l'hypoglycémie post-hépatectomie empêche la régénération du foie (Weymann et al. 2009).

La signification de cette stéatose hépatique survenant transitoirement et précocement au cours de la régénération hépatique n'est pas connue, mais il a par contre bien été démontré que la suppression de l'adipogenèse hépatique altérerait la régénération du foie (Shteyer et al. 2004). La présence d'une stéatose hépatique précoce est donc un phénomène normal et indispensable à la régénération du foie. Une hypothèse concernant la survenue de la stéatose hépatique post-hépatectomie est qu'elle soit une source d'énergie pour la régénération du foie. Thevanther et al. (2010) ont émis l'hypothèse que l'hypoglycémie précoce survenant après hépatectomie

était un signal permettant de déclencher la libération des acides gras stockés dans le tissu adipeux périphérique. Les acides gras ainsi libérés du tissu adipeux périphérique seraient responsables de la stéatose hépatique.

De nombreuses questions demeurent donc quant au lien existant entre la composition corporelle, l'état nutritionnel et la régénération du foie. Notre modèle de miniporcs Yucatan dénutris, caractérisé sur le plan de la composition corporelle et du phénotype musculaire, pourra donc être utilisé dans ce cadre.

Le modèle de miniporcs obèses dénutris permettra également l'étude de la relation inter-organes : foie, muscle, tissu adipeux. Il existe peu de publications sur les conséquences de l'obésité sur la fonction hépatique post-hépectomie. Lodewick et al. (2015) avait mis en évidence une augmentation de la taille du foie chez les patients présentant une obésité sarcopénique avec une diminution de la fonction hépatique.

Dans nos deux travaux de recherche, à la fois chez l'Homme et chez l'animal, nous avons constaté une finalité commune à savoir l'atrophie musculaire. Cependant, il est important de souligner qu'elle résulte de deux mécanismes distincts. Dans l'article 1, l'atrophie musculaire surviendrait en réponse à l'hypercatabolisme engendré par la tumeur et à l'anorexie liée au cancer. Dans l'article 2, l'atrophie musculaire serait au contraire une adaptation du muscle lui-même à la restriction protéino-énergétique. Dans notre modèle de miniporcs dénutris, les biopsies musculaires n'ont été réalisées qu'après 8 semaines de dénutrition. Nous n'avons donc pas pu étudier précisément les mécanismes d'adaptation musculaire, mais uniquement ses conséquences, à savoir la diminution de la masse musculaire et du diamètre des fibres musculaires. Sur le plan moléculaire, nous avons tout de même pu observer une augmentation de la phosphorylation d'AMPK et d'Akt dans les muscles *trapèze* et *biceps fémoris* mais sans augmentation de 4EBP1 et p70S6K. Il nous semble important de réaliser des biopsies

musculaires répétées plus précocement dans ce modèle afin d'analyser les mécanismes mis en œuvre. Ce modèle nous semble correspondre à un modèle préclinique de dénutrition protéino-énergétique sévère de type marasme comme observé chez l'Homme dans l'anorexie mentale. Un phénomène observé chez les patients atteints d'anorexie mentale est l'autophagie du foie (Kheloufi et al. 2014). Il serait donc intéressant d'analyser les prélèvements hépatiques réalisées à 8 semaines au moment de l'euthanasie pour tenter d'identifier ce phénomène.

Le rôle du microbiote dans la dénutrition est mal connu. Smith et al ont suggéré la responsabilité du microbiote dans la survenue d'une dénutrition de type Kwashiorkor (Smith et al. 2013b). Dans cette étude ils se sont intéressés à des jumeaux originaire du Malawi dont l'un avait un phénotype Kwashiorkor et le second un phénotype nutritionnel normal. La transplantation fécale chez des souris gnotobiotiques a entraîné une perte pondérale chez les souris transplantées avec la flore des jumeaux dénutris lorsqu'elles étaient alimentées par une alimentation pauvre en protéines. Lors de la réalimentation avec une alimentation thérapeutique, elles ont repris du poids et leur microbiote s'est modifié. Cette étude suggère que des métabolites issus du microbiote inhibent des enzymes du cycle de Krebs avec altération du métabolisme énergétique (Smith et al. 2013). Le lien entre l'axe digestif, le muscle et le microbiote intestinal est mal connu mais il est probable qu'ils communiquent entre eux (de Sire et al. 2018). Il a été mis en évidence chez la souris que l'administration de la bactérie *Lactobacillus reuteri* permettait de protéger contre la cachexie (Varian et al. 2016). Ceci suggère un axe intestin-microbiote-muscle.

Dans le cas de la dénutrition induite par l'anorexie mentale, une dysbiose a été mise en évidence chez l'Homme (Hanachi et al. 2019c; Di Lodovico et al. 2021; Galmiche et al. 2021). On ne sait pas si celle-ci est la cause ou la conséquence de l'anorexie mentale.

Le microbiote joue également un rôle crucial dans la régénération du foie. En effet, il a été mis en évidence que celle-ci était inhibée chez des souris traitées par une antibiothérapie (Wu

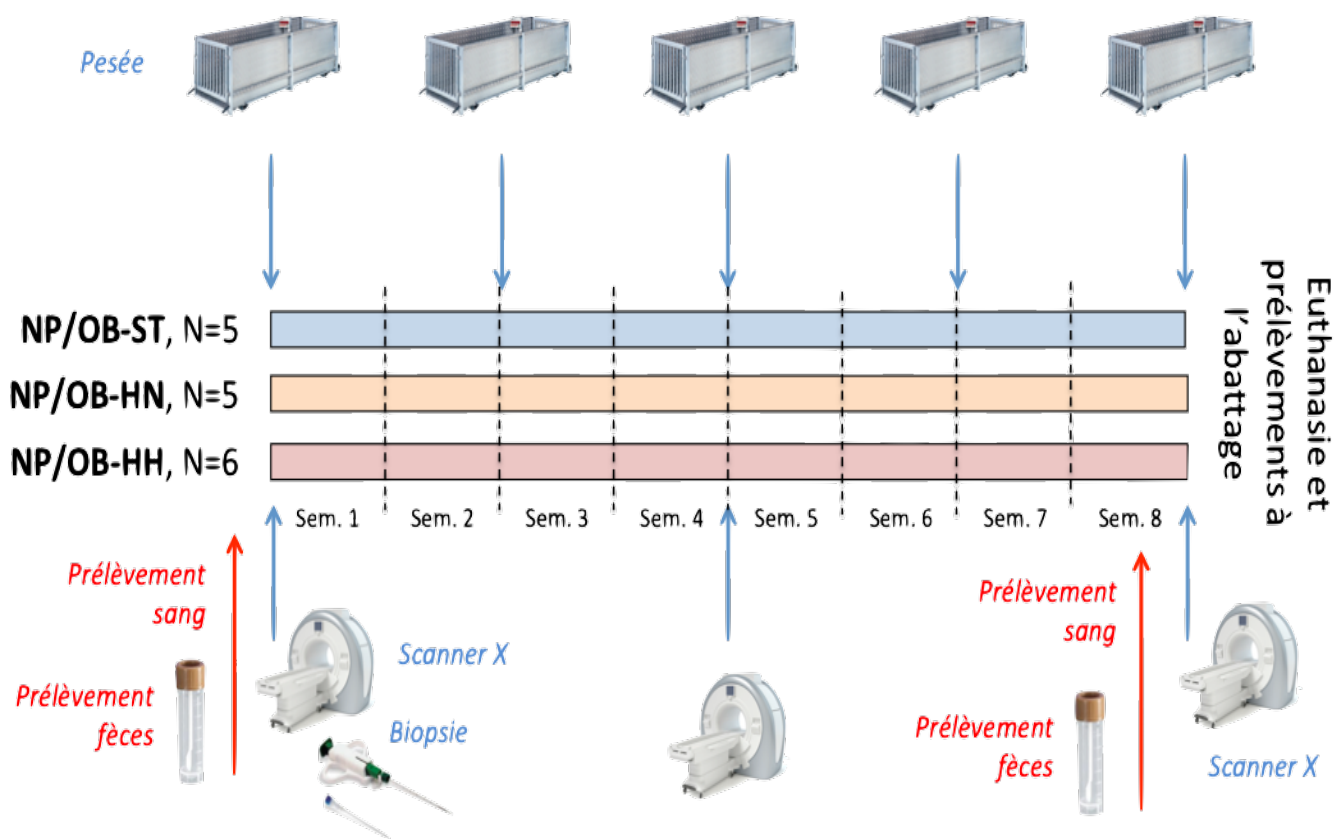
et al. 2015). Le foie est exposé aux bactéries du tube digestif par l'intermédiaire de la veine porte. Il contient le plus grand nombre de cellules de Küpffer et de cellules Natural Killer (NK) de l'organisme et il a été mis en évidence qu'une augmentation des cellules NK altérerait la régénération du foie (Wu et al. 2015). Chez les souris soumises à l'antibiotique, le nombre de cellules de Küpffer augmentaient et les cellules NK étaient activées inhibant ainsi la régénération du foie. Une autre étude a pu mettre en évidence la variation du microbiote en fonction des différentes étapes de la régénération (Bao et al. 2020). Il serait donc intéressant d'étudier les liens éventuels entre le microbiote, le foie, le muscle et le tissu adipeux en situation de dénutrition, puis dans diverses conditions modulant cet axe.

A l'avenir, nous souhaitons mieux caractériser le modèle notamment sur le plan de la fonction musculaire après optimisation de notre technique de twitch mais aussi sur l'évolution du comportement des animaux au cours de la dénutrition. D'éventuelles modifications dans la fonction de barrière intestinale mériteraient également d'être recherchées dans ce modèle. Nous aimerions aussi caractériser le foie des miniporcs dénutris à la fois histologiquement et par scanner. Ce modèle animal, proche de la physiologie humaine, a été initialement développé pour l'étude de l'impact de la dénutrition sur régénération du foie ; celle-ci sera réalisée dans un second temps. Ce modèle permettra également d'étudier le rôle physiopathologique du microbiote dans la dénutrition de type marasmique. Ainsi, la dysbiose est-elle une conséquence ou une cause de celle-ci comme cela a pu être suggéré dans la dénutrition de type Kwashiorkor ? Ce modèle permettra enfin d'étudier les effets de traitements de la sarcopénie sur un modèle animal plus proche de l'Homme que les rongeurs, notamment les inhibiteurs de la myostatine ou les modulateurs sélectifs des récepteurs à Androgènes (SARMs) (Rooks and Roubenoff 2019; Hardee and Lynch 2019).

Ce nouveau modèle animal de dénutrition permet d'ouvrir des perspectives pour augmenter la compréhension des mécanismes responsables de la sarcopénie dans le cadre de la dénutrition, mais aussi pour améliorer la prise en charge des patients dénutris.

XII. ANNEXES

Annexe 1 - Projets Sarcopig 1 et 2



ST = Standard, HN = Hypocalorique Normoprotéique, HH = Hypocalorique Hypoprotéique, NP = Normo-Pondéral

Annexe 2 - La composition des différents types d'aliments

Composition des aliments (en %).

EM: Energie Métabolique, MAD: Matière Azotée Digestible, EN: Energie Nette

	Aliment Standard	Aliment Hypoprotéique
Blé tendre	10	30,77
Orge	33	10
Son de blé tendre	25	25
Coques de soja	12	12
Pulpe de betterave déshydratée	-	5
Tourteau de soja 48	6	-
Tourteau de tournesol non décortiqué	10	-
Mélasse de canne	1	1
Amidon de maïs	-	8,14
Cellulose	-	5
Sel	0,6	0,6
Carbonate de Sodium	1,3	1,1
Phosphate bicalcique	0,6	0,89
COV INRA	0,5	0,5
Total	100	100
EM (kj)	10,33	10,37
EM (kcal)	2470	2479
MAD/EN	15	8,63

XIII. Bibliographie

- Abdalla EK, Adam R, Bilchik AJ, Jaeck D, Vauthey J-N, Mahvi D. 2006. Improving Resectability of Hepatic Colorectal Metastases: Expert Consensus Statement. *Ann Surg Oncol*. 13(10):1271–1280. <https://doi.org/10.1245/s10434-006-9045-5>
- Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ. 2004. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes*. 53(1):25–31. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.1.25>
- Alaverdashvili M, Li X, Paterson PG. 2015. Protein-Energy Malnutrition Causes Deficits in Motor Function in Adult Male Rats. *J Nutr*. 145(11):2503–2511. <https://doi.org/10.3945/jn.115.216382>
- Alexandre P. 2019. Haute Autorité de santé. :142.
- Alix P, Val-Laillet D, Turlin B, Ben Mosbah I, Burel A, Bobillier E, Bendavid C, Delpy E, Zal F, Corlu A, Boudjema K. 2020. Adding the oxygen carrier M101 to a cold-storage solution could be an alternative to HOPE for liver graft preservation. *JHEP Rep Innov Hepatol*. 2(4):100119. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100119>
- Allen DL, Yasui W, Tanaka T, Ohira Y, Nagaoka S, Sekiguchi C, Hinds WE, Roy RR, Edgerton VR. 1996. Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 81(1):145–151. <https://doi.org/10.1152/jappl.1996.81.1.145>
- Amini B, Boyle SP, Boutin RD, Lenchik L. 2019. Approaches to Assessment of Muscle Mass and Myosteatosis on Computed Tomography: A Systematic Review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 74(10):1671–1678. <https://doi.org/10.1093/gerona/glz034>
- Amirouche A, Durieux A-C, Banzet S, Koulmann N, Bonnefoy R, Mouret C, Bigard X, Peinnequin A, Freyssen D. 2009. Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle. *Endocrinology*. 150(1):286–294. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0959>
- Apostolopoulos V, de Courten MPJ, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K, de Courten B. 2016. The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Mol Nutr Food Res*. 60(1):43–57. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500272>
- Argilés JM, Stemmler B, López-Soriano FJ, Busquets S. 2019. Inter-tissue communication in cancer cachexia. *Nat Rev Endocrinol*. 15(1):9–20. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0123-0>
- Bao Q, Yu L, Chen D, Li L. 2020. Variation in the gut microbial community is associated with the progression of liver regeneration. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol*. 50(1):121–136. <https://doi.org/10.1111/hepr.13424>
- Baracos VE, Martin L, Korc M, Guttridge DC, Fearon KCH. 2018. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primer*. 4:17105. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.105>
- Barazzoni R, Gortan Cappellari G. 2020. Double burden of malnutrition in persons with obesity. *Rev Endocr Metab Disord*. 21(3):307–313. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09578-1>
- Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. 2005. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol*. 37(10):2098–2114. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.02.029>
- Belmonte L, Coëffier M, Le Pessot F, Miralles-Barrachina O, Hiron M, Leplingard A, Lemeland J-F, Hecketsweiler B, Daveau M, Ducrotté P, Déchelotte P. 2007. Effects of glutamine supplementation on gut barrier, glutathione content and acute phase response in

- malnourished rats during inflammatory shock. *World J Gastroenterol.* 13(20):2833–2840. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i20.2833>
- Bergeat D, Blat S, Gautier Y, Guérin S, Le Huërou-Luron I, Thibault R, Val-Laillet D. 2021. A pilot study about the development and characterization of a Roux en Y gastric bypass model in obese Yucatan minipigs. *Sci Rep.* 11:20190. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98575-8>
- Bilancio G, Lombardi C, Pisot R, De Santo NG, Cavallo P, Cirillo M. 2014. Effects of bed-rest on urea and creatinine: correlation with changes in fat-free mass. *PloS One.* 9(9):e108805. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108805>
- Biolo G, Cederholm T, Muscaritoli M. 2014. Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: From sarcopenic obesity to cachexia. *Clin Nutr.* 33(5):737–748. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.03.007>
- Blechacz B. 2017. Cholangiocarcinoma: Current Knowledge and New Developments. *Gut Liver.* 11(1):13–26. <https://doi.org/10.5009/gnl15568>
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK-M, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, et al. 2001. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science.* 294(5547):1704–1708. <https://doi.org/10.1126/science.1065874>
- Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. 2002. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem.* 277(27):23977–23980. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200171200>
- Bonaldo P, Sandri M. 2013. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis Model Mech.* 6(1):25–39. <https://doi.org/10.1242/dmm.010389>
- Bozzetti F, Gianotti L, Braga M, Di Carlo V, Mariani L. 2007. Postoperative complications in gastrointestinal cancer patients: the joint role of the nutritional status and the nutritional support. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 26(6):698–709. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2007.06.009>
- Brioche T, Lemoine-Morel S. 2016. Oxidative Stress, Sarcopenia, Antioxidant Strategies and Exercise: Molecular Aspects. *Curr Pharm Des.* 22(18):2664–2678. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160219120531>
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. 1999. Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell.* 96(6):857–868. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80595-4)
- Buettner S, van Vugt JLA, IJzermans J, Groot Koerkamp B. 2017. Intrahepatic cholangiocarcinoma: current perspectives. *OncoTargets Ther.* Volume 10:1131–1142. <https://doi.org/10.2147/OTT.S93629>
- Campos F, Abrigo J, Aguirre F, Garcés B, Arrese M, Karpen S, Cabrera D, Andía ME, Simon F, Cabello-Verrugio C. 2018. Sarcopenia in a mice model of chronic liver disease: role of the ubiquitin-proteasome system and oxidative stress. *Pflugers Arch.* 470(10):1503–1519. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2167-3>
- Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* 458(7241):1056–1060. <https://doi.org/10.1038/nature07813>
- Cantó C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakaki C, Coste A, Lagouge M, Zierath JR, Auwerx J. 2010. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metab.* 11(3):213–219.

- <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.02.006>
- Cao M, Che L, Wang J, Yang M, Su G, Fang Z, Lin Y, Xu S, Wu D. 2014. Effects of maternal over- and undernutrition on intestinal morphology, enzyme activity, and gene expression of nutrient transporters in newborn and weaned pigs. *Nutrition*. 30(11):1442–1447. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2014.04.016>
- Cauley JA. 2015. An Overview of Sarcopenic Obesity. *J Clin Densitom*. 18(4):499–505. <https://doi.org/10.1016/j.jocd.2015.04.013>
- Cederholm T, Barazzoni R, Austin P, Ballmer P, Biolo G, Bischoff SC, Compher C, Correia I, Higashiguchi T, Holst M, et al. 2017a. ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 36(1):49–64. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.09.004>
- Cederholm T, Barazzoni R, Austin P, Ballmer P, Biolo G, Bischoff SC, Compher C, Correia I, Higashiguchi T, Holst M, et al. 2017b. ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clin Nutr Edinb Scotl*. 36(1):49–64. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.09.004>
- Cederholm T, Bosaeus I, Barazzoni R, Bauer J, Van Gossum A, Klek S, Muscaritoli M, Nyulasi I, Ockenga J, Schneider SM, et al. 2015. Diagnostic criteria for malnutrition – An ESPEN Consensus Statement. *Clin Nutr*. 34(3):335–340. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.03.001>
- Cederholm T, Jensen GL, Correia MITD, Gonzalez MC, Fukushima R, Higashiguchi T, Baptista G, Barazzoni R, Blaauw R, Coats A, et al. 2019. GLIM criteria for the diagnosis of malnutrition – A consensus report from the global clinical nutrition community. *Clin Nutr*. 38(1):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.08.002>
- Chakedis J, Spolverato G, Beal EW, Woelfel I, Bagante F, Merath K, Sun SH, Chafitz A, Galo J, Dillhoff M, et al. 2018. Pre-operative Sarcopenia Identifies Patients at Risk for Poor Survival After Resection of Biliary Tract Cancers. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract*. 22(10):1697–1708. <https://doi.org/10.1007/s11605-018-3802-1>
- Chang H-W, McNulty NP, Hibberd MC, O'Donnell D, Cheng J, Lombard V, Henrissat B, Ilkayeva O, Muehlbauer MJ, Newgard CB, et al. 2021. Gut microbiome contributions to altered metabolism in a pig model of undernutrition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 118(21):e2024446118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2024446118>
- Cheung K, Lee SS, Raman M. 2012. Prevalence and Mechanisms of Malnutrition in Patients With Advanced Liver Disease, and Nutrition Management Strategies. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 10(2):117–125. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2011.08.016>
- Childers MK, Grange RW, Kornegay JN. 2011. In vivo canine muscle function assay. *J Vis Exp JoVE*. (50):2623. <https://doi.org/10.3791/2623>
- Cho K-M, Park H, Oh D-Y, Kim Tae-Yong, Lee KH, Han S-W, Im S-A, Kim Tae-You, Bang Y-J. 2017. Skeletal muscle depletion predicts survival of patients with advanced biliary tract cancer undergoing palliative chemotherapy. *Oncotarget*. 8(45):79441.
- Christian CJ, Benian GM. 2020. Animal models of sarcopenia. *Aging Cell*. 19(10):e13223. <https://doi.org/10.1111/accel.13223>
- Ciuni R, Biondi A, Grosso G, Nunnari G, Panascia E, Randisi L, Volpes R, Arcadipane A, Basile F, Gridelli B, Gruttadauria S. 2011. Nutritional aspects in patient undergoing liver resection. *Updat Surg*. 63(4):249–252. <https://doi.org/10.1007/s13304-011-0121-4>
- Clark W, Siegel EM, Chen YA, Zhao X, Parsons CM, Hernandez JM, Weber J, Thareja S, Choi J, Shibata D. 2013. Quantitative measures of visceral adiposity and body mass index in predicting rectal cancer outcomes after neoadjuvant chemoradiation. *J Am Coll Surg*.

- 216(6):1070–1081. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2013.01.007>
- Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibé B, Bouix J, Caiment F, Elsen J-M, Eychenne F, et al. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet.* 38(7):813–818. <https://doi.org/10.1038/ng1810>
- Coen PM, Goodpaster BH. 2012. Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 23(8):391–398. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.009>
- Cornet M, Lim C, Salloum C, Lazzati A, Compagnon P, Pascal G, Azoulay D. 2015. Prognostic value of sarcopenia in liver surgery. *J Visc Surg.* 152(5):297–304. <https://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2015.08.001>
- Coux O, Piechaczyk M. 2000. Le système ubiquitine/protéasome : un ensemble (de) complexe(s) pour dégrader les protéines. *médecine/sciences.* 16(5):623. <https://doi.org/10.4267/10608/1705>
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel J-P, Rolland Y, Schneider SM, et al. 2010. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 39(4):412–423. <https://doi.org/10.1093/ageing/afq034>
- Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, Cooper C, Landi F, Rolland Y, Sayer AA, et al. 2019. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing.* 48(1):16–31. <https://doi.org/10.1093/ageing/afy169>
- Dai Z, Xu Y-C, Niu L. 2007. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol.* 13(31):4199.
- Das SK, Eder S, Schauer S, Diwoky C, Temmel H, Guertl B, Gorkiewicz G, Tamilarasan KP, Kumari P, Trauner M, et al. 2011. Adipose Triglyceride Lipase Contributes to Cancer-Associated Cachexia. *Science.* 333(6039):233–238. <https://doi.org/10.1126/science.1198973>
- Delarue J, Desport J-C, Dubern B, Joly F, Mas E, Pitard A, Fontaine E, Group HW. 2021. Diagnosing undernutrition children and adults: new French criteria. Why, for what and for whom? A joint statement of the French National Authority for Health and French Federation of Nutrition. *Br J Nutr.* 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0007114521001471>
- Dello SAWG, Lodewick TM, van Dam RM, Reisinger KW, van den Broek MAJ, von Meyenfeldt MF, Bemelmans MHA, Olde Damink SWM, Dejong CHC. 2013. Sarcopenia negatively affects preoperative total functional liver volume in patients undergoing liver resection. *HPB.* 15(3):165–169. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2012.00517.x>
- Di Lodovico L, Mondot S, Doré J, Mack I, Hanachi M, Gorwood P. 2021. Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 106:110114. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.110114>
- van Dijk DPJ, Krill M, Farshidfar F, Li T, Rensen SS, Olde Damink SWM, Dixon E, Sutherland FR, Ball CG, Mazurak VC, et al. 2019. Host phenotype is associated with reduced survival independent of tumour biology in patients with colorectal liver metastases. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 10(1):123–130. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12358>
- Dindo D, Demartines N, Clavien P-A. 2004. Classification of Surgical Complications. *Ann Surg.* 240(2):205–213. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000133083.54934.ae>
- Dong J, Yu J, Li Z, Gao S, Wang H, Yang S, Wu L, Lan C, Zhao T, Gao C, et al. 2021. Serum insulin-like growth factor binding protein 2 levels as biomarker for pancreatic

- ductal adenocarcinoma-associated malnutrition and muscle wasting. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 12(3):704–716. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12692>
- Dorling JL, van Vliet S, Huffman KM, Kraus WE, Bhapkar M, Pieper CF, Stewart T, Das SK, Racette SB, Roberts SB, et al. 2020. Effects of caloric restriction on human physiological, psychological, and behavioral outcomes: highlights from CALERIE phase 2. *Nutr Rev*. 79(1):98–113. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa085>
- Dumitriu A, Bm R, M R, Sm C. 2018. Muscle Changes During Atrophy. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. [accessed 2021 Oct 27] 1088. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_4
- Dupont-Versteegden EE. 2006. Apoptosis in skeletal muscle and its relevance to atrophy. *World J Gastroenterol WJG*. 12(46):7463–7466. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i46.7463>
- Durand F, Buyse S, Francoz C, Laouénan C, Bruno O, Belghiti J, Moreau R, Vilgrain V, Valla D. 2014. Prognostic value of muscle atrophy in cirrhosis using psoas muscle thickness on computed tomography. *J Hepatol*. 60(6):1151–1157.
- EASL Clinical Practice Guidelines on nutrition in chronic liver disease. 2019. *J Hepatol*. 70(1):172–193. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.06.024>
- Ebadi M, Bhanji RA, Tandon P, Mazurak V, Baracos VE, Montano-Loza AJ. 2020. Review article: prognostic significance of body composition abnormalities in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 52(4):600–618. <https://doi.org/10.1111/apt.15927>
- Ebadi M, Martin L, Ghosh S, Field CJ, Lehner R, Baracos VE, Mazurak VC. 2017. Subcutaneous adiposity is an independent predictor of mortality in cancer patients. *Br J Cancer*. 117(1):148–155. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.149>
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 35(4):495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Emery PW. 2005. Metabolic changes in malnutrition. *Eye*. 19(10):1029–1034. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701959>
- Englesbe MJ, Patel SP, He K, Lynch RJ, Schaubel DE, Harbaugh C, Holcombe SA, Wang SC, Segev DL, Sonnenday CJ. 2010. Sarcopenia and Mortality after Liver Transplantation. *J Am Coll Surg*. 211(2):271–278. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2010.03.039>
- Epidemiologic and methodologic problems in determining nutritional status of older persons. Proceedings of a conference. Albuquerque, New Mexico, October 19-21, 1988. 1989. *Am J Clin Nutr*. 50(5 Suppl):1121–1235.
- Eriksson S, Nilsson JH, Strandberg Holka P, Eberhard J, Keussen I, Stureson C. 2017. The impact of neoadjuvant chemotherapy on skeletal muscle depletion and preoperative sarcopenia in patients with resectable colorectal liver metastases. *HPB*. 19(4):331–337. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2016.11.009>
- Evans DC, Martindale RG, Kiraly LN, Jones CM. 2014. Nutrition Optimization Prior to Surgery. *Nutr Clin Pract*. 29(1):10–21. <https://doi.org/10.1177/0884533613517006>
- Fearon K, Strasser F, Anker SD, Bosaeus I, Bruera E, Fainsinger RL, Jatoi A, Loprinzi C, MacDonald N, Mantovani G. 2011. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol*. 12(5):489–495.
- Fearon Kenneth C. H. 2011. Cancer Cachexia and Fat–Muscle Physiology. <http://dx.doi.org/101056/NEJMcibr1106880> [Internet]. [accessed 2021 Oct 21]. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1106880>
- Fearon Kenneth C.H. 2011. Cancer Cachexia and Fat–Muscle Physiology. *N Engl J Med*. 365(6):565–567. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr1106880>
- Florio AA, Campbell PT, Zhang X, Zeleniuch-Jacquotte A, Wactawski-Wende J, Smith-Warner SA, Sinha R, Simon TG, Sesso HD, Schairer C, et al. 2019. Abdominal and

- gluteofemoral size and risk of liver cancer: The liver cancer pooling project. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.32760>
- Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L, Carr BI, Sun D, Porter KA, Van Thiel DH, Starzl TE. 1994. Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology* 19(1):210–216.
- Freese KE, Kokai L, Edwards RP, Philips BJ, Sheikh MA, Kelley J, Comerici J, Marra KG, Rubin JP, Linkov F. 2015. Adipose-derived stem cells and their role in human cancer development, growth, progression, and metastasis: a systematic review. *Cancer Res*. 75(7):1161–1168. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2744>
- Fritzen AM, Lundsgaard A-M, Kiens B. 2020. Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise. *Nat Rev Endocrinol*. 16(12):683–696. <https://doi.org/10.1038/s41574-020-0405-1>
- Frontera WR, Ochala J. 2015. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*. 96(3):183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Fujiwara N, Nakagawa H, Kudo Y, Tateishi R, Taguri M, Watadani T, Nakagomi R, Kondo M, Nakatsuka T, Minami T, others. 2015. Sarcopenia, intramuscular fat deposition, and visceral adiposity independently predict the outcomes of hepatocellular carcinoma. *J Hepatology*. 63(1):131–140.
- Fulco M, Sartorelli V. 2008. Comparing and Contrasting the Roles of AMPK and SIRT1 in Metabolic Tissues. *Cell Cycle* 7(23):3669–3679.
- Galmiche M, Achamrah N, Déchelotte P, Ribet D, Breton J. 2021. Role of microbiota-gut-brain axis dysfunctions induced by infections in the onset of anorexia nervosa. *Nutr Rev*.:nuab030. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuab030>
- Galpin AJ, Raue U, Jemiolo B, Trappe TA, Harber MP, Minchev K, Trappe S. 2012. Human Skeletal Muscle Fiber Type Specific Protein Content. *Anal Biochem*. 425(2):175–182. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.03.018>
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 13(9):1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>
- Gavete ML, Martín MA, Alvarez C, Escrivá F. 2005. Maternal food restriction enhances insulin-induced GLUT-4 translocation and insulin signaling pathway in skeletal muscle from suckling rats. *Endocrinology*. 146(8):3368–3378. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1658>
- Glick D, Barth S, Macleod KF. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 221(1):3–12. <https://doi.org/10.1002/path.2697>
- Goll DE, Neti G, Mares SW, Thompson VF. 2008. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *J Anim Sci*. 86(14 Suppl):E19-35. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0395>
- Golse N, Octav Bucur P, Ciaccio O, Pittau G, Sa Cunha A, Adam R, Castaing D, Antonini T, Coilly A, Samuel D, others. 2017. A new definition of sarcopenia in patients with cirrhosis undergoing liver transplantation. *Liver Transpl* [Internet]. [accessed 2017 Mar 15]. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lt.24671/full>
- Goodyear LJ, Hirshman MF, Smith RJ, Horton ES. 1991. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes of red and white skeletal muscle. *Am J Physiol*. 261(5 Pt 1):E556-561. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1991.261.5.E556>
- Greco F, Mallio CA. 2021. Artificial intelligence and abdominal adipose tissue analysis: a literature review. *Quant Imaging Med Surg*. 11(10):4461–4474.

<https://doi.org/10.21037/qims-21-370>

- Grignol VP, Smith AD, Shlapak D, Zhang X, Del Campo SM, Carson WE. 2015. Increased visceral to subcutaneous fat ratio is associated with decreased overall survival in patients with metastatic melanoma receiving anti-angiogenic therapy. *Surg Oncol.* 24(4):353–358. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2015.09.002>
- Guillet C, Prod'homme M, Balage M, Gachon P, Giraudet C, Morin L, Grizard J, Boirie Y. 2004. Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 18(13):1586–1587. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1341fje>
- Gundersen K, Bruusgaard JC. 2008. Nuclear domains during muscle atrophy: nuclei lost or paradigm lost? *J Physiol.* 586(11):2675–2681. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.154369>
- Hamaguchi Y, Kaido T, Okumura S, Ito T, Fujimoto Y, Ogawa K, Mori A, Hammad A, Hatano E, Uemoto S. 2015. Preoperative intramuscular adipose tissue content is a novel prognostic predictor after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *J Hepato-Biliary-Pancreat Sci.* 22(6):475–485. <https://doi.org/10.1002/jhbp.236>
- Hamaguchi Y, Kaido T, Okumura S, Kobayashi A, Fujimoto Y, Ogawa K, Mori A, Hammad A, Hatano E, Uemoto S. 2016. Muscle Steatosis is an Independent Predictor of Postoperative Complications in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *World J Surg.* 40(8):1959–1968. <https://doi.org/10.1007/s00268-016-3504-3>
- Hamaguchi Y, Kaido T, Okumura S, Kobayashi A, Shirai H, Yao S, Yagi S, Kamo N, Seo S, Taura K, et al. 2019. Preoperative Visceral Adiposity and Muscularity Predict Poor Outcomes after Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer.* 8(2):92–109. <https://doi.org/10.1159/000488779>
- Hamaguchi Y, Kaido T, Okumura S, Kobayashi A, Shirai H, Yao S, Yagi S, Kamo N, Uemoto S. 2020. Including body composition in MELD scores improves mortality prediction among patients awaiting liver transplantation. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 39(6):1885–1892. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.08.012>
- Hanachi M, Manichanh C, Schoenenberger A, Pascal V, Levenez F, Cournède N, Doré J, Melchior J-C. 2019a. Altered host-gut microbes symbiosis in severely malnourished anorexia nervosa (AN) patients undergoing enteral nutrition: An explicative factor of functional intestinal disorders? *Clin Nutr Edinb Scotl.* 38(5):2304–2310. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.10.004>
- Hanachi M, Manichanh C, Schoenenberger A, Pascal V, Levenez F, Cournède N, Doré J, Melchior J-C. 2019b. Altered host-gut microbes symbiosis in severely malnourished anorexia nervosa (AN) patients undergoing enteral nutrition: An explicative factor of functional intestinal disorders? *Clin Nutr Edinb Scotl.* 38(5):2304–2310. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.10.004>
- Hanachi M, Manichanh C, Schoenenberger A, Pascal V, Levenez F, Cournède N, Doré J, Melchior J-C. 2019c. Altered host-gut microbes symbiosis in severely malnourished anorexia nervosa (AN) patients undergoing enteral nutrition: An explicative factor of functional intestinal disorders? *Clin Nutr Edinb Scotl.* 38(5):2304–2310. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2018.10.004>
- Hann ZS, Ji C, Olsen SK, Lu X, Lux MC, Tan DS, Lima CD. 2019. Structural basis for adenylation and thioester bond formation in the ubiquitin E1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116(31):15475–15484. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905488116>
- Hardee JP, Lynch GS. 2019. Current pharmacotherapies for sarcopenia. *Expert Opin Pharmacother.* 20(13):1645–1657. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1622093>

- Hari P, Bagga A, Mahajan P, Lakshmy R. 2007. Effect of malnutrition on serum creatinine and cystatin C levels. *Pediatr Nephrol Berl Ger*. 22(10):1757–1761. <https://doi.org/10.1007/s00467-007-0535-x>
- Harimoto N, Shirabe K, Yamashita Y-I, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Ikeda T, Maehara Y, Nishie A, Yamanaka T. 2013a. Sarcopenia as a predictor of prognosis in patients following hepatectomy for hepatocellular carcinoma: Sarcopenia and outcome of hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*. 100(11):1523–1530. <https://doi.org/10.1002/bjs.9258>
- Harimoto N, Shirabe K, Yamashita Y-I, Ikegami T, Yoshizumi T, Soejima Y, Ikeda T, Maehara Y, Nishie A, Yamanaka T. 2013b. Sarcopenia as a predictor of prognosis in patients following hepatectomy for hepatocellular carcinoma: Sarcopenia and outcome of hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Br J Surg*. 100(11):1523–1530. <https://doi.org/10.1002/bjs.9258>
- von Hessen L, Roumet M, Maurer MH, Lange N, Reeves H, Dufour J-F, Radu P. 2021. High subcutaneous adipose tissue density correlates negatively with survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver*. 41(4):828–836. <https://doi.org/10.1111/liv.14755>
- Heymsfield SB, Bethel RA, Ansley JD, Nixon DW, Rudman D. 1979. Enteral hyperalimentation: an alternative to central venous hyperalimentation. *Ann Intern Med*. 90(1):63–71. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-1-63>
- Hirabayashi T, Nakanishi R, Tanaka M, Nisa B un, Maeshige N, Kondo H, Fujino H. 2021. Reduced metabolic capacity in fast and slow skeletal muscle via oxidative stress and the energy sensing of AMPK/SIRT1 in malnutrition. *Physiol Rep [Internet]*. [accessed 2021 Jun 24] 9(5). <https://doi.org/10.14814/phy2.14763>
- Hirabayashi T, Nakanishi R, Tanaka M, Nisa BU, Maeshige N, Kondo H, Fujino H. 2021. Reduced metabolic capacity in fast and slow skeletal muscle via oxidative stress and the energy-sensing of AMPK/SIRT1 in malnutrition. *Physiol Rep*. 9(5):e14763. <https://doi.org/10.14814/phy2.14763>
- van den Hoek AM, Zondag GCM, Verschuren L, de Ruiter C, Attema J, de Wit EC, Schwerk AMK, Guigas B, Lek S, Rietman A, et al. 2019. A novel nutritional supplement prevents muscle loss and accelerates muscle mass recovery in caloric-restricted mice. *Metabolism*. 97:57–67. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2019.05.012>
- Horii N, Sawda Y, Kumamoto T, Tsuchiya N, Murakami T, Yabushita Y, Honma Y, Matsuyama R, Morioka D, Akiyama H, Endo I. 2020. Impact of intramuscular adipose tissue content on short- and long-term outcomes of hepatectomy for colorectal liver metastasis: a retrospective analysis. *World J Surg Oncol*. 18(1):68. <https://doi.org/10.1186/s12957-020-01836-5>
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, et al. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 20(7):1981–1991. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248>
- Huang J, Glauber M, Qiu Z, Gazit V, Dietzen DJ, Rudnick DA. 2012. The Influence of Skeletal Muscle on the Regulation of Liver:Body Mass and Liver Regeneration. *Am J Pathol*. 180(2):575–582. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.10.032>
- Huang T-H, Hsieh C-C, Kuo L-M, Chang C-C, Chen C-H, Chi C-C, Liu C-H. 2019. Malnutrition associated with an increased risk of postoperative complications following hepatectomy in patients with hepatocellular carcinoma. *HPB*. 21(9):1150–1155. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2019.01.003>

- Hubert MF, Laroque P, Gillet JP, Keenan KP. 2000. The effects of diet, ad Libitum feeding, and moderate and severe dietary restriction on body weight, survival, clinical pathology parameters, and cause of death in control Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 58(1):195–207. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.1.195>
- Huguet A, Latournerie M, Debry PH, Jezequel C, Legros L, Rayar M, Boudjema K, Guyader D, Jacquet EB, Thibault R. 2018. The psoas muscle transversal diameter predicts mortality in patients with cirrhosis on a waiting list for liver transplantation: A retrospective cohort study. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 51–52:73–79. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.01.008>
- Hyder O, Marques H, Pulitano C, Marsh JW, Alexandrescu S, Bauer TW, Gamblin TC, Sotiropoulos GC, Paul A, Barroso E, et al. 2014. A nomogram to predict long-term survival after resection for intrahepatic cholangiocarcinoma: an Eastern and Western experience. *JAMA Surg.* 149(5):432–438. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2013.5168>
- Ibrahim MM. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev.* 11(1):11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x>
- Imai K, Takai K, Maeda T, Watanabe S, Hanai T, Suetsugu A, Shiraki M, Shimizu M. 2018. Increased visceral fat volume raises the risk for recurrence of hepatocellular carcinoma after curative treatment. *Oncotarget* [Internet]. [accessed 2019 Dec 20] 9(18). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24500>
- Inotai A, Nuijten M, Roth E, Hegazi R, Kaló Z. 2012. Modelling the burden of disease associated malnutrition. *E-SPEN J.* 7(5):e196–e204. <https://doi.org/10.1016/j.clnme.2012.07.003>
- International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Cancer today. [accessed 2021 Sep 30]. <http://gco.iarc.fr/today/home>
- Ishizu Y, Ishigami M, Honda T, Imai N, Ito T, Yamamoto K, Fujishiro M. 2021. Impact of visceral fat accumulation on the prognosis of patients with cirrhosis. *Clin Nutr ESPEN.* 42:354–360. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.01.008>
- Iwase T, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Sakakibara J, Hayama S, Ishigami E, Masuda T, Miyazaki M. 2016. Impact of body fat distribution on neoadjuvant chemotherapy outcomes in advanced breast cancer patients. *Cancer Med.* 5(1):41–48. <https://doi.org/10.1002/cam4.571>
- Jäger S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(29):12017–12022. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705070104>
- Joglekar S, Asghar A, Mott SL, Johnson BE, Button AM, Clark E, Mezhir JJ. 2015. Sarcopenia is an independent predictor of complications following pancreatectomy for adenocarcinoma. *J Surg Oncol.* 111(6):771–775. <https://doi.org/10.1002/jso.23862>
- de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, Paul A, Alexandrescu S, Marques H, Pulitano C, Barroso E, Clary BM, Aldrighetti L, et al. 2011. Intrahepatic Cholangiocarcinoma: An International Multi-Institutional Analysis of Prognostic Factors and Lymph Node Assessment. *J Clin Oncol.* 29(23):3140–3145. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6519>
- Jouany JP, Zainab B, Senaud J, Groliere CA, Grain J, Thivend P. 1981. Rôle of the rumen ciliate protozoa *Polypastron multivesiculatum*, *Entodinium* sp. and *Isotricha prostoma* in the digestion of a mixed diet in sheep. *Reprod Nutr Dév.* 21(6A):871–884. <https://doi.org/10.1051/rnd:19810701>
- Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim D-H. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol*

- Cell. 20(7):1992–2003. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249>
- Kahn D, Hickman R, Terblanche J, von Sommoggy S. 1988. Partial hepatectomy and liver regeneration in pigs--the response to different resection sizes. *J Surg Res.* 45(2):176–180.
- Kalinkovich A, Livshits G. 2017. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Res Rev.* 35:200–221. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.09.008>
- Kam I, Lynch S, Svanas G, Todo S, Polimeno L, Francavilla A, Penkrot RJ, Takaya S, Ericzon BG, Starzl TE, Van Thiel DH. 1987. Evidence that Host Size Determines Liver Size: Studies in Dogs Receiving Orthotopic Liver Transplants. *Hepatology* 7(2):362–366.
- Kameda M, Teruya T, Yanagida M, Kondoh H. 2021. Reduced uremic metabolites are prominent feature of sarcopenia, distinct from antioxidative markers for frailty. *Aging.* 13(17):20915–20934. <https://doi.org/10.18632/aging.203498>
- Kaushik S, Cuervo AM. 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 19(6):365–381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>
- Keys A, Henschel A, Mickelsen O, Taylor HL. *The Biology of Human Starvation*. 1–2 Minneapolis, MN: University of Minnesota Press; 1950.
- Kheloufi M, Boulanger CM, Durand F, Rautou P-E. 2014. Liver autophagy in anorexia nervosa and acute liver injury. *BioMed Res Int.* 2014:701064. <https://doi.org/10.1155/2014/701064>
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 13(2):132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>
- Kim JY. 2013. Hindlimb muscle atrophy occurs from short-term undernutrition in rats. *Biol Res Nurs.* 15(4):459–464. <https://doi.org/10.1177/1099800412459882>
- Kinoshita H, Sakai K, Hirohashi K, Igawa S, Yamasaki O, Kubo S. 1986. Preoperative portal vein embolization for hepatocellular carcinoma. *World J Surg.* 10(5):803–808. <https://doi.org/10.1007/BF01655244>
- Kleiger G, Mayor T. 2014. Perilous journey: a tour of the ubiquitin–proteasome system. *Trends Cell Biol.* 24(6):352–359. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.12.003>
- Kobayashi A, Kaido T, Hamaguchi Y, Okumura S, Shirai H, Kamo N, Yagi S, Taura K, Okajima H, Uemoto S. 2018. Impact of Visceral Adiposity as Well as Sarcopenic Factors on Outcomes in Patients Undergoing Liver Resection for Colorectal Liver Metastases. *World J Surg.* 42(4):1180–1191. <https://doi.org/10.1007/s00268-017-4255-5>
- Kobayashi A, Kaido T, Hamaguchi Y, Okumura S, Shirai H, Yao S, Kamo N, Yagi S, Taura K, Okajima H, Uemoto S. 2019. Impact of Sarcopenic Obesity on Outcomes in Patients Undergoing Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg.* 269(5):924–931. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002555>
- Kroh A, Uschner D, Lodewick T, Eickhoff RM, Schöning W, Ulmer FT, Neumann UP, Binnebösel M. 2019. Impact of body composition on survival and morbidity after liver resection in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 18(1):28–37. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2018.07.008>
- Kwak JY, Kwon K-S. 2019. Pharmacological Interventions for Treatment of Sarcopenia: Current Status of Drug Development for Sarcopenia. *Ann Geriatr Med Res.* 23(3):98–104. <https://doi.org/10.4235/agmr.19.0028>
- Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. 2016. Body

- Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 375(8):794–798. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1606602>
- Lee DU, Wang E, Fan GH, Hastie DJ, Addonizio EA, Chou H, Karagozian R. 2021. Malnutrition as a risk factor of adverse postoperative outcomes in patients undergoing hepatic resection: analysis of US hospitals. *Br J Nutr.*:1–28. <https://doi.org/10.1017/S0007114521003809>
- Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang H-G. 2010. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PloS One.* 5(11):e15394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015394>
- Litten-Brown JC, Corson AM, Clarke L. 2010. Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *Anim Int J Anim Biosci.* 4(6):899–920. <https://doi.org/10.1017/S1751731110000200>
- Lodewick TM, van Nijnatten TJA, van Dam RM, van Mierlo K, Dello SAWG, Neumann UP, Olde Damink SWM, Dejong CHC. 2015. Are sarcopenia, obesity and sarcopenic obesity predictive of outcome in patients with colorectal liver metastases? *HPB.* 17(5):438–446. <https://doi.org/10.1111/hpb.12373>
- Loh KW, Vriens MR, Gerritsen A, Borel Rinkes IHM, van Hillegersberg R, Schippers C, Steenhagen E, Ong TA, Moy FM, Molenaar IQ. 2012. Unintentional weight loss is the most important indicator of malnutrition among surgical cancer patients. *Neth J Med.* 70(8):365–369.
- Lokireddy S, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R, McFarlane C. 2011. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *Am J Physiol Cell Physiol.* 301(6):C1316–1324. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00114.2011>
- Lv Y, Ji M-L, Feng Q-Y, Zhu D-X, Lin S-B, Mao Y-H, Xu Y-Q, Zheng P, He G-D, Xu J-M. 2019. Combined test of third lumbar skeletal muscle index and prognostic nutrition index improve prognosis prediction power in resected colorectal cancer liver metastasis. *Aging.* 11(22):10301–10315. <https://doi.org/10.18632/aging.102457>
- Lykke M, Hother A-L, Hansen CF, Friis H, Mølgaard C, Michaelsen KF, Briend A, Larsen T, Sangild PT, Thymann T. 2013. Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition. *Am J Transl Res.* 5(5):543–554.
- Machairas N, Tsilimigras DI, Pawlik TM. 2021. State-of-the-art surgery for hepatocellular carcinoma. *Langenbecks Arch Surg.* <https://doi.org/10.1007/s00423-021-02298-3>
- Madeira MS, Pires VMR, Alfaia CM, Lopes PA, Martins SV, Pinto RMA, Prates JAM. 2016. Restriction of dietary protein does not promote hepatic lipogenesis in lean or fatty pigs. *Br J Nutr.* 115(8):1339–1351. <https://doi.org/10.1017/S0007114516000453>
- Madoff DC, Abdalla EK, Vauthey J-N. 2005. Portal vein embolization in preparation for major hepatic resection: evolution of a new standard of care. *J Vasc Interv Radiol JVIR.* 16(6):779–790. <https://doi.org/10.1097/01.RVI.0000159543.28222.73>
- Marra M, De Filippo E, Signorini A, Silvestri E, Pasanisi F, Contaldo F, Scalfi L. 2005. Phase angle is a predictor of basal metabolic rate in female patients with anorexia nervosa. *Physiol Meas.* 26(2):S145–152. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/26/2/014>
- Martin L, Birdsell L, Macdonald N, Reiman T, Clandinin MT, McCargar LJ, Murphy R, Ghosh S, Sawyer MB, Baracos VE. 2013. Cancer cachexia in the age of obesity: skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 31(12):1539–1547.

<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2722>

- Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, Leeuwenburgh C. 2013. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol.* 45(10):2288–2301. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.06.024>
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S, Sandri M. 2009. Autophagy Is Required to Maintain Muscle Mass. *Cell Metab.* 10(6):507–515. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.10.008>
- Massarweh NN, El-Serag HB. 2017. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent.* 24(3):1073274817729245. <https://doi.org/10.1177/1073274817729245>
- Masuoka H, Suda W, Tomitsuka E, Shindo C, Takayasu L, Horwood P, Greenhill AR, Hattori M, Umezaki M, Hirayama K. 2020. The influences of low protein diet on the intestinal microbiota of mice. *Sci Rep.* 10:17077. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74122-9>
- Mauland KK, Eng Ø, Ytre-Hauge S, Tangen IL, Berg A, Salvesen HB, Salvesen ØO, Krakstad C, Trovik J, Hoivik EA, et al. 2017. High visceral fat percentage is associated with poor outcome in endometrial cancer. *Oncotarget.* 8(62):105184–105195. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21917>
- Mavros MN, Economopoulos KP, Alexiou VG, Pawlik TM. 2014. Treatment and Prognosis for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Surg.* 149(6):565. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2013.5137>
- McGovern J, Dolan RD, Horgan PG, Laird BJ, McMillan DC. 2021. Computed tomography-defined low skeletal muscle index and density in cancer patients: observations from a systematic review. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* <https://doi.org/10.1002/jcsm.12831>
- McGown C, Birerdinc A, Younossi ZM. 2014. Adipose tissue as an endocrine organ. *Clin Liver Dis.* 18(1):41–58. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.09.012>
- McPherron AC, Lee SJ. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(23):12457–12461. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12457>
- Michalopoulos GK. 2010. Liver Regeneration after Partial Hepatectomy. *Am J Pathol.* 176(1):2–13. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090675>
- Michalopoulos GK. 2014. Advances in liver regeneration. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 8(8):897–907. <https://doi.org/10.1586/17474124.2014.934358>
- Michalopoulos GK. 2017. Hepatostat: Liver regeneration and normal liver tissue maintenance. *Hepatol Baltim Md.* 65(4):1384–1392. <https://doi.org/10.1002/hep.28988>
- Michalopoulos GK, Bhushan B. 2021. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 18(1):40–55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>
- Milan G, Romanello V, Pescatore F, Armani A, Paik J-H, Frasson L, Seydel A, Zhao J, Abraham R, Goldberg AL, et al. 2015. Regulation of autophagy and the ubiquitin–proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. *Nat Commun.* 6(1):6670. <https://doi.org/10.1038/ncomms7670>
- Miller ER, Ullrey DE. 1987a. The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 7:361–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.07.070187.002045>
- Miller ER, Ullrey DE. 1987b. The pig as a model for human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 7:361–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.07.070187.002045>
- Miller KD, Jones E, Yanovski JA, Shankar R, Feuerstein I, Falloon J. 1998. Visceral

- abdominal-fat accumulation associated with use of indinavir. *Lancet Lond Engl*. 351(9106):871–875. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)11518-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11518-5)
- Mitsiopoulos N, Baumgartner RN, Heymsfield SB, Lyons W, Gallagher D, Ross R. 1998. Cadaver validation of skeletal muscle measurement by magnetic resonance imaging and computerized tomography. *J Appl Physiol*. 85(1):115–122.
- Miyamoto Y, Baba Y, Sakamoto Y, Ohuchi M, Tokunaga R, Kurashige J, Hiyoshi Y, Iwagami S, Yoshida N, Yoshida M, et al. 2015. Sarcopenia is a Negative Prognostic Factor After Curative Resection of Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 22(8):2663–2668. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4281-6>
- Miyamoto Y, Hanna DL, Zhang W, Baba H, Lenz H-J. 2016. Molecular Pathways: Cachexia Signaling-A Targeted Approach to Cancer Treatment. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 22(16):3999–4004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0495>
- Mohamed AB, Rémond D, Chambon C, Sayd T, Hébraud M, Capel F, Cohade B, Hafnaoui N, Béchet D, Coudy-Gandilhon C, et al. 2019. A mix of dietary fermentable fibers improves lipids handling by the liver of overfed minipigs. *J Nutr Biochem*. 65:72–82. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.12.002>
- Molfino A, Imbimbo G, Muscaritoli M. 2021. Role of metabolic changes of adiposity in cancer. *Trends Endocrinol Metab*. TEM.:S1043-2760(21)00200–9. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.08.007>
- Montano-Loza AJ, Angulo P, Meza-Junco J, Prado CMM, Sawyer MB, Beaumont C, Esfandiari N, Ma M, Baracos VE. 2016. Sarcopenic obesity and myosteatosis are associated with higher mortality in patients with cirrhosis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 7(2):126–135. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12039>
- Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. 2007. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet*. 3(5):e79. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030079>
- Mourtzakis M, Prado CMM, Lieffers JR, Reiman T, McCargar LJ, Baracos VE. 2008. A practical and precise approach to quantification of body composition in cancer patients using computed tomography images acquired during routine care. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab*. 33(5):997–1006. <https://doi.org/10.1139/H08-075>
- Nault J-C, Pigneur F, Nelson AC, Costentin C, Tselikas L, Katsahian S, Diao G, Laurent A, Mallat A, Duvoux C, et al. 2015. Visceral fat area predicts survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver*. 47(10):869–876. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2015.07.001>
- Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, Bechstein WO, Primrose JN, Walpole ET, Finch-Jones M, et al. 2013. Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 14(12):1208–1215. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70447-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70447-9)
- Núñez IN, Galdeano CM, Carmuega E, Weill R, de Moreno de LeBlanc A, Perdigon G. 2013. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein-energy malnutrition. *Br J Nutr*. 110(3):500–508. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005302>
- Ochoa M, Val-Laillet D, Lallès J-P, Meurice P, Malbert C-H. 2016. Obesogenic diets have deleterious effects on fat deposits irrespective of the nature of dietary carbohydrates in a Yucatan minipig model. *Nutr Res*. 36(9):947–954.

<https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.07.003>

- Okamura A, Watanabe M, Yamashita K, Yuda M, Hayami M, Imamura Y, Mine S. 2018. Implication of visceral obesity in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Langenbecks Arch Surg*. 403(2):245–253. <https://doi.org/10.1007/s00423-017-1643-0>
- Oku M, Sakai Y. 2018. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays*. 40(6):1800008. <https://doi.org/10.1002/bies.201800008>
- Okumura S, Kaido T, Hamaguchi Y, Fujimoto Y, Masui T, Mizumoto M, Hammad A, Mori A, Takaori K, Uemoto S. 2015. Impact of preoperative quality as well as quantity of skeletal muscle on survival after resection of pancreatic cancer. *Surgery*. 157(6):1088–1098. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.02.002>
- Okumura S, Kaido T, Hamaguchi Y, Kobayashi A, Shirai H, Fujimoto Y, Iida T, Yagi S, Taura K, Hatano E, et al. 2016. Impact of Skeletal Muscle Mass, Muscle Quality, and Visceral Adiposity on Outcomes Following Resection of Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol* [Internet]. [accessed 2016 Dec 27]. <https://doi.org/10.1245/s10434-016-5668-3>
- Ong WK, Tan CS, Chan KL, Goesantoso GG, Chan XHD, Chan E, Yin J, Yeo CR, Khoo CM, So JBY, et al. 2014. Identification of Specific Cell-Surface Markers of Adipose-Derived Stem Cells from Subcutaneous and Visceral Fat Depots. *Stem Cell Rep*. 2(2):171–179. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.002>
- Ono Y, Sorimachi H. 2012. Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochim Biophys Acta*. 1824(1):224–236. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.005>
- Owen OE, Reichle FA, Mozzoli MA, Kreulen T, Patel MS, Elfenbein IB, Golsorkhi M, Chang KH, Rao NS, Sue HS, Boden G. 1981. Hepatic, gut, and renal substrate flux rates in patients with hepatic cirrhosis. *J Clin Invest*. 68(1):240–252. <https://doi.org/10.1172/jci110240>
- Paddon-Jones D, Sheffield-Moore M, Cree MG, Hewlings SJ, Aarsland A, Wolfe RR, Ferrando AA. 2006. Atrophy and impaired muscle protein synthesis during prolonged inactivity and stress. *J Clin Endocrinol Metab*. 91(12):4836–4841. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0651>
- Pan F, Zhang L, Li M, Hu Y, Zeng B, Yuan H, Zhao L, Zhang C. 2018. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammaging effects in calorie-restricted mice. *Microbiome*. 6(1):54. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0440-5>
- Pang X, Hua X, Yang Q, Ding D, Che C, Cui L, Jia W, Bucheli P, Zhao L. 2007. Interspecies transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME J*. 1(2):156–162. <https://doi.org/10.1038/ismej.2007.23>
- Paniagua R, Santos D, Muñoz R, Luengas J, Frenk S. 1980. Renal function in protein-energy malnutrition. *Pediatr Res*. 14(11):1260–1262. <https://doi.org/10.1203/00006450-198011000-00021>
- Park CY, Park S, Kim MS, Kim H-K, Han SN. 2017. Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 490(3):636–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.090>
- Patel MS, Natanek SA, Stratakos G, Pascual S, Martínez-Llorens J, Disano L, Terzis G, Hopkinson NS, Gea J, Vogiatzis I, et al. 2014. Vastus Lateralis Fiber Shift Is an Independent Predictor of Mortality in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 190(3):350–352. <https://doi.org/10.1164/rccm.201404-0713LE>
- Patel T. 2001. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma

- in the United States. *Hepatology* Baltim Md. 33(6):1353–1357. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.25087>
- Pedersen HD, Galsgaard ED, Christoffersen BØ, Cirera S, Holst D, Fredholm M, Latta M. 2020. NASH-inducing Diets in Göttingen Minipigs. *J Clin Exp Hepatol*. 10(3):211–221. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2019.09.004>
- Peng PD, van Vledder MG, Tsai S, de Jong MC, Makary M, Ng J, Edil BH, Wolfgang CL, Schulick RD, Choti MA, et al. 2011. Sarcopenia negatively impacts short-term outcomes in patients undergoing hepatic resection for colorectal liver metastasis. *HPB*. 13(7):439–446. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2011.00301.x>
- Petersen JS, Henckel P, Oksbjerg N, Sørensen MT. 1998. Adaptations in muscle fibre characteristics induced by physical activity in pigs. *Anim Sci*. 66(3):733–740. <https://doi.org/10.1017/S1357729800009310>
- Petrack JL, Florio AA, Znaor A, Ruggieri D, Laversanne M, Alvarez CS, Ferlay J, Valery PC, Bray F, McGlynn KA. International trends in hepatocellular carcinoma incidence, 1978–2012. *Int J Cancer* [Internet]. [accessed 2020 Apr 14] n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/ijc.32723>
- Pierre N, Appriou Z, Gratas-Delamarche A, Derbré F. 2016a. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radic Biol Med*. 98:197–207. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.028>
- Pierre N, Appriou Z, Gratas-Delamarche A, Derbré F. 2016b. From physical inactivity to immobilization: Dissecting the role of oxidative stress in skeletal muscle insulin resistance and atrophy. *Free Radic Biol Med*. 98:197–207. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.028>
- Polakof S, Rémond D, David J, Dardevet D, Savary-Auzeloux I. 2018a. Time-course changes in circulating branched-chain amino acid levels and metabolism in obese Yucatan minipig. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 50:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.11.004>
- Polakof S, Rémond D, David J, Dardevet D, Savary-Auzeloux I. 2018b. Time-course changes in circulating branched-chain amino acid levels and metabolism in obese Yucatan minipig. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif*. 50:66–73. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.11.004>
- Prado CM, Lieffers JR, McCargar LJ, Reiman T, Sawyer MB, Martin L, Baracos VE. 2008. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study. *Lancet Oncol*. 9(7):629–635.
- Pravisan R, Soyama A, Ono S, Baccarani U, Isola M, Takatsuki M, Hidaka M, Adachi T, Hara T, Hamada T, et al. 2020. Is there any correlation between liver graft regeneration and recipient's pretransplant skeletal muscle mass?—a study in extended left lobe graft living-donor liver transplantation. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 9(2):183–194. <https://doi.org/10.21037/hbsn.2019.11.08>
- Quillot D. 2016. *Traité de Nutrition Clinique*. [place unknown].
- Raven, PB, Wasserman DH, Squires WG Jr, Muray TD. 2013. *Exercise physiology: an integrative approach*. Wadsworth Cengage Learning. Belmont CA.
- Risi R, Tuccinardi D, Mariani S, Lubrano C, Manfrini S, Donini LM, Watanabe M. 2021. Liver disease in obesity and underweight: the two sides of the coin. A narrative review. *Eat Weight Disord EWD*. 26(7):2097–2107. <https://doi.org/10.1007/s40519-020-01060-w>
- Riva A, Pigni M, Nacinovich R. 2021. Renal dysfunctions and clinical correlates in adolescents with restrictive anorexia nervosa. *Clin Nutr ESPEN*. 43:230–234.

<https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.04.011>

- Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A, Seiliez I, Picard B, Bonniieu A. 2014. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 71(22):4361–4371. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1689-x>
- Roh E, Choi KM. 2020. Health Consequences of Sarcopenic Obesity: A Narrative Review. *Front Endocrinol*. 11:332. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00332>
- Rooks D, Roubenoff R. 2019. Development of Pharmacotherapies for the Treatment of Sarcopenia. *J Frailty Aging*. 8(3):120–130. <https://doi.org/10.14283/jfa.2019.11>
- Roura E, Koopmans S-J, Lallès J-P, Le Huerou-Luron I, de Jager N, Schuurman T, Val-Laillet D. 2016. Critical review evaluating the pig as a model for human nutritional physiology. *Nutr Res Rev*. 29(1):60–90. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000020>
- Ruiz-Rosado A, Cabrera-Fuentes HA, González-Calixto C, González-López L, Cázares-Raga FE, Segura-Alegría B, Lochnit G, de la Cruz Hernández-Hernández F, Preissner KT, Jiménez-Estrada I. 2013. Influence of chronic food deprivation on structure–function relationship of juvenile rat fast muscles. *J Muscle Res Cell Motil*. 34(5–6):357–368. <https://doi.org/10.1007/s10974-013-9357-6>
- Runkel M, Diallo TD, Lang SA, Bamberg F, Benndorf M, Fichtner-Feigl S. 2021. The Role of Visceral Obesity, Sarcopenia and Sarcopenic Obesity on Surgical Outcomes After Liver Resections for Colorectal Metastases. *World J Surg*. 45(7):2218–2226. <https://doi.org/10.1007/s00268-021-06073-9>
- Salameh E, Morel FB, Zeilani M, Déchelotte P, Marion-Letellier R. 2019. Animal Models of Undernutrition and Enteropathy as Tools for Assessment of Nutritional Intervention. *Nutrients*. 11(9):2233. <https://doi.org/10.3390/nu11092233>
- Salles J, Cardinault N, Patrac V, Berry A, Giraudet C, Collin M-L, Chanet A, Tagliaferri C, Denis P, Pouyet C, et al. 2014. Bee pollen improves muscle protein and energy metabolism in malnourished old rats through interfering with the Mtor signaling pathway and mitochondrial activity. *Nutrients*. 6(12):5500–5516. <https://doi.org/10.3390/nu6125500>
- Salles J, Chanet A, Berry A, Giraudet C, Patrac V, Domingues-Faria C, Rocher C, Guillet C, Denis P, Pouyet C, et al. 2017. Fast digestive, leucine-rich, soluble milk proteins improve muscle protein anabolism, and mitochondrial function in undernourished old rats. *Mol Nutr Food Res*. 61(11). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700287>
- Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, Walsh K, Schiaffino S, Lecker SH, Goldberg AL. 2004. Foxo Transcription Factors Induce the Atrophy-Related Ubiquitin Ligase Atrogin-1 and Cause Skeletal Muscle Atrophy. *Cell*. 117(3):399–412. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00400-3)
- Sartori R, Romanello V, Sandri M. 2021. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nat Commun*. 12(1):330. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20123-1>
- Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, Stantzou A, Mouisel E, Toniolo L, Ferry A, et al. 2013. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet*. 45(11):1309–1318. <https://doi.org/10.1038/ng.2772>
- Schakman O, Kalista S, Bertrand L, Lause P, Verniers J, Ketelslegers JM, Thissen JP. 2008. Role of Akt/GSK-3 β /beta-catenin transduction pathway in the muscle anti-atrophy action of insulin-like growth factor-I in glucocorticoid-treated rats. *Endocrinology*. 149(8):3900–3908. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0439>
- Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M. 2013. Mechanisms regulating

- skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280(17):4294–4314. <https://doi.org/10.1111/febs.12253>
- Schiesser M., Chen JWC, Maddern GJ, Padbury RTA. 2008. Perioperative morbidity affects long-term survival in patients following liver resection for colorectal metastases. *J Gastrointest Surg Off J Soc Surg Aliment Tract.* 12(6):1054–1060. <https://doi.org/10.1007/s11605-007-0438-y>
- Schiesser Marc, Müller S, Kirchhoff P, Breitenstein S, Schäfer M, Clavien P-A. 2008. Assessment of a novel screening score for nutritional risk in predicting complications in gastro-intestinal surgery. *Clin Nutr Edinb Scotl.* 27(4):565–570. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2008.01.010>
- Schlesinger S, Aleksandrova K, Pischon T, Fedirko V, Jenab M, Trepo E, Boffetta P, Dahm CC, Overvad K, Tjønneland A, et al. 2013. Abdominal obesity, weight gain during adulthood and risk of liver and biliary tract cancer in a European cohort. *Int J Cancer.* 132(3):645–657. <https://doi.org/10.1002/ijc.27645>
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012a. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9(7):671–675.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012b. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9(7):671–675.
- Schneider SM, Correia MITD. 2020. Epidemiology of weight loss, malnutrition and sarcopenia: A transatlantic view. *Nutrition.* 69:110581. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2019.110581>
- Schneider SM, Veyres P, Pivot X, Soummer A-M, Jambou P, Filippi J, van Obberghen E, Hébuterne X. 2004. Malnutrition is an independent factor associated with nosocomial infections. *Br J Nutr.* 92(1):105–111. <https://doi.org/10.1079/BJN20041152>
- Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee S-J. 2004. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med.* 350(26):2682–2688. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040933>
- Schuetz P, Seres D, Lobo DN, Gomes F, Kaegi-Braun N, Stanga Z. 2021. Management of disease-related malnutrition for patients being treated in hospital. *Lancet Lond Engl.* S0140-6736(21)01451–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)01451-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)01451-3)
- Schwartz LM. 2019. Skeletal Muscles Do Not Undergo Apoptosis During Either Atrophy or Programmed Cell Death-Revisiting the Myonuclear Domain Hypothesis. *Front Physiol.* 9:1887. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01887>
- Shen W, Punyanitya M, Wang Z, Gallagher D, St-Onge M-P, Albu J, Heymsfield SB, Heshka S. 2004a. Total body skeletal muscle and adipose tissue volumes: estimation from a single abdominal cross-sectional image. *J Appl Physiol.* 97(6):2333–2338. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00744.2004>
- Shen W, Punyanitya M, Wang Z, Gallagher D, St-Onge M-P, Albu J, Heymsfield SB, Heshka S. 2004b. Total body skeletal muscle and adipose tissue volumes: estimation from a single abdominal cross-sectional image. *J Appl Physiol.* 97(6):2333–2338. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00744.2004>
- Sherwood L. 2010. Human Physiology. Brooks/Cole-Cengage Learning. Belmont CA.
- Shiozawa T, Kikuchi Y, Wakabayashi T, Matsuo K, Takahashi Y, Tanaka K. 2020. Body composition as reflected by intramuscular adipose tissue content may influence short- and long-term outcome following 2-stage liver resection for colorectal liver metastases. *Langenbecks Arch Surg.* 405(6):757–766. <https://doi.org/10.1007/s00423-020-01973-1>
- Shteyer E, Liao Y, Muglia LJ, Hruz PW, Rudnick DA. 2004. Disruption of hepatic

- adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology* Baltim Md. 40(6):1322–1332. <https://doi.org/10.1002/hep.20462>
- Siddiqui A, Parkash O, Hashmi SA. 2021. Malnutrition and liver disease in a developing country. *World J Gastroenterol*. 27(30):4985–4998. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i30.4985>
- Sieber CC. 2019. Malnutrition and sarcopenia. *Aging Clin Exp Res*. 31(6):793–798. <https://doi.org/10.1007/s40520-019-01170-1>
- Siff T, Parajuli P, Razzaque MS, Atfi A. 2021. Cancer-Mediated Muscle Cachexia: Etiology and Clinical Management. *Trends Endocrinol Metab*. 32(6):382–402. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2021.03.007>
- Silveira EA, da Silva Filho RR, Spexoto MCB, Haghighatdoost F, Sarrafzadegan N, de Oliveira C. 2021. The Role of Sarcopenic Obesity in Cancer and Cardiovascular Disease: A Synthesis of the Evidence on Pathophysiological Aspects and Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 22(9):4339. <https://doi.org/10.3390/ijms22094339>
- Singh R, Letai A, Sarosiek K. 2019. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 20(3):175–193. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- de Sire R, Rizzatti G, Ingravalle F, Pizzoferrato M, Petito V, Lopetuso L, Graziani C, de Sire A, Mentella MC, Mele MC, et al. 2018. Skeletal muscle-gut axis: emerging mechanisms of sarcopenia for intestinal and extra intestinal diseases. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 64(4):351–362. <https://doi.org/10.23736/S1121-421X.18.02511-4>
- Smith MI, Yatsunenkov T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, Kau AL, Rich SS, Concannon P, Mychaleckyj JC, et al. 2013a. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*. 339(6119):548–554. <https://doi.org/10.1126/science.1229000>
- Smith MI, Yatsunenkov T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, Kau AL, Rich SS, Concannon P, Mychaleckyj JC, et al. 2013b. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science*. 339(6119):548–554. <https://doi.org/10.1126/science.1229000>
- Snider JT, Linthicum MT, Wu Y, LaVallee C, Lakdawalla DN, Hegazi R, Matarese L. 2014. Economic Burden of Community-Based Disease-Associated Malnutrition in the United States. *J Parenter Enter Nutr*. 38(2S):77S–85S. <https://doi.org/10.1177/0148607114550000>
- Spadini S, Ferro M, Lamanna J, Malgaroli A. 2021. Activity-based anorexia animal model: a review of the main neurobiological findings. *J Eat Disord*. 9:123. <https://doi.org/10.1186/s40337-021-00481-x>
- Sparks LM, Redman LM, Conley KE, Harper M-E, Yi F, Hodges A, Eroshkin A, Costford SR, Gabriel ME, Shook C, et al. 2017. Effects of 12 Months of Caloric Restriction on Muscle Mitochondrial Function in Healthy Individuals. *J Clin Endocrinol Metab*. 102(1):111–121. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3211>
- Spurlock ME, Gabler NK. 2008. The development of porcine models of obesity and the metabolic syndrome. *J Nutr*. 138(2):397–402. <https://doi.org/10.1093/jn/138.2.397>
- Srikantia SG, Jacob CM, Reddy V, Hyderabad T. 1964. SERUM ENZYME LEVELS IN PROTEIN-CALORIE MALNUTRITION. STUDIES IN CHILDREN WITH KWASHIORKOR AND MARASMUS. *Am J Dis Child* 1960. 107:256–259. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1964.02080060258006>
- Sulpice L, Rayar M, Boucher E, Pracht M, Meunier B, Boudjema K. 2012. Treatment of recurrent intrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Surg*. 99(12):1711–1717.

<https://doi.org/10.1002/bjs.8953>

- Taiwo OO, Thomas KD. 1992. Plasma biochemical parameters in Nigerian children with protein energy malnutrition. *East Afr Med J.* 69(8):428–432.
- Takagi K, Yagi T, Yoshida R, Shinoura S, Umeda Y, Nobuoka D, Kuise T, Watanabe N, Fujiwara T. 2016. Sarcopenia and American Society of Anesthesiologists Physical Status in the Assessment of Outcomes of Hepatocellular Carcinoma Patients Undergoing Hepatectomy. *Acta Med Okayama.* 70(5):8.
- Thevananther S. 2010. Adipose to the rescue: Peripheral fat fuels liver regeneration. *Hepatology.* 52(6):1875–1876. <https://doi.org/10.1002/hep.24057>
- Thibault R, Genton L, Pichard C. 2012. Body composition: why, when and for who? *Clin Nutr Edinb Scotl.* 31(4):435–447. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2011.12.011>
- Tomas E, Tsao T-S, Saha AK, Murrey HE, Zhang C cheng, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: Acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(25):16309–16313. <https://doi.org/10.1073/pnas.222657499>
- Tsilimigras DI, Brodt P, Clavien P-A, Muschel RJ, D'Angelica MI, Endo I, Parks RW, Doyle M, de Santibañes E, Pawlik TM. 2021. Liver metastases. *Nat Rev Dis Primer.* 7(1):27. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00261-6>
- Val-Laillet D. 2019. Review: Impact of food, gut-brain signals and metabolic status on brain activity in the pig model: 10 years of nutrition research using in vivo brain imaging. *Anim Int J Anim Biosci.* 13(11):2699–2713. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001745>
- Val-Laillet D, Blat S, Louveau I, Malbert CH. 2010. A computed tomography scan application to evaluate adiposity in a minipig model of human obesity. *Br J Nutr.* 104(11):1719–1728. <https://doi.org/10.1017/S0007114510002667>
- Val-Laillet D, Layec S, Guérin S, Meurice P, Malbert C-H. 2011. Changes in Brain Activity After a Diet-Induced Obesity. *Obesity.* 19(4):749–756. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.292>
- Valle JW, Kelley RK, Nervi B, Oh D-Y, Zhu AX. 2021. Biliary tract cancer. *Lancet Lond Engl.* 397(10272):428–444. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00153-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00153-7)
- Van Thiel DH, Gavalier JS, Kam I, Francavilla A, Polimeno L, Schade RR, Smith J, Diven W, Penkrot RJ, Starzl TE. 1987. Rapid growth of an intact human liver transplanted into a recipient larger than the donor. *Gastroenterology.* 93(6):1414–1419. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(87\)90274-5](https://doi.org/10.1016/0016-5085(87)90274-5)
- Varian BJ, Goureshetti S, Poutahidis T, Lakritz JR, Levkovich T, Kwok C, Teliousis K, Ibrahim YM, Mirabal S, Erdman SE. 2016. Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget.* 7(11):11803.
- Vazeille C, Jouinot A, Durand J-P, Neveux N, Boudou-Rouquette P, Huillard O, Alexandre J, Cynober L, Goldwasser F. 2017. Relation between hypermetabolism, cachexia, and survival in cancer patients: a prospective study in 390 cancer patients before initiation of anticancer therapy. *Am J Clin Nutr.* 105(5):1139–1147. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.140434>
- Villanueva A. 2019. Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* 380(15):1450–1462. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1713263>
- Viollet B, Foretz M. 2011. « Se manger soi-même » pour survivre: Régulation coordonnée de l'autophagie par les nutriments. *médecine/sciences.* 27(6–7):569–571. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011276002>
- van Vledder MG, Levolger S, Ayez N, Verhoef C, Tran TCK, IJzermans JNM. 2012. Body

- composition and outcome in patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg.* 99(4):550–557. <https://doi.org/10.1002/bjs.7823>
- Vodicka P, Smetana K, Dvoránková B, Emerick T, Xu YZ, Ourednik J, Ourednik V, Motlík J. 2005. The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann N Y Acad Sci.* 1049:161–171. <https://doi.org/10.1196/annals.1334.015>
- Voron T, Tselikas L, Pietrasz D, Pigneur F, Laurent A, Compagnon P, Salloum C, Luciani A, Azoulay D. 2015. Sarcopenia Impacts on Short- and Long-term Results of Hepatectomy for Hepatocellular Carcinoma: *Ann Surg.* 261(6):1173–1183. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000000743>
- van Vugt JLA, Leveloger S, de Bruin RWF, van Rosmalen J, Metselaar HJ, IJzermans JNM. 2016. Systematic Review and Meta-Analysis of the Impact of Computed Tomography–Assessed Skeletal Muscle Mass on Outcome in Patients Awaiting or Undergoing Liver Transplantation. *Am J Transplant.* 16(8):2277–2292. <https://doi.org/10.1111/ajt.13732>
- Waalboer RB, Meyer YM, Galjart B, Olthof PB, van Vugt JLA, Grünhagen DJ, Verhoef C. 2021. Sarcopenia and long-term survival outcomes after local therapy for colorectal liver metastasis: a meta-analysis. *HPB.*:S1365182X21015914. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2021.08.947>
- Wada Y, Komatsu Y, Izumi H, Shimizu T, Takeda Y, Kuwahata M. 2018. Increased Ratio of Non-mercaptalbumin-1 Among Total Plasma Albumin Demonstrates Potential Protein Undernutrition in Adult Rats. *Front Nutr.* 5:64. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00064>
- Wajswol E, Jazmati T, Contractor S, Kumar A. 2018. Portal Vein Embolization Utilizing N-Butyl Cyanoacrylate for Contralateral Lobe Hypertrophy Prior to Liver Resection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 41(9):1302–1312. <https://doi.org/10.1007/s00270-018-1964-6>
- Wang H, Listrat A, Meunier B, Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Combaret L, Taillandier D, Polge C, Attaix D, Lethias C, et al. 2014. Apoptosis in capillary endothelial cells in ageing skeletal muscle. *Aging Cell.* 13(2):254–262. <https://doi.org/10.1111/accel.12169>
- Wang Y, Li J, Xia Y, Gong R, Wang K, Yan Z, Wan X, Liu G, Wu D, Shi L, et al. 2013. Prognostic nomogram for intrahepatic cholangiocarcinoma after partial hepatectomy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 31(9):1188–1195. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.41.5984>
- Wang Y, Pessin JE. 2013. Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 16(3):243–250. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328360272d>
- Welle S, Burgess K, Mehta S. 2009. Stimulation of skeletal muscle myofibrillar protein synthesis, p70 S6 kinase phosphorylation, and ribosomal protein S6 phosphorylation by inhibition of myostatin in mature mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 296(3):E567–572. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90862.2008>
- Welsh GI, Miller CM, Loughlin AJ, Price NT. 1998. Regulation of eukaryotic initiation factor eIF2B: glycogen synthase kinase-3 phosphorylates a conserved serine which undergoes dephosphorylation in response to insulin. *FEBS Lett.* 421(2):125–130. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01548-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01548-2)
- Weymann A, Hartman E, Gazit V, Wang C, Glauber M, Turmelle Y, Rudnick DA. 2009. p21 is required for dextrose-mediated inhibition of mouse liver regeneration. *Hepatol Baltim Md.* 50(1):207–215. <https://doi.org/10.1002/hep.22979>
- White JP, Baynes JW, Welle SL, Kostek MC, Matesic LE, Sato S, Carson JA. 2011. The regulation of skeletal muscle protein turnover during the progression of cancer cachexia in

- the Apc(Min/+) mouse. *PloS One*. 6(9):e24650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024650>
- Wilburn D, Ismaeel A, Machek S, Fletcher E, Koutakis P. 2021. Shared and distinct mechanisms of skeletal muscle atrophy: A narrative review. *Ageing Res Rev*. 71:101463. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101463>
- Wing SS, Lecker SH, Jagoe RT. 2011. Proteolysis in illness-associated skeletal muscle atrophy: from pathways to networks. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 48(2):49–70. <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.586171>
- Witjes CDM, Karim K, Kos HE, Visser O, de Vries E, IJzermans JNM, de Man RA, Coebergh JWW, Verhoef C. 2012. Intrahepatic cholangiocarcinoma in a low endemic area: rising incidence and improved survival. *HPB*. 14(11):777–781. <https://doi.org/10.1111/j.1477-2574.2012.00536.x>
- Wu C-L, Cornwell EW, Jackman RW, Kandarian SC. 2014. NF- κ B but not FoxO sites in the MuRF1 promoter are required for transcriptional activation in disuse muscle atrophy. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 306(8):C762–C767. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00361.2013>
- Wu X, Sun R, Chen Y, Zheng X, Bai L, Lian Z, Wei H, Tian Z. 2015. Oral ampicillin inhibits liver regeneration by breaking hepatic innate immune tolerance normally maintained by gut commensal bacteria. *Hepatology*. 62(1):253–264. <https://doi.org/10.1002/hep.27791>
- Wykes LJ, Fiorotto M, Burrin DG, Del Rosario M, Frazer ME, Pond WG, Jahoor F. 1996a. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. *J Nutr*. 126(5):1481–1488. <https://doi.org/10.1093/jn/126.5.1481>
- Wykes LJ, Fiorotto M, Burrin DG, Del Rosario M, Frazer ME, Pond WG, Jahoor F. 1996b. Chronic low protein intake reduces tissue protein synthesis in a pig model of protein malnutrition. *J Nutr*. 126(5):1481–1488. <https://doi.org/10.1093/jn/126.5.1481>
- Xie W, He M, Yu D, Wu Y, Wang X, Lv S, Xiao W, Li Y. 2021. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 12(3):538–554. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12709>
- Xu L, Jing Y, Zhao C, Zhang Q, Zhao X, Yang J, Wu L, Yang Y. 2020. Preoperative computed tomography-assessed skeletal muscle index is a novel prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma following hepatectomy: a meta-analysis. *J Gastrointest Oncol*. 11(5):1040–1053. <https://doi.org/10.21037/jgo-20-122>
- Yabusaki N, Fujii T, Yamada S, Suzuki K, Sugimoto H, Kanda M, Nakayama G, Koike M, Fujiwara M, Kodera Y. 2016. Adverse impact of low skeletal muscle index on the prognosis of hepatocellular carcinoma after hepatic resection. *Int J Surg*. 30:136–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2016.04.049>
- Yoon M-S. 2017a. mTOR as a Key Regulator in Maintaining Skeletal Muscle Mass. *Front Physiol*. 8:788. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00788>
- Yoon M-S. 2017b. mTOR as a Key Regulator in Maintaining Skeletal Muscle Mass. *Front Physiol*. 8:788. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00788>
- Yoshida T, Delafontaine P. 2020. Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*. 9(9):1970. <https://doi.org/10.3390/cells9091970>
- Yoshizumi T, Nakamura T, Yamane M, Islam AH, Menju M, Yamasaki K, Arai T, Kotani K, Funahashi T, Yamashita S, Matsuzawa Y. 1999. Abdominal fat: standardized technique for measurement at CT. *Radiology*. 211(1):283–286. <https://doi.org/10.1148/radiology.211.1.r99ap15283>
- Yugawa K, Itoh S, Kurihara T, Yoshiya S, Mano Y, Takeishi K, Harada N, Ikegami T, Soejima Y, Mori M, Yoshizumi T. 2019. Skeletal muscle mass predicts the prognosis of

- patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Surg.* 218(5):952–958. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2019.03.010>
- Zanetto A, Shalaby S, Gambato M, Germani G, Senzolo M, Bizzaro D, Russo FP, Burra P. 2021. New Indications for Liver Transplantation. *J Clin Med.* 10(17):3867. <https://doi.org/10.3390/jcm10173867>
- Zhao J, Huang Y, Yu X. 2021a. A Narrative Review of Gut-Muscle Axis and Sarcopenia: The Potential Role of Gut Microbiota. *Int J Gen Med.* 14:1263–1273. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S301141>
- Zhao J, Huang Y, Yu X. 2021b. A Narrative Review of Gut-Muscle Axis and Sarcopenia: The Potential Role of Gut Microbiota. *Int J Gen Med.* 14:1263–1273. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S301141>
- Zhou G, Bao H, Zeng Q, Hu W, Zhang Q. 2015. Sarcopenia as a prognostic factor in hepatolithiasis-associated intrahepatic cholangiocarcinoma patients following hepatectomy: a retrospective study. *Int J Clin Exp Med.* 8(10):18245.
- Zijlstra RT, McCracken BA, Odle J, Donovan SM, Gelberg HB, Petschow BW, Zuckermann FA, Gaskins HR. 1999. Malnutrition modifies pig small intestinal inflammatory responses to rotavirus. *J Nutr.* 129(4):838–843. <https://doi.org/10.1093/jn/129.4.838>
- Zou WY, Enchakalody BE, Zhang P, Shah N, Saini SD, Wang NC, Wang SC, Su GL. Automated Measurements of Body Composition in Abdominal CT Scans Using Artificial Intelligence Can Predict Mortality in Patients With Cirrhosis. *Hepatol Commun* [Internet]. [accessed 2021 Oct 3] n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/hep4.1768>
- de Zwaan M, Aslam Z, Mitchell JE. 2002. Research on energy expenditure in individuals with eating disorders: a review. *Int J Eat Disord.* 32(2):127–134. <https://doi.org/10.1002/eat.10074>

Titre : Muscle, nutrition, tumeurs primitives hépatiques : de la prise en charge médico-chirurgicale à l'optimisation pronostique

Mots clés : composition corporelle, dénutrition, sarcopénie, tissu adipeux, cholangiocarcinome

Résumé :

La dénutrition est un problème de santé publique dans le monde. Elle se manifeste par une perte de masse musculaire. Celle-ci impacte négativement le pronostic de nombreux cancers, notamment les cancers du foie. L'obésité sarcopénique, dont la prévalence augmente, joue également un rôle pronostique péjoratif. La composition corporelle par scanner sur une coupe axiale passant par la 3^{ème} vertèbre lombaire est une des méthodes de diagnostic de la dénutrition et de la sarcopénie. La tomодensitométrie a l'avantage d'être utilisée au cours du suivi des patients atteints de cancer. Dans la première partie de cette thèse, nous avons évalué la prévalence de la diminution de masse musculaire, puis l'impact de la composition corporelle sur la survie globale et la survie sans récurrence chez les patients opérés à visée curative de cholangiocarcinome intrahépatique, 2^{ème} tumeur hépatique primitive la plus fréquente. Nous avons mis en évidence que la prévalence de la dénutrition pré-opératoire était élevée et que c'est l'augmentation de la graisse viscérale qui était un facteur de mauvais pronostic.

En l'absence de modèle standardisé de dénutrition protéino-énergétique chez le gros mammifère, nous avons eu pour second objectif de développer chez le miniporc Yucatan un modèle de dénutrition de type marasmique, proche de ce qui est observé dans l'anorexie restrictive humaine. Les porcs sont des animaux proches de l'Homme sur le plan physiologique, constituant un bon modèle d'étude de la composition corporelle et du métabolisme musculaire. Une restriction protéino-énergétique de 8 semaines a induit une perte de poids supérieure à 10%, une baisse de la masse musculaire et de la masse grasse, ainsi qu'une diminution de la surface des fibres musculaires. La restriction s'accompagne d'une stimulation de la phosphorylation de l'AMPK, (senseur métabolique de la cellule) et de Akt sans activation de 4EBP1 and P70S6K dans les muscles *trapezius* et *biceps femoris*, ainsi que d'une tendance à la diminution de l'expression de la myostatine dans le *trapezius*. Il a également été observé une diminution de l'alpha-diversité du microbiote intestinal.

Ce modèle mime donc bien la dénutrition marasmique humaine et pourrait notamment servir dans des études précliniques explorant l'impact de la dénutrition sur la régénération du foie.

Title: Muscle, nutrition, primary liver tumors: from medico-surgical management to prognostic optimization

Keywords: Body composition, malnutrition, sarcopenia, muscle mass, adiposity

Abstract: Malnutrition is currently a public health problem around the world, and is characterized by a loss of muscle mass. This negatively impacts the prognosis of many cancers, especially liver cancers. Sarcopenic obesity, the prevalence of which is increasing, also plays a negative prognostic role.

The assessment of body composition by CT scan targeted on the 3rd lumbar vertebra level is currently advised to diagnose malnutrition. Computed tomography has the advantage of being routinely used during the follow-up of patients with cancer.

In the first part of our work, we assessed the prevalence of decreased muscle mass and the impact of body composition on overall survival and recurrence-free survival in patients operated for curative treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma, the 2nd most frequent primary liver tumor. We show that the preoperative prevalence of malnutrition is high and that the increase of visceral fat area is associated with worse survival.

In the absence of a standardized large mammal model of protein-energy malnutrition, our second objective was to develop a Yucatan minipig model of marasmic-type malnutrition as observed in human restrictive anorexia. Pigs are physiologically close to humans, allowing the study of body composition and metabolism. An 8-week protein-energy restriction induced a weight loss greater than 10%, a decrease in muscle mass and fat mass, as well as a decrease in the cross-sectional area of muscle fibers. We observed activations of AMPK (energetic sensor of the cell) and Akt both in *biceps femoris* and *trapezius* without activation of 4EBP1 and P70S6K. Myostatin mRNA levels tended to decrease in the *trapezius* muscle, whereas no significant change was reported in the *biceps femoris*. A decreased alpha diversity of the gut microbiota was reported.

This model therefore mimics human marasmic malnutrition and could be used in particular in preclinical studies investigating the impact of malnutrition on liver regeneration.