



**HAL**  
open science

**Stratégie nutritionnelle de réduction de la sarcopénie  
chez les personnes âgées en sous-nutrition :  
enrichissement d'un aliment en probiotique “ energy  
saver ”**

Muriel Giron

► **To cite this version:**

Muriel Giron. Stratégie nutritionnelle de réduction de la sarcopénie chez les personnes âgées en sous-nutrition : enrichissement d'un aliment en probiotique “ energy saver ”. Alimentation et Nutrition. Université Clermont Auvergne, 2022. Français. NNT : 2022UCFAC124 . tel-04534083

**HAL Id: tel-04534083**

**<https://theses.hal.science/tel-04534083>**

Submitted on 5 Apr 2024

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

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

## Thèse de doctorat

Spécialité Biologie-Santé

Présentée le 8 décembre 2022 par **Muriel GIRON**

# Stratégie nutritionnelle de réduction de la sarcopénie chez les personnes âgées en sous-nutrition : enrichissement d'un aliment en probiotique « energy saver »

Dirigée par Isabelle SAVARY-AUZELOUX  
Co-dirigée par Christophe CHASSARD et Muriel THOMAS

### Membres du Jury :

<b>Yves BOIRIE</b> (Professeur, Université Clermont Auvergne, INRAE UNH – Clermont-Ferrand)	<b>Président</b>
<b>Claire CHERBUY</b> (Ingénieure de Recherche, INRAE Micalis – Jouy-en-Josas)	<b>Rapporteur</b>
<b>Vincent OLLENDORFF</b> (Directeur de Recherche, INRAE DMEM – Montpellier)	<b>Rapporteur</b>
<b>Francisca JOLY</b> (Professeure, Université Paris-Diderot, Service de Gastroentérologie, Hôpital Beaujon – Clichy)	<b>Examineur</b>
<b>Isabelle SAVARY-AUZELOUX</b> (Directrice de Recherche, INRAE UNH – Clermont-Ferrand)	<b>Examineur</b>
<b>Christophe CHASSARD</b> (Directeur de Recherche, INRAE UMR – Aurillac)	<b>Examineur</b>

Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019  
INRAE, Clermont-Ferrand/Theix  
63 122 Saint-Genès-Champanelle

Unité Mixte de Recherche sur le Fromage, UMR 0545  
INRAE, Centre Aurillac  
15 000 Aurillac

*« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »*

Albert Einstein

**Stratégie nutritionnelle de réduction de la sarcopénie chez les personnes âgées en sous nutrition : enrichissement d'un aliment en probiotique « energy saver »** – Le vieillissement s'accompagne d'une diminution de masse et de force musculaires appelée sarcopénie. Ce phénomène peut altérer les performances physiques et favoriser la fragilité, voire la dépendance chez les personnes âgées, d'autant plus lorsqu'il est associé à la dénutrition. Les suppléments protéiques et les programmes d'exercice physique sont des stratégies connues de lutte contre la sarcopénie mais peu efficaces chez des patients de faible appétit ou ayant des difficultés à se déplacer. De nouvelles approches complémentaires et plus appropriées à ces populations spécifiques doivent donc être développées. Le microbiote intestinal, dont l'implication dans la régulation de la physiologie de l'hôte n'est plus à démontrer, jouerait un rôle déterminant dans le métabolisme et la fonctionnalité des muscles squelettiques. Des études portant sur des rongeurs âgés ont ainsi montré les effets bénéfiques de traitements probiotiques sur la masse musculaire, la force ou la performance physique. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse dont l'objectif est de mettre au point un aliment fonctionnel enrichi en probiotiques capable de limiter la fonte musculaire chez l'âgé fragile. Comme réservoir de bactéries probiotiques potentielles, nous nous sommes intéressés au microbiote fécal originaire d'un patient atteint du syndrome de grêle court. Ce microbiote particulier est composé quasi-exclusivement de bactéries lactiques (Lactobacilles) et permettrait d'optimiser l'absorption et l'utilisation des nutriments chez ces patients dont la surface d'échange intestinale a été réduite par la résection. Des isolats bactériens ont été obtenus, identifiés, puis criblés sur le nématode *Caenorhabditis elegans* pour leur effet pro-longévité. Deux souches ont été retenues puis testées chez le rat âgé en restriction alimentaire modérée (modèle de fragilité) pendant 1 à 2 mois. Une des souches, *Lacticaseibacillus casei* CNCM I-5663, a permis de limiter la perte de masses maigre et musculaire chez les animaux sous-alimentés. Cet effet peut s'expliquer par une sensibilisation des muscles squelettiques aux signaux anaboliques (activation de la voie Akt/mTOR/S6K) *via* une modulation de signaux du microbiote intestinal et de la sensibilité de l'hôte à certains signaux microbiens (récepteurs GPRs au niveau de l'iléon, acides gras à chaîne ramifiée caecaux). La dernière partie de mon travail a consisté en la caractérisation des propriétés probiotiques de la souche bactérienne (capacité à résister à l'environnement gastro-intestinal, sécurité), à sa protection (par ma participation à la rédaction d'un brevet) et à valider la possibilité d'intégrer cette bactérie dans un fromage. En perspective, les effets prometteurs de cet aliment enrichi en probiotique « energy saver » devront être validés chez l'humain âgé fragile.

**Mots clés :** muscle squelettique, sarcopénie, probiotique, bactéries lactiques, sensibilité à l'insuline, synthèse protéique, *Caenorhabditis elegans*, fromage

---

**Nutritional strategy for reducing sarcopenia in undernourished elderly people: enrichment of a food with a probiotic “energy saver”** – Ageing is associated with a reduction in muscle mass and strength, called sarcopenia. This phenomenon can impair physical performance and lead to frailty or even dependence in the elderly, especially when it is associated with undernutrition. Protein supplementation and exercise can be effective strategies but difficult to implement in patients with poor appetite or physical disability. New complementary approaches more suitable to this specific population need therefore to be developed. The gut microbiota, whose involvement in host physiology is well known, plays a determining role in the optimal metabolism and function of skeletal muscles. Studies, mainly done in old rodents, have proven beneficial effects of probiotic treatments on muscle mass, strength or physical performance. The objective of my thesis project is to develop a probiotic-enriched functional food capable of limiting muscle wasting in the frail elderly. As a reservoir of potential probiotic bacteria, we focused on the faecal microbiota arising from a patient suffering from short bowel syndrome. This specific microbiota is composed almost exclusively of lactic acid bacteria (Lactobacilli) and could optimise the absorption and use of nutrients in these patients whose intestinal exchange surface has been reduced by resection. The bacterial isolates were identified and then screened on the nematode *Caenorhabditis elegans* for their pro-longevity effects. Two strains were selected and tested in aged rats under moderate food restriction (frailty model) for 1 to 2 months. One of the strains, *Lacticaseibacillus casei* CNCM I-5663, limited the loss of lean and muscle mass in undernourished animals. This effect can be explained by a sensitisation of skeletal muscles to anabolic signals (activation of the Akt/mTOR/S6K pathway) and by a modulation of microbial signals and host sensitivity to gut microbial signals (GPRs receptors in the ileum, caecal branched chain fatty acids). The last part of this work consisted in characterising the probiotic properties of the bacterial strain (capacity to resist the gastrointestinal environment, safety), protecting the strain (involved in patent drafting) and ensuring that the bacteria can be integrated into a cheese. In the future, the promising effects of this probiotic “energy saver” -enriched food will require to be validated in old frail humans.

**Keywords:** skeletal muscle, sarcopenia, probiotic, lactic acid bacteria, insulin sensitivity, protein synthesis, *Caenorhabditis elegans*, cheese

# COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES & VALORISATION

## COMMUNICATIONS ORALES

GIRON Muriel, THOMAS Muriel, JARZAGUET Marianne, DARDEVET Dominique, CHASSARD Christophe et SAVARY-AUZELOUX Isabelle. Un probiotique capable de réduire la sarcopénie chez l'âge fragile : investigation du dialogue intestin-microbiote-muscle. *Assises Régionales de Nutrition*, Octobre 2022, Clermont-Ferrand, France.

GIRON Muriel, THOMAS Muriel, BORNES Stéphanie, JARZAGUET Marianne, DARDEVET Dominique, CHASSARD Christophe and SAVARY-AUZELOUX Isabelle. A probiotic capable to reduce sarcopenia in undernourished elderly, results from a pre-clinical study. *International Conference on Frailty & Sarcopenia Research (ICFSR) On Demand*, Avril 2022, Boston, USA.

GIRON Muriel, CHASSARD Christophe and SAVARY-AUZELOUX Isabelle. How to reduce Sarcopenia in the Undernourished Elderly: Enrichment of Food with “Energy Saver” Probiotics. *Journées de l'Ecole Doctorale ED65*, Mai 2021, Clermont-Ferrand, France.

GIRON Muriel, MAYEUR Camille, BORNES Stéphanie, SAVARY-AUZELOUX Isabelle, THOMAS Muriel and CHASSARD Christophe. To build a new Lactobacillus culture collection of human origin and farther screening on cellular and *Caenorhabditis elegans* models. *20<sup>ème</sup> Colloque du Club des Bactéries Lactiques (CBL)*, Juin 2019, Caen, France.

## POSTERS

GIRON Muriel, THOMAS Muriel, BORNES Stéphanie, MAYEUR Camille, DARDEVET Dominique, CHASSARD Christophe and SAVARY-AUZELOUX Isabelle. A promising probiotic capable to reduce the impact of undernutrition on the development of sarcopenia. (Poster Tour) *44<sup>th</sup> Congress on clinical nutrition and metabolism (ESPEN)*, Septembre 2022, Vienne, Autriche.

GIRON Muriel, THOMAS Muriel, BORNES Stéphanie, JARZAGUET Marianne, MAYEUR Camille, DARDEVET Dominique, CHASSARD Christophe and SAVARY-AUZELOUX Isabelle. Bactéries probiotiques issues d'un patient souffrant du syndrome de grêle court : une stratégie prometteuse pour réduire la sarcopénie chez les personnes âgées sous-alimentées. *Journées Francophones de Nutrition (JFN)*, Novembre 2021, Lille, France.

GIRON Muriel, THOMAS Muriel, BORNES Stéphanie, MAYEUR Camille, DARDEVET Dominique, CHASSARD Christophe and SAVARY-AUZELOUX Isabelle. From our preclinical study, enrichment of food with “Energy Saver” probiotics: a promising strategy to reduce sarcopenia in undernourished elderly. *12<sup>th</sup> International Symposium on Gut Microbiology*, Octobre 2021, intégralement en ligne.

## BREVETS

L'effet de la souche *Lactocaseibacillus casei* CNCM I-5663 (et CNCM I-5662) sur la masse musculaire des rats âgés en sous-nutrition et les effets potentiels chez les humains insulino-résistants, ou fragiles au sens large, a été breveté en France courant juin 2021 (Brevet : FR2106084). Je suis co-inventrice de ce brevet. Une licence d'exploitation est en cours de négociation avec la start-up *Carembouche* (Muriel Thomas, Odile de Christen et Francisca Joly).

Un deuxième brevet, dont je suis co-inventrice, est en cours d'écriture. Ce nouveau brevet protégera une application pour des souches de l'espèce *Limosilactobacillus mucosae*.

## PUBLICATIONS

GIRON M., THOMAS M., DARDEVET D., CHASSARD C. and SAVARY-AUZELOUX I. Gut microbes and muscle function: can probiotics make our muscles stronger? *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* – mars 2022. DOI: 10.1002/jcsm.12964

GIRON M., THOMAS M., JARZAGUET M., MAYEUR C., FERRERE G., NOORDINE M.L., BORNES S., DARDEVET D., CHASSARD C. and SAVARY-AUZELOUX I. Supplementation with *Lactocaseibacillus casei* CNCM I-5663 maintained muscle mass in a model of frail rodents. *Frontiers in Nutrition* – août 2022. DOI: 10.3389/fnut.2022.928798

# REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier chaleureusement les membres du jury, **Claire Cherbuy**, **Francisca Joly**, **Vincent Ollendorff** et **Yves Boirie** d'avoir accepté de juger ce travail, et en particulier aux Docteurs Cherbuy et Ollendorff pour votre tâche de rapporteurs sur ce doctorat.

Puis, je tiens à remercier très sincèrement ma directrice de thèse, **Isabelle Savary-Auzeloux**, pour ton encadrement, ta disponibilité et ta confiance. Tu as énormément contribué à ce que cette thèse se déroule dans d'excellentes conditions, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Un immense merci à **Christophe Chassard**, mon co-directeur de thèse, pour tes nombreux conseils, tes encouragements et ta bienveillance. Je te remercie infiniment de m'avoir proposé ce fameux stage de Master 2 passionnant et qui a finalement débouché sur cette « aventure doctorale ». Et, merci à ma co-directrice de thèse **Muriel Thomas**, pour tout le temps que tu as pu m'accorder et tes relectures minutieuses.

Je souhaite aussi remercier toutes les autres personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail de longue haleine. Tous les membres de l'équipe *iMPROVINg* et notamment **Didier Rémond** pour ton accueil dans l'Unité de Nutrition Humaine et dans l'équipe, **Dominique Dardevet** pour tes précieux conseils et **Marianne Jarzaguet** pour m'avoir patiemment enseigné les différentes techniques de laboratoire.

Un merci spécial confinement-COVID à Isabelle, Christophe, Dominique et Didier pour avoir assuré les expérimentations animales à seulement vous quatre et avoir ainsi permis à ce travail d'avancer dans les temps.

Il m'est impossible d'oublier les enseignants-chercheurs de l'IUT d'Aurillac, **Stéphanie Bornes**, **Philippe Veisseire** et **Muriel Bonnet**. Merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre partage de connaissance du modèle nématode. Merci aussi à **Marylise Gachinat** et **Olivier Camares** pour votre expertise de la culture cellulaire.

Je remercie également l'équipe de l'UMR Fromage, et tout particulièrement **René Lavigne** pour le développement des petits fromages et **Sébastien Theil** pour le temps que tu as passé aux analyses bio-informatiques.

À **Camille Mayeur**, merci pour tout. Si j'ai commencé un doctorat, c'est en grande partie grâce à toi.

Enfin, mes derniers remerciements vont à mes proches. Ma sœur, Sandrine, pour toutes tes critiques justifiées sur l'esthétique de mes différents documents. Mes parents qui m'ont toujours donné les ressources nécessaires pour suivre les études de mon choix. J'espère que vous êtes fières de moi. Mes beaux-parents, pour votre affection et votre indulgence. Et Simon, je te remercie infiniment d'exister, d'avoir été là pour moi depuis toutes ces années et de m'avoir patiemment soutenue et écouté râler. Avec toi, j'irais au bout (de mes rêves) du monde.





# TABLE DES MATIÈRES

Communications scientifiques & valorisation.....	1
Remerciements.....	3
Tables des matières.....	5
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	9
Introduction générale.....	11
<b>PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>17</b>
<b>Chapitre 1. Caractéristiques du vieillissement</b>	
<b>I- Personnes âgées : vue d'ensemble .....</b>	<b>19</b>
A) Épidémiologie de la population âgée.....	19
B) Conséquences socio-économiques du vieillissement .....	23
<b>II- Modifications physiologiques du vieillissement .....</b>	<b>23</b>
A) Effets de l'âge sur la composition corporelle .....	25
B) Effets de l'âge sur le système musculaire .....	25
C) Effets de l'âge sur l'aire splanchnique et ses fonctions.....	26
<b>III- Altération de la fonction musculaire avec l'âge : la sarcopénie .....</b>	<b>34</b>
A) Définitions de la sarcopénie.....	34
B) Mécanismes physiopathologiques de la sarcopénie .....	40
<b>Chapitre 2. La fragilité chez les sujets âgés</b>	
<b>I- Inégalités au cours du vieillissement.....</b>	<b>59</b>
A) Comment expliquer la grande hétérogénéité de la population âgée ? .....	59
B) Dénutrition chez la personne âgée .....	61
<b>II- Concept du syndrome de fragilité.....</b>	<b>64</b>
A) Deux grands modèles de fragilité .....	66
B) Les outils actuellement utilisés pour évaluer la fragilité .....	68
<b>III- Prise en charge des patients fragiles.....</b>	<b>70</b>
A) L'activité physique comme stratégie de lutte contre la fragilité .....	70
B) Supplémentations et interventions nutritionnelles.....	73
<b>Chapitre 3. Lien entre microbiote intestinal et muscle squelettique</b>	
<b>I- Le microbiote intestinal .....</b>	<b>81</b>
A) Quelques généralités sur le microbiote de l'intestin .....	81
B) Principaux déterminants du microbiote .....	82
C) Principales fonctions du microbiote intestinal .....	87
D) Microbiote et impact sur l'hôte âgé .....	90
E) Stratégies pour moduler le microbiote intestinal chez l'agé .....	99
<b>II- Stratégie probiotique .....</b>	<b>101</b>
A) Un peu d'histoire et définitions .....	101
B) Sélection et évaluation des probiotiques .....	103
C) Les probiotiques, une stratégie de lutte contre la sarcopénie .....	108
D) Autres stratégies ciblant le microbiote pour lutter contre la sarcopénie .....	113

PARTIE 2 : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE .....	119
Chapitre 1. Contexte, objectifs et stratégies expérimentales du travail de recherche	
I- Contexte et objectif généraux du projet .....	121
II- Stratégies expérimentales .....	123
A) Pourquoi utiliser le microbiote intestinal des patients ayant subi une résection intestinale ?.....	123
B) Démarche expérimentale globale .....	123
Chapitre 2. Présentation des travaux de thèse	
I- Isolement des bactéries lactiques .....	129
II- Stratégie de criblage n°1 : criblage <i>in vivo</i> sur <i>Caenorhabditis elegans</i> et validation des deux souches sélectionnées sur un modèle rongeur de fragilité.....	133
A) <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	133
B) Modèles rongeurs de la fragilité .....	143
Publication « <i>Lacticaseibacillus casei</i> CNCM I-5663 supplementation maintained muscle mass in a model of frail rodents » Frontiers in Nutrition, 2022 .....	147
III- Suite de la stratégie de criblage n°1 : étude de la faisabilité technologique d'une incorporation du probiotique dans un produit laitier fermenté .....	169
A) Introduction .....	169
B) Matériel et méthodes .....	171
C) Résultats et discussion .....	172
IV- Stratégie de criblage n°2 : les études <i>in vitro</i> .....	177
A) Introduction .....	177
B) Matériel et méthodes .....	179
C) Résultats et discussion .....	180
V- Caractérisation des propriétés probiotiques pour leur utilisation chez l'Homme .....	185
A) Résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires .....	185
B) Adhérence aux cellules intestinales .....	187
C) Critères d'innocuité des souches .....	190
Discussion générale & perspectives .....	193
Références bibliographiques .....	213
Annexes .....	257

# LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Organisation générale du travail de thèse. *(Page 14)*
- Figure 2.** Pourcentage des personnes âgées de 65 ans et plus en 2020 dans le Monde. *(Page 20)*
- Figure 3.** Proportion et projections du pourcentage des personnes âgées de 60 ans et de 80 et plus, en France de 1950 à 2100. *(Page 22)*
- Figure 4.** Modifications physiologiques associées au vieillissement sur les principaux organes. *(Page 24)*
- Figure 5.** Forest plots de la masse musculaire ou de la force musculaire associées au risque de déclin des capacités fonctionnelles et démontrant que la force est davantage corrélée à ce déclin que la masse. *(Page 35)*
- Figure 6.** Adaptation de l'algorithme de dépistage de la sarcopénie chez les personnes âgées proposé par le groupe de travail EWGSOP en 2019. *(Page 37)*
- Figure 7.** Facteurs et mécanismes contribuant au développement de la sarcopénie. *(Page 40)*
- Figure 8.** Organisation générale d'un muscle squelettique et structure du sarcomère. *(Page 41)*
- Figure 9.** Scans du haut de la jambe et coloration immunohistochimique de biopsie musculaire d'un jeune adulte et d'une personne âgée. *(Page 43)*
- Figure 10.** Représentation schématique d'une unité motrice et d'une jonction neuromusculaire. *(Page 45)*
- Figure 11.** Voies cellulaires impliquées dans la synthèse protéique et la dégradation des protéines. *(Page 52)*
- Figure 12.** Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome dépendant. *(Page 53)*
- Figure 13.** Représentation schématique des trois principaux types d'autophagie. *(Page 54)*
- Figure 14.** Causes et facteurs de risque de dénutrition chez la personne âgée. *(Page 63)*
- Figure 15.** Modèle de la fragilité physique comme un état dynamique et réversible. *(Page 65)*
- Figure 16.** Cycle de la fragilité selon la conception phénotypique de Fried et Walston. *(Page 66)*
- Figure 17.** Organisation dynamique de l'écosystème bactérien le long du tractus intestinal. *(Page 82)*
- Figure 18.** Ensemble des facteurs influençant la composition du microbiote intestinal. *(Page 83)*
- Figure 19.** Évolution du microbiote intestinal au cours de la vie. *(Page 84)*
- Figure 20.** Différentes voies métaboliques impliquées dans la production des acides gras à chaîne courte à partir des fibres alimentaires. *(Page 88)*
- Figure 21.** Effets du microbiote intestinal sur la physiopathologie de l'hôte. *(Page 92)*
- Figure 22.** Conséquences d'une inflammation intestinale sur le métabolisme musculaire de l'hôte. *(Page 96)*
- Figure 23.** Effets des acides gras courte chaîne sur le métabolisme musculaire de l'hôte. *(Page 98)*
- Figure 24.** Frise chronologique présentant les faits marquants autour des probiotiques. *(Page 100)*

- Figure 25.** Lignes directrices pour évaluer les probiotiques destinés à l'alimentation humaine. (Page 104)
- Figure 26.** Conception et mécanismes d'action des synbiotiques complémentaires et synergiques. (Page 114)
- Figure 27.** Schéma général représentant les différents mécanismes adaptatifs du syndrome du grêle court afin d'optimiser le métabolisme énergéico-azoté des patients. (Page 124)
- Figure 28.** Démarche expérimentale globale du projet de recherche. (Page 126)
- Figure 29.** Organigramme représentant les étapes de manipulation réalisées sur l'échantillon fécal de rat n°0, collecté 25 jours après inoculation, dans le but d'isoler et de caractériser des bactéries lactiques. (Page 130)
- Figure 30.** Cycle de vie hermaphrodite de *Caenorhabditis elegans* à 20 °C. (Page 134)
- Figure 31.** Principales caractéristiques anatomiques de *Caenorhabditis elegans*. (Page 135)
- Figure 32.** Organisation schématique de l'intestin de *Caenorhabditis elegans*. (Page 136)
- Figure 33.** Altération de la structure des fibres musculaires avec l'âge du ver. (Page 139)
- Figure 34.** Schéma expérimental des deux études réalisées sur les rats âgés au cours de la thèse. (Page 147)
- Figure 35.** Mode opératoire utilisé pour la fabrication des fromages lactiques. (Page 171)
- Figure 36.** Paramètres organoleptiques des fromages lactiques Témoins et Essais (E1, E2, E3 et E4) après 12 jours d'affinage scorés par des dégustateurs non experts. (Page 174)
- Figure 37.** Le syndrome du grêle court, le microbiote intestinal et le GLP-1. (Page 178)
- Figure 38.** Concentrations moyennes de GLP-1 sécrétées par les cellules STC-1 après contact avec les sept souches de bactéries lactiques pendant 4 heures. (Page 181)
- Figure 39.** Concentrations moyennes de GLP-1 sécrétées par les cellules STC-1 après contact avec quatre souches de *Limosilactobacillus mucosae* pendant 3 heures. (Page 182)
- Figure 40.** Production de D- et L-lactates par six souches lactiques pré-sélectionnées. (Page 192)
- Figure 41.** Synthèse des principaux résultats obtenus au cours du projet de thèse. (Page 195)
- Figure 42.** Mécanismes moléculaires reliant le microbiote intestinal et la santé de l'hôte. (Page 197)
- Figure 43.** Peptides intestinaux mesurés chez les rats après 2 mois de restriction alimentaire. (Page 198)
- Figure 44.** Expression des paramètres d'inflammation chez les rats après 1 mois de restriction. (Page 199)
- Figure 45.** Données de dépense énergétique des rongeurs après 2 mois de restriction alimentaire. (Page 201)
- Figure 46.** Shift dans l'utilisation des nutriments au niveau de l'iléon et du foie des rats. (Page 202)
- Figure 47.** Paramètres relatifs au métabolisme lipidique dans le muscle squelettique des rats. (Page 203)
- Figure 48.** Hormones gastro-intestinales mesurées chez les rats après 2 mois de restriction. (Page 206)

# LISTE DES TABLEAUX

**Tableau 1.** Changements physiologiques fonctionnels liés à l'âge et pouvant être associés à la diminution de la mobilité des personnes âgées. (Page 26)

**Tableau 2.** Principales hormones produites dans l'intestin et le pancréas, leur structure biochimique et leurs actions. (Page 30)

**Tableau 3.** Outils et valeurs seuils (retenues par l'EWGSOP2) utilisés pour diagnostiquer un patient à risque de sarcopénie et évaluer le degré de sévérité de la maladie. (Page 38)

**Tableau 4.** Techniques utilisées pour mesurer la masse et la qualité des muscles du patient âgé. (Page 39)

**Tableau 5.** Les trois principaux types de fibres musculaires des muscles squelettiques. (Page 42)

**Tableau 6.** Critères diagnostiques recommandés par la Haute Autorité de Santé (HAS) de la dénutrition des personnes en fonction de leur âge. (Page 62)

**Tableau 7.** Caractéristiques des principaux outils de diagnostic clinique de la fragilité. (Page 69)

**Tableau 8.** Exemples d'essais cliniques attestant de l'efficacité de la pratique physique à réduire la fragilité chez la personne âgée. (Page 72)

**Tableau 9.** Exemples d'études interventionnelles investiguant les effets de la supplémentation en protéines sur la fonction musculaire des personnes âgées. (Page 75)

**Tableau 10.** Études investiguant les effets de souches probiotiques sur la fonction musculaire de modèles rongeurs de sarcopénie. (Page 111)

**Tableau 11.** Études investiguant les effets de pré-, syn- et postbiotiques sur la fonction musculaire et les performances physiques. (Page 117)

**Tableau 12.** Proportion des genres et espèces bactériens isolés dans l'échantillon fécal de rat, représentant sélectionnés et leurs principales caractéristiques morphologiques. (Page 131)

**Tableau 13.** Quelques modèles rongeurs pour l'étude du vieillissement et de la sarcopénie. (Page 144)

**Tableau 14.** Quantités de bactéries lactiques (*Lactocaseibacillus*) inoculées dans le lait et quantité dans les fromages après 12 jours d'affinage. (Page 173)

**Tableau 15.** Résistance en pourcentage des trois souches d'intérêt à l'acidité gastrique après 45 et 90 minutes d'incubation à 37°C. (Page 186)

**Tableau 16.** Résistance en pourcentage des trois souches d'intérêt aux sels biliaires après 1h, 2h, 3h et 4 heures d'incubation à 37°C. (Page 187)

**Tableau 17.** Résultats en pourcentage de l'adhérence des cellules des souches probiotiques aux cellules intestinales Caco-2 après 3 heures d'incubation en fonction de la MOI. (Page 189)



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

À partir de quel âge peut-on considérer qu'une personne est âgée ? Un sondage Ipsos de 2019, réalisé sur 10 800 personnes âgées entre 16 et 64 ans de 30 pays différents, s'est intéressé à la question. Il en résulte que les Français se considèrent comme « vieux » à partir de 69 ans. À noter que cet âge varie beaucoup selon les pays (74 ans en Espagne contre 55 et 56 ans pour l'Arabie Saoudite et la Malaisie) et dépend du regard que les citoyens portent sur leur vieillissement. En Inde, la longévité est synonyme de sagesse et 73 % des sondés « *voient d'un bon œil les années qui défilent* » tandis que 78 % des Français sont pessimistes à l'idée de vieillir. Ce pessimisme s'explique par la peur de plusieurs facteurs associés au vieillissement : la perte d'autonomie (pour 40 % des sondés), de mobilité (29 %) et de mémoire (28 %). En dehors de ces évaluations subjectives, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'Organisation des Nations Unies (ONU) ont établi une définition : on considère une « personne âgée » à partir de 60 ans. En Europe, l'Institut national de la statistique et des études économiques (Insee), l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) ou encore Eurostat (Direction Générale de la Commission Européenne chargée de l'information statistique à l'échelle communautaire) considèrent 65 ans comme l'âge limite à partir duquel une personne est considérée comme âgée.

Toutefois, il est impossible de définir un « âge » standard pour définir l'entrée dans la vieillesse puisque les personnes âgées constituent une population extrêmement hétérogène sur le plan de leur état de santé général, de leur statut nutritionnel ou de leur mobilité. L'hétérogénéité s'explique en partie par un parcours de vie propre à chaque individu (environnement socio-économique, culture, facteurs génétiques, maladies). Le concept du « syndrome de fragilité », sur lequel nous reviendrons largement dans ce manuscrit, permet ainsi de repérer les sujets âgés les plus susceptibles de devenir dépendant et les plus à risque de comorbidités et de mortalité. La sarcopénie – perte de masse, de force et de fonction musculaires – est une composante clé de la fragilité qui est principalement due à une altération du métabolisme protéique (résistance anabolique), à des apports protéiques insuffisants et/ou à la sédentarité ainsi qu'à une diminution de production des hormones anabolisantes ou à des processus neurodégénératifs. Cette sarcopénie, d'autant plus fréquente et sévère chez les personnes dénutries ou à risque de dénutrition, augmente les risques de

chute, d'hospitalisation et de dépendance et constitue un réel problème de santé publique. Les chercheurs et gériatres travaillent depuis des années sur le développement de stratégies capables de limiter la sarcopénie chez le sujet âgé ; en vue des facteurs contributeurs de la sarcopénie (déficits nutritionnels, sédentarité), l'exercice physique combiné, ou non, avec les suppléments en protéines/acides aminés (AA) sont parmi les plus étudiées et les plus efficaces. Néanmoins, les programmes d'entraînement physique ne sont pas nécessairement adaptables aux personnes dont les capacités fonctionnelles et la mobilité sont déjà bien diminuées et nécessitent l'intervention de professionnels qualifiés pour superviser les patients âgés. Les suppléments nutritionnels doivent également être adaptés à l'âge afin de prendre en compte l'état bucco-dentaire, la présence de troubles de la déglutition ou l'appétit des sujets. Ainsi, la recherche sur ce sujet reste nécessaire et de nouvelles approches nutritionnelles complémentaires doivent être considérées.

Les personnes âgées, et notamment les plus fragiles (sarcopéniques, dénutries), présentent généralement une résistance anabolique (aux AA et à l'insuline) associée à une inflammation systémique chronique sur lesquelles il pourrait être possible d'intervenir afin d'améliorer leur état de santé général. Par ailleurs, le microbiote intestinal – la communauté microbienne dont le rôle dans le fonctionnement physio-métabolique de l'organisme est reconnu – est altéré chez les patients âgés par rapport aux jeunes adultes mais également par rapport aux personnes du même âge en meilleure santé. Plusieurs auteurs ont montré qu'un déséquilibre de composition du microbiote était partiellement impliqué dans le développement de pathologies métaboliques et/ou inflammatoires (obésité, diabète de type 2, maladies inflammatoires chroniques de l'intestin) et que rétablir cet écosystème permettrait de réduire les symptômes de la maladie. Différentes stratégies peuvent moduler la composition et la diversité du microbiote, parmi lesquelles les probiotiques. Les probiotiques sont définis par l'OMS et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) comme des « *micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets bénéfiques à la santé du consommateur* » [1]. Actuellement, les souches probiotiques sont généralement isolées à partir d'aliments fermentés (par ex., yaourts et fromages) ou directement d'un microbiote humain particulier.



*L'objectif général de mon travail de thèse est de développer une nouvelle stratégie « microbienne » pour lutter contre la fonte musculaire chez l'âge. Cette stratégie a consisté à isoler, caractériser puis identifier des souches de bactéries probiotiques capables d'optimiser le métabolisme protéo-énergétique (insulino-sensibilité) et/ou de limiter la fonte musculaire chez un modèle rongeur de fragilité. Puis, d'intégrer la/les souche(s) la(les) plus prometteuse(s) dans un aliment fermenté afin d'envisager, dans l'avenir, une validation de ces effets chez l'Homme.*

Ce travail de thèse a été réalisé selon un programme présenté dans la **Figure 1**, au sein de trois équipes de recherche dans lesquelles je me suis physiquement rendue et dont les compétences sont complémentaires :

1. L'équipe ProbiHôte (Institut MICALIS, INRAE Jouy-en-Josas), spécialiste dans l'étude des effets santé par le microbiote. C'est dans cette équipe que les souches bactériennes ont été isolées à partir de fèces de rat ayant subi un transfert avec les matières fécales d'un patient atteint du syndrome du grêle court (collaboration avec le Dr Francisca Joly, Service de Gastroentérologie et Assistance Nutritive, Hôpital Beaujon, Clichy). Les souches y ont été caractérisées puis identifiées.
2. L'Unité UMR Fromage (INRAE Aurillac), spécialiste dans l'étude de la diversité microbienne de la matrice laitière/fromagère et dans les effets santé apportés par les fromages traditionnels. C'est dans cette Unité que certaines souches ont été criblées sur cellules intestinales pour leur capacité à stimuler la sécrétion d'hormones intestinales insulino-sensibilisatrices et sur le modèle *Caenorhabditis elegans* pour leurs effets sur la longévité et la structure musculaire. C'est également dans cette unité que l'enrichissement de fromages avec la bactérie probiotique retenue a été réalisé (Hall Fromager).
3. L'équipe iMPROVINg (Unité de Nutrition Humaine, INRAE Clermont-Theix), spécialiste des stratégies nutritionnelles permettant de limiter la perte d'autonomie et de fonction musculaire liées à l'âge. C'est dans cette équipe que deux souches candidates ont été testées *in vivo* sur le métabolisme énergétique-protéique d'un modèle de rat âgé fragile.

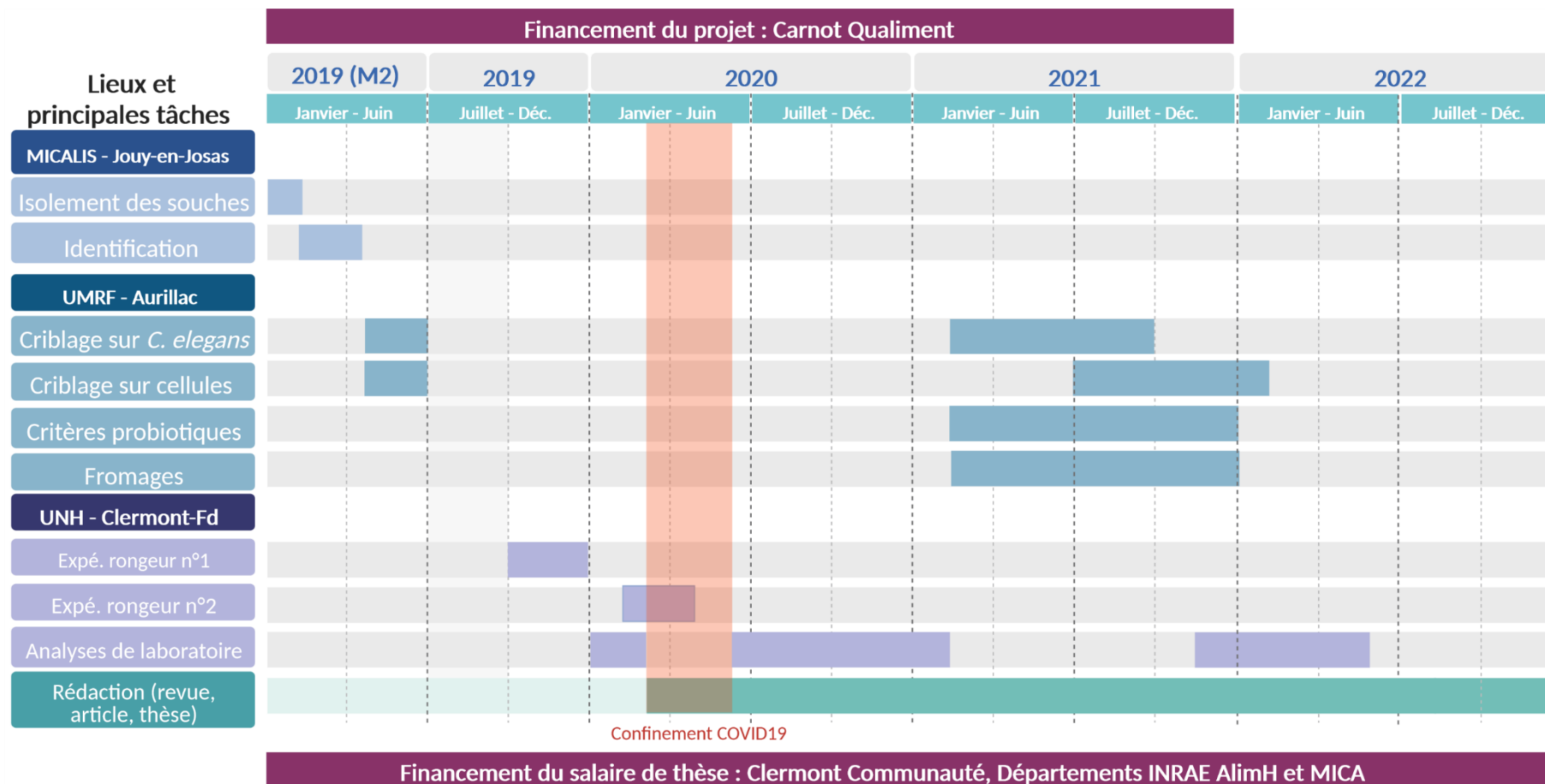


Figure 1. Organisation générale du travail de thèse.

L'analyse bibliographique présentée dans la première partie de ce manuscrit permet, dans son chapitre 1, de dresser une vision globale du vieillissement en France, des caractéristiques physiologiques associées à l'âge, puis de fournir un état des lieux des connaissances actuelles sur la sarcopénie (définitions, mécanismes). Le chapitre 2 porte sur le concept de la fragilité chez l'agé en se focalisant particulièrement sur la composante physique du syndrome ainsi que sur les moyens de diagnostic et de prise en charge des patients disponibles à ce jour (interventions nutritionnelles, exercice). Le dernier chapitre s'intéresse aux liens qu'ils existent entre la fonction musculaire et le microbiote intestinal et explique pourquoi les probiotiques peuvent constituer une stratégie pertinente pour lutter contre le développement de la sarcopénie.

Les résultats obtenus au cours du travail de thèse sont présentés dans la deuxième partie de ce manuscrit sous la forme d'une publication et de travaux complémentaires non publiés actuellement. La publication a porté sur l'isolement, l'identification et la sélection de souches de bactéries lactiques sur le modèle *Caenorhabditis elegans* (longévité, intégrité musculaire) puis l'évaluation de leurs effets sur la sensibilité à l'insuline, la tolérance au glucose et le métabolisme protéique musculaire chez le rat âgé en sous-nutrition. D'autres travaux, non encore publiés (Demande d'Invention déposée, Brevet en cours d'écriture) ont mis en évidence *in vitro* la capacité de souches bactériennes à stimuler la sécrétion d'hormones intestinales insulino-sensibilisatrices. Ces données prometteuses devront être validées chez le rongeur âgé fragile. La troisième partie de mon travail expérimental est consacrée aux résultats relatifs à l'enrichissement d'un fromage avec la souche probiotique testée *in vivo* et publiée, à son impact sur le processus de fabrication et sur les propriétés organoleptiques de ce nouveau fromage au moment de la dégustation. Cette analyse permettra d'envisager rapidement une étude chez l'Homme puisqu'un vecteur de notre bactérie probiotique d'intérêt a été mis au point. Finalement, certaines caractéristiques essentielles aux probiotiques (capacité à survivre dans le tractus gastro-intestinal, innocuité) sont présentées dans la dernière partie de l'étude expérimentale.



**PARTIE 1 :**  
**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**



# Chapitre 1. Caractéristiques du vieillissement

---

## I- Personnes âgées : vue d'ensemble

### A) Épidémiologie de la population âgée

La population des pays industrialisés tend vers une proportion de plus en plus importante de séniors, qui sont également de plus en plus âgés. En 2015, il y avait environ 900 millions de personnes de plus de 60 ans dans le monde, représentant 12 % de la population mondiale. En 2020, 700 millions de personnes ont 65 ans et plus, représentant 9 % de la population mondiale (**Figure 2**). En Europe, ce pourcentage est bien plus élevé puisqu'il dépasse 25 % pour les personnes de plus de 60 ans et 20 % pour celles de plus de 65 ans [2]. En 2020, les pays où la part des 65 ans et plus est la plus élevée sont l'Italie (23,2 %), la Finlande (22,3 %), la Grèce (22,3 %) et le Portugal (22,1 %) ; le pays où elle est le plus faible est l'Irlande (14,4 %) (*Tableaux économie française 2020 Insee et Bilan démographique 2021 Insee*).

En France, 67,8 millions de personnes (65,6 millions en France métropolitaine) ont été recensées au 1<sup>er</sup> janvier 2022 dont 14,2 millions de 65 ans et plus, soit 21,0 % des Français et de 4,1 millions d'âgés de 80 et plus, soit 6,1 % des Français (*Bilan démographique 2021 Insee*). Notons que les femmes représentent près de 57 % des personnes de 65 et plus et 63 % des 80 ans et plus.

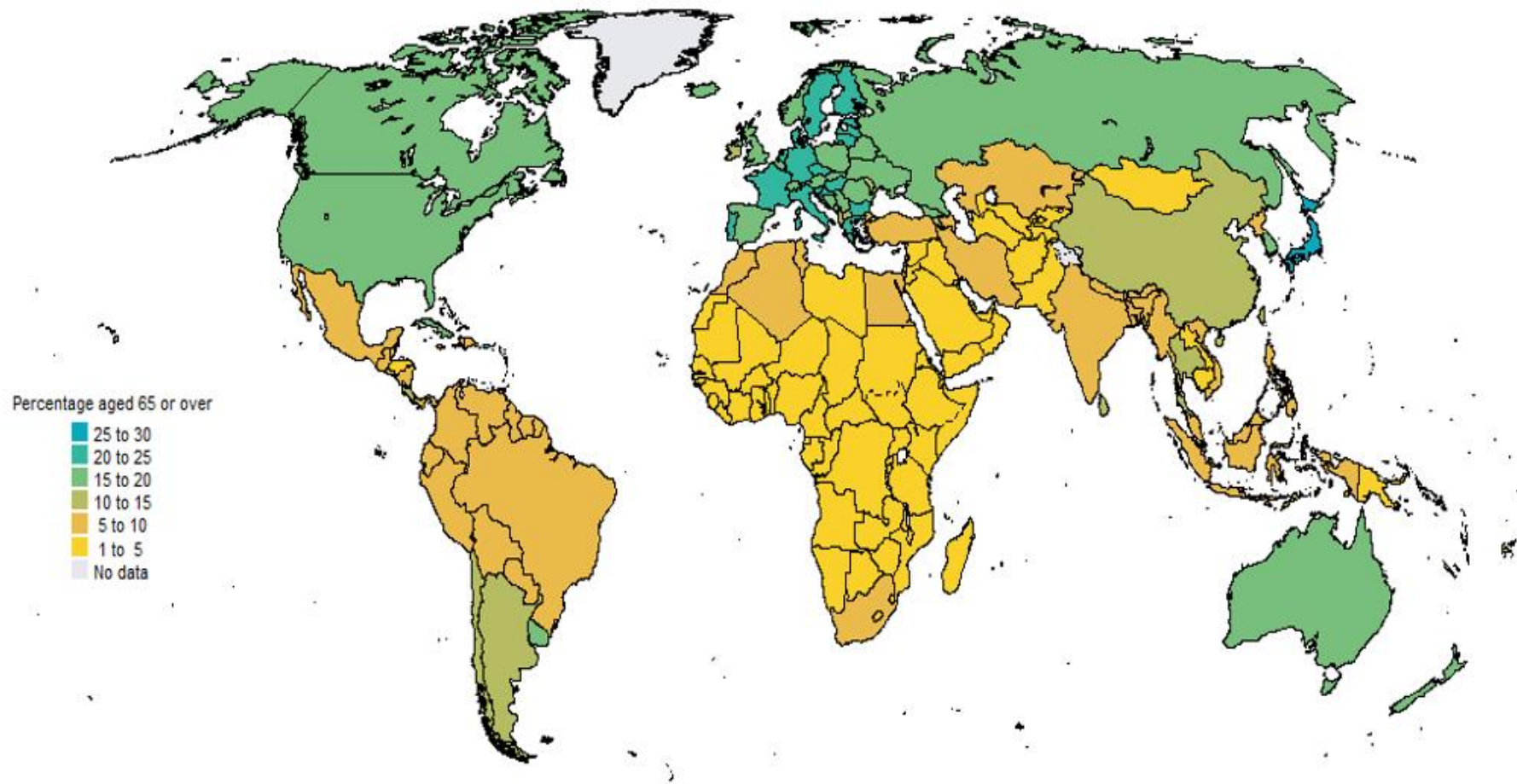


Figure 2. Pourcentage des personnes âgées de 65 ans et plus en 2020 dans le Monde.  
Données United Nations, DESA, Population Division, *World Population Prospects 2019*.



En 2050, Eurostat et United Nations Prospects (2019) estiment que près de 35 % des populations européenne et française auront plus de 60 ans [2] (**Figure 3**). La proportion de Français de plus de 80 ans pourrait dépasser 11 % en 2050 et atteindre 12,6 % en 2070 (*United Nations 2022 et tableau économie française Insee 2020*). Certaines de ces estimations ont été publiées avant l'épisode de pandémie mondiale de la COVID-19 et mériteraient d'être révisées étant donné que près de 95 % des décès dus à cette maladie en France ont touché des personnes de 60 et plus (*Données Santé Publique France*). Toutefois, ce nombre proche des 140 000 morts ne représentant même pas 1 % des personnes âgées, nous pouvons considérer que les estimations de 2019 restent d'actualité (<https://i-technology.net/stats-covid-france/>).

La baisse de la fertilité, la diminution du nombre d'individus jeunes et l'allongement de l'espérance de vie expliquent en grande partie le vieillissement de la population française. En effet, l'espérance de vie en France était de 85,6 ans pour les femmes et 79,7 ans pour les hommes en 2019 [3]. Légèrement plus faible suite à la pandémie de la COVID-19, l'espérance de vie en 2021 est de 85,4 ans pour les femmes et 79,3 ans pour les hommes (*Bilan démographique 2021 Insee*). Ainsi, les projections estimant que cet âge pourrait atteindre en 2050, entre 89 et 91 ans pour les femmes et entre 84 et 87 ans pour les hommes en France [4,5] mériteraient d'être ré-estimées.

*À retenir :*

- *La population âgée concerne généralement les personnes de plus de 65 ans ;*
- *L'évolution de cette population, en France et dans le monde, est en augmentation.*

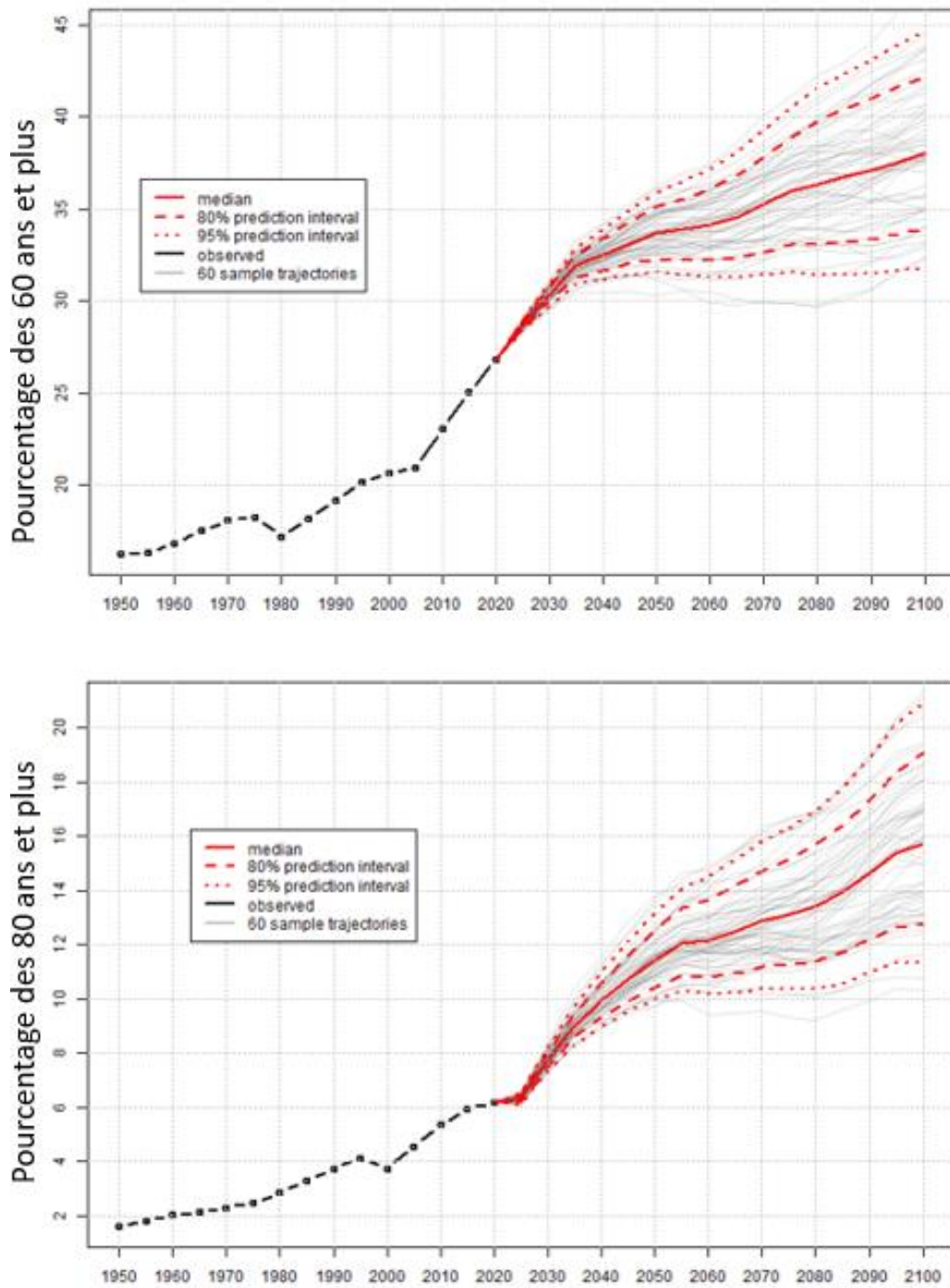


Figure 3. Proportion et projections du pourcentage des personnes âgées de 60 ans et plus (figure du haut) et de 80 et plus (figure du bas) en France de 1950 à 2100. Données United Nations, DESA, Population Division, *World Population Prospects 2019*.

## **B) Conséquences socio-économiques du vieillissement**

De manière générale, la population âgée est plus sujette aux maladies chroniques (diabète, syndrome métabolique, cancers), déficits sensitifs (visuels, auditifs) et troubles mentaux/cognitifs (maladies d'Alzheimer ou de Parkinson) que la population jeune et est également plus sensible aux infections. Elle a donc d'avantage recours aux services médicaux (consultations, hospitalisations). En lien avec ces pathologies, 43 % des personnes de plus de 65 ans prennent au moins cinq médicaments remboursés par jour en France [6]. Et plus d'un quart de cette même population (27 %) subirait une forte polymédication, c'est-à-dire une consommation d'au moins dix médicaments par jour [6]. Ainsi, les soins de longue durée aux personnes âgées ont augmenté de 4,4 % par an en moyenne entre 2008 et 2017. Et en 2017, les coûts de ces soins s'élevaient à 11 milliards d'euros en France. Quant aux dépenses liées à la prise en charge des personnes en perte d'autonomie, elles sont estimées à 30 milliards d'euros la même année [7]. Il est évalué une augmentation de 50 % des patients en statut d'affection de longue durée (ALD, par ex., diabète de type 2, accident vasculaire cérébral invalidant, maladie d'Alzheimer, insuffisance respiratoire chronique), soit 15 millions en 2030 (contre 10 millions en 2014), ce qui pourrait absorber plus des deux tiers des ressources de l'Assurance Maladie (*Rapport annuel de la Cour des comptes, 2016*).

*Améliorer la qualité de vie des seniors et leur permettre de garder une bonne autonomie le plus longtemps possible sont donc un enjeu important dans le contexte de vieillissement des populations de nos sociétés occidentales. Permettre à nos aînés de mieux vieillir aura aussi pour conséquence de limiter les dépenses de soins.*

## **II- Modifications physiologiques du vieillissement**

Le vieillissement est un processus complexe, multifactoriel et inéluctable qui se traduit par des altérations anatomiques et physio-métaboliques de l'ensemble de l'organisme au cours de l'avancée en âge, de la conception jusqu'à la mort d'un être vivant. Ce vieillissement est considéré comme physiologique (« en bonne santé » ou « normal ») lorsqu'il n'est pas accompagné de maladies qui vont altérer profondément l'autonomie et la qualité de vie de la personne âgée [8].

Le processus de vieillissement impacte l'ensemble des fonctions, organes et systèmes physiologiques d'un individu et perturbe l'homéostasie générale. Des effets de l'âge sont ainsi retrouvés sur la peau, le squelette, les muscles, le système cardio-respiratoire, l'appareil digestif, la fonction rénale et le système nerveux (Figure 4). Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons sur les effets de l'âge aux niveaux des muscles squelettiques, du système digestif et des métabolismes au sens large.

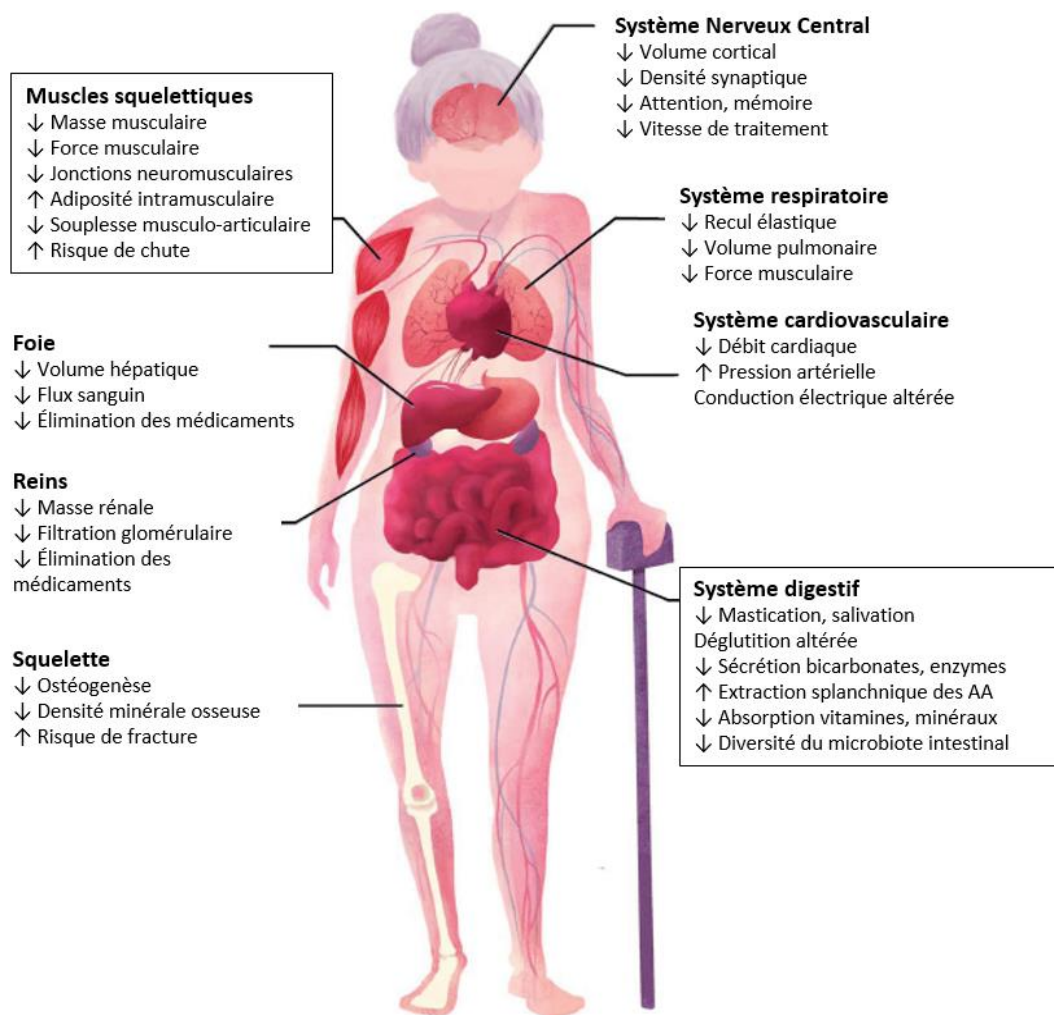


Figure 4. Modifications physiologiques majeures associées au vieillissement sur les principaux organes du corps. D'après Soto-Perez-de-Celis *et al.*, 2018 et Milenkovic *et al.*, 2022 [9,10].

## **A) Effets de l'âge sur la composition corporelle**

La composition corporelle – répartition de la masse du corps en masses grasse (tissus adipeux) et maigre (eau, organes dont les muscles et les os) – change significativement au cours de la vie et constitue un indicateur du statut nutritionnel et de la condition physique d'un individu. L'augmentation de la masse grasse (+0,6 % par an entre 40 et 64 ans), notamment abdominale/viscérale (facteur de risque d'insulino-résistance et de maladies cardio-vasculaires) ainsi que la réduction de masse maigre (-0,4 % par an entre 40 et 64 ans) sont fortement associées à la diminution de force musculaire qui s'opère avec le vieillissement [11–13]. Ce phénomène de fonte musculaire s'accélère à partir de 60 ou 70 ans et à l'âge de 75 ans, près de 50 % de la masse musculaire totale d'un individu aurait disparu [14]. Les modifications de la composition corporelle liées à l'âge dépendent de facteurs génétiques, du statut hormonal (hormone de croissance et IGF-1) sur lesquels il est difficile d'intervenir, mais également de facteurs comportementaux (nutrition, activité physique) sur lesquels il est possible d'intervenir [13].

## **B) Effets de l'âge sur le système musculaire**

Les muscles squelettiques constituent près de 40 % de la masse totale du corps humain [15]. Les muscles sont des organes paracrines complexes qui jouent un rôle fondamental dans le maintien postural et la locomotion, et contribuent au métabolisme de l'ensemble de l'organisme. En effet, ils jouent le rôle de « réserve » de glucose (glycogène) et surtout d'AA (sous forme de protéines) pouvant être utilisée pour maintenir des fonctions vitales lors de perturbations métaboliques importantes [16]. L'avancée en âge entraîne une diminution de la masse des muscles (en partie remplacée par du tissu adipeux et du tissu conjonctif) de 1 à 2 % par an et de la force musculaire de 1,5 à 5 % par an à partir de 50 ans [17,18]. Ainsi, on estime qu'une personne de 80 ans a perdu près de la moitié de sa masse musculaire initiale, depuis ses 20 ans [19]. La perte de masse musculaire associée à la réduction de la fonction du muscle constitue la sarcopénie. La prévalence de la sarcopénie chez les personnes de plus de 65 ans est estimée entre 3 et 24 % selon le critère de diagnostic utilisé [20,21] et pourrait augmenter de 72 % chez les européens en 2045 [22]. Des précisions concernant le diagnostic de la sarcopénie chez la personne vieillissante et les

modifications physiologiques, métaboliques et moléculaires des muscles seront détaillées dans la partie III de ce chapitre.

Outre la force et la fonction musculaire, la souplesse et les capacités neuromusculaires, en particulier l'équilibre, sont également altérées avec le vieillissement contribuant au risque de chute. Pour résumer, ces altérations physiologiques (sur le système musculo-squelettique mais également sur le système cardio-respiratoire qui n'a pas été abordé) réduisent les capacités fonctionnelles (marche), augmentent les risques de chutes et de fractures et diminuent l'autonomie et la qualité de vie des sujets âgés (Tableau 1).

**Tableau 1. Changements physiologiques fonctionnels liés à l'âge et pouvant être associés à la diminution de la mobilité des personnes âgées. D'après Izquierdo *et al.*, 2017 [23].**

Variables	Changements avec l'âge
Fréquence cardiaque et débit cardiaque	↓
Pression artérielle (au repos et à l'exercice)	↑
Capacité respiratoire vitale	↓
Masse musculaire	↓
Force et puissance musculaire	↓
Pourcentage de masse grasse corporelle	↑
Masse osseuse	↓
Souplesse musculo-articulaire	↓
Tolérance au glucose	↓

### **C) Effets de l'âge sur l'aire splanchnique et ses fonctions**

Le vieillissement entraîne des modifications anatomiques et fonctionnelles qui peuvent altérer le processus de digestion des aliments tout le long du tractus digestif (phases buccale, stomacale et intestinale).

## 1- Modifications structurelles et fonctionnelles du tractus digestif

L'atrophie des muscles masticateurs (sarcopénie), la perte des dents (elle-même causée par une mauvaise hygiène bucco-dentaire et l'ostéoporose) et la baisse de production salivaire réduisent la fonction masticatoire/orale et favorisent la dénutrition chez la personne âgée [24–26]. Les troubles de la déglutition (dysphagie) sont également communs chez la personne âgée – au moins 15 % des 65 ans et plus [27] – et peuvent contribuer à diminuer la prise alimentaire et le confort de vie de ces personnes [28]. Dans l'estomac, ni la sécrétion d'acide, la production de mucus et la vitesse de vidange gastrique ne semblent être affectées directement par le vieillissement [24,29,30] mais plutôt par la polymédication (inhibiteurs de la pompe à protons, anti-inflammatoires non stéroïdiens) et des infections chroniques. Par exemple, la prévalence de l'infection par *Helicobacter pylori*, augmente chez la population âgée des pays développés [31]. La sécrétion de bicarbonate, ainsi que les concentrations enzymatiques (pepsine dans l'estomac ; lipase, chymotrypsine et amylase dans le duodénum) sont plus faibles chez les personnes âgées en bonne santé que chez les jeunes adultes [24,32]. Comme pour l'estomac, il n'y a pas ou peu de changements de la fonction motrice de l'intestin grêle et du côlon avec le vieillissement physiologique [33]. Ainsi, la diminution du péristaltisme musculaire (en particulier au niveau du côlon) notifiée chez les personnes âgées par certains auteurs et pouvant ralentir le transit intestinal et augmenter la fréquence de la constipation ne sont pas des caractéristiques propres à l'âge mais plutôt la conséquence d'une déficience masticatoire, d'apports hydrique et en fibres insuffisants, d'une activité physique réduite, de la prise de médicaments et de comorbidités chez les sujets âgés plus fragiles [24,30,34,35].

## 2- Modifications de l'absorption et du métabolisme des nutriments

Au regard des connaissances actuelles, il est difficile d'affirmer que l'âge a un impact réel sur la digestion des protéines en AA et leur absorption dans l'intestin grêle [24,36]. Par contre, il est admis que l'utilisation des AA par le tractus gastro-intestinal et le foie (extraction splanchnique) est augmentée avec l'âge, réduisant ainsi la quantité d'AA disponibles pour les organes périphériques dont les muscles [37,38]. Ceci est d'autant plus important qu'il est par ailleurs démontré que la quantité d'AA ramifiés après un repas (valine, isoleucine et surtout leucine – connus pour être des

signaux de stimulation de la synthèse protéique musculaire) nécessaire pour stimuler l'anabolisme protéique musculaire est supérieure chez l'âge [39].

Chez les personnes âgées, l'absorption du glucose est généralement préservée [36,40] mais celle de glucides spécifiques, tel que le lactose, peut être altérée en raison de la diminution de l'activité de la lactase avec l'âge [41]. Par ailleurs, le vieillissement physiologique s'accompagne d'une intolérance au glucose, d'une résistance à l'insuline puis du diabète de type 2 [42–46]. La glycémie à jeun augmente d'environ 1 mg/dL tous les 10 ans et la glycémie 2 heures post-prandiale s'accroît de 5,3 mg/dL par décennie [47]. Ce phénomène pourrait s'expliquer par un défaut d'utilisation/dégradation du glucose post-prandial et par un défaut de sécrétion/action/clairance de l'insuline [48–51]. Mais il est difficile d'attribuer l'intolérance au glucose et l'augmentation de la résistance à l'insuline uniquement au vieillissement. Un certain nombre d'auteurs suggère, en effet, que des facteurs parfois aggravés avec le vieillissement tels que l'inactivité physique et l'obésité viscérale, seraient bien plus associés au développement de l'insulino-résistance que l'âge chronologique *per se* [49,52–54].

Enfin, le vieillissement est associé à une diminution de l'absorption de certaines vitamines et minéraux expliquée en partie par des apports alimentaires insuffisants (produits animaux pour la vitamine B12, le calcium et le fer) ou une synthèse endogène réduite avec l'âge pour la vitamine D et la vitamine B12 [36,55,56].

Ainsi, ce n'est pas réellement la digestion des nutriments mais plutôt l'altération des métabolismes protéique, glucidique et lipidique liée à l'âge (c'est-à-dire l'utilisation post-prandiale) qui impacterait l'homéostasie générale et le muscle squelettique des personnes âgées.

### **3- Modifications de la fonction endocrine de l'aire splanchnique**

Il existe un certain nombre de peptides ou hormones (produits par l'estomac, l'intestin et le pancréas) capables de réguler l'appétit, la balance énergétique et la vidange gastrique en réponse aux nutriments ou au jeûne. Seules les hormones les plus décrites seront détaillées (**Tableau 2**).



Des études ont montré chez l'âge une augmentation du taux plasmatique de la cholécystokinine (CCK) à jeun [57–59] ainsi qu'une sensibilité aux effets satiétogènes de CCK accrue en réponse à une infusion lipidique intra-duodénale, par rapport aux plus jeunes [60]. Néanmoins, l'effet du vieillissement sur la signalétique de CCK est complexe et pourrait dépendre de la cible puisque d'autres auteurs ont mis en évidence une diminution de la sensibilité de la vésicule biliaire (contraction) et du pancréas à cette hormone chez l'âge suite à l'ingestion d'un repas test ou l'administration d'huile intra-duodénale [61,62]. L'augmentation des taux de CCK à jeun et/ou de la sensibilité aux effets anorexigènes pourrait représenter un des mécanismes de l'anorexie liée à l'âge et expliquer en partie pourquoi l'appétit des personnes âgées diminue [62,63].

Quelques auteurs ont rapporté une augmentation plus importante de la réponse du Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) suite à l'ingestion d'un repas (ou de glucose) chez l'âge par rapport à l'adulte [64,65], mais la plupart des études ne montrent pas d'effet de l'âge sur les taux plasmatiques ou sur la réponse du GLP-1 chez les sujets en bonne santé et non diabétiques [58–60,66–68]. Le Glucagon Like Peptide-2 (GLP-2) est co-sécrété avec le GLP-1 mais présente des actions différentes (**Tableau 2**). Les effets de l'âge sur la sécrétion de cette incrétine ne sont pas connus mais une étude sur le rat montre que la concentration plasmatique en GLP-2 est plus faible chez les animaux âgés que chez les plus jeunes (état nutritionnel des animaux non précisé dans l'étude) et qu'il existe une corrélation positive entre le taux de GLP-2 et l'abondance de certaines populations microbiennes « bénéfiques » du microbiote intestinal [69]. Tout comme le GLP-1 et la CCK, le peptide YY (PYY) permet d'inhiber la prise alimentaire, et de stimuler la sécrétion de l'insuline par le pancréas et ses analogues représentent donc une stratégie thérapeutique intéressante contre le diabète de type 2 et l'obésité [70]. Toutefois, les taux de PYY ne semblent pas être affectés par l'âge [58,71].

Enfin, la ghréline est produite majoritairement dans l'estomac en réponse au jeûne et représente la principale hormone orexigène (**Tableau 2**). Ainsi, plusieurs auteurs ont relevé une diminution du taux plasmatique à jeun de ghréline et d'acyl-ghréline (forme active) chez les rongeurs et les patients âgés qui pourrait expliquer en partie la baisse d'appétit souvent observée avec le vieillissement [72,73] mais d'autres n'ont montré aucune différence liée à l'âge [24].

Tableau 2. Principales hormones produites dans l'intestin et le pancréas, leur structure biochimique et leurs actions. [24,74,75]

Hormones	Lieux de production	Signaux stimulateurs	Structures	Actions sur l'organisme
<b>CCK</b>	Duodénum et jéjunum (cellules I)	Sécrétion en réponse à l'arrivée dans le duodénum de lipides et de protéines essentiellement	Polypeptide de 4, 8 ou 33 AA (CCK4, CCK8 ou CCK33) ; CCK8 contient l'activité biologique	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Sécrétions enzymatiques du pancréas</li> <li>↑ Contraction de la vésicule biliaire</li> <li>↓ Vidange gastrique</li> <li>Action anorexigène</li> </ul>
<b>Ghréline</b>	Fundus de l'estomac (et intestin grêle proximal)	Augmentation de la sécrétion avec le jeûne	Polypeptide de 28 AA (groupement acyl sur la sérine 3 pour la forme active)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Sécrétion d'acide gastrique et vidange gastrique</li> <li>↑ Sécrétion de glucagon</li> <li>↓ Sécrétion d'insuline</li> <li>Action orexigène</li> </ul>
<b>GLP-1</b>	Iléon principalement (cellules L)	Sécrétion en réponse à l'arrivée de nutriments dans l'intestin	Polypeptide de 29 AA dérivant du proglucagon (gène <i>GCG</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Sécrétion d'acide gastrique et vidange gastrique</li> <li>↑ Sécrétion d'insuline</li> <li>↑ Prolifération des cellules <math>\beta</math> pancréatiques</li> <li>↓ Sécrétion de glucagon</li> <li>Action anorexigène</li> </ul>
<b>GLP-2</b>	Iléon principalement (cellules L)	Sécrétion en réponse à l'arrivée de nutriments dans l'intestin	Polypeptide de 32 AA dérivant du proglucagon	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ Sécrétion d'acide gastrique</li> <li>↑ Prolifération cellules intestinales et mucus</li> <li>↓ Perméabilité intestinale</li> <li>Action anorexigène</li> </ul>
<b>PYY</b>	Iléon et côlon (cellules L)	Sécrétion en réponse à un repas, proportionnelle aux calories ingérés	Polypeptide de 36 AA ; deux formes endogènes	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Sécrétions enzymatiques du pancréas</li> <li>↓ Sécrétion d'acide gastrique et vidange gastrique</li> <li>↑ Sécrétion d'insuline</li> <li>Action anorexigène</li> </ul>
<b>Insuline</b>	Cellules $\beta$ des îlots de Langerhans (pancréas)	Sécrétion en réponse à une hyperglycémie et à des hormones (GLP-1, PYY)	Polypeptide de 51 AA ; chaîne A : 21 AA et chaîne B : 30 AA reliées par 2 ponts S-S	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Transport du glucose et glycogénogenèse</li> <li>↑ Synthèse protéique</li> <li>↑ Lipogenèse</li> </ul>
<b>Glucagon</b>	Cellules $\alpha$ des îlots de Langerhans (pancréas)	Sécrétion en réponse à une hypoglycémie, au stress et aux protéines	Polypeptide de 28 AA dérivant du proglucagon	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ Lipolyse, gluconéogenèse et glycogénolyse</li> <li>Action anorexigène</li> </ul>

En plus de son rôle dans la prise alimentaire, la ghréline (et ses agonistes) présente une action anti-inflammatoire, anti-catabolique sur le muscle et stimule la sécrétion d'hormone de croissance, des propriétés intéressantes pour la prise en charge de la sarcopénie [76,77].

En dehors des hormones synthétisées par l'intestin, le pancréas peut également synthétiser des hormones dont le profil change avec le vieillissement. Plusieurs études ont montré que les niveaux à jeun d'insuline chez les personnes âgées et les jeunes ne présentaient aucune différence [60,65,78,79], alors que d'autres ont rapporté des niveaux d'insuline (à jeun) significativement plus élevés chez les personnes âgées que chez les jeunes [59,80]. Comme dit précédemment, l'âge est fréquemment associé à une résistance des cellules à l'action de l'insuline (ou diminution de la sensibilité des cellules à l'insuline) ; cela signifie que des taux circulants supérieurs à la « normale » sont nécessaires pour maintenir une normoglycémie. L'insulino-résistance pourrait être causée/aggravée par l'hyper-insulinémie remarquée par certains auteurs, pour compenser la diminution de tolérance au glucose et l'hyperglycémie. L'âge peut également être associé à un défaut de sécrétion de l'insuline liée à une altération des cellules  $\beta$  attribuée à plusieurs facteurs dont la dysfonction mitochondriale [81,82] ou la réponse diminuée au GLP-1 [68,83,84]. Le glucagon présente une action hyperglycémiant antagoniste à l'insuline. Mais globalement, les personnes âgées ne présentent pas une altération de production de glucagon et de sensibilité à cette hormone comparativement aux plus jeunes [85].

#### **4- Modifications de la barrière intestinale et de la composition du microbiote avec l'âge**

L'intestin est une zone de contact importante avec l'environnement extérieur. La barrière intestinale, composée d'éléments physiques (épithélium et mucus), biochimiques (enzymes, protéines antimicrobiennes), immunologiques (IgA, cellules immunitaires associées à l'épithélium) et microbiens (le microbiote, sa composition et son activité) a pour fonction d'empêcher/limiter l'exposition de l'hôte et de son système immunitaire aux germes/toxines présents dans la lumière intestinale [86]. L'immunosénescence peut se traduire par l'augmentation de la perméabilité intestinale (syndrome du « leaky gut ») et l'entrée anormale de bactéries dans l'organisme de l'hôte, induisant alors une activation persistante du système immunitaire (inflammation chronique de bas-

bruit). Ce triptyque liant altération de la composition/fonction du microbiote, perméabilité intestinale et inflammation systémique de bas-bruit est souvent considéré comme un des éléments causal et/ou aggravant du développement de nombreuses pathologies (maladies inflammatoires de l'intestin, pathologies métaboliques, cancers) [32,87–91]. Des données récentes suggèrent qu'il serait également impliqué dans les altérations de la masse et de la fonction musculaire chez l'âge [92] (voir chapitre 3).

La mesure de la perméabilité des cellules épithéliales de l'intestin peut être réalisée de différentes manières [93]. Pour la mesure *in vivo* chez l'homme ou l'animal, les méthodes les plus utilisées sont : le lactulose-mannitol et le gavage au FITC-dextran (4 kDa Fluorescéine Isothiocyanate-Dextran). L'épreuve lactulose-mannitol (ou plus récemment multi-sucres) consiste, après ingestion d'une quantité connue de ces deux molécules, à doser dans les urines pendant plusieurs heures le ratio lactulose (grosse molécule) sur mannitol (petite molécule) afin de déterminer l'intégrité de la barrière intestinale. Plus le ratio est élevé (supérieur à 0,02), plus la perméabilité est jugée importante. Plus invasif mais plus précis, le gavage des rongeurs avec une quantité connue de FITC-dextran permet, par du prélèvement de sérum, de quantifier le flux de translocation de ce polysaccharide combiné à un fluorochrome et de déterminer une perméabilité relative. La chambre de Ussing, qui permet de mesurer *ex vivo* le transfert d'un marqueur (par ex., FITC-dextran) et/ou de mesurer la résistance transépithéliale (TER) d'un échantillon d'épithélium, est une technique relativement ancienne mais encore parfois utilisée pour déterminer le degré de perméabilité d'un tissu. Suite à l'utilisation du test lactulose-mannitol, Valentini *et al.* n'a pas montré de différence entre l'index de perméabilité des personnes âgées (60-82 ans) et des plus jeunes et conclue que l'étanchéité de la barrière épithéliale de l'intestin grêle n'est pas altérée avec le vieillissement en bonne santé [94]. Plus récemment, Wilms *et al.* montre également aucun effet significatif de l'âge sur la perméabilité intestinale en combinant les résultats du test lactulose-mannitol et ceux d'une étude *ex vivo* – biopsies coliques dans une chambre de Ussing [95]. Theravanjan *et al.*, quant à eux, observent que la perméabilité intestinale au FITC-dextran et au <sup>51</sup>Chromium-EDTA (marqueur radioactif) est augmentée chez des souris de 18-22 mois par rapport aux plus jeunes et expliquent (à l'aide de rongeurs axéniques) que ce phénomène est une conséquence de l'altération du microbiote intestinal liée à l'âge [89]. Finalement, des protéines des jonctions serrées (zonuline, claudines), jouant un rôle important dans le maintien de la barrière et

de la perméabilité intestinale, ont également été investiguées. Ainsi, l'âge diminuerait l'expression de ZO-1 et Occludin au niveau du côlon chez le babouin [96] et au niveau de l'iléon chez le rat [97] mais pas chez l'homme [86]. Ces observations suggèrent que l'augmentation de la perméabilité n'est pas une caractéristique intrinsèque du vieillissement mais que l'altération du microbiote au cours du vieillissement pourrait être associée à une augmentation de la perméabilité intestinale.

## 5- Modifications des organes du goût et de l'odorat

Les pertes du goût (agueusie) et de l'odorat (anosmie) sont fréquemment observées au cours du vieillissement physiologique. Ces altérations sont très courantes puisqu'au moins 60 % des personnes de 65 à 80 ans présentent une déficience majeure de l'un de ces sens, et celles-ci résultent de la perte des cellules sensorielles et/ou de leur sensibilité ainsi qu'à une mauvaise hygiène bucco-dentaire [98]. Les déficits du goût et de l'odorat sont associés à une diminution de l'appétit, de la prise alimentaire (macronutriments) et à une mauvaise qualité nutritionnelle (alimentation plus salée et sucrée) qui pourraient favoriser le risque de sous-nutrition (et malnutrition) chez la personne âgée, même si le lien de cause à effet est difficile à démontrer [99].

*Pour conclure, les données les plus récentes indiquent que la majorité des fonctions digestives est préservée chez l'agé. Les effets de l'âge per se sur les fonctions digestives semblent mineurs par rapport aux effets associés à l'état de santé (comorbidités) et aux habitudes de vie (alimentation, sédentarité, médication) [36]. Les troubles de la mastication/salivation/déglutition ainsi que l'augmentation de l'extraction splanchnique des AA et la résistance anabolique (aux AA et à l'insuline) néanmoins fréquents avec le vieillissement, vont altérer l'assimilation et l'utilisation optimales des nutriments, augmentant ainsi le risque de sarcopénie et/ou de dénutrition chez la population âgée.*

### III- Altération de la fonction musculaire avec l'âge : la sarcopénie

La survenue de pathologies fait partie intégrante et participe au phénomène de vieillissement [100]. La frontière entre le vieillissement physiologique et pathologique est donc mince et difficile à établir. Selon la Global Burden of Disease Study de 2017, plus de 31 % des maladies de l'adulte seraient associées à l'âge [101], dont les plus communément décrites sont : les troubles musculo-squelettiques (sarcopénie, arthrose, ostéoporose), les maladies métaboliques (diabète), les maladies cardio-vasculaires et respiratoires, les cancers, les pathologies neurodégénératives (maladies d'Alzheimer et de Parkinson) et les déficits sensoriels [102]. Dans la suite de ce manuscrit, seulement la sarcopénie sera développée puisque le muscle squelettique est la cible de notre travail.

#### A) Définitions de la sarcopénie

Il est connu depuis plus de 40 ans que l'âge est associé à une perte de masse maigre – composée essentiellement des muscles squelettiques, puis des os et autres organes. Le terme de sarcopénie (du grec *sarx* et *penia* : perte de chair) a été introduit pour la première fois en 1988 par Rosenberg et ses collaborateurs [103]. La sarcopénie a ensuite été définie comme la perte de masse musculaire progressive survenant avec l'âge [104]. Elle est diagnostiquée à l'aide de l'indice de masse musculaire squelettique ou appendiculaire (défini par le rapport de la somme des masses musculaires des membres (ASM) / taille<sup>2</sup>) et souvent mesurée par absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA) [105]. La sarcopénie peut être de classe I ou II sur la base d'un indice de masse musculaire squelettique (SMI) inférieur respectivement d'un ou deux écarts types aux valeurs de références des jeunes adultes [16,106–108]. Toutefois, des travaux ont rapidement montré que les limitations fonctionnelles et de mobilité survenant au cours du vieillissement étaient davantage dues à la perte de force musculaire qu'à la perte de masse des muscles [109–112] (Figure 5).

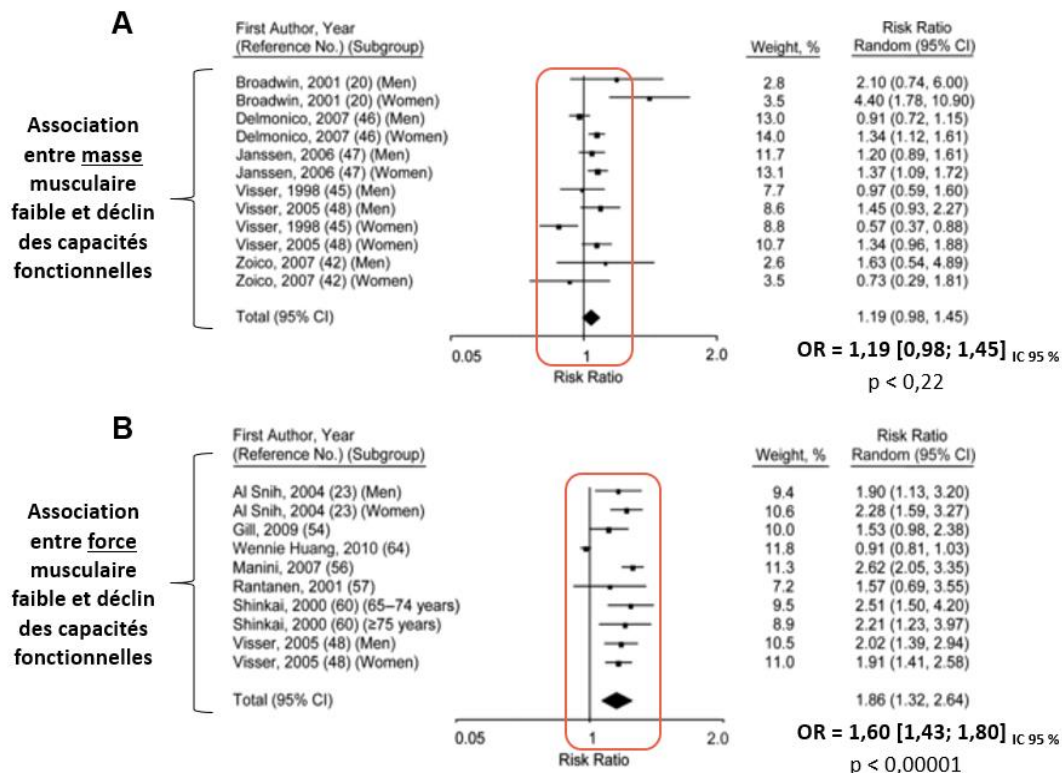


Figure 5. Forest plots de (A) la masse musculaire ou de (B) la force musculaire associées au risque de déclin des capacités fonctionnelles et démontrant que la force est davantage corrélée à ce déclin que la masse. D'après Schaap *et al.*, 2013 [111].

En 2010, le European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) publie un premier consensus concernant le concept de sarcopénie en ajoutant à la définition l'aspect « force musculaire » et « performance physique » en plus de la masse, mais sans proposer de valeurs seuils [113]. La sarcopénie est alors définie comme la *perte progressive et involontaire de masse et de force musculaires associée à une baisse de la performance physique et de la qualité de vie* [18]. En prenant en compte les composantes fonctionnelles, l'EWGSOP a ainsi classé la sarcopénie en trois stades : (1) la pré-sarcopénie, qui décrit une faible masse musculaire avec une force musculaire et des performances physiques non affectées ; (2) la sarcopénie, qui décrit une faible masse musculaire avec une faible force musculaire ou des performances physiques réduites ; et (3) la sarcopénie sévère décrite par une réduction simultanée de la masse musculaire, de la force musculaire et des performances physiques [113].

En vue des conséquences de la sarcopénie sur la morbidité et la mortalité des personnes âgées [21], l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a reconnu la sarcopénie comme une maladie, ajoutée à la Classification Internationale des Maladies (ICD-10-CM) en 2016 [114]. Néanmoins, cette pathologie reste encore mal diagnostiquée et traitée [115]. Or, l'identification des individus sarcopéniques permet, en clinique, d'adapter la prise en charge des patients et d'optimiser la prévention. Pour mieux diagnostiquer ces patients, le groupe de travail Européen sur la Sarcopénie (EWGSOP2) a récemment mis à jour la définition de la sarcopénie (la force musculaire passe alors au premier plan) pour faciliter le diagnostic, évaluer le degré de sévérité de la maladie et mettre en place une stratégie préventive ou thérapeutique adaptée (**voir partie 2- Diagnostic clinique des patients**).

Bien que la sarcopénie soit encore souvent attribuée à l'âge [113], elle est également retrouvée dans des situations de sédentarité extrême (alitement, vie en apesanteur), de pathologies (cancer, insuffisance d'organe avec cachexie) ou de jeûne prolongé [21,116]. De plus, elle n'est pas l'exclusivité des personnes maigres puisqu'elle touche aussi les sujets obèses (syndrome d'obésité sarcopénique) et est alors associée à un pronostic plus sévère [117].

## 1- Prévalence de la sarcopénie

La prévalence de la sarcopénie est difficile à estimer et dépend de la définition utilisée, mais jusqu'à 30 % des plus de 60 ans (vivant à domicile ou en institution) et 50 % des plus de 80 ans pourraient être concernés [19,118–120]. Les auteurs d'une méta-analyse récente ont revisité ces chiffres et estiment que la prévalence de la sarcopénie est de 10 % (définition complète de l'EWGSOP2) à 27 % (masse musculaire seulement) pour les personnes de plus de 60 ans [121].

## 2- Diagnostic clinique des patients

Le diagnostic de la sarcopénie repose sur des critères cliniques et des valeurs seuils associant l'évaluation de la force musculaire, de la masse musculaire et de la performance physique [18,21]. De nombreux outils sont disponibles (**Tableau 3**) et certains d'entre eux ont été choisis par



l'EWGSOP2 (en fonction de la facilité d'accès en clinique, l'acceptation par le patient) pour déterminer des points seuils (« cut-off points ») à partir desquels une sarcopénie peut être suspectée (Figure 6).

Brièvement, l'examen clinique « suspect » d'un patient et/ou son auto-évaluation par le questionnaire SARC-F [122] permettent d'identifier les individus à risque de sarcopénie. Puis, la force musculaire du patient est mesurée et des valeurs inférieures aux seuils suggèrent la suspicion d'une sarcopénie. Le diagnostic de la sarcopénie est confirmé par la mesure de la masse musculaire à l'aide d'une multitude de techniques différentes (Tableau 4), mais l'absorptiométrie biphotonique (DXA) est la plus couramment utilisée. Enfin, des tests de performance physique permettent d'évaluer le degré de sévérité de la sarcopénie afin de mettre en place les stratégies de prise en charge les plus appropriées (Tableau 3).

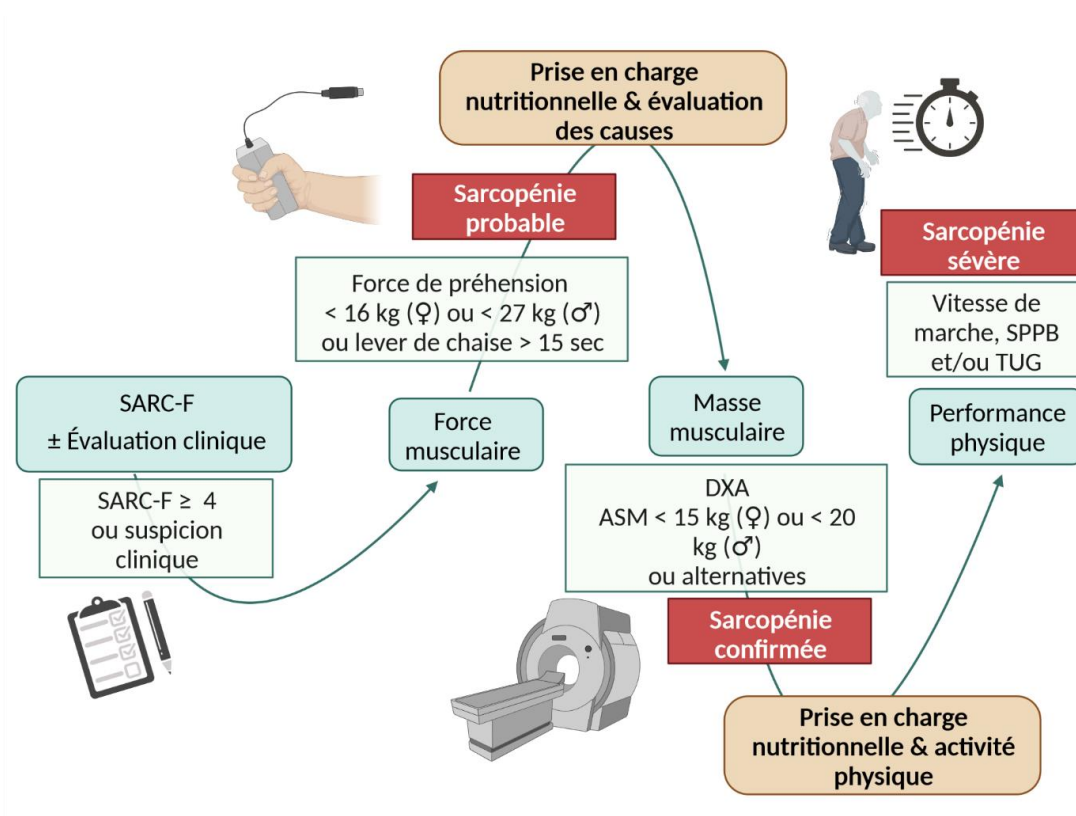


Figure 6. Adaptation de l'algorithme de dépistage de la sarcopénie chez les personnes âgées proposé par le groupe de travail EWGSOP en 2019. [115] Acronymes : ASM, appendicular skeletal mass ; DXA, dual-energy-X-ray absorptiometry ; SPPB, short physical performance battery ; TUG, timed up and go test.

Tableau 3. Principaux outils et valeurs seuils (retenues par l'EWGSOP2) utilisés pour diagnostiquer un patient à risque de sarcopénie et évaluer le degré de sévérité de la maladie. D'après Ackermans *et al.*, 2022 et Cruz-Jentoft *et al.*, 2019.

Tests/outils	Principes et valeurs seuils	Avantages	Inconvénients
<b>Suspicion d'une sarcopénie</b>			
<b>Questionnaire SARC-F (5 questions)</b>	1. Difficultés pour lever/transporter des charges de 4,5 kg ; 2. Traverser une pièce ; 3. Se lever d'une chaise ; 4. Monter 10 marches ; 5. Nombre de chute dans les 12 derniers mois	Rapide et facile à utiliser en clinique Spécificité élevée pour la sarcopénie	Sensibilité faible pour la sarcopénie (risque de sous-diagnostic)
<b>Examen clinique</b>	Mesures anthropométriques (circonférence du mollet < 31 cm)	<i>voir Tableau 4</i>	
<b>Mesure de la force musculaire</b>			
<b>Force de préhension (grip strength)</b>	Mesure au dynamomètre (Newton) la force des membres supérieurs Méthode de référence retenue par l'EWGSOP2 ♂ < 16 kg ou ♀ < 27 kg : <u>sarcopénie probable</u>	Marqueur prédictif de la morbidité et mortalité d'un patient âgé Facile à utiliser en clinique	Membres supérieurs uniquement et calibration du dynamomètre (taille de la main)
<b>Test du lever de chaise (chair stand)</b>	Mesure du temps nécessaire à un patient pour se lever cinq fois d'une position assise sans utiliser ses bras (force des jambes) > 15 secondes pour 5 levers : <u>sarcopénie probable</u>	Alternative à la force de préhension qui mesure aussi l'endurance et l'équilibre	Manque de standardisation (hauteur de la chaise, position de départ) et difficultés d'interprétation des résultats
<b>Mesure de la masse/qualité des muscles</b>			
<b>Masse squelettique appendiculaire (ASM)</b>	Masse des membres supérieurs et inférieurs ♂ < 15 kg ou ♀ < 20 kg : <u>sarcopénie confirmée</u>	<i>Voir Tableau 4 pour les différentes techniques de mesure de la masse/qualité musculaire, leurs avantages et leurs limites</i>	
<b>Indice de masse squelettique (SMI)</b>	Rapport ASM / taille <sup>2</sup> ♂ < 5,5 kg ou ♀ < 7,0 kg : <u>sarcopénie confirmée</u>		
<b>Mesure de la performance physique</b>			
<b>Vitesse de marche (gait speed)</b>	Vitesse de marche ≤ 0,8 m/seconde Ou ≥ 6 minutes (ou inachèvement) pour parcourir 400 mètres Suggère que la <u>sarcopénie est sévère</u>	Bon indicateur de l'état de santé général Mesure standard en clinique et en recherche, simple à mettre en œuvre	N'est pas très spécifique à la sarcopénie puisque d'autres systèmes sont impliqués (cardio-vasculaires, nerveux...)
<b>Test TUG (Timed Up and Go)</b>	Mesure du temps nécessaire à un patient pour se lever d'une chaise, marcher sur 3 mètres, se retourner, marcher vers la chaise et se rasseoir ≥ 20 secondes : <u>sarcopénie sévère</u>	Simple à mettre en œuvre	Spécificité et sensibilité de la sarcopénie plutôt basses, manque de standardisation, à compléter avec d'autres tests
<b>SPPB (Short Physical Performance Battery)</b>	Somme de 3 tests : équilibre, vitesse de marche (sur 2,5 m) et lever de chaise (force des jambes). Score ≤ 8 points : <u>sarcopénie sévère</u>	Mesure standard en clinique et en recherche, simple à mettre en œuvre Combine plusieurs tests	

**Tableau 4. Principales techniques utilisées pour mesurer la masse et la qualité des muscles du patient âgé.**

D'après Tosato *et al.*, 2017 et Ackermans *et al.*, 2022.

Techniques	Avantages	Inconvénients
<b>Techniques d'imagerie médicale</b>		
<b>Imagerie par résonance magnétique (IRM)</b>	Grande précision quantitative/qualitative d'analyse des muscles Pas d'exposition à des radiations Très bonne reproductibilité	Coût de l'appareil et manque de portabilité Nécessité de personnel qualifié Temps nécessaire pour l'acquisition/traitement des scans Absence de protocole standardisé Contre-indications (implants)
<b>Tomodensitométrie (TDM) ou tomographie ou scanner X</b>	Grande précision quantitative/qualitative d'analyse des muscles Rapidité de la mesure Très bonne reproductibilité même avec différents logiciels	Exposition à des radiations (rayons X) Coût de l'appareil et manque de portabilité Nécessité de personnel qualifié
<b>Absorptiométrie biphotonique à rayons X (DXA) ou ostéodensitométrie</b>	Méthode de référence / bonne alternative pour l'étude de la composition corporelle (masse grasse, masse maigre et contenu minéral osseux) Faible exposition aux radiations (rayons X) relativement au scanner Coût abordable de l'appareil (par rapport autres techniques d'imagerie) Rapidité de la mesure	Manque de portabilité Résultats compromis (masse maigre) par l'état hydrique du sujet La masse musculaire est « approximée » avec la masse maigre Ne mesure pas l'adiposité intramusculaire (qualité musculaire) Résultats parfois incohérents entre les marques/logiciels
<b>Ultrasonographie ou échographie</b>	Pas d'exposition à des radiations Appareil portable avec un prix très abordable Mesure simple et relativement rapide de l'épaisseur et de la structure des muscles	Nécessité de personnel qualifié pour obtenir des résultats fiables Impédance acoustique des muscles similaire au tissu adipeux Compression du muscle par le transducteur nécessaire Manque de standardisation limitant l'interprétation des résultats
<b>Analyse par impédance bioélectrique</b>	Appareil portable et à coût très abordable Mesure simple et relativement rapide de la composition corporelle Pas d'exposition à des radiations	Résultats fortement compromis par l'état hydrique et général du sujet (obèse, cachectique) Manque de standardisation limitant l'interprétation des résultats
<b>Paramètres anthropométriques et marqueurs biochimiques</b>		
<b>Circonférence du mollet ou du muscle du milieu du bras</b>	Méthode la plus facilement applicable (portable, coût, matériel) pour évaluer l'état nutritionnel d'un sujet Alternative ou complément des techniques plus coûteuses	Manque de standardisation (valeurs seuils) chez la personne âgée Nécessité d'un personnel bien entraîné pour limiter la variabilité
<b>Albumine, Potassium, Créatinine</b>	Dosage de « routine »	Non standardisé et peu adapté pour l'étude de la sarcopénie
<b>Dilution de créatine deutérée</b>	Résultats cohérents avec les données IRM	Équipement de laboratoire sophistiqué et personnel qualifié
<b>Biopsie musculaire</b>	Excellent typage des fibres musculaires (histologie, activités enzymatiques)	Méthode très invasive nécessitant une structure et du personnel qualifié Investigation de la qualité musculaire seulement

## B) Mécanismes physiopathologiques de la sarcopénie

De nombreux mécanismes, indissociables au vieillissement et interconnectés, sont impliqués dans le développement de la sarcopénie (Figure 7). La physiopathologie complexe de cette maladie pourrait être causée par (1) des altérations de la structure et de la physiologie du muscle liées à l'âge, elles-mêmes aggravées par (2) des paramètres biologiques (inflammation, stress oxydatif, résistance anabolique), (3) un déséquilibre de l'homéostasie protéique et (4) des facteurs externes tels que l'inactivité physique et la dénutrition [104,123].

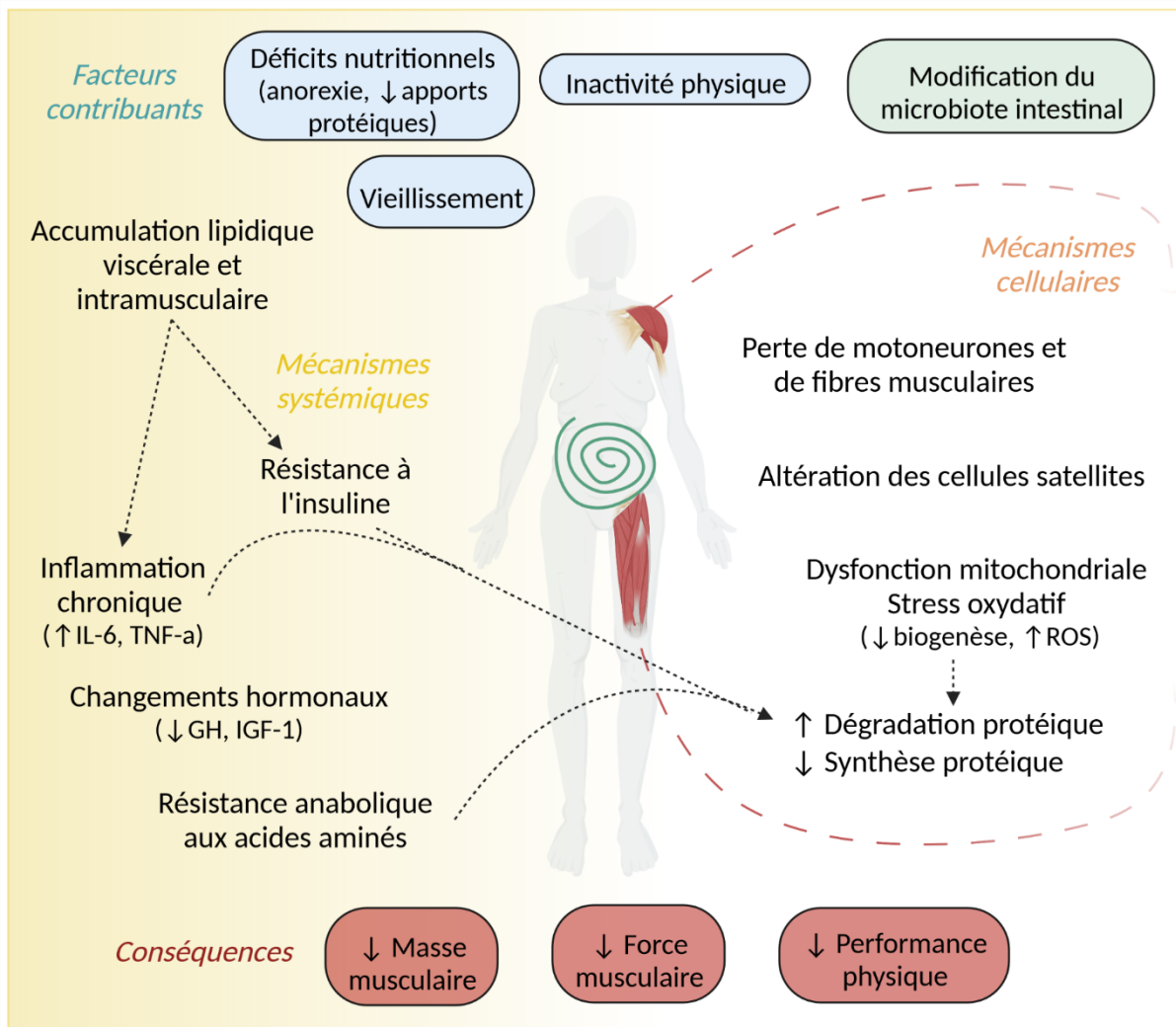


Figure 7. Facteurs et mécanismes contribuant au développement de la sarcopénie. [16,21,124,125]

## 1- Altérations physiologiques et structurales du muscle liées à l'âge

Pour expliquer le déclin de la masse et de la fonction musculaires avec l'âge, plusieurs paramètres intrinsèques au muscle sont mis en jeu : la réduction des fibres musculaires, des cellules satellites, des unités motrices et de la vascularisation musculaire (Figure 8).

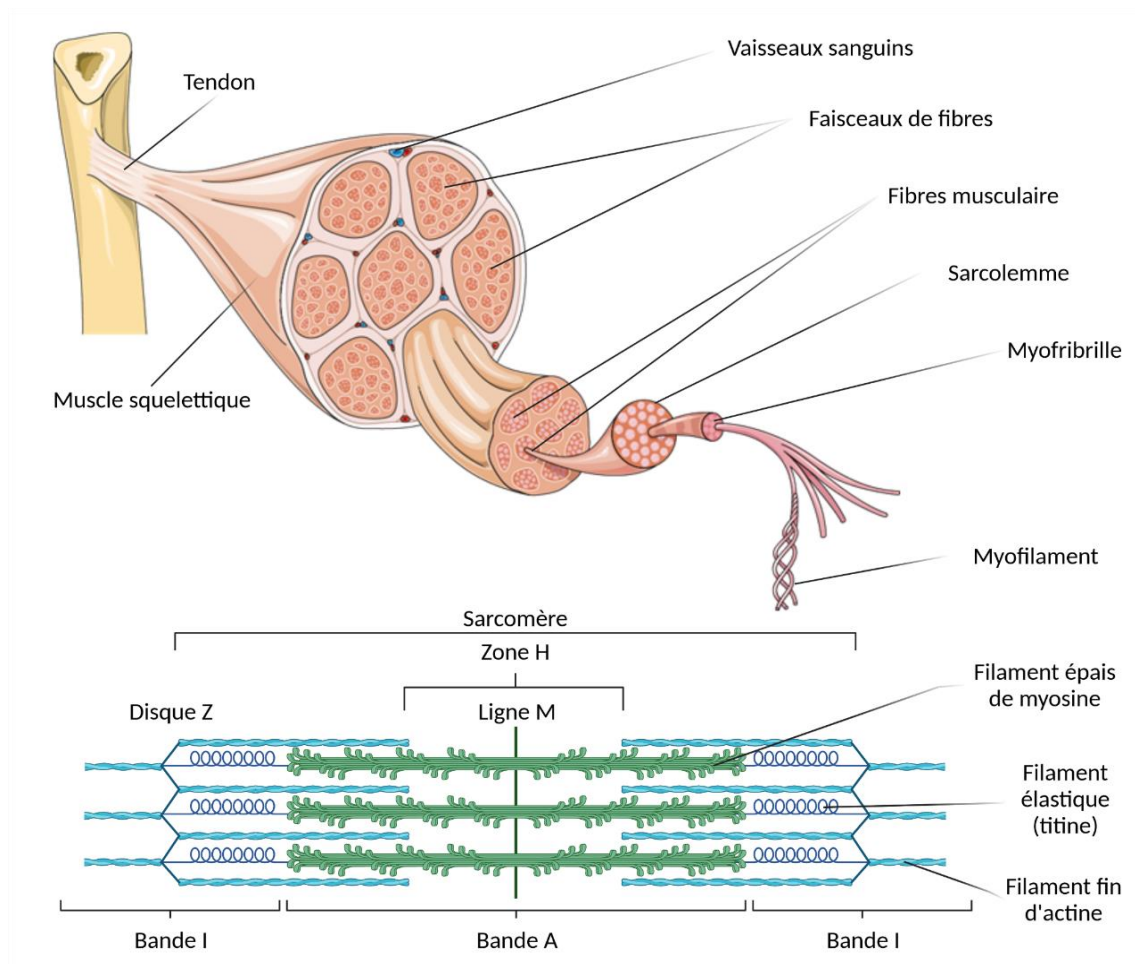


Figure 8. Organisation générale d'un muscle squelettique et structure du sarcomère.  
Images de Smart.sevier.com et Biorender.com.

### ○ Les fibres musculaires

Le muscle est généralement composé d'une association de plusieurs types de fibres caractérisés par des propriétés métaboliques et contractiles différentes. Certains muscles présentent une dominance en un type particulier de fibres afin d'accomplir au mieux sa fonction (posture ou puissance). Il existe trois principaux types de fibres musculaires : les fibres à contraction lente ou

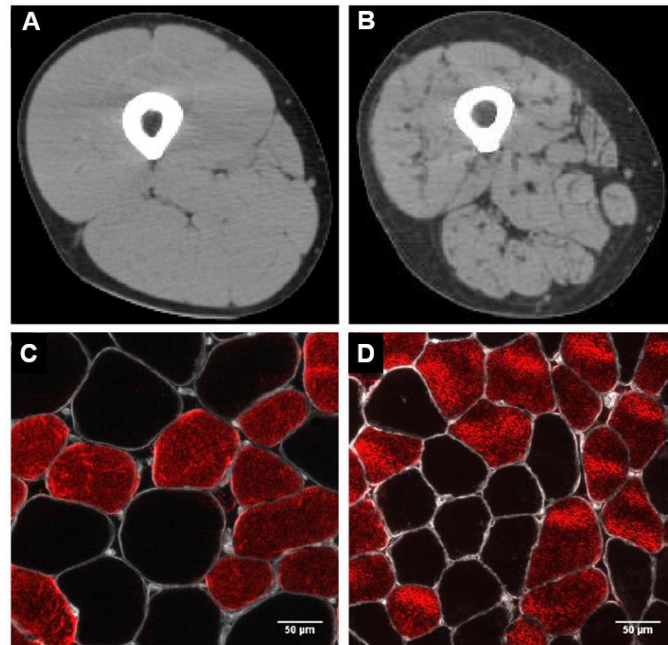
oxydatives (de type MHC I), les fibres à contraction rapide ou glycolytiques (de type MHC IIB) et les fibres intermédiaires (de type MHC IIA) (Tableau 5).

**Tableau 5. Les trois principaux types de fibres musculaires des muscles squelettiques.** [126]

Caractéristiques	Type I (lentes, oxydatives)	Type IIB (rapides, glycolytiques)	Type IIA (intermédiaires)
Couleur de la fibre	Rouge	Blanche	Rosée
Diamètre de la fibre	Petit	Grand	Grand
Vascularisation	Très vascularisée	Peu vascularisée	Bien vascularisée
Teneur en myoglobine (stockage de l'oxygène)	Élevée	Faible	Moyenne
Abondance des mitochondries	Élevée	Faible	Moyenne
Quantité de glycogène (fourni rapidement de l'ATP nécessaire à la contraction <i>via</i> la glycolyse)	Faible	Élevée	Élevée
Vitesse de contraction	Lente (100 millisecondes)	Rapide (25 millisecondes)	Rapide (50 millisecondes)
Résistance à la fatigue	Élevée (plusieurs heures)	Faible (plusieurs minutes)	Moyenne
Capacité aérobie (effort peu intense, endurance)	Élevée	Faible	Moyenne
Capacité anaérobie (effort intense mais bref)	Faible	Moyenne	Élevée

Des analyses histologiques (chez l'animal et l'homme) ont montré que la sarcopénie résulterait d'une diminution du nombre des fibres rapides [127–129] mais surtout d'une réduction de la taille et de la surface de ces fibres, de 10 à 40 %, au cours de la vieillesse – tandis que les fibres de type I seraient généralement peu impactées pour une majorité d'auteurs [127,129–135] (Figure 9). Par ailleurs, il a été observé que près d'un tiers des fibres du muscle âgé (> 85 ans) n'étaient ni strictement de type I ni strictement de type II, mais présentaient des fibres co-exprimant à la fois les MHC I et IIA, ce qui n'est pas observé dans les fibres musculaires des adultes jeunes [136]. Pour tenter de comprendre les mécanismes explicatifs de la réduction des fibres musculaires, les résultats de plusieurs études ayant fait appel à la transcriptomique sur biopsies musculaires chez le rongeur et l'homme, indiquent que le vieillissement est associé à : l'augmentation de la mort cellulaire (apoptose) [137–140], l'activation de la réponse immunitaire (inflammation), l'altération du

métabolisme lipidique (accumulation de cellules adipeuses), le déclin du métabolisme énergétique (altération de la fonction mitochondriale, réduction de la glycolyse, résistance à l'insuline) et l'altération de la dégradation protéique [134,141–143].



**Figure 9. Scans (tomodensitométrie) du haut de la jambe (A) d'un adulte de 23 ans et (B) d'une personne de 70 ans et (C) coupes transversales suivies d'une coloration immunohistochimique de biopsie musculaire du jeune adulte et (D) de la personne âgée. Les fibres de type I sont en rouges, les fibres de types II en noir et la lame basale en gris. Images de Nilwik *et al.*, 2013 [130].**

Le protéome du muscle révèle que l'âge est associé à : l'altération des protéines sarcomériques, la réduction du contenu mitochondrial (complexes de la chaîne respiratoire), l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'altération du métabolisme glucidique (réduction de la glycolyse, de la formation du glycogène) et la diminution de la synthèse protéique [133,134,141], et ce tout particulièrement dans les fibres de type II [133].

#### ○ Les cellules satellites

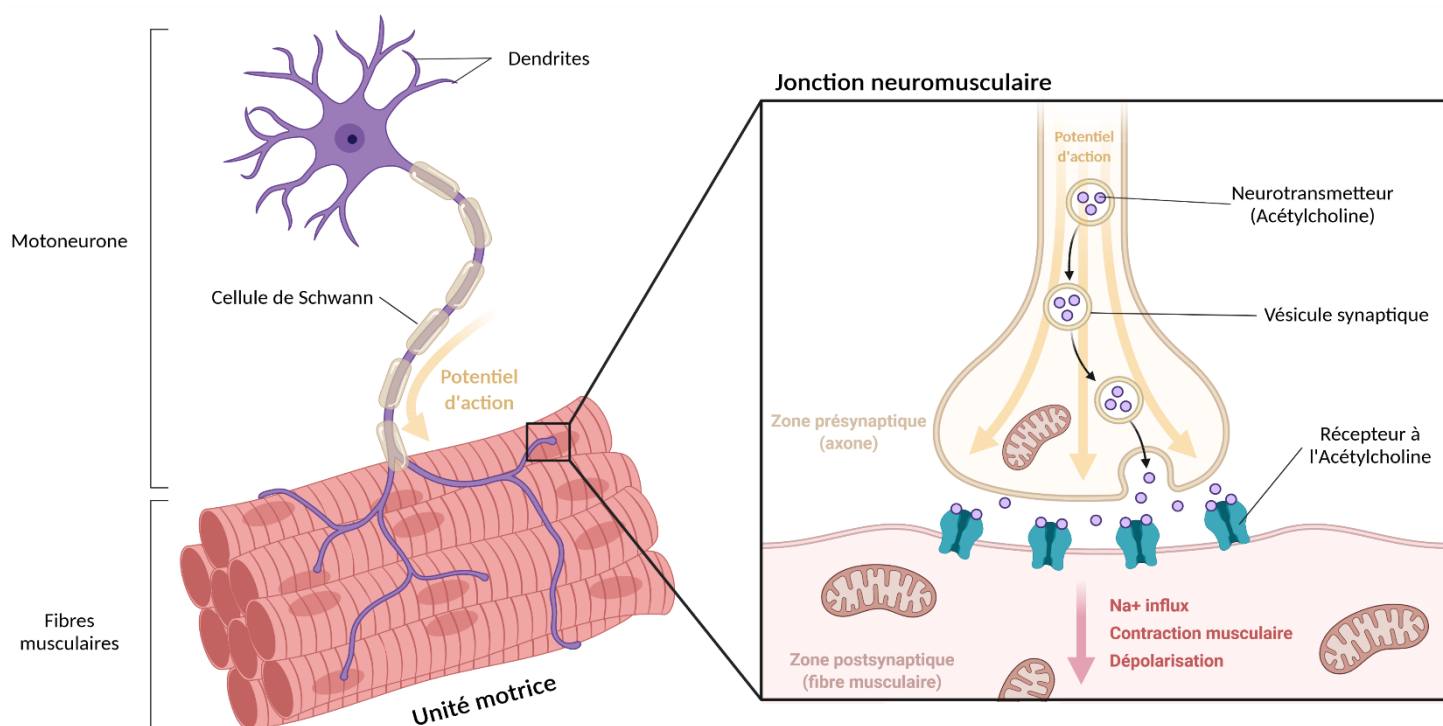
Les cellules souches musculaires, ou cellules satellites, assurent le maintien du réservoir de cellules souches, la différenciation des cellules souches en myocytes matures et la régénération des

fibres après une lésion. Ces cellules peuvent être dans un état de quiescence (arrêt réversible du cycle cellulaire) ou activé. Les cellules quiescentes peuvent s'activer (reprise du cycle cellulaire et prolifération) pour s'auto-renouveler ou régénérer le tissu après une blessure sous l'influence de signaux intrinsèques (facteurs de croissance, facteurs trophiques, cytokines) et extrinsèques tels que l'exercice physique ou un traumatisme musculaire [144,145]. L'âge est associé à une réduction progressive du nombre des cellules satellites et de leur capacité de régénération, et principalement dans les fibres musculaires de type II [145–147]. Par ailleurs, Leiter *et al.* ont montré que l'activation des cellules quiescentes suite à un stimulus est ralentie chez la souris âgée et nécessite un signal plus intense par rapport aux jeunes rongeurs [148]. Ces phénomènes peuvent être expliqués par plusieurs mécanismes dont l'activation augmentée de la voie signalétique du stress (p38), l'élévation d'inhibiteurs de kinases-cycline-dépendantes associées à la sénescence (p16<sup>Ink4a</sup>) et l'altération de l'activité autophagique due à l'accumulation de vieilles protéines/organelles [145]. D'autre part, la diminution du taux de prolifération et de croissance des cellules souches est favorisée par l'expression diminuée de marqueurs de différenciation (Myf-5, MyoD, Myogenin et MRF-4/Myf6) ainsi que par une production constitutive par les cellules souches âgées de facteur de croissance fibroblastique (FGF-2) qui altèrent la capacité d'auto-renouvellement [144,147–150]. L'ensemble de ces mécanismes aboutit finalement à la réduction des cellules souches actives et à une diminution de différenciation en cellules matures fonctionnelles.

#### ○ Le vieillissement neuromusculaire

La dénervation des motoneurones, la perte de nombre et de fonctionnalité des unités motrices et la dégradation des jonctions neuromusculaires (**Figure 10**) sont associées à l'âge et pourraient également favoriser l'atrophie musculaire [150,151]. Plus précisément, il semblerait que l'âge entraîne une diminution des motoneurones  $\alpha$  (innervant les fibres rapides) à cause d'une mort cellulaire accélérée, une expansion du nombre de terminaisons présynaptiques (probablement pour compenser l'altération de communication entre l'axone et le muscle) et une réduction du nombre de vésicules synaptiques [123,148].





**Figure 10. Représentation schématique d'une unité motrice et d'une jonction neuromusculaire.**  
Image de Biorender.com.

Des effets de l'âge sont également observés dans la composante postsynaptique de la jonction neuromusculaire (le muscle) parmi lesquels une « fragmentation » de la plaque terminale, une diminution du nombre de récepteurs à l'acétylcholine et une réduction des mitochondries fonctionnelles, décrits comme irréversibles [123,152,153]. Il a également été montré que le vieillissement s'accompagne d'une désorganisation des cellules de Schwann – cellules composantes de la gaine de myéline entourant les axones – qui pourrait contribuer à la diminution de la vitesse de propagation de l'influx nerveux chez les sujets âgés [154]. L'ensemble de ces altérations affecteraient plus particulièrement les fibres de types II [151,155,148].

### ○ La vascularisation musculaire

La vascularisation/capillarisation (densité capillaire et ratio capillaire/fibre musculaire) serait 12 à 25 % plus faible dans les muscles des personnes de plus de 60 ans par rapport à des jeunes adultes, et les fibres de types II seraient à nouveau plus impactées que les fibres lentes [156]. La réduction des capacités oxydantes ainsi que la résistance à l'insuline – puisque l'insuline favorise la vasodilatation en activant la monoxyde d'azote (NO) synthase endothéliale – sont des facteurs contribuant à la raréfaction des capillaires et à l'hypo-perfusion qui pourraient eux-mêmes contribuer au développement de la sarcopénie [123].

*L'ensemble de ces altérations structurelles (réduction de la surface des fibres musculaires de type II, de la capacité à former de nouveaux myocytes, de l'innervation et de la capillarisation des muscles) expliquent en partie la perte de force musculaire observée chez les patients sarcopéniques et leur incapacité à réaliser des exercices de forte intensité pour lesquels les fibres rapides sont largement sollicitées.*

## 2- Environnement biologique favorable au développement de la sarcopénie

### a) Résistance anabolique

Un phénomène de résistance anabolique se met en place avec l'âge, c'est-à-dire que la sensibilité du muscle à l'action de stimuli anaboliques tels que la leucine, l'insuline et l'exercice physique peut être diminuée chez l'âge par rapport aux jeunes, conduisant à une déficience de l'anabolisme protéique [157–159]. En effet, il a été démontré par Dardevet *et al.* que la stimulation de la synthèse protéique et de la voie de signalisation mTOR/S6K dans le muscle du rat âgé requerrait deux fois plus de leucine que chez les jeunes animaux [160]. De la même manière, l'induction de la synthèse protéique et de la phosphorylation de p70S6K dans le muscle vaste latéral pendant un clamp euglycémique-hyperinsulinémique-hyperaminoacidémique est diminuée chez l'homme âgé par rapport aux jeunes adultes [161]. Ce phénomène de résistance anabolique pourrait être aggravé par

une réduction de la disponibilité en AA avec l'âge (systémique et/ou intracellulaire [162,163]) elle-même causée par l'augmentation de l'extraction splanchnique, la réduction du transport en AA dans les cellules musculaires et l'altération de la vascularisation du muscle avec l'âge [164,165]. Par ailleurs, des études plus récentes suggèrent que le microbiote intestinal jouerait un rôle important dans la régulation de l'utilisation des AA et la résistance anabolique liée au vieillissement [165,166] (**voir chapitre 3**).

L'insuline joue également un rôle majeur dans le métabolisme des protéines en stimulant le transport des AA dans les tissus, en augmentant la synthèse des protéines et en inhibant la protéolyse [21], notamment *via* la voie de signalisation Akt/mTOR/S6K. De nombreuses études ont montré qu'une hyper-insulinémie pouvait stimuler la synthèse des protéines musculaires et inhiber la protéolyse, en particulier lorsque la disponibilité en AA est augmentée [167–170]. Avec l'âge, la sensibilité des muscles à l'action de l'insuline peut être diminuée, d'autant plus chez les individus obèses [171–173]. La sarcopénie est clairement associée au développement d'une résistance à l'insuline (IR) avec l'âge et ce par plusieurs mécanismes [135,174]. Tout d'abord, l'accumulation ectopique des lipides dans le muscle squelettique conduit au phénomène de « lipotoxicité » qui favorise la générations de ROS et l'inflammation (facteur NF- $\kappa$ B) contribuant au développement de l'IR et à l'altération de l'anabolisme protéique [175–177]. D'autre part, le phénomène de résistance anabolique aux AA (leucine), implique également l'insuline [158,178]. Ainsi, le taux basal en insuline pourrait progressivement augmenter chez l'individu âgé pour contrer cette résistance anabolique et conduire progressivement à une IR (puis au diabète de type 2). Finalement, l'IR aggrave et peut être aggravée par l'inflammation, le stress oxydatif et la dysfonction des mitochondries, d'autres caractéristiques fréquemment décrites dans le muscle sarcopénique [150,174,179].

### *b) Inflammation chronique*

Le processus de vieillissement est associé à l'augmentation de marqueurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  ; IL-6, interleukine-6 ; CRP, protéine réactive C) dans le plasma et les tissus et à l'installation progressive d'une inflammation chronique de bas-bruit ou

« inflammaging » [180]. L'élévation de ces cytokines est connue pour être impliquée dans la perte de masse musculaire, comme cela a notamment été montré chez les patients souffrant de cachexie cancéreuse [181], ou les patients atteints de diabète et d'obésité [182,183]. Des taux élevés d'IL-6 et/ou de CRP ont également été associés à une diminution des performances physiques et à une incapacité fonctionnelle importante [148].

Une cause possible de l'inflammaging est la dérégulation avec l'âge du système immunitaire (immunosénescence) entraînant une altération de la barrière intestinale et l'augmentation de sa perméabilité qui, en permettant une entrée accrue d'endotoxines (lipopolysaccharides, LPS – voire bactéries entières) dans la circulation, génère de l'inflammation systémique [184]. Cet état inflammatoire stimulerait la protéolyse musculaire, inhiberait la synthèse protéique, diminuerait le nombre de cellules satellites et altérerait les capacités de régénération des cellules musculaires [148,185]. Dans des modèles rongeurs d'inflammation aiguë, on observe une stimulation de la protéolyse musculaire (système ubiquitine-protéasome, UPS), une diminution de la synthèse protéique (mTOR), et l'induction de l'apoptose cellulaire ou l'inhibition de la différenciation des cellules satellites [186,187]. Des mécanismes similaires peuvent également se produire dans une situation d'inflammation de bas-bruit comme cela a été montré par Rieu *et al.* sur des rats présentant une modeste augmentation des niveaux plasmatiques d' $\alpha$ -2 macroglobuline (marqueur d'inflammation systémique du rongeur) sans aucune inflammation intestinale diagnostiquée ou induite [188]. Ces animaux présentaient une inhibition de la synthèse protéique musculaire post-prandiale (normalement stimulée chez des animaux âgés et non enflammés) mais qui, de manière intéressante, est rétablie avec un traitement à l'ibuprofène suggérant que l'état inflammatoire était la cause de l'absence de réponse de la synthèse protéique aux stimuli anaboliques alimentaires [188]. Chez l'Homme, l'IL-6 est corrélée à l'atrophie musculaire lorsqu'elle est liée à une inflammation chronique de bas bruit comme cela est observé chez les personnes âgées ou chez certains patients cancéreux présentant une synthèse protéique diminuée [189,190]. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 (et d'autres médiateurs pro-inflammatoires) agissent par l'intermédiaire de deux voies intracellulaires différentes : les voies NF- $\kappa$ B et p38 MAP kinase [150,191], toutes deux connues pour induire l'expression de MuRF-1 et MAFbx – des ligases impliquées dans le système protéolytique ubiquitine-protéasome (voir partie 3- Conséquences du vieillissement sur le turnover protéique musculaire) – et pour induire la NO-synthase (iNOS), capable de produire des radicaux libres (oxyde nitrique, ion

superoxyde  $O_2^-$ ) et provoquer du stress oxydatif [150]. De plus, le  $TNF-\alpha$  inhiberait la régénération musculaire (déstabilisation des facteurs myogéniques MyoG/MyoD) [135,192] et l'IL-6 pourrait inhiber la voie de signalisation de l'insuline au niveau du muscle, augmentant le risque de diabète de type 2 chez l'Homme [193]. Il est ainsi extrêmement complexe de séparer l'inflammation du stress oxydatif et de la sensibilité à l'insuline au niveau des muscles squelettiques puisque tous ces phénomènes sont interconnectés.

Enfin, il est intéressant de noter que le rôle de l'IL-6 est paradoxal (dépend de la dose, du mode d'administration et de la présence d'autres cytokines) puisque cette cytokine peut également présenter des effets anti-inflammatoire et anabolique (régulation des cellules satellites) en tant que « myokine » lorsqu'elle est sécrétée par le muscle lui-même pendant/après l'exercice physique [16,189,194]. Cette observation souligne le rôle que peut jouer le muscle squelettique sur le système immunitaire et le processus d'immunosénescence en tant qu'organe endocrine [194].

### *c) Dysfonction mitochondriale et stress oxydatif*

Les mitochondries sont des organelles indispensables à la production d'ATP nécessaire à la fonction contractile, au maintien de l'homéostasie oxydative et de la génération des ROS et sont très présentes dans les fibres musculaires et les jonctions neuromusculaires [195]. Ainsi, la dysfonction mitochondriale qui apparaît avec l'âge pourrait être un des mécanismes responsable de l'atrophie du muscle vieillissant [196]. La dysfonction des mitochondries se traduit par : une diminution du contenu mitochondrial et l'altération de leur morphologie/volume [197], une réduction de production d'ATP, une susceptibilité accrue des mitochondries à l'apoptose, une diminution et/ou une altération de l'ADN mitochondrial et enfin un défaut d'activité des enzymes/complexes de la chaîne respiratoire (citrate synthase et cytochrome c oxydase) [16,145,150,195,198–201]. Ces altérations mitochondriales sont plus importantes chez les personnes âgées avec une capacité physique réduite (sédentaires et/ou avec un faible score au test SPPB) [202,203]. Par ailleurs, les cellules musculaires âgées ne parviennent plus à éliminer et/ou remplacer les mitochondries dysfonctionnelles [195,200,201] comme le montre l'expression du PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activateur  $\alpha$ ), un régulateur crucial de la

biogénèse et de la fonction mitochondriales qui est réduite chez les souris âgées par rapport aux jeunes [150,204]. Finalement, la dysfonction des mitochondries (ainsi que l'inflammation évoquée précédemment) aboutit à une production accrue de ROS dans les cellules musculaires et qui, du fait de l'émoussement du potentiel antioxydant avec l'âge, seront moins prises en charge [16,198,200].

Les radicaux libres peuvent activer la voie NF- $\kappa$ B dans le muscle squelettique [205] entraînant la production de myostatine, un facteur qui limite la croissance des cellules musculaires (inhibition de la voie Akt/mTOR) et favorise la dégradation des protéines musculaires [206]. Des hauts niveaux de radicaux libres peuvent également altérer la structure et la fonction des molécules dont l'ADN, les lipides et les protéines conduisant finalement à la lésion puis à la mort cellulaire [207]. De plus, il a été montré que l'oxydation des protéines (carbonylation) modifie l'activité enzymatique et la liaison sur l'ADN des facteurs de transcription, tout en rendant les protéines plus sujettes à la dégradation [207]. Comme l'oxydation des protéines musculaires augmente avec l'âge, les fonctions préalablement citées sont altérées [208]. L'augmentation des taux de ROS dans les muscles, indiquant un stress oxydatif exacerbé, a d'ailleurs été corrélé négativement avec la force musculaire chez la femme âgée [21,209].

### **3- Conséquence du vieillissement sur le turnover protéique musculaire**

Les muscles squelettiques comptabilisent à eux-seuls entre 50 et 75 % des protéines totales du corps humain [15,210]. Comme il n'y a pas d'organe réellement dédié au stockage des AA, les muscles sont le réservoir protéique majeur sollicité en cas d'une diminution des apports protéiques (malnutrition) et/ou d'une augmentation de l'utilisation des AA par l'organisme (pathologies inflammatoires, exercice physique). Le statut protéique musculaire dépend de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines qui se traduit chaque jour par un anabolisme protéique après un repas, compensé par un catabolisme lors du jeûne [39]. L'homéostasie protéique musculaire peut être modifiée sur le long-terme avec l'âge, les pathologies (cachexie, obésité sarcopénique) et la pratique de l'exercice physique. Ces effets sur la masse musculaire sont visibles en l'espace de quelques jours, semaines ou mois.

### *a) La synthèse protéique musculaire*

Plusieurs études ont montré que le taux de synthèse protéique dans le muscle était diminué de 16 à 30 % chez les personnes de plus de 60 ans comparativement à des adultes plus jeunes après un bolus d'AA [150,211–214]. Ce défaut de synthèse concerne principalement les protéines myofibrillaires (actine et myosine) mais également les protéines mitochondriales [211,215–217]. Par ailleurs, les acteurs p70S6K et 4EBP1 de la voie Akt/mTOR/S6K seraient 30 à 40 % moins phosphorylés dans le muscle âgé par rapport aux jeunes après 1 heure d'exercice de résistance [218].

La voie de signalisation Akt/mTOR/S6K est impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et plus spécifiquement dans la croissance des fibres musculaires [219]. Régulant les étapes clés de l'initiation de la traduction, elle est la voie de régulation majeure de la synthèse protéique dans le tissu musculaire. Son activation – par l'insuline, l'Insulin-Growth Factor 1 (IGF-1), les AA dont plus spécifiquement la leucine ou encore l'exercice physique – s'accompagne généralement d'une hypertrophie des muscles tandis que son inhibition (pharmacologique) est à l'origine d'une atrophie [220,221]. La cascade de phosphorylation de la voie Akt/mTOR/S6K est complexe et l'activation de mTOR peut, en plus de stimuler la synthèse protéique, inhiber la dégradation des protéines et promouvoir la synthèse de glycogène et l'entrée du glucose dans la cellule musculaire [220,222,223] (**Figure 11**).

Il est intéressant de noter qu'à l'état basal (par ex., à jeun), les muscles squelettiques âgés présentent généralement une hyper-phosphorylation de mTORC1 [224–226] mais qui ne s'accompagne pas d'une synthèse protéique accrue [225]. Des auteurs suggèrent que cette hyper-activation chronique conduirait même à une perte de sensibilité du complexe mTOR en réponse aux AA ou à l'exercice [227].

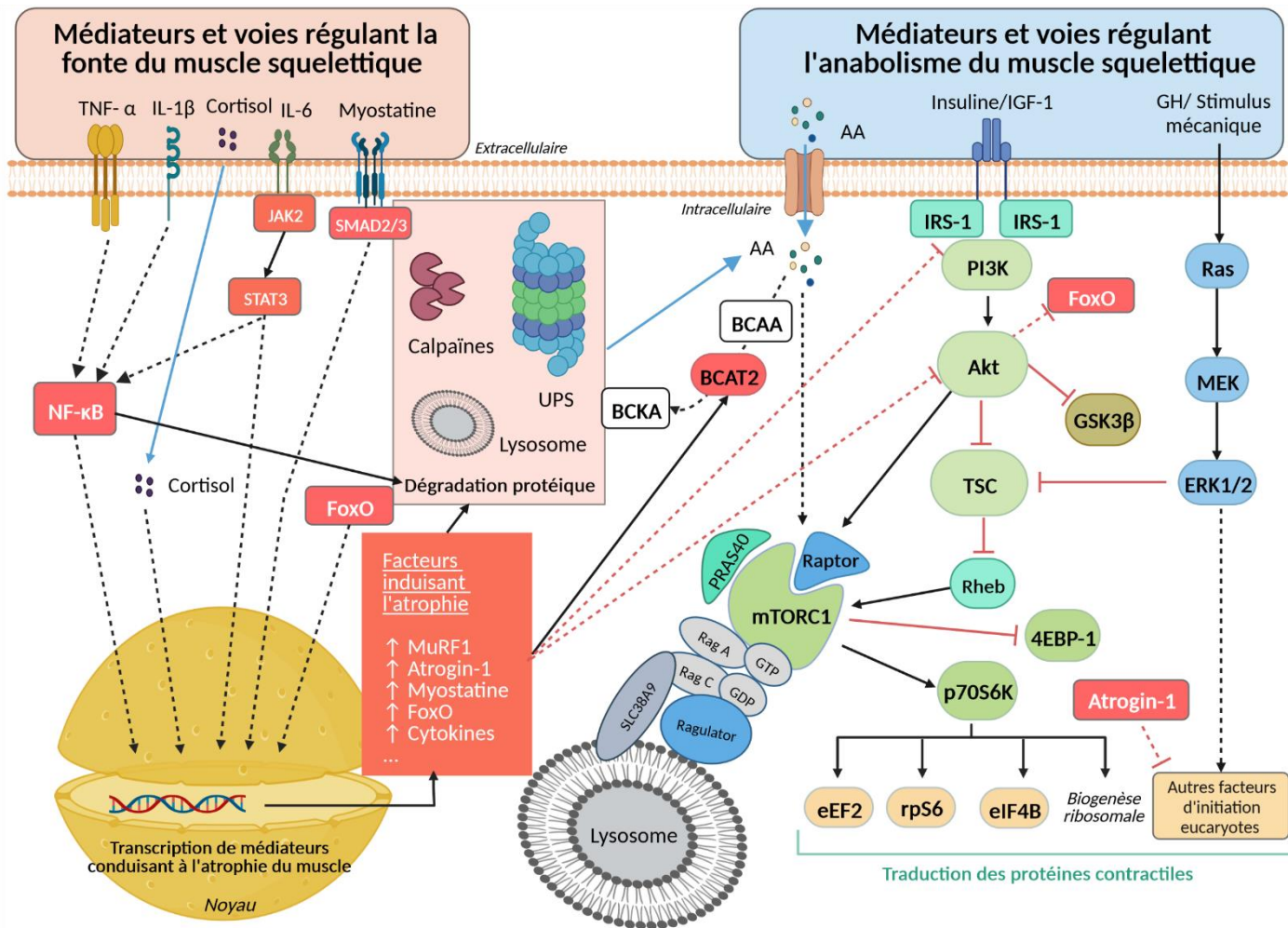


Figure 11. Voies cellulaires impliquées dans la synthèse protéique (voie Akt/mTOR) et dans la dégradation des protéines. D'après Nunes *et al.*, 2022 [227].

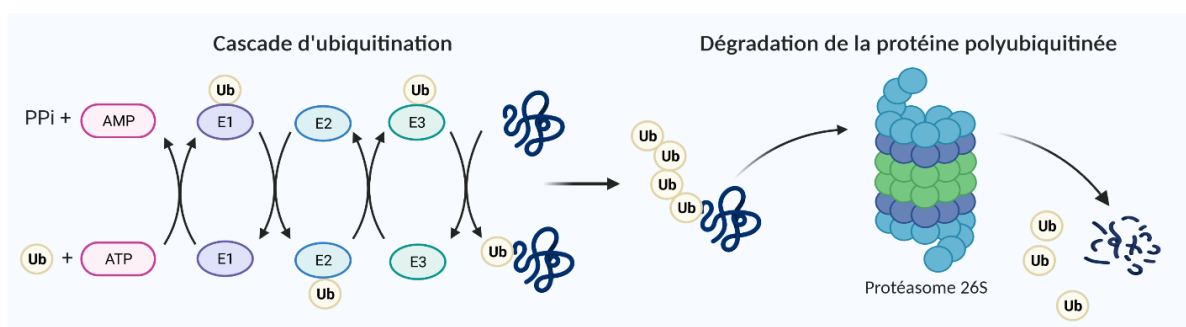
Acronymes : 4EBP-1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; Akt (PKB), protein kinase B; AA, amino acids; BCAA, branched-chain amino acids, BCKA, branched-chain keto-acids; eEF2, eukaryotic elongation factor 2; eIF4B, eukaryotic translation initiation factor 4B; ERK 1/2, extracellular signal-related kinase1/2; FoxO, Forkhead box transcription factors; GSK3β, Glycogen synthase kinase-3 β; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IL, interleukin; IRS, insulin receptor substrate; JAK, Janus kinase; mTORC1, mechanistic (mammalian) target of rapamycin complex 1; MEK, mitogen-activated protein kinase; MuRF-1, muscle RING-finger protein-1; NF-κB, nuclear factor-κ-B; p70S6K, p70 S6 kinase 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PRAS40, proline-rich AKT substrate 40 kDa; Raptor, regulatory-associated protein of mTOR; Rheb, Ras homolog enriched in brain; rpS6, ribosomal S6; SMAD, Small Mothers Against Decapentaplegic; STAT, signal transducers and activators of transcription; TNFα, tumor necrosis factor-α; TSC, tuberous sclerosis complex; UPS, Ubiquitin Proteasome System.



## b) La dégradation protéique musculaire

Des auteurs ont également montré que la régulation de la protéolyse au niveau des muscles squelettiques était altérée (excessivement réduite ou stimulée) avec l'âge [228,229]. Il existe au moins quatre grandes voies protéolytiques de dégradation des protéines dans les muscles squelettiques des mammifères mais les deux principales sont le système ubiquitine-protéasome (UPS) et la voie autophagie-lysosome [230].

L'UPS est la voie cellulaire la plus décrite mais les preuves actuelles restent contradictoires quant à son rôle spécifique dans la sarcopénie [230]. Ce système consiste en la fixation de groupements ubiquityls sur les protéines cibles *via* une cascade enzymatique impliquant trois types de facteurs : E1, E2 et E3 correspondant au complexe protéique de l'ubiquitine ligase (Figure 12). Les E3 les plus décrites sont l'Atrogin-1/MAFbx et MuRF-1/TRIM63 [231] mais il en existe au moins 500 autres chez l'humain [227]. La protéine polyubiquitylée est ensuite adressée au protéasome où elle sera dégradée en peptides.



**Figure 12. Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome dépendant.**

Image de Biorender.com [232].

Il faut savoir que l'expression au niveau musculaire des E3 ligases Atrogin-1 et MuRF-1 est élevée dans des situations propices au développement de l'atrophie telles que la dénervation, l'immobilisation et le traitement à l'interleukine pro-inflammatoire IL-1 [231,233–235]. Les ligases MuRF-1 et Atrogin-1, en se fixant sur les protéines myofibrillaires des muscles, entraînent leur dégradation. Il a également été montré par Bodine *et al.* que des souris déficientes pour les gènes MuRF-1 ou MAFbx étaient partiellement résistantes à l'atrophie musculaire, démontrant pour la première fois le rôle crucial de la voie ubiquitine-protéasome dépendante dans la régulation de la

masse musculaire [231]. L'ensemble de ces observations a établi les gènes codant ces deux E3 ligases comme les gènes principaux contrôlant l'atrophie musculaire et sont par conséquent parfois qualifiés d'atrogènes. Néanmoins, la modification d'expression de MuRF-1 et de MAFbx dans le muscle des animaux âgés par rapport aux jeunes n'est pas toujours cohérente [230] puisque d'autres études ne montrent aucun changement [236,237] voire même une diminution de ces atrogènes avec l'âge [238]. Ces résultats difficilement interprétables laissent penser que d'autres voies protéolytiques pourraient jouer un rôle dans le développement de la sarcopénie [230].

L'autophagie est un processus catabolique retrouvé dans toutes les cellules eucaryotes et consiste en la dégradation de composants cytoplasmiques par le lysosome [239]. Il existe trois types d'autophagie : la macro-autophagie (forme principale), l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et la micro-autophagie (Figure 13). D'autres types d'autophagie sont sélectives d'un organelle spécifique comme la mitophagie qui est une forme particulière de macro-autophagie ciblant les mitochondries endommagées [240].

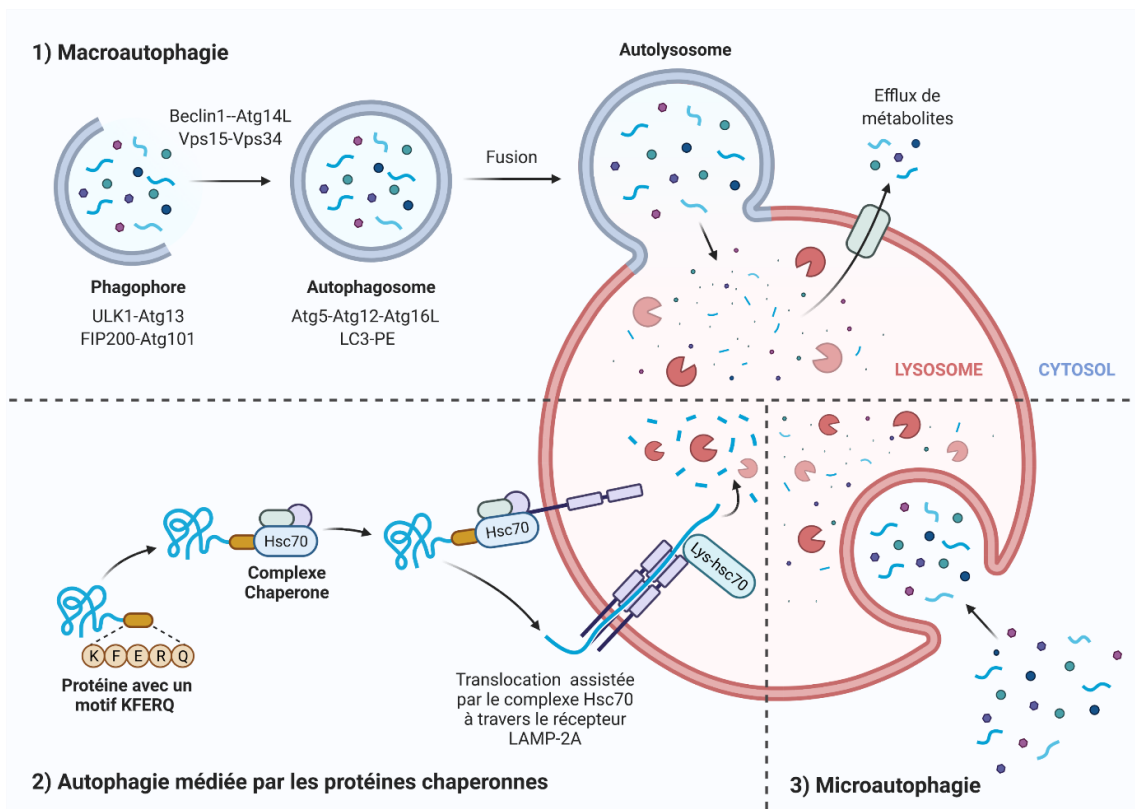


Figure 13. Représentation schématique des trois principaux types d'autophagie. Image de Biorender.com [241,242].

De nombreuses pathologies (essentiellement neurodégénératives) liées à l'âge résultent d'une dégradation défectueuse de protéines et à l'accumulation consécutive de protéines ou organelles dysfonctionnelles [243,244]. En agrément avec le rôle protecteur de l'autophagie, plusieurs auteurs ont montré qu'un dysfonctionnement progressif de l'activité autophagique musculaire chez le rongeur et l'humain âgés pourrait contribuer à la sarcopénie [244–249]. La cellule musculaire qui présente une activité autophagique faible (ou nulle) contient des mitochondries altérées, des défauts des sarcomères [246] ainsi qu'une détérioration des jonctions neuromusculaires [248] pouvant contribuer à la perte de masse musculaire. L'autophagie joue également un rôle essentiel dans le maintien des cellules satellites en limitant leur sénescence [250]. D'autre part, lorsque l'autophagie devient dysfonctionnelle chez les personnes âgées, d'autres systèmes protéolytiques moins sélectifs, tel que l'UPS, pourraient s'activer davantage et être alors responsables de l'atrophie des myofibrilles et de la perte de masse musculaire [246,251]. À l'inverse, quelques travaux suggèrent que l'activation trop intense de l'autophagie pourrait aggraver la fonte musculaire dans des situations cataboliques [252]. Ainsi, pour prévenir la sarcopénie, il est important de maintenir une activité autophagique minimale afin de prévenir l'accumulation de mitochondries et protéines dysfonctionnelles, mais pas trop « stimulée » pour éviter l'atrophie [246].

#### **4- Inactivité physique et sédentarité**

La réduction de la masse (et de la force) musculaire avec l'âge est accélérée par un mode de vie sédentaire au cours de la vie [253]. Il faut différencier la sédentarité qui correspond au temps passé en position assise ou allongée, de l'inactivité physique décrite par la durée et fréquence d'activité physique inférieures au seuil recommandé et dépendant de l'âge. Néanmoins, ces deux comportements sont des facteurs de causalité à l'origine de 35 états pathologiques associés au vieillissement tels que la perte des capacités fonctionnelles, les maladies cardio-vasculaires, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 [254].

Les recommandations de l'OMS sur l'activité physique et la sédentarité stipulent que les adultes de 65 ans et plus devraient [255] :

- Pratiquer 150 à 300 minutes d'activité aérobie d'intensité modérée (aquagym, vélo, jardinage) ou 75 à 150 minutes d'activité aérobie d'intensité soutenue (marche rapide, jogging, nage rapide) par semaine ;
- Pratiquer une activité de renforcement musculaire (c'est-à-dire un entraînement de force/résistance) deux fois par semaine ;
- Pratiquer une activité mettant l'accent sur l'équilibre fonctionnel trois fois par semaine ;
- Limiter le comportement sédentaire.

Il est généralement admis que les individus réduisent leur activité physique en vieillissant, tout particulièrement lors du passage à la retraite (à partir de 60 ans) [256]. Mais les chiffres varient considérablement d'une étude à l'autre [257] et dépendent principalement de la méthode de mesure utilisée (nombre de pas, recommandations de l'OMS), du lieu de vie (rural/citadin, à domicile/en institut) et de l'état de santé de la population investiguée. Sur les 10 000 pas que nous devrions réaliser chaque jour, les personnes de 35 à 54 ans en réalisent en moyenne 8 000 et les 55 à 64 ans en réalisent légèrement moins (environ 7 700 pas). Par contre, une forte diminution du nombre moyen de pas quotidiens est observée à partir de 65 ans : 5 800 pas (*Baromètre Attitude Prévention 2016*) et diminue progressivement avec l'avancée en âge. Pourtant, selon l'étude française INCA3 (2014-2015), les personnes de 65 à 79 ans présentent un niveau de sédentarité plus faible que les adultes plus jeunes puisqu'elles ne sont « que » 72,5 % à passer plus de 3 heures par jour en position assise/allongée contre plus de 89 % pour les 18-44 ans et 83 % pour les 45-64 ans. D'après cette même étude, près de 40 % des jeunes adultes (moins de 44 ans), 34 % des 45-64 ans et 37 % des 65-79 ans ont une activité physique inférieure aux recommandations de l'OMS (inactivité physique). L'ensemble de ces résultats suggère que l'activité physique des personnes âgées sondées n'est pas fondamentalement réduite par rapport aux plus jeunes, mais que la population générale présente un mode de vie bien trop sédentaire qui n'est pas sans conséquences sur la santé, d'autant plus lorsqu'il est combiné aux altérations physio-métaboliques de l'âge. Il faut néanmoins préciser que les seniors constituent une population extrêmement hétérogène et que certains individus (généralement non inclus dans les études épidémiologiques précédemment décrites) présentent une activité physique fortement diminuée par rapport aux autres : les âgés fragiles et dépendants (**voir chapitre 2**).

L'inactivité physique pourrait contribuer à la fonte musculaire *via* de multiples mécanismes relatifs à l'inflammation, le stress oxydatif ou encore aux altérations métaboliques [16]. Il a été montré que la réduction à court-terme (14 jours) de l'activité physique (réduction du nombre de pas/jour de 10 000 à 1 500) pouvait avoir un impact sur la sensibilité à l'insuline, augmenter la graisse viscérale et favoriser la dyslipidémie chez le jeune adulte en bonne santé [258]. L'analyse transcriptionnelle sur des biopsies musculaires de personnes de 30 à 70 ans immobilisées (repos au lit pendant 5 jours) a révélé que l'inactivité physique induisait une IR en modifiant l'expression de gènes au niveau du muscle ; réduction de l'oxydation des lipides, augmentation de la lipogenèse (par ex., expression de l'acide gras synthase) et augmentation de l'exportation des AA [259]. Cette inactivité physique pourrait avoir des conséquences plus marquées chez la personne âgée. En effet, une étude menée par Breen *et al.* a montré que la réduction de la marche (nombre de pas) pendant 14 jours était suffisante pour favoriser une inflammation de bas-grade, réduire la sensibilité à l'insuline de 43 % et la synthèse protéique post-prandiale de 26 % chez des adultes âgés en bonne santé [260]. Cela s'est traduit par une perte d'environ 4 % de la masse maigre des jambes, soit considérablement plus que ce qui observé dans des conditions physiologiques, à savoir 1-2 % par an [21]. De manière similaire, Rommersbach *et al.* ont montré une perte de 5 % de la masse musculaire chez des personnes âgées immobilisées pendant deux semaines [261].

D'un point de vue moléculaire, l'inactivité physique réduit l'activité de Akt et augmente les concentrations de cytokines inflammatoires (TNF- $\alpha$ , CRP [260]) ainsi que des marqueurs clés de la dégradation protéique musculaire : FoxO, MuRF-1 et MAFbx (UPS), Beclin 1 et LC3 (autophagie) [262–264]. Le stress oxydatif, qui augmente physiologiquement avec le processus de vieillissement, est également plus important chez les personnes sédentaires [265]. Et comme évoqué précédemment, le stress oxydatif induit une altération de la fonction mitochondriale et une surproduction de ROS aggravant les états inflammatoire et d'IR dans le muscle qui contribuent à l'atrophie. Enfin, des études récentes suggèrent que l'atrophie des muscles provoquée par l'immobilisation (en plus du vieillissement) est accompagnée d'une altération des cellules satellites et donc à une régénération musculaire et des jonctions neuromusculaires défectueuses [263,266]. Outre les altérations musculaires physiologiques liées à l'âge, ces résultats suggèrent que la sédentarité et l'inactivité physique contribuent à la fonte musculaire en modifiant les activités métaboliques et mitochondriales dans le muscle squelettique.

*Le vieillissement s'accompagne inéluctablement d'une modification des grandes fonctions et systèmes de l'organisme vivant. En particulier, celui-ci est associé à une perte de force et de masse musculaires, la sarcopénie, et qui, en fonction de sa sévérité, peut nuire à l'autonomie des personnes âgées. La sarcopénie est une maladie multifactorielle causée par des mécanismes intrinsèques à l'âge (réduction des hormones anaboliques, stress oxydatif, inflammation) mais aussi par des facteurs externes tels que la dénutrition, la sédentarité et des comorbidités. L'atrophie musculaire qui s'opère avec l'âge peut être expliquée en partie par un déséquilibre de l'homéostasie protéique (diminution de la synthèse et altération de la protéolyse) elle-même aggravée par un état inflammatoire chronique. Néanmoins, le processus de vieillissement est très variable d'un sujet à l'autre et certains individus seront plus susceptibles de développer des pathologies ou de devenir dépendants. Mais puisque certains facteurs causaux de la sarcopénie sont modifiables, des stratégies de prévention peuvent être développées et c'est tout l'objet de ce travail de thèse.*

## Chapitre 2. La fragilité chez les sujets âgés

---

### I- Inégalités au cours du vieillissement

L'effet général sur la population étant posé, penchons-nous sur la très forte hétérogénéité des personnes âgées qu'il existe en termes d'état de santé général, de mobilité ou encore d'autonomie.

#### A) Comment expliquer la grande hétérogénéité de la population âgée ?

L'allongement de l'espérance de vie (« lifespan ») n'est pas toujours associé à un vieillissement en bonne santé ou sans incapacités (« healthspan »). En utilisant l'espérance de vie ajustée sur la santé (années vécues avec handicap et décès prématurés causés par des maladies), l'écart entre l'espérance de vie et la longévité en bonne santé est estimée à environ 9 ans aux États-Unis [267] et dépend des individus, de leur sexe et de leurs habitudes de vie. L'espérance de vie sans incapacités (EVSI) est globalement stable en France depuis ces dix dernières années. En 2020, elle est estimée à 65,9 ans pour les femmes et 64,4 ans pour les hommes contre une espérance de vie totale respective de 85,1 ans et 79,1 ans (*Insee pour l'espérance de vie ; Drees, méthode EHEMU pour l'EVSI*). Cette relative stagnation de l'EVSI est notamment due à l'augmentation des maladies chroniques associées au mode de vie « moderne » telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et les cancers [268]. En France, le pourcentage des personnes âgées en perte d'autonomie varie fortement entre les zones géographiques, indépendamment de l'âge. En 2015, les zones les plus touchées par la perte d'autonomie (à domicile ou en institution) sont le Massif Central et le Nord tandis que les moins touchées sont l'Île-de-France et la Bretagne (*Insee, projections Omphale ; Drees, enquêtes EHPA 2015 et enquête Vie quotidienne et Santé (VQS) 2014*). En moyenne, plus de 18 % des personnes de 60 ans ou plus sont en perte d'autonomie dans le Massif Central contre 11 % en Île-de-France. Ainsi, en France, bien qu'une majorité des individus de 60 ans et plus soit autonome, d'autres du même âge souffrent de sarcopénie, de dénutrition et voire même de

dépendance pour 4 millions d'entre eux à l'horizon 2050 (*Insee, projections Omphale ; Drees, enquêtes EHPA 2015 et VQS 2014*).

Comment expliquer ces inégalités ? Des études réalisées sur des jumeaux dans la décennie 1990 suggèrent qu'entre 1 à 27 % de la variabilité de l'âge de la mort est due à l'héritabilité génétique [269–273]. L'analyse plus récente de deux cohortes danoises a montré que la composante génétique pouvait être responsable de 43 % du phénotype de fragilité (du Robustness Index Ratio plus exactement), et ce, d'autant plus chez les personnes très âgées (> 77 ans) et chez les hommes [274]. Les autres causes de dégradation de l'état de santé global des sujets âgés sont environnementales et comportementales, et sont donc des causes sur lesquelles une politique de prévention est possible. Parmi ces causes, retenons :

- L'alimentation éloignée des recommandations (pauvre en protéines, calories, fibres, micronutriments) [275–278] ;
- L'inactivité physique et la sédentarité [279–281] ;
- Le tabagisme [282,283] et/ou la consommation abusive d'alcool [284,285] ;
- Le contexte socio-économique et le niveau de vie [286] qui sont liés aux trois causes sus-citées.

D'après l'étude du Global Burden of Disease (GBD) et un rapport de l'OMS de 2018, ces causes comportementales sont les principaux facteurs de risque de maladies chroniques : maladies cardio-vasculaires, cancers, maladies pulmonaires obstructives et diabète de type 2 [287]. Ces maladies seraient responsables de plus de 80 % des décès prématurés, c'est-à-dire avant l'âge de 65 ans [287]. Tandis que certains sujets âgés voient leur durée de vie raccourcie à cause d'une alimentation trop « riche », certains présentent des caractéristiques de sous-nutrition, qui là encore, impactent fortement l'espérance de vie en bonne santé.



## **B) Dénutrition chez la personne âgée**

La dénutrition est l'un des principaux facteurs causant et/ou aggravant la sarcopénie [288]. En effet, sur une cohorte de plus de 500 personnes âgées (> 65 ans) vivant à domicile, la dénutrition (critères Global Leadership Initiative of Malnutrition , GLIM [289]) pourrait multiplier par trois le risque de développer une sarcopénie sévère (critères EWGSOP2 [18]) dans les 4 ans à venir [288,290].

### **1- Définition et prévalence de la dénutrition chez l'âgé**

La dénutrition (ou sous-nutrition) est caractérisée par des apports nutritionnels insuffisants en regard des dépenses énergétiques et/ou besoins nutritionnels de l'organisme. Chez les personnes âgées, la dénutrition fait généralement référence à un déficit protéino-énergétique, le plus souvent accompagné d'une carence en vitamines et en oligo-éléments. La prévalence de la dénutrition augmente avec l'âge mais les personnes âgées institutionnalisées sont sensiblement les plus touchées. De fait, selon un rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) de 2007, la dénutrition toucherait entre 4 et 10 % des personnes âgées vivant à domicile, 15 à 38 % des patients vivant en institution et même 30 à 70 % des sujets âgés hospitalisés [291]. La grande variation entre les valeurs s'explique par l'utilisation d'outils diagnostics différents selon les auteurs [24]. Ces chiffres, bien que relativement anciens, étaient encore utilisés dans un rapport gouvernemental de 2021 autour de la semaine nationale de la dénutrition suggérant qu'ils sont toujours d'actualité (<https://solidarites-sante.gouv.fr/archives/archives-presse/archives-communiques-de-presse/article/semaine-nationale-de-la-denuitration-du-12-au-20-novembre-2021-tous-mobilises>).

### **2- Diagnostic clinique d'une personne dénutrie**

Le diagnostic clinique de la dénutrition repose sur des critères phénotypiques et étiologiques internationaux proposés, entre autres, par les experts du GLIM et de l'European Society for clinical nutrition and metabolism (ESPEN). Ces critères, qui dépendent de l'âge du sujet (moins ou plus

de 70 ans), ont récemment été repris par la HAS et certains chevauchent le diagnostic de la sarcopénie [292,293] (Tableau 6).

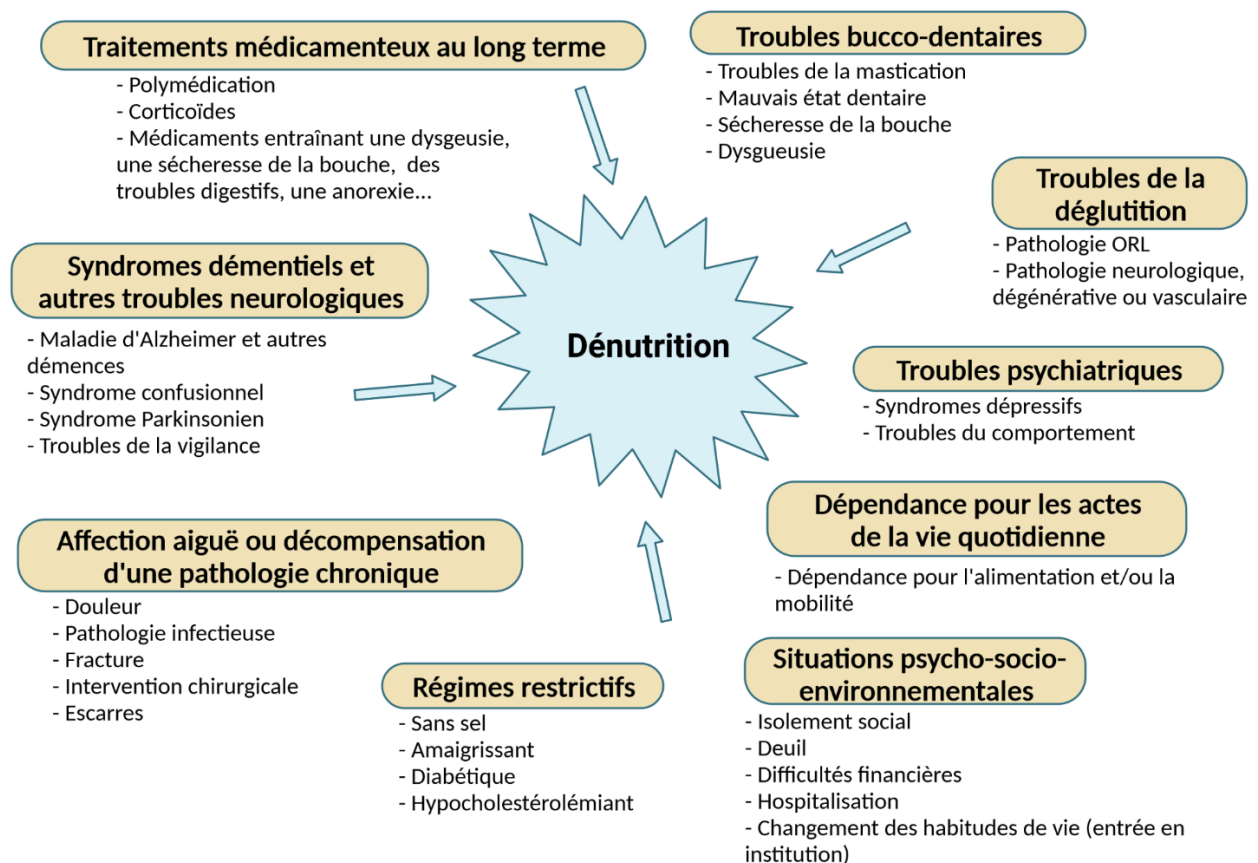
**Tableau 6. Critères diagnostiques de la dénutrition recommandés par la Haute Autorités de Santé (HAS) en fonction de l'âge du patient.** [292,293]

Personnes de < 70 ans	Personnes de ≥ 70 ans
<b>Critères phénotypiques</b>	
Perte de poids ≥ 5 % en 1 mois Ou ≥ 10 % en 6 mois, ou 10 % par rapport au poids habituel avant le début de la maladie	
IMC < 18,5 kg/m <sup>2</sup> : dénutrition diagnostiquée 17 kg/m <sup>2</sup> < IMC < 18,5 kg/m <sup>2</sup> : dénutrition modérée IMC ≤ 17 kg/m <sup>2</sup> : dénutrition sévère	IMC < 22 kg/m <sup>2</sup> : dénutrition diagnostiquée 20 kg/m <sup>2</sup> ≤ IMC ≤ 22 kg/m <sup>2</sup> : dénutrition modérée IMC < 20 kg/m <sup>2</sup> : dénutrition sévère
Réduction quantifiée de la masse et/ou de la fonction musculaire (force de préhension ou vitesse de marche sur 4 mètres ou indice de masse musculaire ou masse musculaire appendiculaire)	Sarcopénie confirmée (critères EWGSOP2 : voir chapitre 1-III)
35 g/L ≥ Albuminémie ≥ 30 g/L : dénutrition modérée Albuminémie < 30 g/L : dénutrition sévère	
<b>Critères étiologiques</b>	
Réduction de la prise alimentaire > 50 % pendant plus d'une semaine ou toute réduction des apports pendant plus de 2 semaines, par rapport à la consommation habituelle quantifiée ou aux besoins protéino-énergétiques estimés	
Absorption réduite par maldigestion ou malabsorption	
Hypercatabolisme protéique avec ou sans syndrome inflammatoire (pathologies aiguë ou chronique)	
<i>Dénutrition si au moins 1 critère phénotypique et 1 critère étiologique</i>	

### 3- Causes de la dénutrition chez la personne âgée

Cet état de sous-nutrition s'explique par toutes les situations susceptibles d'entraîner une diminution des apports alimentaires, une augmentation des besoins énergéto-protéiques, une malabsorption et/ou une association de ces facteurs [294].

Les modifications physiologiques liées au vieillissement telles que la perte d'appétit (anorexie de l'âge), l'agueusie (atrophie des papilles gustatives), les troubles bucco-dentaires et de la déglutition ainsi que la modification des habitudes de vie (prise des repas seul, sédentarité) et des comorbidités (hyperthyroïdie, infections) sont des situations risquant d'entraîner la dénutrition chez l'âge (Figure 14).



**Figure 14. Causes et facteurs de risque de dénutrition chez la personne âgée.** [291,295]

Une enquête préliminaire menée par l'Institut du bien vieillir Korian en 2016, s'étant intéressée aux habitudes alimentaires de 600 Français âgés entre 75 à 95 ans et vivant à domicile, révèle que plus de la moitié d'entre eux mangeraient par habitude, 7 % par contrainte et seulement 1/3 par plaisir. Les personnes âgées ont aussi tendance à consommer des aliments dont les apports protéiques sont faibles (produits sucrés tels que les biscuits, le chocolat et la confiture) au détriment de produits plus riches en protéines, notamment de la viande [296–298]. Il est estimé que 30 % des femmes et 25 % des hommes de 60 ans et plus ne suivraient pas les recommandations de 1 à 1,2 g de protéines/kg/jour [297]. Les apports protéiques réels moyens sont actuellement de 0,8 g

de protéines/kg/jour, signifiant que les personnes présentant un faible appétit pourraient être encore en dessous de cette valeur [299]. De plus, cette recommandation de 1-1,2 g de protéines/kg/jour est relative aux sujets âgés bien portants [300] ; les recommandations pour les plus fragiles (dénutris) sont préconisées à 1,5 g/kg/jour [301]. Par ailleurs, l'utilisation des protéines par l'organisme est optimale pour maintenir la masse et la fonction musculaire si l'apport énergétique est suffisant. Les apports caloriques recommandés chez les personnes âgées sont de 1800 à 2000 kcal/jour [301], mais les apports réels moyens seraient de 1300 à 1600 kcal/jour pour les femmes et de 1400 à 1900 kcal/jour pour les hommes de plus de 60 ans [302–304].

#### 4- Conséquences de la dénutrition chez la personne âgée

La dénutrition peut conduire au développement ou à l'aggravation de la sarcopénie, d'une fragilité osseuse et à un déficit immunitaire favorisant alors la survenue de morbidités [305]. À l'hôpital, il a clairement été montré qu'un statut nutritionnel altéré était associé à une plus grande fréquence d'infections nosocomiales, de septicémie ainsi que de complications post-opératoires [291], doublait le nombre de jours d'hospitalisation et augmentait significativement le taux de réadmission après la sortie du patient [306].

## II- Concept du syndrome de fragilité

Le concept de « fragilité » a été développé afin de définir cet état de diminution des capacités physiques et de l'état de santé général avec l'âge et de déterminer dans quelle mesure un individu est susceptible de devenir dépendant dans les années à venir. La fragilité est le terme utilisé par les gériatres dès les années 1990 pour décrire un *syndrome clinique de diminution de la réserve et de la résistance aux facteurs de stress, résultant de déclin cumulatifs dans de multiples systèmes physiologiques et entraînant une vulnérabilité accrue à des événements indésirables (dépendance, morbidité et mortalité)* [307,308]. Il est important de noter que la fragilité n'est pas un état systématiquement observé dans le processus de vieillissement – des adultes atteignent des âges avancés sans devenir

fragiles – et que ce concept est généralement différencié de l’invalidité (ou handicap) et des comorbidités puisqu’une personne peut être fragile sans présenter d’incapacité à réaliser des activités de la vie quotidienne (ADL) ou de comorbidités [307]. Néanmoins, plus la population vieillit et plus elle est à risque d’être fragile car plus susceptible de développer des maladies chroniques et des limitations fonctionnelles. Selon une revue systématique de 2012, la prévalence de la fragilité dans nos pays industrialisés serait en moyenne de 10,7 % chez les personnes de 65 ans et plus vivant à domicile, 15,7 % chez les 80-84 ans et 26 % pour les plus de 85 ans [309]. Comme pour la dénutrition, la fragilité d’une personne est une situation réversible [307,310], et le niveau de fragilité d’une personne peut évoluer positivement ou négativement au cours du temps (Figure 15). Le diagnostic de la fragilité et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent à sa prévalence chez les personnes âgées sont donc essentiels pour adapter le suivi médical et la prise en charge pour limiter l’arrivée de la dépendance, des chutes, des hospitalisations et donc augmenter l’espérance de vie en bonne santé [311,312].

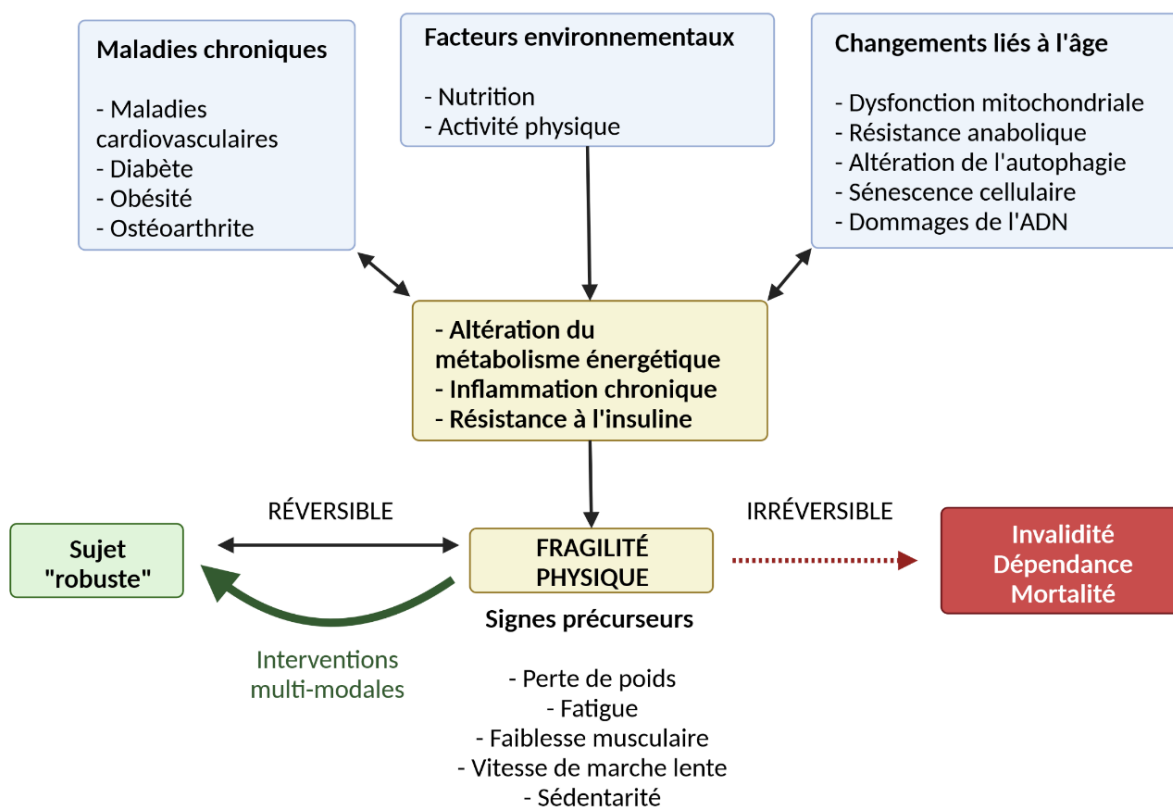


Figure 15. Modèle de la fragilité physique comme un état dynamique et réversible.  
Inspiré de Buchner *et al.*, 1996 et Dent *et al.*, 2019 [313].

## A) Deux grands modèles de fragilité

Plusieurs auteurs ou groupes de travail ont proposé des critères diagnostics permettant de caractériser l'état de fragilité. À la fin des années 1990, le Dr Linda Fried et ses collaborateurs sont les premiers à proposer un modèle de fragilité qui est alors basé sur des critères phénotypiques. Ce modèle est basé sur une proposition théorique de « cycle de la fragilité » selon laquelle les caractéristiques cliniques mesurables dans la fragilité et la réduction de la plasticité physiologique sont dues à un cycle de facteurs physiopathologiques comprenant la maladie, la dénutrition chronique, la sarcopénie et la réduction du métabolisme de repos [307] (Figure 16).

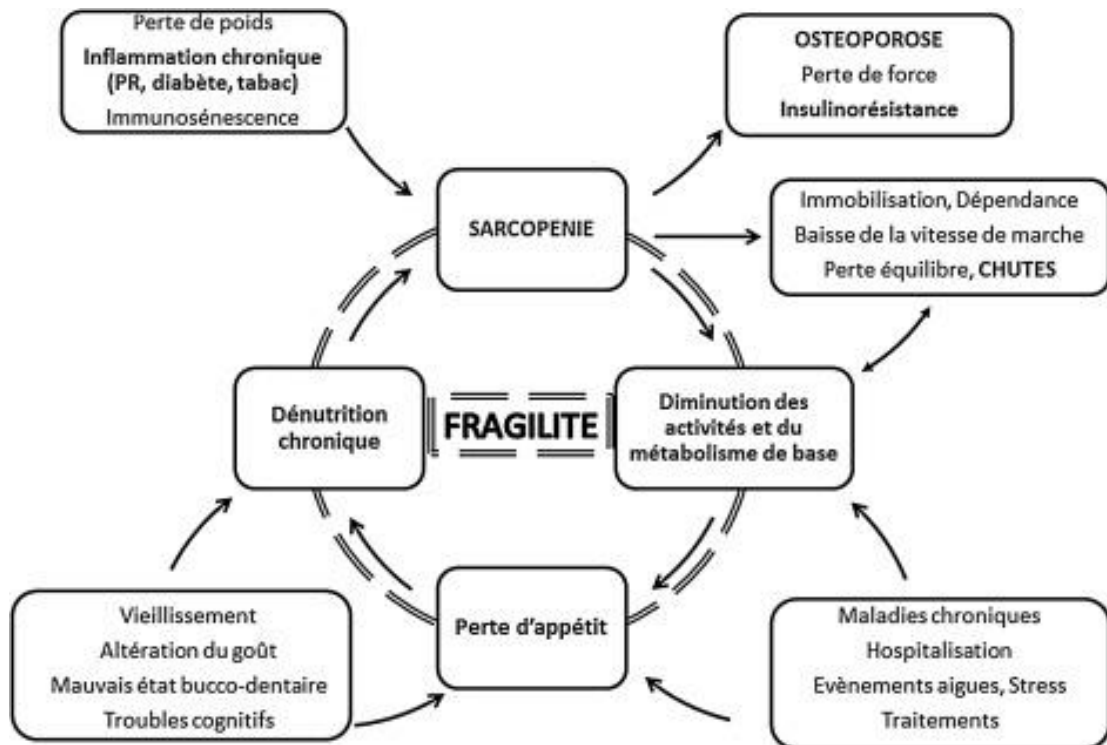


Figure 16. Cycle de la fragilité selon la conception phénotypique de Fried et Walston. [314]

Dans cette approche, la fragilité est considérée comme un ou plusieurs symptômes liés à des changements physio-métaboliques (biologie du vieillissement) et conduisant à la perte des capacités fonctionnelles.

Les critères du phénotype de fragilité sont les suivants [313,314] :

- Perte de poids involontaire de plus de 4,5 % ou de plus de 5 kg en 1 an ;
- Asthénie ressentie par le patient selon une échelle d'auto-évaluation ;
- Diminution de la vitesse de marche sur 4 mètres ( $\leq 0,8$  m/s) ;
- Perte de force musculaire (« grip test » selon la taille et l'IMC) ;
- Sédentarité mesurée selon un seuil de dépense énergétique.

Une personne est alors considérée comme « robuste » si elle ne remplit aucun des critères, « pré-fragile » si elle en présente entre 1 et 2 et « fragile » si elle en présente plus de 2. En France et en utilisant cette définition, 15 % des personnes de plus de 65 ans était fragile et plus de 43 % était pré-fragile en 2004 [315]. Enfin, à noter que ce modèle est indépendant des comorbidités et précède l'entrée dans la dépendance et l'arrivée de pathologies [316].

Un autre modèle de sarcopénie a été proposé par le Dr Ken Rockwood : le modèle cumulatif des déficits ou index de fragilité [317,318]. Ce modèle permet de scorer de manière cumulative plus de 30 déficits de santé liés à l'âge dont les maladies chroniques (diabète, hypertension), les limitations de mobilité (chutes, ostéoporose) et les troubles cognitifs sur une échelle de 0,0 (présence d'aucun déficit) à 1,0 (présence de tous les déficits) [317–319]. En effet, pour Rockwood et ses collègues, la fragilité n'est pas un état dichotomique (robuste/fragile) mais le résultat d'une accumulation de pathologies (**Annexe 2**). À la différence du phénotype de Fried, cette approche apparaît plutôt comme un indicateur global de santé des personnes âgées (« syndrome de fragilité »), moins spécifique de la fragilité physique et nécessite une évaluation gériatrique complète (et non pas seulement des performances physiques) pour être interprétable [316,320].

À partir de ces modèles initiaux, des groupes de travail internationaux continuent d'élaborer de nouveaux outils afin de dépister le plus précocement possible le syndrome de fragilité et de mettre en place les stratégies de prévention les plus adaptées.

## **B) Les outils actuellement utilisés pour évaluer la fragilité**

L'International Conference on Frailty and Sarcopenia Research (ICFSR) a proposé en 2019 des lignes directrices afin d'identifier et de prendre en charge la fragilité physique chez la personne âgée en pratique clinique [313,321]. L'ICFSR 2019 recommande aux médecins de dépister la fragilité chez toutes les personnes de 65 ans et plus à l'aide de différents outils simples, validés et adaptés au contexte. Parmi la multitude d'outils actuellement existants, le groupe de travail recommande en particulier : Rockwood Clinical Frailty Score (CFS), International Association of Nutrition and Ageing FRAIL scale (échelle FRAIL) et Edmonton Frailty Scale (EFS) [321]. Le Gérotopôle de Toulouse Frailty Screening Tool (GFST) et le Groningen Frailty Indicator (GFI) sont également des outils de référence (**Tableau 7, Annexe 2**).

Les différents outils cliniques de diagnostic de la fragilité s'intéressent à des critères variés (statut nutritionnel, activité physique, force musculaire, performance physique, cognition, dépendance, comorbidités) ce qui représente à la fois une force et une limite (**Tableau 7**). En effet, puisque les mécanismes physiopathologiques de la fragilité ne sont pas encore parfaitement connus, il est difficile de déterminer lequel de ces facteurs joue le rôle le plus important [316]. Ainsi, il peut être intéressant d'investiguer différentes composantes qui peuvent également être impactées différemment en fonction des personnes. D'autres part, la prévalence de la fragilité va dépendre fortement de la définition utilisée. L'analyse des données de la cohorte SHARE (Survey of Health, Ageing and Retirement in Europe) de plus de 25 500 patients montre une prévalence de la fragilité de 6 % avec l'échelle FRAIL, 12 % avec les critères de Fried, 23 % avec l'index de fragilité de Rockwood et 44 % avec le GFI [322]. Il est donc essentiel de bien préciser les critères utilisés avant d'interpréter les résultats obtenus.



Tableau 7. Caractéristiques des principaux outils de diagnostic clinique de la fragilité. Inspiré du Livre Blanc de la Fragilité, Gérotopôle de Toulouse [316].

Outils	Domaines explorés	Descriptions
<b>Échelles basées sur les critères de Fried</b>		
<b>FRAIL scale [323,324]</b>	Questionnaire évaluant 5 paramètres de la fragilité physique : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fatigue ;</li> <li>- Résistance (force) ;</li> <li>- Mobilité (vitesse de marche) ;</li> <li>- Présence de maladies ;</li> <li>- Statut nutritionnel (perte de poids).</li> </ul>	Fragilité ≥ 3 critères ; Pré-fragilité 1-2 critères ; Robuste 0 critère.
<b>Gérotopôle de Toulouse Frailty Screening Tool (GFST) [325,326]</b>	Grille de repérage associant : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Critères de Fried (perte de poids, fatigue, mobilité) ;</li> <li>- Composantes sociale et mnésique.</li> </ul>	Si 1 critère et en fonction de l'avis subjectif du médecin : patient fragile
<b>Échelles d'évaluation multidimensionnelles</b>		
<b>Groningen Frailty Indicator [327]</b>	15 items d'auto-évaluation relatifs à : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mobilité ;</li> <li>- Dépendance ;</li> <li>- Statut nutritionnel (perte de poids) ;</li> <li>- Vision et audition ;</li> <li>- Composantes sociale et mnésique ;</li> <li>- Comorbidités.</li> </ul>	Fragilité ≥ 4 items
<b>Clinical Frailty Score (échelle de fragilité de Rockwood) [328]</b>	Jugement clinique du niveau d'autonomie d'un sujet âgé dans la réalisation des ADL (Activities of Daily Living).	7 étapes allant du score « 1- Très en forme » au score « 7- Sévèrement fragile »
<b>Edmonton Frailty Scale [329]</b>	Grille de neuf composantes : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dépendance ;</li> <li>- État de santé (autoévalué et hospitalisation) et continence ;</li> <li>- Composantes sociale et mnésique ;</li> <li>- Performance fonctionnelle (test Time Up and Go) ;</li> <li>- Polymédication.</li> </ul>	Sévèrement fragile 9-17 items ; Modérément fragile 6-8 items ; Légèrement fragile 4-5 items ; Non fragile 0-3 critères.

### III- Prise en charge des patients fragiles

Comme décrit précédemment, l'alimentation et l'activité physique vont grandement influencer sur les modifications physio-métaboliques apparaissant avec le vieillissement. L'ICFSR 2019 précise que la fragilité nécessite une prise en charge multidimensionnelle associant la gestion de la sarcopénie, les causes traitables de la perte de poids, les causes de l'épuisement (dépression, anémie, hypotension, hypothyroïdie et carence en B12) et le traitement médicamenteux [321]. En accord avec les directives de l'OMS sur les soins intégrés pour les personnes âgées (ICOPE) [313,330], le traitement de première intention pour la prise en charge de la fragilité doit inclure un programme d'activité physique (« multi-composant » et résistance) ainsi qu'une supplémentation protéique/calorique en cas de perte de poids ou de dénutrition [321]. En revanche, l'ICFSR n'a formulé aucune recommandation concernant les thérapies complémentaires (thérapie cognitive, thérapie de résolution de problèmes), la supplémentation en vitamine D, le traitement hormonal et le traitement pharmacologique.

#### **A) L'activité physique comme stratégie de lutte contre la fragilité**

Une activité physique insuffisante (inactivité physique) combinée à un mode de vie sédentaire sont des éléments explicatifs de la sarcopénie, de la fragilité et des maladies chroniques [313,331,332]. De nombreuses revues ont comparé les études estimant l'efficacité de différents types d'exercice physique permettant de réduire la sarcopénie et/ou le syndrome de fragilité [279,333–337]. Comprendre les voies par lesquelles l'exercice impacte sur les fonctions physiques (par ex., équilibre, force musculaire) peut faciliter le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le but d'améliorer les performances de la population âgée et de prévenir la fragilité [337]. Une grande variété de pratiques physiques a été testée et s'est montrée efficace : les exercices de résistance (force), les exercices d'équilibre, les exercices d'endurance (aérobie), les exercices multi-composants (entraînements de résistance, d'équilibre et d'endurance simultanés), le Tai Chi, etc. [338,339] (**Tableau 8**). Les programmes d'exercice multi-composants incluant des entraînements de résistance semblent les plus efficaces pour améliorer l'état de santé général des

personnes âgées fragiles et diminuer le risque de chute [338]. Ce type d'entraînement, lorsqu'il est pratiqué régulièrement pendant au minimum 12 semaines, permettrait de réduire significativement la sévérité de la fragilité et d'améliorer les performances physiques des individus. Les exercices de force, seuls ou combinés à d'autres types d'entraînements, seraient quant à eux les plus intéressants pour favoriser le gain de force musculaire [338].

Pour être efficace sur la fonction musculaire, l'activité physique doit être pratiquée pendant 3 mois à 1 an et de manière relativement intense (au moins 2 séances d'une heure par semaine). De ce fait, cette pratique soulève plusieurs difficultés et limites :

- La nécessité de professionnels (par ex., coach sportif, gériatres, rééducateurs) pour encadrer les personnes âgées seules chez elles, ou location de locaux adaptés, qui sont tous deux onéreux ;
- La motivation et compliance des personnes (jusqu'à 20 % des sujets abandonnent le programme par manque d'intérêt et sans raison médicale) (**Tableau 8**) ;
- Quelle activité physique pratiquer pour les personnes âgées très dépendantes, peinant même à se déplacer ?

*Ainsi, l'exercice physique est une intervention efficace pour réduire le syndrome de fragilité des personnes âgées lorsqu'elle est pratiquée régulièrement et sous la supervision de professionnels mais elle nécessite une compliance importante chez les personnes et peut être complexe à mettre en place chez les personnes présentant des difficultés fonctionnelles importantes.*

**Tableau 8. Exemples d'essais cliniques attestant de l'efficacité de la pratique physique pour réduire la fragilité chez la personne âgée.**

Acronymes : BBS, Berg Balance Score ; SPPB, Short Physical Performance Battery ; TUG, Timed Up and Go.

Références	Types d'étude	Sujets	Interventions	Durées	Résultats	Compliances
Manor <i>et al.</i> , 2014 [340]	Étude clinique en simple aveugle, contrôlée et randomisée <u>Cross-over</u> Cohorte américaine	Personnes âgées vivant dans un logement supervisé (87 ± 5 ans) N = 29	Tai Chi Séances supervisées	1h 2 x fois par semaine pendant 12 semaines	↑ performances physiques (SPPB, TUG) ↑ vitesse de marche ↑ équilibre (BBS)	6/35 des sujets n'ont pas terminé l'intervention (2x plus que le groupe témoin) <u>à cause d'une diminution de l'intérêt porté à l'intervention</u>
Fairhall <i>et al.</i> , 2008 et 2014 [341,342]	Étude clinique en parallèle, en simple aveugle, randomisée et contrôlée « The Frailty Intervention Trial » Cohorte australienne	Personnes âgées fragiles vivant à domicile (83,4 ± 5,8 ans) N = 120	Activité physique programme WEBB, <u>et</u> un programme nutritionnel, un suivi psychologique...	20-30 min 3 à 5 x par semaine pendant 12 mois	↓ facteurs de risque de chute ↑ performances physiques (SPPB) ↑ vitesse de marche  Mais n'a pas réduit les chutes	<u>Niveau d'adhésion entre 29 et 45 %</u> , en sachant que 13 % des sujets n'ont totalement pas adhéré
Cesari <i>et al.</i> , 2015 [343]	Étude clinique à 2 bras, en simple aveugle, contrôlée et randomisée « LIFE-P Study » Cohorte américaine	Personnes âgées sédentaires vivant à domicile et à risque de développer des troubles de mobilité (pré-fragiles et fragiles) (76,5 ± 4,2 ans) N = 211	Activité physique régulière et multi-composante (aérobie, résistance, équilibre, souplesse)	40-60 min Au moins 3 x par semaine pendant 12 mois	↓ prévalence et sévérité de la fragilité (critères un peu différents de Fried) des personnes âgées sédentaires. L'intervention a été davantage bénéfique aux sujets les plus fragiles au départ	<u>Taux d'assiduité de 70,7 % après 6 mois et 60,9 % après 12 mois</u> (contre 70,0 % et 73,0 % pour les témoins)
Tarazona-Santabalbina <i>et al.</i> , 2016 [339]	Étude clinique en simple aveugle, contrôlée et randomisée Cohorte espagnole	Personnes âgées fragiles, sédentaires et vivant à domicile (79,5 ± 3,9 ans) N= 51	Activité physique régulière, supervisée et multi-composante (aérobie, résistance, équilibre, souplesse) Programme Vivifrail	65-70 min 5 x par semaines pendant 24 semaines	↓ sévérité de la fragilité (critères de Fried et Edmonton) ↑ performances physiques (SPPB, échelle d'autonomie de Lawton...) ↓ aspect social (dépression) Mais pas d'effet sur les chutes ou le risque de chutes	9/51 sujets n'ont pas souhaité poursuivre l'étude (contre 9/49 pour le groupe témoin)
Martinez-Velilla <i>et al.</i> , 2019 [344]	Étude clinique en simple aveugle Cohorte espagnole	Patients âgés <u>hospitalisés</u> (87,6 ± 4,6 ans) N= 185	Activité physique dans l'hôpital et individualisée multi-composante (résistance, équilibre, marche)	20 min 2 x par jour pendant 5 à 7 jours	↑ performances physiques (SPPB, index d'autonomie de Barthel)	Les sujets étaient des patients hospitalisés donc les raisons de non suivi sont différentes (décès, transfert...)
Sadjapong <i>et al.</i> , 2020 [345]	Étude clinique contrôlée et randomisée Cohorte thaïlandaise	Personnes âgées fragiles (Fried) (78,9 ± 1,3 ans) N = 32	Activité physique multi-composante (aérobie, résistance et équilibre) supervisée	45-60 min 3 x par semaine pendant 12 semaines	↓ sévérité de la fragilité quelques ↑ performances physiques (TUG, BBS)	Sauf 1 pour des raisons médicales, tous les sujets ont suivi le programme

## **B) Supplémentations et interventions nutritionnelles**

### **1- Enrichissement de l'alimentation en protéines**

Rappelons qu'atteindre des apports protéiques d'au moins 1 g/kg/jour est primordial chez la personne âgée en bonne santé du fait de la résistance anabolique et de l'extraction splanchnique augmentées afin de maintenir la balance azotée à l'équilibre et limiter la fonte musculaire [346,347]. Lorsque les apports protéiques journaliers ne sont pas suffisants, des conseils nutritionnels sont d'abord préconisés afin de redonner goût à une alimentation plus diversifiée (en variant les aliments, en les rendant plus appétant, en modifiant les habitudes de prise des repas, en évitant de jeûner). Si ces conseils ne sont pas suffisants, il est possible, chez des personnes de petit appétit, de densifier le contenu protéique des rations alimentaires en augmentant la part des éléments riches en protéines dans les repas (poudre de lait, fromage râpé, dés de jambon) sans réellement « modifier » le volume des repas [291].

### **2- Compléments nutritionnels oraux (CNO) pour les personnes dénutries**

Lorsque les conseils nutritionnels ne sont pas efficaces, une stratégie de seconde intention consiste à introduire des CNO dans l'alimentation [291]. Les CNO sont des préparations nutritives qui permettent d'obtenir un apport calorique et/ou protéique important (400 kcal et/ou 30 g de protéines recommandés par l'HAS) dans un petit volume sous formes variées (crème dessert, yaourt à boire). Ces compléments sont qualifiés par la réglementation des aliments diététiques destinés à des fins médicales spéciales (ADDFMS) et ne sont pas réservés aux personnes âgées mais à toute personne dénutrie vivant à domicile ou hospitalisée [348,349]. Des études ont prouvé leur efficacité sur le poids corporel, la force musculaire et la mortalité des sujets âgés [348,350–352]. Les CNO riches en protéines pourraient également permettre de limiter les complications, les réadmissions des personnes âgées hospitalisées [351] ainsi que le risque d'hospitalisation des sujets dénutris vivant à domicile [353]. Toutefois, le manque de volonté, un goût « déplaisant » ou encore des effets indésirables gastro-intestinaux (nausées, diarrhées) peut limiter l'utilisation de ce type de

supplémentation chez les populations âgées [348]. La compliance pour certains sujets peut donc être limitée sur le long-terme, surtout chez des individus avec un faible appétit.

### 3- Nature et forme d'apport des protéines

S'il est admis que des apports protéiques élevés sont bénéfiques sur la masse et/ou la force musculaires de la personne âgée, ces effets peuvent être variables d'une étude à l'autre [354–357]. Ceci pourrait s'expliquer par divers paramètres pas toujours entièrement décrits dans les études : population étudiée (par ex., plus ou moins dénutrie, avec des besoins, capacités orales et digestives variées), autres facteurs d'intervention (couplage de l'apport protéique avec de l'activité physique, de la vitamine D), nature des protéines (CNO protéo-énergétiques à boire ou en poudre, extraits concentrés de lactosérum, nature des protéines ou composition en AA variés notamment concernant les apports en leucine), quantité des protéines (13 à 40 g par jour), moment de la journée où la supplémentation est réalisée et durée de supplémentation (3 à 18 mois) (**Tableau 9**). L'ensemble de ces facteurs modulant l'efficacité de l'apport protéique est résumé dans un article récemment publié à l'Unité de Nutrition Humaine par Dardevet et collaborateurs [355]. À titre d'exemple, prenons le cas de la leucine, un AA ramifié indispensable retrouvé en grande quantité dans les aliments d'origine animale (volaille, œuf, thon, foie, gruyère, lait) et dans quelques fruits secs et légumineuses (soja, amande, pois chiches). La protéine de lactosérum est particulièrement riche en leucine car elle en contient 10 %. La leucine est un AA qui entre dans la composition des protéines mais elle joue aussi le rôle de molécule signal capable de stimuler la voie de signalisation Akt/mTOR/S6K impliquée dans l'initiation de la synthèse protéique au niveau des muscles (**voir chapitre 1-III**) [355]. Ainsi, plusieurs travaux ont montré que la supplémentation en leucine lors d'un repas pouvait augmenter la synthèse protéique et la masse maigre chez l'homme âgé [358,359] ainsi que diminuer la protéolyse musculaire (voie UPS) chez le vieux rat [360]. Mais cet effet est contesté sur le long-terme (3-6 mois) [361,362] et reste peu utilisé en pratique [349].

**Tableau 9. Exemples d'études interventionnelles investiguant les effets de la supplémentation en protéines sur la fonction musculaire des personnes âgées.** Acronymes : ADL, Activities of Daily Living ; IMC, Indice de Masse Corporelle ; MNA, Mini Nutritional Assessment ; SPPB, Short Physical Performance Battery ; TUG, Timed Up.

Références	Sujets	Interventions	Durées	Résultats	Compliances
Bunout <i>et al.</i> , 2001 [363]	Âgés sains (70-77 ans) N = 98	Supplémentation (porridge/soupe 6,5 g protéines 2x par jour) Exercice de résistance <u>Supplémentation + Exercice</u>	18 mois	Supplémentation nutritionnelle : ↑ ADL Combinée à l'exercice : ↑ marche ↑ force musculaire	48 % pour le programme de supplémentation et 56 % pour le programme d'entraînement
Bonnefoy <i>et al.</i> , 2003 [364]	Âgés fragiles (82-85 ans) N = 57	Supplémentation (boisson énergisante 15 g protéines 2x par jour) + <u>Exercice</u> (multicomposant)	9 mois	Supplémentation nutritionnelle par rapport au placebo: ↑ force musculaire ↑ IMC	54 % pour le programme de supplémentation et 63 % pour le programme d'entraînement
Tieland <i>et al.</i> , 2012 [365]	Âgés fragiles (77-82 ans) N = 65	Supplémentation (15 g de protéines 2x par jour) pour atteindre ~1,4 g/kg/jour	6 mois	Pas d'effet de la supplémentation sur la masse musculaire et la force musculaire ↑ performance physique (SPPB) par rapport au placebo	92 %
Chalé <i>et al.</i> , 2013 [366]	Âgés fragiles (70-85 ans) N = 80	Supplémentation (concentré de protéines de lactosérum 40 g/jour) + <u>exercice</u> de résistance	6 mois	Supplémentation : aucun effet sur la masse maigre, la force musculaire et la performance physique par rapport au placebo	>70 %
Bauer <i>et al.</i> , 2015 [367]	Âgés sarcopéniques (70-85 ans) N = 196	Supplémentation (20 g protéine de lactosérum <u>enrichie en leucine</u> (3 g) / jour) + vitamine D (800 UI/jour)	13 sem.	Supplémentation par rapport au placebo : ↑ masse musculaire ↑ lever de chaise Pas d'effet sur la performance physique (SPPB) et la force musculaire	79 %
Park <i>et al.</i> , 2018 [368]	Âgés pré-fragiles et fragiles dénutris (70-85 ans) N = 120	Groupes : 0,8 ; 1,2 et 1,5 g de protéines/kg/jour (protéines de lactosérum en poudre)	3 mois	Groupe 1,5 g/kg/jour : ↑ masse musculaire ↑ vitesse de marche Pas d'effet sur la performance physique (SPPB, TUG...) et le MNA par rapport aux groupes 0,8 et 1,2 g/kg/jour	100 % ?
Yamada <i>et al.</i> , 2018 [369]	Âgés sarcopéniques (80-90 ans) N = 112	Supplémentation (10 g de lactosérum /jour) + <u>vitamine D</u> (800 UI/jour) + <u>exercice de résistance</u>	3 mois	Supplémentation combinée à l'exercice : ↑ vitesse de marche ↑ masse musculaire	>75 %
Kang <i>et al.</i> , 2019 [370]	Âgés fragiles (70-85 ans) N = 115	Supplémentation (32,4 g de protéines de lactosérum /jour) Et exercice de résistance pour les groupes placebo et supplémentés	3 mois	Supplémentation : ↑ force musculaire ↑ performance physique (lever de chaise) Par rapport au placebo	?
Amasene <i>et al.</i> , 2019 [371]	Âgés qui sortent d'hospitalisation (75-88 ans) N = 28	Supplémentation (20 g protéine de lactosérum <u>enrichie en leucine</u> (3 g) / jour) Et exercice de résistance pour les groupes placebo et supplémentés	3 mois	Supplémentation par rapport au placebo : ↑ marche (6 minutes) ↑ (tendance) force musculaire Pas d'effet sur la masse musculaire et la performance physique par rapport à l'exercice seul	85 %
Björkman <i>et al.</i> , 2020 [372]	Âgés sarcopéniques (75-96 ans) N = 218	Supplémentation (20 g de protéines de lactosérum 2x par jour) Et exercice de résistance + vitamine D pour les groupes placebo et supplémentés	12 mois	Supplémentation: aucun effet sur la force musculaire et la performance physique (SPPB) par rapport au placebo	>50 %

#### 4- Supplémentation en micronutriments

Les carences en certains micronutriments peuvent aussi jouer un rôle dans la fonte musculaire. Les micronutriments (vitamines, minéraux et oligoéléments), à la différence des macronutriments (protéines, glucides et lipides), n'ont pas de valeur énergétique et sont souvent des nutriments indispensables (et doivent donc être apportés dans l'alimentation). En micronutrition, d'autres catégories de micronutriments comme les polyphénols, les acides gras polyinsaturés ou même les pro/prébiotiques sont également étudiés. Plusieurs revues recensent les différents types de composés qu'il est possible de supplémenter dans l'alimentation des personnes âgées pour prévenir la fragilité physique (sarcopénie) [354,373,374]. Voici quelques exemples les plus étudiés des micronutriments capables de prévenir la sarcopénie.

##### a) La vitamine D

La perte de masse musculaire peut être liée à une carence en vitamine D et les personnes âgées sont d'avantage sujettes à ce type de carences (diminution de la synthèse endogène de la pré-vitamine D, de l'exposition au soleil et des apports alimentaires) [375,376]. Bien que la vitamine D soit l'hormone principale du métabolisme osseux, le récepteur nucléaire de la vitamine D (Vitamin D Receptor, VDR) est exprimé dans une grande variété de cellules dont les cellules musculaires squelettiques, dans lesquelles l'expression diminue avec l'âge [377] suggérant qu'il pourrait exister une perte de sensibilité des muscles à la vitamine D [378]. L'activation du récepteur VDR par la vitamine D a pour effet de stimuler la synthèse protéique (activation de la voie Akt/mTOR), réguler la croissance des cellules musculaires (différenciation et prolifération des cellules musculaires *via* l'expression d'IGF-1) et moduler la fonction contractile [376,378]. De nombreuses études chez l'Homme ont investigué à la fois les effets d'une carence en vitamine D et d'une supplémentation en vitamine D sur le phénotype de la fragilité (incidence des chutes, force musculaire et mobilité) [376,379]. Une méta-analyse récente et portant sur 12 études internationales conclut que des taux plasmatiques bas en 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D, le marqueur du statut en vitamine D) sont significativement associés à la sévérité de la fragilité (mesurée à l'aide des critères de Fried) chez les personnes âgées [380]. Pourtant, les effets bénéfiques



de la supplémentation sont contradictoires avec des études longitudinales sur 4 mois (8 400 UI/jour) [381], 2 ans (1 000 UI/jour) [382] ou 8 ans (1 000 UI/jour) [383] qui n'ont pas montré d'effet bénéfique de la supplémentation en vitamine D chez des personnes âgées fragiles (hypovitaminose D, risque élevé de chute, ostéo-arthrite) alors que d'autres auteurs observent que la supplémentation (1 000 UI/jour) pendant 9 ou 12 mois améliorerait la force musculaire chez la femme âgée présentant initialement des taux bas en 25(OH)D [384,385]. D'après une étude de Chanet *et al.*, la prise quotidienne avant le petit-déjeuner d'une boisson riche en vitamine D (800 UI) et en leucine (21g de protéines de lactosérum) chez des volontaires sains et âgés ( $70 \pm 4$  ans) pendant 6 semaines a permis de stimuler la synthèse protéique post-prandiale et d'augmenter la masse musculaire par rapport au groupe placebo [386]. L'ensemble de ces travaux suggèrent que la supplémentation en vitamine D est une stratégie nutritionnelle intéressante pour prévenir la sarcopénie chez des personnes âgées en bonne santé (en particulier chez les individus présentant initialement des taux bas), lorsqu'elle est combinée à d'autres types de supplémentation (par ex., protéines riche en leucine).

### *b) Les acides gras polyinsaturés oméga-3*

L'acide  $\alpha$ -linoléique (huile de lin, noix, poissons gras) est le précurseur de l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA), les acides gras polyinsaturés (AGPI) n-3 les plus étudiés [374]. La supplémentation en AGPI n-3 (huile de poisson) pendant 5 semaines chez le ruminant et 8 semaines chez le rat adulte (13 mois) favoriserait la sensibilité à l'insuline et augmenterait la phosphorylation des protéines de la voie Akt/mTOR (PI3K, p70S6K) [387,388]. Chez l'Homme, les études de Smith *et al.* rapportent que la supplémentation avec 4 g/jour d'un composé commercial contenant 1,86 g d'EPA et 1,50 g de DHA pendant 8 semaines améliorerait la synthèse protéique musculaire et favoriserait la phosphorylation de la voie de signalisation anabolique mTOR/S6K chez des sujets âgés [389]. La supplémentation avec ce même composé pendant 6 mois limitait la perte de masse et de force musculaires des patients [390]. Il est à noter que la quantité d'AGPI n-3 utilisée dans ces études est assez élevée (équivalente à 200-400 g de poisson gras par jour) et que la dose minimale recommandée d'EPA et de DHA combinés est de 250 mg par jour pour les adultes (et les personnes âgées) en bonne santé, selon l'OMS et

l'European Food Safety Authority (EFSA). Une méta-analyse très récente de 16 études révèle que la supplémentation en AGPI n-3 (combinée ou non avec l'exercice de résistance) chez des séniors ( $\geq 55$  ans) permettrait d'augmenter la force musculaire (membres inférieurs seulement), d'améliorer partiellement la performance physique (test TUG, mais pas la vitesse de marche) sans apporter d'effet significatif sur la masse maigre/musculaire [391]. Au regard des résultats actuels, la supplémentation en AGPI n-3 pourrait être une stratégie efficace pour lutter contre la fragilité physique mais des précisions quant à la quantité permettant une efficacité « optimale » du DHA et de l'EPA seraient nécessaires.

### c) *Les minéraux*

Le calcium, minéral le plus abondant du corps humain, est la principale molécule de signalisation qui régule la fonction (contraction/relaxation) musculaire [392,393]. Ainsi, certains auteurs suggèrent que les apports calciques quotidiens seraient positivement corrélés à la masse musculaire des personnes âgées [394,395] et que des apports élevés sont associés à une diminution du risque de sarcopénie [396]. Néanmoins, ces résultats ne sont pas confirmés par d'autres études [397,398]. En cohérence avec le fait que la vitamine D est indispensable pour l'absorption intestinale et la fixation osseuse du calcium, Pfeifer *et al.* ont montré que la combinaison calcium et vitamine D (1 000 mg de calcium et 800 IU) permettait d'augmenter la force musculaire (quadriceps), la performance physique (test TUG) et de diminuer le risque de chute de personnes de 70 ans et plus après 12 mois de traitement contrairement à une supplémentation mono-calcique [399].

Le magnésium, deuxième cation intracellulaire le plus abondant, pourrait améliorer la fonction musculaire *via* son implication dans la synthèse protéique et le métabolisme énergétique (rôle de cofacteur) et contribuer au processus de contraction et de relaxation musculaire (transport actif des ions calcium) [395,400]. Une méta-analyse a révélé que l'apport alimentaire en magnésium était inférieur à l'apport nutritionnel recommandé chez les personnes âgées sarcopéniques [395]. Ainsi, une supplémentation en magnésium pourrait être recommandée dans certaines populations spécifiques. Le magnésium sérique et l'apport alimentaire en magnésium ont été associés dans

quelques études à une meilleure force musculaire [401] et masse musculaire [402] chez les sujets âgés, ainsi qu'à une plus grande force et puissance chez les sportifs professionnels [403] mais pas de manière systématique [374].

Ainsi, les preuves scientifiques actuelles ne soutiennent pas un effet bénéfique de la supplémentation en calcium et en magnésium sur la fonction musculaire des sujets dont le statut calcique/magnésique est correct. Mais la supplémentation en ces minéraux pourrait être bénéfique chez les personnes déficientes telles que les personnes âgées [404] en particulier lorsqu'elle est combinée avec d'autres interventions nutritionnelles (par ex., vitamine D ou protéines).

*La fragilité est définie comme un état de vulnérabilité accrue, attribuable à un déclin des réserves physiologiques associé à l'âge et se traduisant par une capacité diminuée de composer avec les facteurs de stress. Le risque de mortalité serait d'ailleurs mieux prédit par le degré de fragilité que par l'âge chronologique. À noter que le syndrome de fragilité comporte une dimension physique (fragilité physique), psychologique, sociale et environnementale. La prise en charge de la fragilité physique comprend notamment des programmes d'exercice physique multi-composants qui se sont révélés prometteurs mais parfois limités dans leur usage sur le long-terme (coût, compliance). Parmi les suppléments nutritionnelles, les protéines (notamment celles riches en leucine), bien que théoriquement efficaces pour améliorer la fonction ou la masse des muscles de la personne âgée, peuvent être également difficiles à appliquer en pratique chez certaines populations avec un petit appétit. Les résultats des études concernant les effets bénéfiques des autres suppléments nutritionnelles (oméga 3, minéraux, vitamines) ne sont pas toujours concluants. D'autres types d'interventions nutritionnelles qui ciblent le microbiote intestinal, les pro-, pré- et synbiotiques, sont de plus en plus étudiés dans le cadre de la sarcopénie. La partie suivante a ainsi pour objectif de décrire en quoi cibler le microbiote pourrait être pertinent pour les sujets âgés fragiles.*



# Chapitre 3. Lien entre microbiote intestinal et muscle squelettique

---

## I- Le microbiote intestinal

### A) Quelques généralités sur le microbiote de l'intestin

La recherche sur les microbiotes, en plein essor depuis une trentaine d'années, a montré un rôle prépondérant des microbiotes sur notre santé. Mon travail de thèse s'est focalisé sur le microbiote intestinal qui correspond à l'ensemble des micro-organismes colonisant l'intestin des animaux (et de l'Homme). Bien que de nombreuses études limitent l'analyse du microbiote aux espèces bactériennes, cet écosystème est également composé d'archées, de cellules eucaryotes (levures, champignons, protozoaires) et de virus. Le microbiote est un écosystème complexe qui comporte chez l'Homme  $10^{13-14}$  bactéries, appartenant à près de 1 000 espèces différentes [405] ce qui fait du côlon un des habitats microbiens le plus peuplé de la Terre. Ce monde microbien représenterait ainsi un poids de 2 kg et d'au moins 10 millions de gènes uniques, soit 300 fois plus de gènes que le génome humain [406,407]. Cet ensemble de gènes est appelé « métagénome » [408].

La composition taxonomique du microbiote intestinal a été principalement caractérisée par la méthode de métagénomique 16S (**Annexe 3**). À ce jour, 25 phyla différents ont été identifiés et les plus abondants sont : Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria et dans une moindre mesure, Verrucomicrobia et Fusobacteria. Dans le phylum Firmicutes, on retrouve notamment les genres bactériens *Faecalibacterium*, *Clostridium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* et *Staphylococcus*. Les Bacteroidetes rassemblent principalement les genres *Prevotella* et *Bacteroides* ; les Actinobacteria, le genre *Bifidobacterium* et les Verrucomicrobia, le genre *Akkermansia*. Enfin, les Proteobacteria sont constituées des espèces appartenant aux genres *Escherichia*, *Shigella*, *Desulfovibrio*, *Helicobacter* et *Enterobacter* [409,410] (**Figure 17**). À noter que les nomenclatures taxonomiques de certains groupes bactériens ont été récemment modifiées (pour les *Lactobacillus* en particulier).

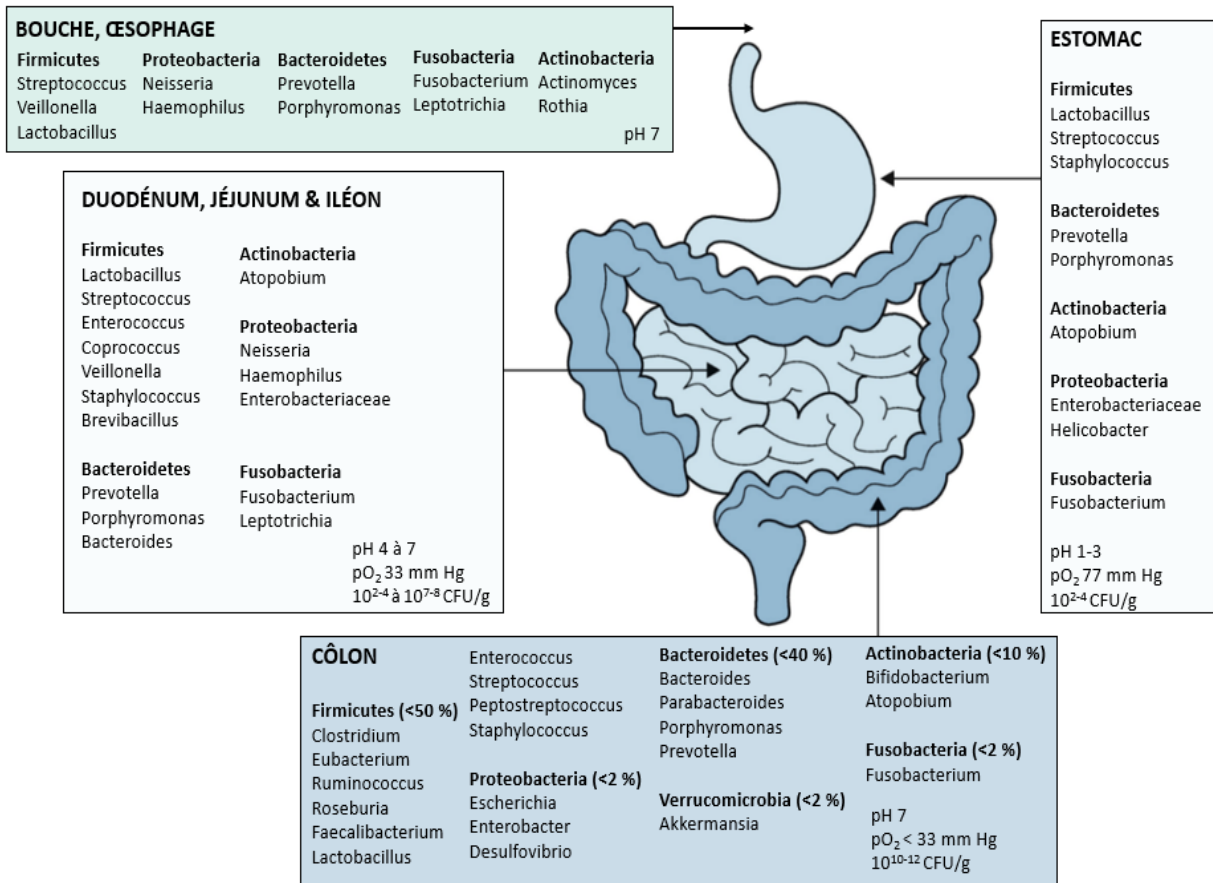


Figure 17. Organisation dynamique de l'écosystème microbien bactérien le long du tractus intestinal humain. [409,411,412]

## B) Principaux déterminants du microbiote

La composition du microbiote intestinal varie entre les individus, et chez une même personne au cours du temps, en fonction de tout un ensemble de facteurs intrinsèques à l'hôte (génétique, ethnie, âge, sexe, rythme circadien) ainsi que de paramètres environnementaux (origine géographique) et comportementaux (alimentation, activité physique, médication) (Figure 18). Les principaux paramètres sur lesquels nous nous focaliserons sont l'âge et le régime alimentaire.

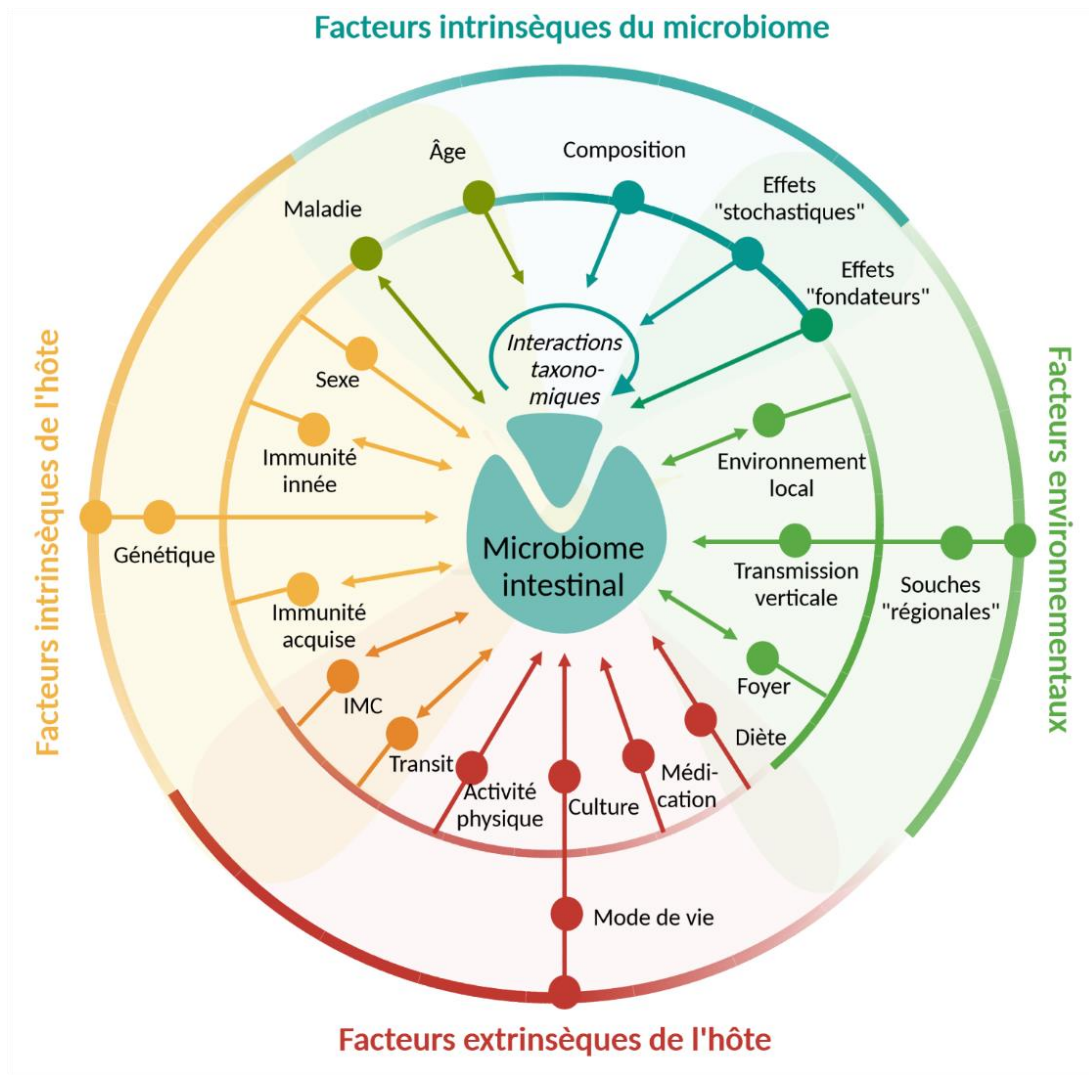


Figure 18. Ensemble des facteurs influençant la composition du microbiote intestinal.  
D'après Schmidt *et al.*, 2018 [413].

### 1- Comment le microbiote évolue avec l'âge ?

La colonisation de l'intestin par la population microbienne débute massivement à la naissance et des facteurs tels que l'âge gestationnel, le mode d'accouchement, le type d'alimentation et la prise d'antibiotiques vont fortement jouer sur la composition du microbiote de l'enfant et conditionner son état de santé futur [414,415]. Ainsi, les enfants nés par césarienne possèdent généralement un microbiote intestinal moins diversifié, un retard de colonisation des bactéries anaérobies strictes (*Bifidobacterium* et *Bacteroides*) et un microbiote enrichi en bactéries d'origine cutanée (Staphylocoques) et environnementale (*Clostridium*) par rapport aux enfants nés par voie basse [416]. Les enfants allaités présentent un microbiote intestinal dominé par le genre *Bifidobacterium*

et qui contient peu d'Entérobactéries, de *Clostridium* et de Bacteroidetes comparativement aux enfants nourris au lait maternisé [416]. Enfin, la diversification alimentaire de l'enfant lui permettra peu à peu d'obtenir un écosystème intestinal diversifié et stable comparable à celui de l'adulte vers l'âge de 3 ou 4 ans [417] (Figure 19).

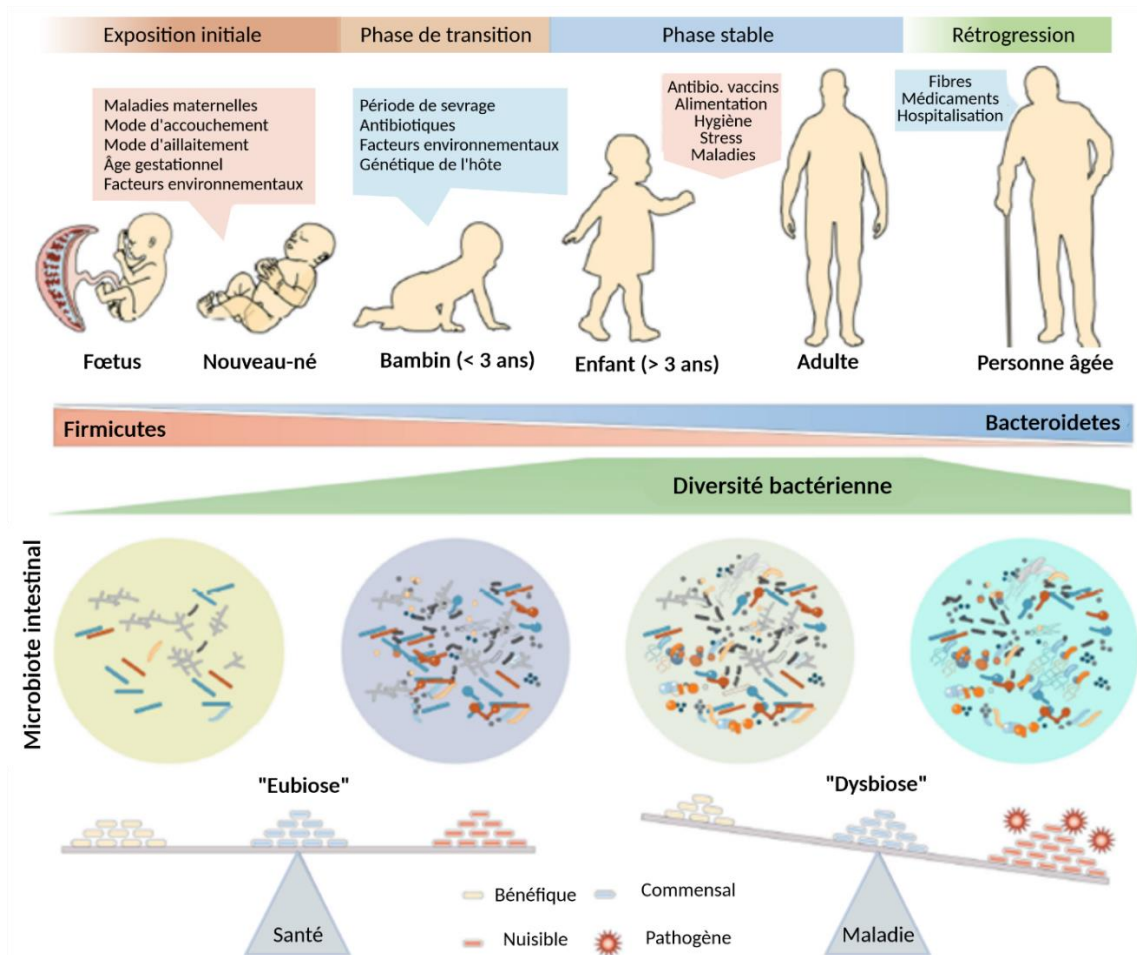


Figure 19. Évolution du microbiote intestinal au cours de la vie. D'après Ling *et al.*, 2022 [418].

Le microbiote adulte reste relativement stable tout au long de la vie avant de connaître une évolution progressive mais considérable avec l'avancée en âge ( $\geq 65$  ans) et les maladies qui y sont associées [417]. Il est maintenant bien établi que le microbiote intestinal de l'âgé se caractérise par une réduction de la diversité et une plus grande variabilité interindividuelle [419–422]. Les pathogènes opportunistes tels que certaines bactéries du phylum Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*) et les anaérobies facultatifs (Streptocoques, Staphylocoques, Entérocoques) sont plus abondants avec l'âge [417,419,420,423–425].



Au contraire, des bactéries bénéfiques dont les Bifidobactéries, *Lactobacillus* spp. ainsi que *Faecalibacterium prausnitzii* sont généralement diminuées chez le sujet âgé [417,420,423–426].

L'analyse du microbiote intestinal au sein de cohortes de personnes âgées montre que l'état de santé (fragilité), bien plus que l'âge « chronologique », est un déterminant majeur de l'évolution du microbiote au cours du temps. Les personnes ayant un score de fragilité élevé présentent une réduction significative de l'abondance relative en Lactobacilles, *Bacteroides/Prevotella*, *Faecalibacterium prausnitzii* et une augmentation des *Enterobacteriaceae* par rapport aux personnes du même âge avec un faible score de fragilité [426–428]. À l'inverse, le microbiote fécal de supercentenaires (> 105 ans) est plus diversifié et enrichi en bactéries bénéfiques (*Bifidobacteria*, *Akkermansia*) suggérant un écosystème microbien spécifique associé à la longévité [429,430]. Actuellement, la question de savoir si le déséquilibre du microbiote intestinal est un facteur causal, une conséquence ou un accélérateur du processus de vieillissement (et de la fragilité) reste encore débattue [9].

## 2- Comment le microbiote évolue avec l'alimentation ?

Les habitudes alimentaires sont reconnues comme un des moteurs principaux de la composition et de la diversité du microbiote. Les personnes âgées sont généralement plus susceptibles de consommer moins de protéines, de fruits/légumes et d'énergie (calories) que les individus plus jeunes [431]. La perte de diversité alimentaire chez les personnes âgées serait corrélée à une réduction de diversité du microbiote et à un risque accru d'inflammation et de fragilité [421]. Une étude clinique contrôlée a montré que la consommation d'un régime méditerranéen était associée à des modifications du microbiote et à une progression retardée de la fragilité chez les personnes âgées [432]. Les effets bénéfiques du régime méditerranéen sur la force musculaire, la performance physique (par ex., SPPB) et la mobilité (marche) des personnes âgées ont également été mis en évidence dans une revue récente [433]. La consommation de ce type de diète est décrite pour favoriser la croissance de bactéries liées à des bénéfices sur la santé et métaboliquement très actives : *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* et *Prevotella*, et réduire le nombre de pathobiontes. L'effet inverse est observé sur le microbiote lors de la consommation d'un régime de type occidental et peu diversifié [434–436].

Le microbiote intestinal caractéristique d'une consommation importante de produits animaux, d'aliments ultra-transformés, d'alcool et de sucre est associé à une augmentation de la perméabilité intestinale, de l'inflammation et à une diminution des taux d'acides gras à chaîne courte (AGCC) fécaux [435,436]. À noter que les principaux taxons bactériens commensaux sont résilients à la plupart des influences extérieures ponctuelles (médicaments, stress) mais la communauté microbienne intestinale dans son ensemble (genres et espèces) pourrait changer rapidement dans les 24 à 48 heures après une intervention diététique [437]. Néanmoins, les interventions des études sont trop courtes (1 à 2 semaines) et les modifications du microbiote engendrées sont seulement transitoires (quelques jours) suggérant que des changements plus marqués et durables des habitudes alimentaires sont requis pour significativement moduler la composition microbienne de l'hôte sur le long-terme [438]. Actuellement, nous ne savons pas quelle durée est nécessaire pour qu'une intervention diététique ait un impact durable sur le microbiote intestinal notamment parce qu'il n'existe pas, ou trop peu, d'études humaines sur le long-terme. Par ailleurs, un certain nombre d'auteurs suggèrent que le microbiote d'un individu peut être plus ou moins sensible à l'intervention alimentaire en fonction de la présence ou l'absence de bactéries particulières (par ex., celles qui dégradent les fibres) [438].

### **3- Peut-on définir un microbiote « en bonne santé » ?**

Bien que la question paraisse simple, la réponse est extrêmement complexe. Pourtant, définir un microbiote « en santé » pourrait permettre de caractériser le profil du microbiote d'un individu « pathologique » et de définir des marqueurs de pathologies au sein des microbiotes. En pratique, l'importante variabilité qui existe entre les individus (âge, sexe, alimentation, ethnie, migration), les connaissances parcellaires sur les agents non bactériens qui colonisent l'intestin (levures, Archées, phages), l'impossibilité de caractériser des genres bactériens comme « bénéfiques » ou « néfastes » pour la santé de l'hôte et les limites de nos techniques pour déterminer les rôles et l'importance clinique d'une souche spécifique, fait qu'il est difficile de définir un microbiote « sain » [439]. Ainsi, le terme « dysbiose » utilisé pour décrire un déséquilibre du microbiote en association avec une maladie sera susceptible d'être modifié avec l'accroissement des connaissances [440].

Néanmoins, une importante diversité microbienne est généralement un indicateur de « bonne santé » [441].

## **C) Principales fonctions du microbiote intestinal**

Les rôles du microbiote intestinal sur la physiologie de l'hôte, innombrables, sont notamment reliés à l'immunité, le comportement alimentaire ainsi que diverses régulations métaboliques et hormonales [442].

### **1- Fonctions digestives et métaboliques**

La fermentation des carbohydrates contenus dans les fibres alimentaires non digérées par l'hôte (10 à 60 g) constitue la principale source d'énergie des micro-organismes du microbiote [443]. La bio-transformation de ces fibres par le microbiote colique permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et génère la production de métabolites, dont les AGCC [443]. L'acétate, le propionate et le butyrate sont présents dans le côlon dans un rapport molaire d'environ 3:1:1, et représentent  $\geq 95$  % des AGCC totaux [444,445] (**Figure 20**). Ces métabolites sont absorbés par les cellules intestinales et le butyrate entre dans le cycle de Krebs sous forme d'acétyl-CoA pour fournir 60 à 70 % des besoins énergétiques des colonocytes [446–448]. Les AGCC restants sont ensuite dirigés vers la veine porte et atteignent le foie (~80 % du propionate est absorbé par le foie et ~40 % pour l'acétate), le propionate étant utilisé comme substrat dans les voies de la gluconéogenèse [445,447,449–451]. En fin de compte, une petite proportion seulement et principalement l'acétate atteint les organes périphériques, dont les muscles squelettiques [444,452,453].

De même que les fibres, certains peptides alimentaires ou endogènes peuvent échapper aux processus de digestion dans l'intestin grêle et atteindre le côlon (5 à 12 g par jour) où ils seront en contact avec la communauté microbienne intestinale [454,455]. Les protéines et peptides non digérés peuvent alors être utilisés comme substrats pour le métabolisme microbien, ou être dégradés en métabolites (acides gras à chaîne ramifiée dont isobutyrate et isovalérate, AGCC, phénols).

Les métabolites synthétisés par les micro-organismes intestinaux peuvent ensuite être absorbés par les colonocytes, rejoindre la circulation portale de l'hôte ou être excrétés dans les fèces [455]. Bien que quantitativement moins importante que la fermentation des carbohydrates, la biodégradation des protéines mérite d'être mentionnée car elle représente la principale source azotée (et parfois énergétique) des bactéries du côlon.

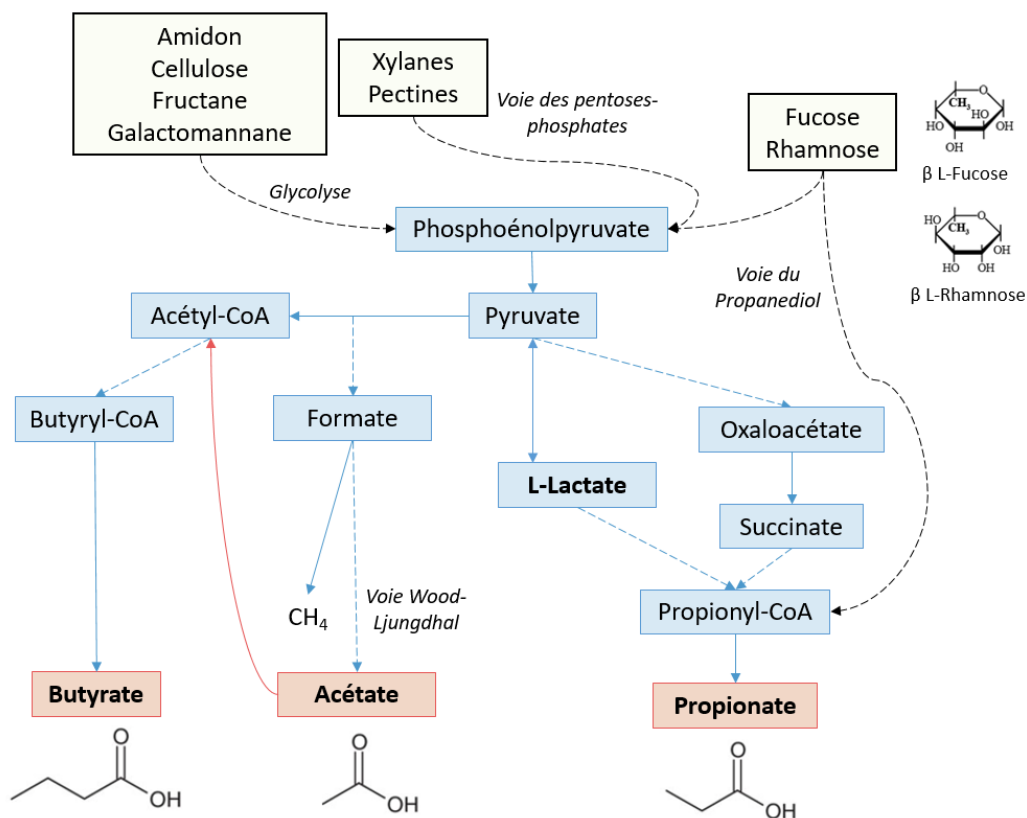


Figure 20. Chaîne trophique de dégradation des fibres alimentaires et différentes voies métaboliques impliquées dans la production des acides gras à chaîne courte. [456,457]

Outre leurs rôles dans la digestion/fermentation, certaines espèces bactériennes du microbiote intestinal (Lactobacilles, Bifidobactéries) sont capables de produire des micronutriments que les mammifères ne peuvent synthétiser eux-mêmes, tels que les vitamines K, B12 et B9 [458]. Ces vitamines sont importantes pour le métabolisme bactérien (puisqu'elles en utilisent une partie) mais également pour la physiologie de l'hôte. Par exemple, les souris axéniques présentent des taux

anormalement bas de prothrombine (un facteur de la coagulation et précurseur de la thrombine) et développent plus d'hémorragies que leurs homologues conventionnels, à moins d'être supplémentées en vitamine K [458,459]. De la même manière, des individus soumis à un régime alimentaire pauvre en vitamine K et sous traitement antibiotique à large spectre présentent des taux sanguins en prothrombine diminués par rapport aux sujets suivant le même régime mais non traités [458]. Quant aux vitamines B, ce sont des cofacteurs et des coenzymes importants impliqués dans différentes voies métaboliques ; métabolisme des nutriments, propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes, maintien de l'homéostasie immunitaire, génération d'ATP par le cycle de Krebs et stimulation de l'anabolisme *via* la synthèse de l'Insulin-Growth Factor-1 (IGF-1) [460–464]. Finalement, le microbiote intestinal joue aussi un rôle dans l'absorption et le métabolisme de certains minéraux tels que le calcium, le magnésium et le fer [465,466].

## **2- Fonctions barrière et rôle dans l'immunité**

Le microbiote intestinal est particulièrement étudié pour ses effets sur le système immunitaire. Tout d'abord, il joue un rôle de protection de la barrière intestinale contre les agents pathogènes. Pour se faire, les micro-organismes commensaux peuvent entrer en compétition avec les pathogènes pour les nutriments et les sites d'adhérence de l'épithélium mais également produire des composés antimicrobiens ou bactériocines [443,467]. Le microbiote permet aussi de limiter la perméabilité intestinale (régulation des jonctions serrées), de maintenir l'épaisseur de la couche de mucus et même de stimuler la sécrétion des IgA afin de limiter la traversée de l'épithélium par des micro-organismes ou des toxines. En plus de cet effet barrière, le microbiote intestinal joue un rôle fondamental dans le développement et la maturation du système immunitaire [443]. Il permettrait notamment le développement des plaques de Peyer (tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) et la stimulation des premières étapes du développement des lymphocytes B et T [443,465].

## **3- Interaction du microbiote avec le cerveau**

Plus récemment, le microbiote intestinal est apparu comme un acteur clé de la régulation des processus cérébraux et du comportement par le biais d'une interaction bidirectionnelle : « l'axe

microbiote-intestin-cerveau » [436]. Les deux organes communiquent constamment et s'influencent mutuellement. En effet, les signaux émis par le tractus gastro-intestinal vers le cerveau sont en mesure d'influencer un certain nombre de fonctions cérébrales, et le cerveau réagit en exécutant des décisions de comportement (alimentation, social, activité) [468]. La communication de cet axe ne dépend pas seulement de signaux neuronaux (neurotransmetteurs), mais aussi de signaux endocriniens (hormones intestinales) et immunitaires (cytokines), ainsi que des métabolites dérivés du microbiote (ex., AGCC) qui agissent ensemble pour réguler la physiologie de l'hôte et le microbiote [468]. Les études utilisant des animaux axéniques ont montré un comportement et un profil neurochimique aberrants, et ont ainsi été essentielles pour établir le lien entre le microbiote intestinal et les processus cérébraux [469,470]. Des preuves supplémentaires du lien entre le microbiote et le cerveau proviennent d'études animales et humaines reliant l'administration de probiotiques à des changements comportementaux et cognitifs chez l'hôte [436]. Les études sur les rongeurs ont démontré que l'administration de probiotiques (par ex., *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. longum*) peut avoir des effets anxiolytiques et antidépresseurs [471,472], et améliorer la fonction cognitive de la souris âgée [473]. De même, des méta-analyses ont rapporté des preuves prometteuses, bien que préliminaires, sur le potentiel des probiotiques à réduire l'anxiété, la dépression et le stress chez l'Homme [436,474].

*Le microbiote intestinal est en interaction avec bien d'autres organes que le cerveau, tels que les muscles squelettiques [475], les poumons [476], le foie ou encore les reins [477,478]. Bien que ces derniers dialogues inter-organes soient probablement unidirectionnels, ils renforcent l'importance et l'étendue des fonctions que peut jouer cet écosystème microbien dans la physiologie des individus et le développement de pathologies lorsqu'il est altéré.*

## **D) Microbiote et impact sur l'hôte âgé**

### **1- Microbiote et altérations des grandes fonctions avec l'âge**

Comme décrit précédemment, le microbiote intestinal exerce des effets métaboliques locaux au niveau du tractus digestif (digestion et absorption des nutriments, extraction de l'énergie), module la perméabilité intestinale et la sécrétion d'hormones intestinales. Il produit également de nombreuses molécules (par ex., acides gras, dérivés des AA) qui peuvent interagir avec la physiologie

de l'hôte directement ou indirectement, tant au niveau de l'intestin que d'autres organes [479]. Ainsi, les altérations de la composition, de la diversité et des caractéristiques fonctionnelles du microbiote associées à l'âge sont étroitement corrélées à un déclin du fonctionnement du système immunitaire (immunosénescence) et à une inflammation chronique de bas-bruit (inflammaging), qui pourraient être à la base de nombreuses maladies liées au vieillissement telles que les infections, les troubles métaboliques ou les cancers [418]. L'étude des interactions microbiote-organes permet de comprendre les rôles physiopathologiques que joue le microbiote « âgé » dans le développement de ces maladies (Figure 21).

Dans la suite du manuscrit, nous nous focaliserons sur l'interaction microbiote-intestin-muscle qui fait référence aux rôles que joue le microbiote intestinal sur le maintien de la masse et de la fonction musculaires [166,184,190,480]. Ce lien microbiote-muscle a fait l'objet d'une revue de synthèse publiée dans le Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle au cours de ma thèse : « *Gut microbes and muscle function : can probiotics make our muscles stronger ?* » (Annexe 1) et qui complètera les concepts développés dans toute la suite du manuscrit.

## 2- Microbiote, muscles et sarcopénie

### a) Existe-il un lien causal entre le microbiote et la fonction musculaire ?

Des études récentes suggèrent que, comme dans le cas d'autres tissus ou fonctions biologiques, la communauté microbienne intestinale peut moduler directement ou indirectement certaines fonctions musculaires et participer au développement de la sarcopénie.

Ainsi, Lahiri *et al.* ont remarqué que des souris axéniques présentaient une altération de la masse et de la force musculaires et que les marqueurs d'atrophie FoxO3, MuRF-1 et Atrogin-1 étaient sur-exprimés par rapport à des souris conventionnelles [481]. Lorsque ces rongeurs axéniques étaient réensemencés avec le microbiote fécal des souris conventionnelles, leur fonction musculaire s'était rétablie après 21 jours [481]. En parallèle, Hsu *et al.* ont montré que les performances physiques (endurance à la nage) et la masse musculaire des souris axéniques étaient réduites par rapport à des rongeurs possédant un microbiote, mais sans effet sur la masse corporelle des animaux [482].

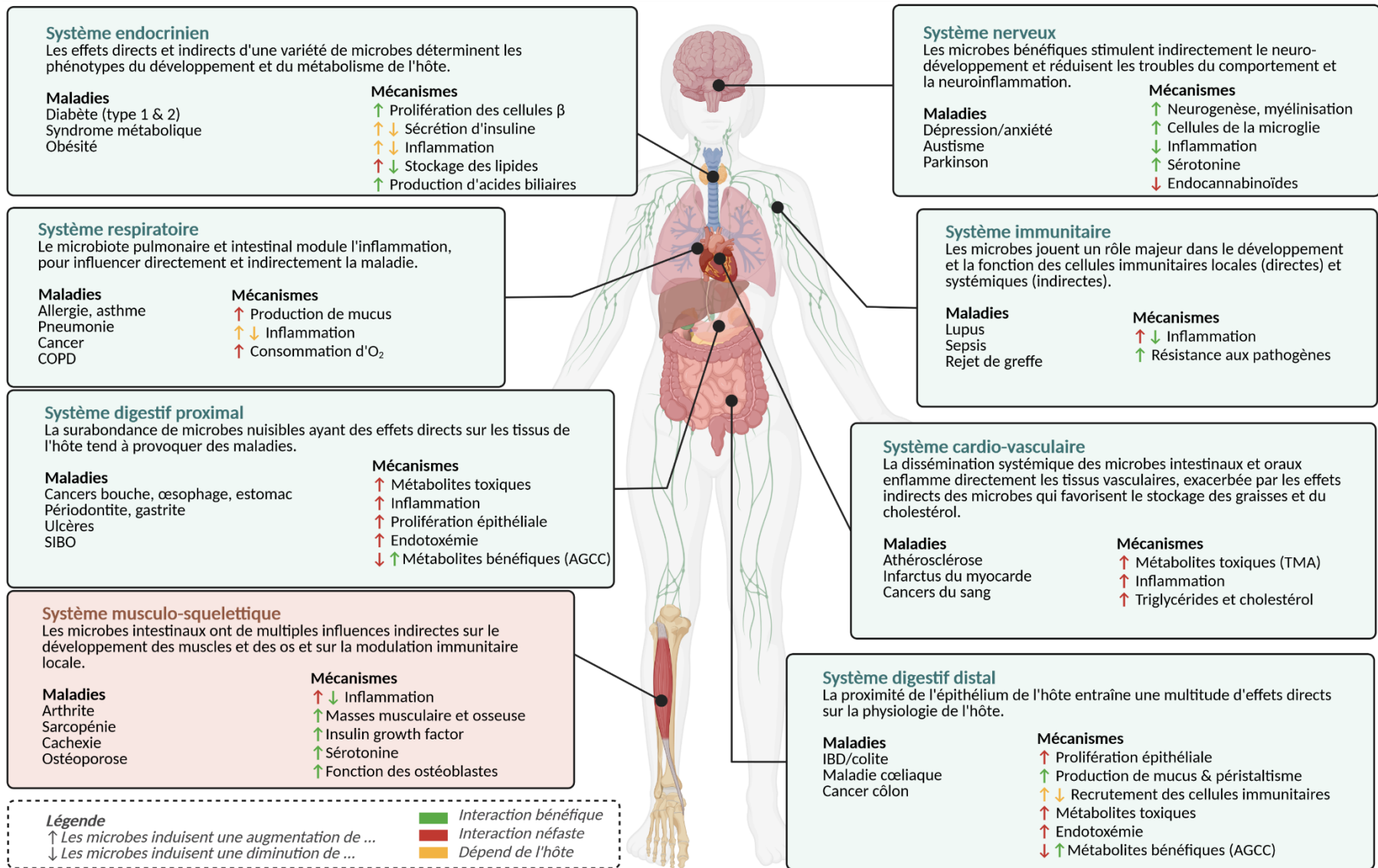


Figure 21 : Effets du microbiote intestinal sur la physiopathologie de l'hôte. Inspirée de Hill and Round, 2021 [483]. Acronymes : AGCC, acides gras à chaîne courte ; IBD, Inflammatory Bowel Disease ; SIBO, Small Intestinal Bacterial Overgrowth ; TMA, triméthylamine.



Le constat est similaire lorsque des souris conventionnelles subissent une antibiothérapie (pendant 15 à 21 jours) ; c'est-à-dire que les animaux traités présentaient une diminution de masse musculaire et de performance physique (endurance) par rapport aux rongeurs témoins non traités [484,485]. Suite à l'arrêt des antibiotiques et le réensemencement naturel pendant 10 jours [485] ou la perfusion continue d'acétate pendant 7 jours [484], une récupération progressive de la masse musculaire et/ou de la performance physique initiale est observée. Tout comme pour les souris axéniques, le modèle traité aux antibiotiques présente des limites puisqu'il n'exclut pas des effets intrinsèques dus au traitement lui-même, avec une adaptation des animaux à l'absence de microbiote ou la sélection de micro-organismes antibio-résistants [486]. La production des métabolites bactériens, dont les AGCC, est fortement diminuée lorsque le microbiote est inexistant (animaux axéniques), par un traitement antibiotique ou chez les sujets âgés. Par exemple, le propionate et le butyrate ne sont pas détectés dans la lumière colique de souris axéniques [487] et la concentration des AGCC diminue chez les personnes âgées tandis que les métabolites des protéines (acides gras ramifiés, ammoniac et phénols) augmentent [488]. Par contre, il est intéressant de noter que la supplémentation en AGCC restaure la masse et/ou la force musculaires, qui étaient diminuées chez les rongeurs axéniques et les rongeurs âgés [481,484,489]. Plus précisément, la supplémentation en acétate (dans la nourriture, eau de boisson ou injection) a permis d'augmenter l'absorption du glucose (expression des récepteurs GLUT4) et le contenu en glycogène dans les muscles squelettiques de rats, et de diminuer l'accumulation intramusculaire des lipides *via* une augmentation de l'absorption et de l'oxydation des acides gras chez le lapin. Ceci s'explique par une meilleure sensibilité à l'insuline chez les deux espèces [490–493]. De même, la supplémentation orale en butyrate chez la souris prévient le stress oxydatif et la perte de masse musculaire en augmentant la biogenèse mitochondriale ainsi que le nombre de fibres de type I dans les muscles squelettiques [489,494–496].

Le dernier élément qui soutient le rôle causal du microbiote intestinal sur le métabolisme musculaire chez les individus âgés repose sur le transfert de microbiote fécal humain à des souris axéniques. Fielding *et al.* ont transplanté le microbiote fécal de patients âgés sédentaires « fragiles » ou de patients du même âge mais en meilleure condition physique (peu/pas fragiles) à des rongeurs axéniques et ont montré que les animaux inoculés avec le microbiote d'un âgé « fragile » présentaient une diminution de la force musculaire significativement supérieure comparée aux

receveurs du microbiote d'âge en meilleure santé [497]. Plus précisément, le microbiote des patients fragiles (et des souris transplantées « fragiles ») était moins riche en représentants du genre *Prevotella* et *Barnesiella*, des genres considérés comme bénéfiques et retrouvés davantage chez les athlètes que chez les personnes sédentaires [497] et davantage chez les jeunes rats en bonne santé que chez les vieux rats sarcopéniques [498]. *L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que le microbiote intestinal, et notamment la présence de certaines populations microbiennes, est déterminant dans le maintien de la fonction des muscles, chez le rongeur et chez l'humain.*

#### *b) Comment le microbiote est-il impliqué dans la fonte musculaire ?*

La sarcopénie et la fragilité physique sont caractérisées par une perte de masse et de fonction musculaires qui augmente les risques de chutes, fractures, invalidité ainsi que la mortalité et sont expliquées par la résistance du muscle aux facteurs anaboliques et par l'installation d'une inflammation bas-bruit [499]. Le microbiote intestinal, et tout particulièrement la multitude de métabolites qu'il produit (toxines, AGCC, dérivés d'AA et d'acides biliaires) vont moduler positivement ou négativement l'ensemble de ces mécanismes et impacter le muscle squelettique.

#### Les lipopolysaccharides

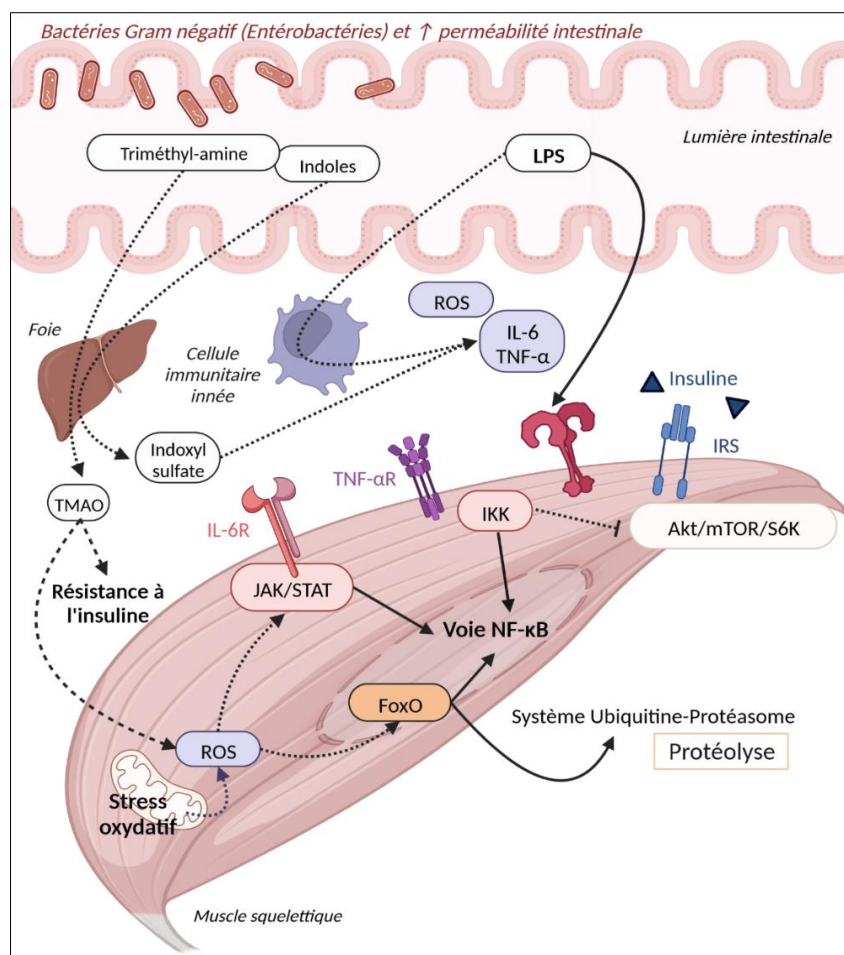
L'altération de la barrière intestinale observée au cours du vieillissement conduit au passage de lipopolysaccharides (LPS) – des composants de la paroi des bactéries Gram négatif – à travers les jonctions serrées des entérocytes pour se retrouver dans la circulation systémique. Les LPS sont des molécules pro-inflammatoires pouvant induire la sécrétion des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$  par les cellules immunitaires et qui sont connues pour jouer sur les voies de signalisation intrinsèques des muscles squelettiques pour stimuler, *in fine*, la protéolyse musculaire et réduire la sensibilité du muscle à répondre aux signaux anaboliques : repas, leucine et insuline (Figure 22).

## Les AA et leurs métabolites

Le microbiote intestinal est impliqué dans l'absorption et le métabolisme des AA au niveau du tube digestif et certains auteurs suggèrent qu'il pourrait contribuer à la résistance anabolique qui s'installe avec l'âge [480]. Par exemple, la réduction des espèces bactériennes capables de synthétiser la leucine et la lysine (*Prevotella*) – des molécules essentielles au turnover protéique musculaire [500,501], ainsi que l'augmentation de l'oxydation de la leucine favoriserait son extraction splanchnique [502], conduirait à une diminution de la disponibilité des AA pour le muscle puis à une perte progressive de fonction musculaire [480]. Néanmoins, la contribution de la communauté microbienne intestinale dans les apports en AA à l'hôte semble relativement faible par rapport aux apports exogènes : entre 1 et 21 % des apports globaux pour la lysine d'après Metges *et al.* [503] et moins de 5 % pour la thréonine, la lysine et la phénylalanine selon une étude plus récente [504].

D'autres métabolites du microbiote intestinal pourraient également participer à l'inflammation chronique ou la résistance à l'insuline observées chez les patients âgés. Pour rappel, des protéines/peptides alimentaires ou endogènes peuvent échapper aux processus de digestion et atteindre le côlon où ils seront utilisés comme substrats pour le métabolisme microbien ou dégradés en métabolites [454,455]. La fermentation des AA aboutit à la production d'AGCC (mais dans une moindre mesure que lors de la fermentation des glucides), d'acides gras à chaîne ramifiée (isobutyrate, isovalérate) et d'ammoniac (NH<sub>3</sub>). Les acides gras ramifiés sont proposés comme des marqueurs de la fermentation des protéines dans le côlon et pourraient moduler le métabolisme du glucose (potentialisation de l'absorption du glucose) et des lipides (inhibition de la lipase hormono-sensible et de la lipogénèse) dans le tissu adipeux du rat ou de l'Homme [505,506]. Le rôle de ces métabolites sur le muscle reste cependant largement inconnu. De nombreuses autres molécules peuvent être produites à partir des AA : composés phénoliques, composés indoliques et sulfures [443,458,507], qui peuvent toutes contribuer positivement ou négativement à la physiologie de l'hôte mais leur impact sur les muscles squelettiques est, là-encore, peu documenté [455,508–510]. Par exemple, un dérivé de l'indole, l'indoxyl sulfate, plus abondant chez l'âge [511], favoriserait la réponse pro-inflammatoire (expression de TNF- $\alpha$  et IL-6) et l'expression de marqueurs d'atrophie (Atrogin-1) *in vitro* et chez la souris [190,512]. Cette molécule a été associée avec la sarcopénie et la dénutrition chez les patients atteints de maladie rénale chronique [512–514].

Le triméthylamine (TMA) peut être produit *via* différentes voies enzymatiques microbiennes (principalement dans la famille des *Enterobacteriaceae*) à partir de la choline ou de la L-carnitine (produits animaux) puis oxydé en N-oxyde de triméthylamine (TMAO) dans le foie [515]. Le TMAO pourrait alors activer les voies PERK et FoxO1 dans le foie et favoriser la gluconéogenèse hépatique et la libération du glucose hépatique [516]. Cet effet, s'il est présent de façon chronique, pourrait perturber l'homéostasie du glucose et évoluer vers une hyperglycémie chronique, le développement d'une résistance à l'insuline et une diminution de la masse et de la force musculaires, comme cela a été montré chez les personnes âgées atteintes de diabète de type 2 [517]. Les cibles du TMAO dans le muscle squelettique ne sont pas encore connues mais, dans les cellules musculaires cardiaques, cette molécule pourrait stimuler l'expression de signaux pro-inflammatoires : ROS, NF-κB et TNF-α [518] (Figure 22).



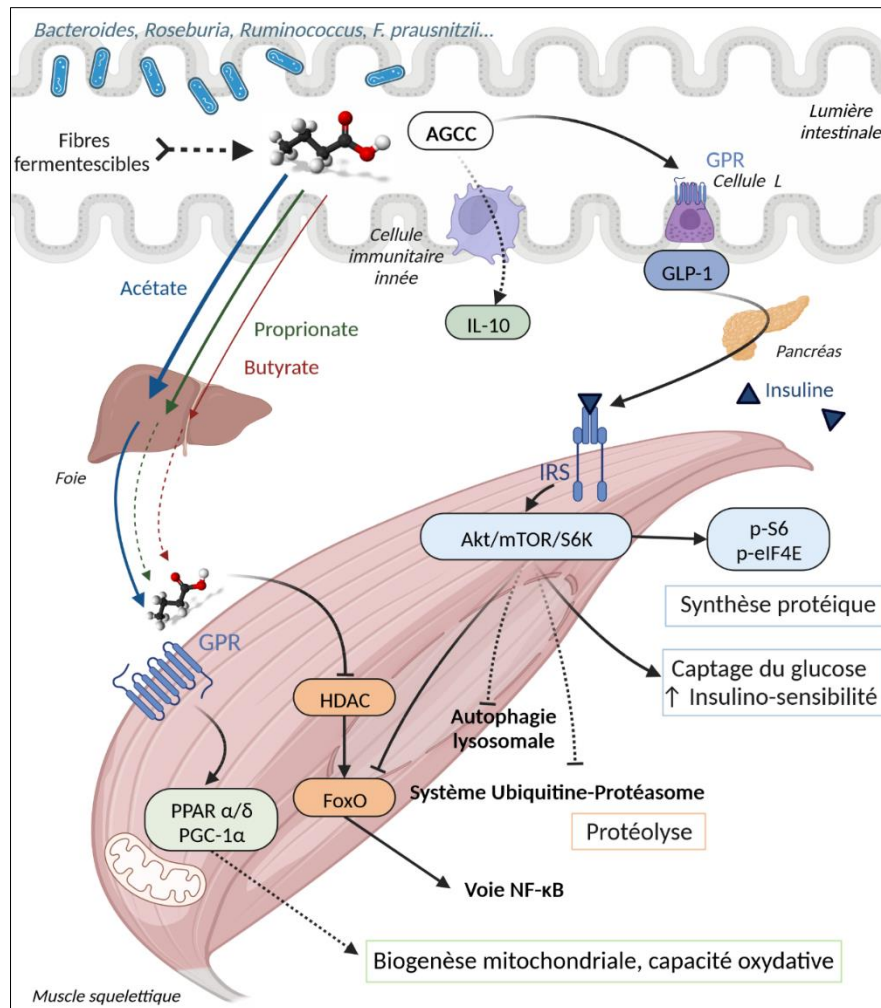
**Figure 22. Conséquences d'une inflammation intestinale sur le métabolisme musculaire de l'hôte.**

Acronymes : Akt (PKB), protein kinase B ; FoxO, Forkhead box transcription factors ; IKK, IκB kinase ; IL, interleukin ; IRS, insulin receptor substrate ; JAK, Janus kinase ; LPS, lipopolysaccharides ; mTOR, mechanistic (mammalian) target of rapamycin ; NF-κB, nuclear factor-κ-B ; ROS, reactive oxygen species ; STAT, signal transducers and activators of transcription ; TMAO, trimethyl-amine oxide ; TNF-α, tumor necrosis factor-α.

## Les acides gras à chaîne courte – AGCC

Les AGCC sont bien connus pour leurs effets bénéfiques sur le métabolisme énergétique et la sensibilité à l'insuline au niveau du corps entier et des muscles squelettiques [447,456]. Les effets métaboliques des AGCC peuvent être directs en tant que substrats pour le métabolisme énergétique ou en tant que signaux en activant les récepteurs membranaires couplés aux protéines G (GPR) – les plus étudiés étant GPR41, GPR43 et GPR109A. Ces récepteurs sont principalement exprimés au niveau des cellules intestinales (côlon, iléon) et des cellules immunitaires innées (monocytes) ; leur activation (par le butyrate principalement) permet ainsi de renforcer la barrière épithéliale et de moduler les fonctions immunitaires de l'hôte [453]. Les AGCC peuvent également exercer des effets indirects en favorisant la sécrétion du Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1), une hormone intestinale qui favorise la sécrétion d'insuline par le pancréas, l'absorption du glucose, la synthèse de glycogène dans les muscles squelettiques et qui stimule la synthèse protéique musculaire (voie Akt/mTOR/S6K) en période post-prandiale [456,519] (**Figure 23**). Les métabolites bactériens (AGCC et lactate) présents dans la lumière intestinale peuvent aussi diffuser directement dans les entérocytes à l'aide des transporteurs MCT-1 (proton-coupled Monocarboxylate Transporter 1) et SMCT-1 (Sodium-dependent Monocarboxylate Transporter 1) présents sur les membranes apicale et basale (MCT-1 seulement) des cellules du côlon et de l'iléon et permettent alors leur sortie vers la circulation sanguine [453].

Les GPR sont également exprimés au niveau du tissu adipeux et des organes périphériques (foie et muscles). Au niveau musculaire, l'activation des GPR (probablement par l'acétate présent en plus grande majorité) a notamment pour effet de stimuler la biogenèse mitochondriale et l'oxydation des acides gras *via* l'activation de l'AMP Kinase (AMPK) puis l'activation sub-conséquent de PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 $\alpha$ ) [456]. L'augmentation du flux sanguin (et donc de l'arrivée de nutriments au niveau musculaire) et leurs propriétés anti-inflammatoires *via* des mécanismes épigénétiques (inhibition des histones désacétylases et de la voie NF- $\kappa$ B) ou l'induction de l'IL-10 par les cellules immunitaires sont d'autres effets indirects des AGCC (du butyrate surtout) qui bénéficieront au muscle [456,479] (**Figure 23**).



**Figure 23. Effets des acides gras à chaîne courte sur le métabolisme musculaire de l'hôte.**  
 Acronymes : AGCC, acides gras courte chaîne; Akt (PKB), protein kinase B ; FoxO, Forkhead box transcription factors ; GLP-1, glucagon-like-protein 1 ; GPR, G-protein-coupled receptor ; HDAC, histone désacétylase ; IKK, IκB kinase ; IL, interleukin ; IRS, insulin receptor substrate ; mTOR, mechanistic (mammalian) target of rapamycin ; PGC-1α, PPAR coactivator 1α ; PPAR α/δ, peroxisome proliferator-activated receptor α/δ ; , p-S6, phosphorylated S6 ; p-eIF4E, phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4E ; NF-κB, nuclear factor-κ-B.

## Les acides biliaires

Le microbiote intestinal est aussi capable de générer des métabolites à partir des acides biliaires (AB) primaires qui n'ont pas été réabsorbés dans l'iléon. Diverses bactéries peuvent transformer les AB primaires en AB secondaires : les acides désoxycholique et lithocholique essentiellement, chez l'humain [443,520,521]. En plus de leur rôle dans l'émulsification des lipides alimentaires, les AB secondaires peuvent également agir comme molécule signal en activant le récepteur membranaire couplé aux protéines G 5 (TGR5). TGR5 est exprimé dans l'iléon mais également dans les cellules

de Kupffer (les macrophages du foie) et les muscles squelettiques. Il peut participer à l'homéostasie du glucose car la liaison AB-TGR5 favorise la sécrétion de GLP-1 et de PYY par les cellules L de l'iléon mais aussi aux réponses inflammatoires hépatiques en inhibant la production de TNF- $\alpha$  par les cellules immunitaires [516,520–523]. Par ailleurs, l'activation de TGR5 par les AB pourraient participer à la croissance et à la fonction musculaire. En effet, il a été démontré que TGR5 est impliqué dans l'homéostasie musculaire puisque les souris TGR5 KO présentent une masse/force musculaire plus faible ; la surexpression musculaire spécifique de TGR5 chez les souris jeunes et âgées induit une masse/force musculaire plus élevée et enfin, l'exercice augmente l'expression de ce récepteur dans les muscles [524]. Les mécanismes ne sont pas totalement élucidés mais il a été démontré que l'activation de TGR5 favorise la conversion de la thyroxine inactive (T4) en hormone thyroïdienne anabolique active (T3) [520,525]. De plus, TGR5 pourrait renforcer la voie AMPc-PKA-CREB dans les muscles squelettiques, activant des gènes cibles codant des facteurs de transcription (PGC-1 $\alpha$ ) et autres médiateurs (myokines, IGF-1) qui stimulent la biogenèse mitochondriale, améliorent l'absorption des nutriments et le métabolisme, favorisent l'hypertrophie et permettent la réparation musculaire [524,526].

### **E) Stratégies pour moduler le microbiote intestinal chez l'âge**

Le nombre croissant de preuves suggérant un rôle causal des micro-organismes intestinaux et de leurs produits microbiens dans les maladies métaboliques ouvre la possibilité de cibler le microbiote intestinal dans ces maladies [479]. La composition et la fonction du microbiote intestinal peuvent être modulées par l'alimentation, les probiotiques, les prébiotiques, les postbiotiques, la transplantation de microbiote fécal ou certains médicaments (live biotherapeutic products, LBP). Nous nous concentrerons principalement sur les probiotiques dans la suite du manuscrit.

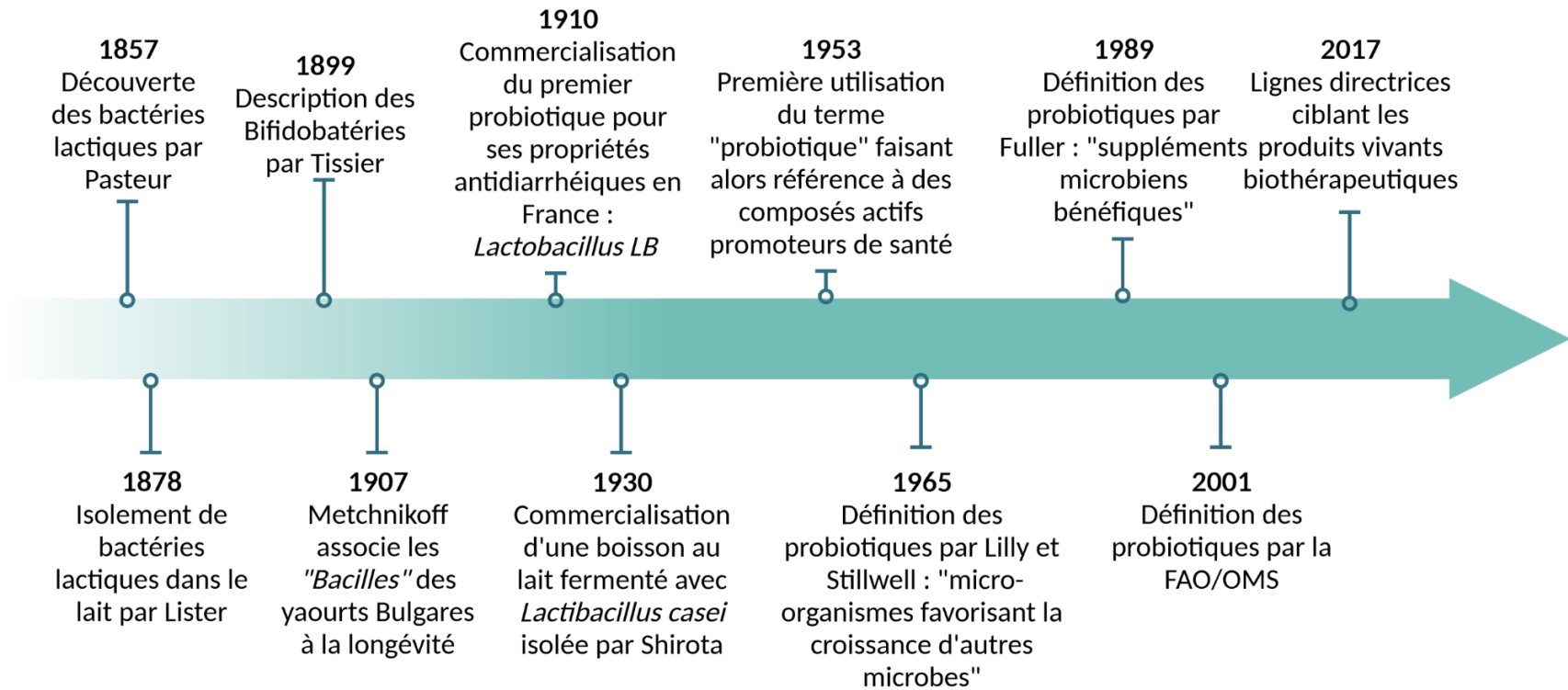


Figure 24. Frise chronologique présentant les faits marquants autour de la question des probiotiques. [527,528]



## II- Stratégie probiotique

### A) Un peu d'histoire et définitions

Les probiotiques ont été définis en 2001 par un groupe de travail mixte combinant l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) comme des « *micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantités adéquates, procurent un effet bénéfique à la sante de l'hôte* » [1].

La définition officielle des probiotiques est donc plutôt récente, mais l'utilisation de ces micro-organismes et l'origine du concept de « probiotiques » ne datent pas d'hier [529] (Figure 24). C'est en 1857 que Louis Pasteur a découvert les bactéries lactiques dans les cuves d'une distillerie de betterave. Cette découverte a permis de différencier la fermentation alcoolique (régie par les levures) de la fermentation lactique [529,530]. Le concept des probiotiques est apparu un peu plus tard, au début du XXe siècle, et serait attribué à plusieurs bactériologistes dont notamment Elie Metchnikoff. Metchnikoff remarqua qu'une consommation régulière de lait fermenté, riche en bactéries lactiques, pouvait améliorer la santé et augmenter la durée de vie des consommateurs bulgares. Le professeur attribua alors l'effet « pro-longévité » aux deux bactéries *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* très présentes dans cet aliment fermenté et émet l'hypothèse que « *la dépendance des microbes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microbes dangereux par des microbes utiles* » [531]. En parallèle, le pédiatre français Henri Tissier a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhées étaient bien plus pauvres en bactéries « bifides » que celles d'enfants en meilleure santé et suggéra que l'administration de ces bactéries particulières aux jeunes patients pourraient rétablir leur « flore intestinale » [532]. C'est à partir des années 1950 que le terme « probiotique » a été utilisé pour la première fois, et cela en opposition à « antibiotique ». Ce terme faisait alors référence à « *l'ensemble des suppléments organiques et inorganiques permettant de restaurer la santé des patients malnutris* » selon le Dr Kollath en 1953 [533], ou à « *des substances produites par des micro-organismes qui favorisent la croissance d'autres micro-organismes* » [532,534] puis à « *un supplément alimentaire vivant qui affecte positivement l'animal receveur en améliorant son équilibre microbien* » [442,535].

Rapidement, il a été choisi d'exclure de la définition les produits issus du métabolisme microbien et les micro-organismes tués (plutôt considérés comme des « postbiotiques » à l'heure actuelle [536]).

Du fait de l'utilisation croissante des médecines alternatives et de la prise de conscience par la population des bienfaits des bactéries pour « soigner » certaines pathologies, le secteur des probiotiques est en pleine expansion. Ainsi, le marché mondial des probiotiques était estimé à 40 milliards d'euros en 2019 et devrait croître de 6,8 % d'ici 2027 (rapport *Coherent Market Insights*).

Sur le plan réglementaire, la définition officielle des probiotiques peut couvrir à la fois des micro-organismes dans les aliments (yaourts, fromage, kimchi et autres aliments fermentés) et les compléments alimentaires. Toutefois, une vigilance particulière doit être portée sur les aliments fermentés, communément appelés « aliments probiotiques » puisqu'ils ne contiennent pas tous des micro-organismes vivants (par ex., le pain), un « prérequis » pour être considéré comme probiotique. De plus, les micro-organismes présents dans ces aliments doivent être parfaitement identifiés et « responsables » des effets bénéfiques apportés par ce type d'aliment (effets démontrés cliniquement).

Les compléments alimentaires sont définis par la Directive 2002/46/CE du Parlement Européen et du Conseil du 10 juin 2002 comme « *des denrées alimentaires dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seuls ou combinés, commercialisés sous forme de doses, [...] telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes [...] destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité* ». À noter que les compléments alimentaires, à la différence des médicaments, n'ont pas pour objectif de prévenir ou de traiter des maladies, mais de maintenir en bonne santé une population saine.

Dans la Directive 1924/2006/CE, l'EFSA précise que la mention « probiotique » à elle seule constitue une allégation de santé et qu'elle est à ce jour la seule allégation théoriquement autorisée à figurer sur le produit. La seule allégation santé autorisée concerne *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* dans les yaourts ou laits fermentés pour améliorer la digestion du lactose chez les individus ayant des difficultés à le digérer. Toutes les autres demandes d'allégations portant sur des souches probiotiques ont été refusées jusqu'à maintenant pour les raisons suivantes : souches microbiennes insuffisamment caractérisées, effets bénéfiques applicables à des populations malades et/ou manque de preuve des bénéfices sur des troubles de santé. Un communiqué de presse du Syndicat National des Compléments Alimentaires (Synadiet), du 17 mai 2021, adressé aux autorités françaises compétentes, estime que l'interdiction de faire figurer le mot « probiotique » sur les emballages des compléments alimentaires qui en contiennent « limite considérablement l'information du consommateur » et précise que beaucoup d'autres pays européens (Espagne, Pays-Bas, Danemark, Italie) ont déjà autorisé cette mention, ce qui « pénalise » les industriels français vis-à-vis de leurs concurrents européens.

## **B) Sélection et évaluation des probiotiques**

Des critères fondamentaux à la fois scientifiques, réglementaires et économiques doivent être remplis par la souche pour qu'elle soit commercialisée. À ce propos, la FAO et l'OMS ont établi des lignes directrices à suivre pour la caractérisation et l'évaluation d'un probiotique destiné à l'usage humain (Figure 25). L'étude de phase 3 chez l'Homme est une étape particulièrement délicate puisque l'intérêt des probiotiques chez des personnes en bonne santé est difficile à mettre en évidence. En effet, si nous reprenons le cas des probiotiques du yaourt, l'effet bénéfique des bactéries est observé non pas chez tous les individus mais seulement chez ceux qui souffrent d'une intolérance au lactose. Les effets bénéfiques des probiotiques seront donc plus faciles à mettre en évidence chez des sous-groupes d'individus en considérant la nutrition personnalisée.

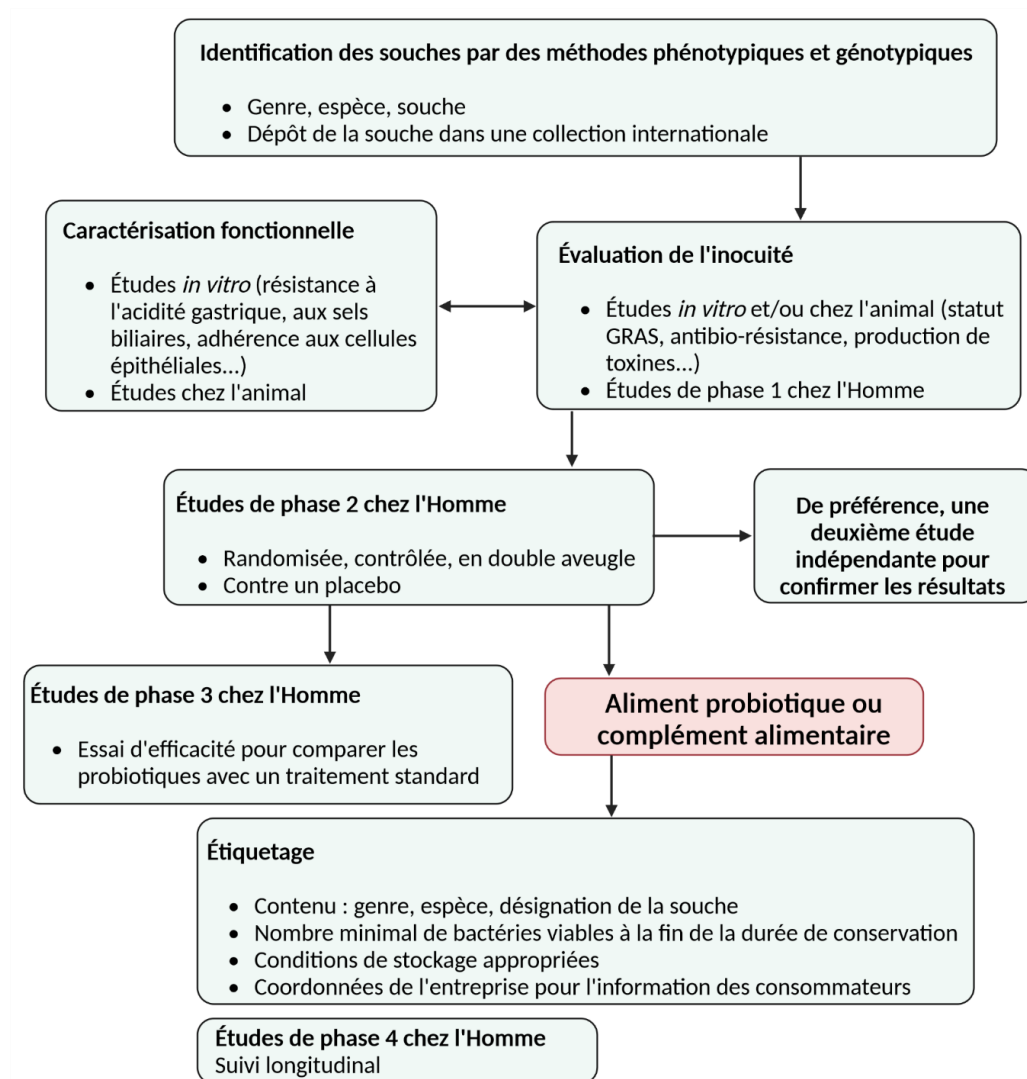


Figure 25. Lignes directrices pour l'évaluation des probiotiques destinés à l'alimentation humaine. [533,537]

### 1- Identification et innocuité : critères de sécurité

Une souche microbienne doit être parfaitement identifiée et caractérisée selon le Code International de Nomenclature – genre, espèce, souche – pour pouvoir être considérée comme probiotique. En effet, bien que la notion de « core benefits », (c'est-à-dire des mécanismes bénéfiques partagés entre des espèces voire des genres bactériens différents) ait été mentionnée par le consensus de l'ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics), il est davantage admis que les effets des probiotiques sont souche-dépendants. Ainsi, les effets d'une souche ne peuvent pas être extrapolés à une autre souche, même si elles appartiennent à la même espèce [538].

La souche identifiée doit également être déposée dans une collection internationalement reconnue telle que la Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) en France.

Suite à l'identification et au dépôt de la souche, son innocuité doit être évaluée. Le statut « Generally Recognized As Safe » (GRAS) établi par la Food and Drug Administration américaine (FDA) assure à certaines bactéries habituellement utilisées dans l'alimentation (par ex., bactéries lactiques, Bifidobactéries et quelques levures) une absence d'effets néfastes [539,540]. Des expérimentations supplémentaires (*in vitro* et cliniques) sont ainsi nécessaires pour s'assurer de l'innocuité d'une nouvelle souche probiotique si elle est absente de la liste « GRAS ». Les micro-organismes probiotiques ne doivent pas être pathogènes, mutagènes ou carcinogènes et résistants à certains antibiotiques.

Toutefois, le groupe d'experts recommande, et ce pour toutes les souches microbiennes, même celles présentes sur la liste « GRAS », la réalisation d'au moins un des tests suivants [1]:

- Détermination du profil de résistance aux antibiotiques ;
- Détermination de certaines activités métaboliques (par ex., production de D-lactate) ;
- Évaluation des effets secondaires durant des études cliniques ;
- Surveillance épidémiologique des effets indésirables chez les consommateurs ;
- Détermination de la production de toxines (si la souche appartient à une espèce connue pour produire des toxines) ;
- Détermination de l'activité hémolytique (si la souche appartient à une espèce connue pour avoir un potentiel hémolytique).

En 2007, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) adopte le concept « Qualified Presumption of Safety » (QPS) pour l'évaluation des risques potentiels à l'utilisation des micro-organismes [541,542] (**Annexe 4**). Le but de cette approche est « *d'harmoniser l'évaluation des risques et de permettre aux évaluateurs des risques de se concentrer sur les agents biologiques qui présentent les incertitudes ou les risques les plus importants et non d'évaluer l'ensemble des microorganismes* ». Ainsi, seulement les espèces inventoriées sur la liste « QPS » (globalement

similaire à la liste « GRAS ») peuvent en théorie être utilisées dans la production d'aliments et commercialisées en Europe [543].

Les critères suivants sont utilisés par l'EFSA pour accorder le statut « QPS » à une bactérie [532,544,545] :

- La définition taxonomique (espèce et sous-espèce) ;
- Revue de la littérature ;
- L'éventuelle pathogénicité de l'espèce ;
- L'utilisation prévue.

À partir de 2014, l'évaluation globale des agents biologiques inclus dans la liste « QPS » est effectuée tous les trois ans (et non plus tous les ans), et se déroule selon la procédure suivante [544] :

- Évaluation de la possibilité pour le micro-organisme cible à être inclus dans la liste « QPS » ;
- Inclusion des micro-organismes dont le statut « QPS » leur a été accordé dans la liste et publication sur le site de l'EFSA ;
- Vérification, à partir des données de la littérature, des micro-organismes de la liste afin de s'assurer qu'ils sont toujours adaptés à un statut « QPS ».

Il existe un troisième type de liste positive qui mérite d'être précisé, établie par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL, ou IDF pour International Dairy Federation). L'inventaire FIL recense les micro-organismes dont les études scientifiques démontrent qu'elles peuvent être utilisées sans danger dans les aliments fermentés. Dans la dernière mise à jour de 2022, nous pouvons retrouver, par exemple, les micro-organismes des genres et espèces *Lactocaseibacillus casei* pour un usage dans les produits laitiers, la viande ou le vin et *Limosilactobacillus mucosae* pour un usage dans les boissons alcoolisées [546].

## 2- Critères fonctionnels et technologiques

En parallèle de son innocuité, la souche microbienne doit présenter des caractéristiques fonctionnelles et technologiques pour pouvoir être commercialisées. Les critères fonctionnels font notamment référence à la capacité que possède le micro-organisme à résister et/ou s'adapter au stress

du tractus gastro-intestinal et à coloniser temporairement la muqueuse intestinale. Les tests *in vitro* sont alors indispensables pour déterminer ces types de critères qui sont, pour un probiotique destiné à un usage « oral » [1] :

- La tolérance au pH acide et à la pepsine (estomac) ;
- La résistance aux sels biliaires (intestin grêle) ;
- L'adhérence aux cellules intestinales ou au mucus (intestin grêle et côlon).

Les critères technologiques font plutôt référence à la capacité d'une souche probiotique à :

- Survivre pendant le processus de fabrication de l'aliment (conditions de fermentation, congélation, séchage) et à son stockage (oxydation, température, pH) – autrement dit, la stabilisation de la souche ;
- Être produite à l'échelle industrielle (résistance aux phages, biomasse) ;
- Ne pas altérer négativement les propriétés sensorielles de l'aliment [532,537,547].

Finalement, les micro-organismes doivent être apportés en quantité suffisante : de  $10^9$  à  $10^{11}$  unités formant une colonie (UFC ou CFU, Colony Forming Unit) par jour.

### **3- Bénéfice santé : critères physiologiques**

Une souche probiotique doit, bien évidemment, apporter des effets bénéfiques prouvés (ou supposés) à la santé du consommateur. Ces effets physiologiques peuvent être de plusieurs types : immunomodulation, activité antimicrobienne, activité enzymatique dans le métabolisme du lactose, capacité d'adhésion, cicatrisation des muqueuses, effet bénéfique sur le métabolisme de l'hôte etc. Ils doivent être démontrés par des études cliniques pour être validés [1].

Étant donné les interactions complexes qu'ils existent entre les micro-organismes du microbiote intestinal, les effets des probiotiques peuvent dépendre des individus. Par exemple, les personnes atteintes de diabète de type 2 qui présentent néanmoins une grande diversité microbienne et un nombre de producteurs de butyrate élevé ne bénéficieront pas nécessairement autant de l'effet du probiotique que les personnes présentant un microbiote altéré.

En conséquence, une connaissance accrue du microbiote intestinal de chaque patient pourrait faciliter la stratification des sujets sur leur capacité à répondre au probiotique dans le cadre d'une médecine plus personnalisée [479].

### **C) Les probiotiques, une stratégie de lutte contre la sarcopénie (Annexe 1)**

Comme développé précédemment, la diversité/composition/fonction du microbiote pourraient être un déterminant de la masse et de la fonction musculaires dans diverses situations physiopathologiques. Les stratégies capables de cibler le microbiote intestinal peuvent alors être considérées comme un levier d'action pour lutter contre la sarcopénie et la fragilité ; ainsi les probiotiques pourraient compléter les stratégies déjà existantes. Par ailleurs, ils ont démontré à plusieurs reprises leur capacité à limiter l'apparition d'une résistance à l'insuline, de moduler les voies métaboliques dans divers tissus, ou encore de limiter l'inflammation et le stress oxydatif dans diverses pathologies [548,549] – des mécanismes également impliqués dans la sarcopénie.

À titre d'exemple, deux probiotiques différents (*Lactocaseibacillus casei* LC122 ou *Bifidobacterium longum* BL986) ont été testés sur des souris de 10 mois (c'est-à-dire des jeunes adultes) pendant 12 semaines [473]. Les deux souches probiotiques ont augmenté la masse des muscles squelettiques et la force de préhension des rongeurs comparativement à des témoins du même âge. Par ailleurs, il est intéressant de noter que ces bactéries semblaient agir sur des voies cellulaires différentes ; *L. casei* a montré un potentiel antioxydant (augmentation des activités superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPx) dans le muscle et l'intestin) tandis que *B. longum* présentait des propriétés anti-inflammatoires (diminution des niveaux de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 $\beta$  dans le muscle et le côlon) [473]. Mais les probiotiques sont-ils également capables d'être efficaces dans des situations de perte musculaire liée à l'âge (sarcopénie) ? Les concepts développés dans la suite de cette dernière partie de thèse pourront être approfondis par la lecture de ma revue de synthèse (Annexe 1).



## 1- Études chez le rongeur âgé

L'âge des rongeurs est un critère fondamental à prendre en compte lorsqu'on s'intéresse à la sarcopénie [550]. Chez les rats, la perte de masse musculaire commence généralement entre 16 et 18 mois, et devient significative entre 18 et 21 mois selon les souches de rats et les études [551–555]. Tout rat adulte qui gagne encore de la masse maigre (jusqu'à 12 mois) ne peut donc pas être considéré comme l'équivalent d'un individu humain âgé, mais comme un adulte d'âge moyen. En gardant ces considérations à l'esprit, plusieurs études ont examiné les effets d'une supplémentation en probiotiques de durée variable (de plusieurs semaines à la vie entière) chez des rongeurs modèles de sarcopénie (Tableau 10).

Varian *et al.* ont testé l'effet d'une supplémentation avec la souche *Limosilactobacillus reuteri* ATCC-PTA-6475 sur les caractéristiques musculaires et la longévité de souris âgées de 8 semaines [556]. La masse des muscles, la taille des fibres musculaires et la survie des animaux ont été augmentées après le traitement probiotique lorsqu'il a été ingéré sur une longue période de 8 mois [556]. Il est à noter que la souche de souris utilisée dans cette étude était la souche CD1 qui se caractérise par une faible espérance de vie par rapport à des souches plus communément utilisées. En effet, tous les animaux CD1 de l'étude sont morts entre 500 et 600 jours de vie, soit entre 16 et 20 mois [556]. Cependant, cet effet a été retrouvé dans d'autres souches murines moins spécifiques (Balb/c) et avec une durée de supplémentation en probiotique *Lactiplantibacillus plantarum* HY7715 de seulement 5 semaines [557]. Des modèles de vieillissement accéléré ont également été utilisés pour démontrer l'impact des suppléments de probiotiques. C'est le cas de la souris sénescence accélérée prone-8 (SAMP8) et du vieillissement induit par le D-galactose. Une supplémentation de 12 semaines avec *Lacticaseibacillus paracasei* PS23 a été réalisée chez des souris SAMP8 âgées de 26 semaines et a conduit à une augmentation de la masse maigre et à une restauration de la force musculaire (force de préhension) au même niveau que les souris SAMP8 de 16 semaines [558]. Ces résultats ont été associés à une amélioration du taux de consommation d'oxygène dans le muscle et de la biogénèse mitochondriale. En parallèle, la teneur en carbonyle des protéines musculaires, un marqueur du stress oxydatif, était plus faible et l'expression des enzymes antioxydantes SOD et GPx dans les muscles était plus élevée chez les animaux

supplémentés par rapport aux témoins [558]. Le statut inflammatoire a également été amélioré par une diminution de la balance pro-inflammatoire/anti-inflammatoire dans le plasma et les muscles (augmentation des niveaux et de l'expression de l'IL-10 et diminution des cytokines pro-inflammatoires). Des résultats similaires sur l'état inflammatoire, les capacités antioxydantes et la force musculaire ont été mis en évidence chez des souris SAMP8 supplémentées en *Lacticaseibacillus casei* Shirota pendant 12 semaines [559] et en *L. paracasei* GKS6 ou *Bifidobacterium lactis* GKK2 pendant 14 semaines [560]. Dans un modèle de vieillissement prématuré induit par le D-galactose chez des rats Sprague-Dawley, Hor *et al.* ont montré que le traitement avec différentes souches de bactéries lactiques (*Limosilactobacillus fermentum* DR9, *L. paracasei* OFS 0291, ou *Lactobacillus helveticus* OFS 1515) pendant 12 semaines entraînait une augmentation de la performance après un test d'épuisement sur tapis roulant par rapport aux rats non traités [561]. La force et l'endurance des rongeurs âgés supplémentés avec chaque probiotique ont été augmentées à un niveau relativement similaire à celui des jeunes rats sans traitement au D-galactose. Ceci s'explique par une diminution des marqueurs de sénescence (protéine p53 impliquée dans l'induction de l'apoptose), une augmentation des facteurs anaboliques (IGF-1) dans les muscles et les os, et une amélioration du statut inflammatoire. Il est intéressant de noter que, là-encore, les souches testées ne ciblaient pas les mêmes voies de signalisation intracellulaires musculaires : état d'oxydation, activité de l'AMPK, facteurs myogéniques [561].

*Dans l'ensemble, les données obtenues après la supplémentation de probiotiques dans des modèles animaux soumis à des états cataboliques montrent que l'effet est nul ou anabolique sur la masse et la fonction musculaires.* Un effet anti-inflammatoire est généralement observé, probablement dû à une restauration de la perméabilité intestinale et à l'augmentation de la régulation de la voie NF- $\kappa$ B au niveau de l'intestin puis de l'ensemble du corps et des muscles [562]. Les cibles musculaires sont nombreuses et pourraient différer selon les souches : stimulation de facteurs anaboliques comme l'IGF-1, stimulation de facteurs myogéniques ou de la voie mTOR, régulation du statut énergétique dans le muscle (*via* AMPK), et inhibition de la protéolyse ou du statut oxydatif [92]. Finalement, les probiotiques utilisés sont généralement des bactéries lactiques (*Limosilactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactobacillus*) ou des Bifidobactéries ce qui n'est pas surprenant puisque ces groupes bactériens représentent à eux deux plus de 80 % de l'ensemble des probiotiques commercialisés en France [532].

Tableau 10. Études investiguant les effets de souches probiotiques sur la masse et la fonction musculaires de modèles rongeurs de sarcopénie.

Références	Modèles et âges	Souches probiotiques	Dosages	Résultats
Varian <i>et al.</i> , 2016 [556]	Souris CD-1 (de 8 semaines à 10 mois)	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC-PTA-6475	10 mois (10 <sup>5</sup> CFU/jour)	↑ masse musculaire et taille des fibres ↑ hormone de croissance ↑ taux de survie
Hor <i>et al.</i> , 2019 [561]	Rats Sprague-Dawley + D-galactose	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> DR9 OU <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> OFS 0291	12 semaines (10 <sup>10</sup> CFU/jour)	↑ running time, speed, work and power (treadmill exhaustion test) ↑ expression de p53 dans le muscle (gastrocnémien)
Chen <i>et al.</i> , 2019 [558]	Souris SAMP8 (7 mois)	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> PS23	12 semaines (10 <sup>9</sup> CFU/jour)	↑ masse maigre ↑ force de préhension ↑ digestibilité des protéines ↓ stress oxydatif (protéines carbonylées) ↑ SOD and GPx (muscles)
Ni <i>et al.</i> , 2019 [473]	Souris C57BL/6 (10 mois) /!\ souris adultes et non âgées	<i>Lacticaseibacillus casei</i> LC122 OU <i>Bifidobacterium longum</i> BL986	12 semaines (10 <sup>9</sup> CFU/jour)	↑ masse musculaire (quadriceps et gastrocnémien) ↑ force de préhension ↑ barrière intestinale (production de mucus, claudin-1 et ZO-1) ↓ inflammation dans le muscle (↓ TNF-α, IL-6, IL-1β) Bifidobacterium ++ ↑ capacités antioxydantes dans le muscle (SOD et GPx) Lactobacillus ++
Chen <i>et al.</i> , 2021 [559]	Souris SAMP8 (7 mois)	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	12 semaines (10 <sup>8</sup> or 10 <sup>9</sup> CFU/jour)	↑ masse musculaire (DEXA) ↓ score de sénescence ↑ force musculaire ↑ fonction mitochondriale (gènes de biogenèse mitochondrial, contenu en ADNmt) ↑ capacités antioxydantes dans le muscle (↓ protéines carbonylées) ↓ inflammation dans le muscle (↓ TNF-α, ↑ IL-10) ↑ AGCC vs. témoins âgés (acétate, butyrate et isobutyrate)
Lin <i>et al.</i> , 2021 [560]	Souris SAMP8 (âge?)	<i>Lactobacillus paracasei</i> GKS6 OU <i>Bifidobacterium lactis</i> GKK2	14 semaine (5.0 × 10 <sup>9</sup> CFU/kg/jour)	Masse musculaire non précisée, pas d'effet ? (Aucun effet sur tous les autres organes) ↓ score de sénescence ↑ force musculaire (pour les mâles seulement) ↑ nombre de fibres musculaires, Bifidobacterium seulement ↑ capacités antioxydantes dans le muscle (SOD et catalase)
Lee <i>et al.</i> , 2021 [557]	Souris Balb/c (20 mois)	<i>Lactobacillus plantarum</i> HY7715	5 semaines (10 <sup>8</sup> CFU/kg/jour)	↑ masse musculaire (gastrocnémien et soléus) ↑ force musculaire ↓ paramètres relatifs à la fatigue musculaire : BUN plasmatique, créatinine et lactate ↑ expression dans le muscle de MyoD et MYH1 ↓ expression dans le muscle de Atrogin-1 et MuRF-1

## 2- Études chez l'humain âgé

Bien que potentiellement prometteur [563], l'impact des probiotiques sur la fonction musculaire des patients âgés reste peu investigué. La grande majorité des études utilisant des probiotiques chez l'âge a ciblé la santé digestive et l'immunomodulation et concernaient principalement les Bifidobactéries et les bactéries lactiques ou un mélange de différentes souches (par ex., mélange VSL#3) [564].

La supplémentation en probiotiques chez des sujets âgés a entraîné, dans certains cas, des modifications bénéfiques du microbiote intestinal (diminution des pathogènes) mais avec des effets relativement mineurs sur l'état de santé général [565,566]. Les principaux effets étaient : une légère augmentation du confort intestinal et une réduction de la constipation [567], mais pas toujours [568]. Quelques études ont également rapporté de légers effets positifs sur l'augmentation de l'immunité innée (augmentation de la cytotoxicité des cellules NK96 [569] et amélioration de la cytotoxicité des cellules NK [570]). Le manque d'effet significatif ou l'incohérence des résultats observés peuvent être expliqués par la grande hétérogénéité de cette population en termes d'état de santé, dépendance (**voir chapitre 2**), et habitudes de vie, tous ces paramètres affectant la réponse de l'hôte au probiotique et, enfin, la pertinence, spécificité ou variabilité des paramètres utilisés pour évaluer l'état immunitaire ou de santé [92].

À ma connaissance, une seule étude a mesuré directement la masse et la fonction musculaires de patients âgés supplémentés en probiotiques. Dans cette étude récente de Lee *et al.*, 25 personnes de 75 à 80 ans ont été supplémentées en *Lactiplantibacillus plantarum* TWK10 à deux concentrations différentes ( $2.10^{10}$  ou  $6.10^{10}$  CFU/jour) et comparées à un groupe placebo [571]. Après 18 mois de traitement, les sujets ayant reçu la plus forte dose du probiotique ont montré une augmentation significative de leur force de préhension, de leur masse musculaire et de leur performance (équilibre, vitesse de marche, lever de chaise) par rapport aux témoins [571].

*Au regard de ces résultats, cibler le microbiote intestinal pour limiter le développement de la sarcopénie chez la personne âgée semble être pertinent et prometteur. Toutefois, d'autres études de plus grande envergure sont évidemment nécessaires.*

D'autres cibles pour lesquelles les effets des probiotiques sur les muscles peuvent être investiguées sont les patients cachectiques (la cachexie étant la fonte musculaire associée à un état inflammatoire et à une dénutrition sévère, fréquente dans les cancers) ainsi que les athlètes amateurs ou professionnels ([Annexe 1](#)).

## **D) Autres stratégies ciblant le microbiote pour lutter contre la sarcopénie**

En plus des probiotiques, d'autres stratégies qui ciblent les communautés microbiennes de l'intestin pourraient être intéressantes pour prévenir et/ou traiter de nombreuses maladies, dont la sarcopénie. Parmi ces stratégies, nous discuterons des prébiotiques, des synbiotiques et des postbiotiques.

### **1- Descriptions des pré-, syn- et postbiotiques**

Les **prébiotiques** sont définis comme des « *substrats qui stimulent de manière sélective la croissance ou l'activité des micro-organismes commensaux de l'intestin, conférant ainsi un ou plusieurs avantages pour la santé de l'hôte* » [572]. Les fibres alimentaires sont séparées en deux catégories principales : les fibres solubles (oligosaccharides, inuline,  $\beta$ -glucanes, pectines) et les fibres insolubles (cellulose, lignines). À noter que plus les fibres sont solubles, et plus elles pourront être fermentées par le microbiote intestinal et aboutir à la production d'AGCC (acétate, propionate et butyrate). Les prébiotiques sont généralement des fibres alimentaires fermentescibles, et les plus couramment décrits sont les fructo-oligosaccharides (FOS, dont l'inuline) présents dans les légumes (artichauts, asperges, oignons) et certaines céréales (blé, orge) ainsi que les galacto-oligosaccharides (GOS) plutôt retrouvés dans les produits laitiers fermentés et les légumineuses (lentilles, pois chiches, haricots). Certaines de ces fibres, qualifiées de fonctionnelles, peuvent être extraites ou synthétisées et être ajoutées dans des aliments (pains, sauces, yaourts) en tant qu'additifs par les industries agro-alimentaires ou être commercialisées comme compléments alimentaires.

Les **synbiotiques** sont définis par l'ISAPP (International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics) comme un « *mélange comprenant des micro-organismes vivants et un ou des substrats utilisés de manière sélective par les micro-organismes de l'hôte, qui confère un avantage sur la santé de l'hôte* » [573]. À noter que le préfixe d'origine grecque *syn* signifie « ensemble » et ne se réfère pas à la notion de synergie. Par ailleurs, le terme « synbiotique » ne doit pas être confondu avec « symbiotique » qui décrit une relation de symbiose entre un symbiote et son hôte. Dans le cadre de cette définition, « les micro-organismes de l'hôte » comprennent à la fois les micro-organismes autochtones (résidents ou colonisant l'hôte) et allochtones (extérieurs, comme les probiotiques), qui peuvent tous être des cibles pour le substrat contenu dans le synbiotique. Ainsi, deux sous-ensembles de synbiotiques sont à différencier : les complémentaires et les synergiques (Figure 26). Dans un « synbiotique synergique », le substrat est conçu pour être utilisé sélectivement par le(s) micro-organisme(s) co-administré(s). En plus de présenter cette propriété, le prébiotique et le(s) probiotique(s) constituant le « synbiotique complémentaire » doivent cibler chacun, de manière indépendante, les micro-organismes autochtones de l'hôte.

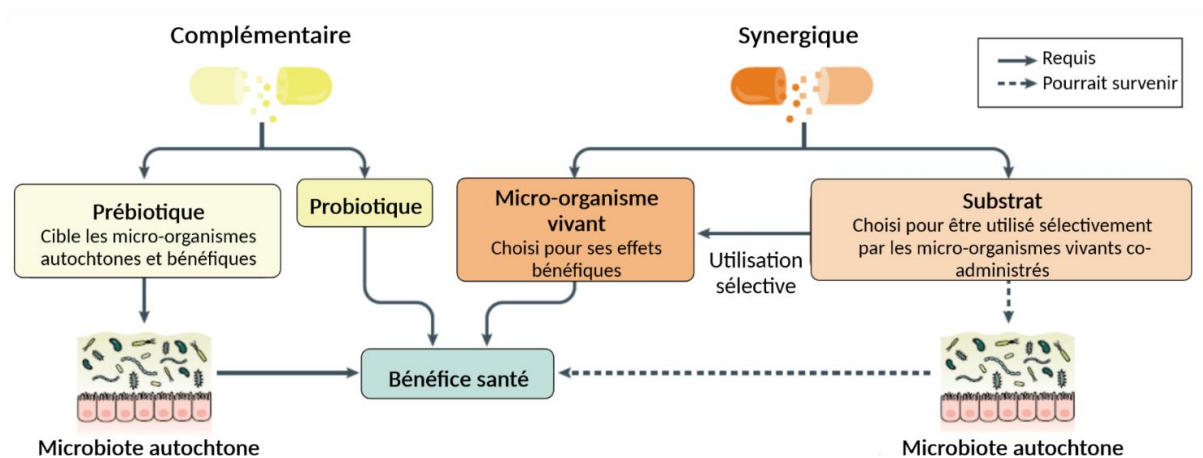


Figure 26. Conception et mécanismes d'action des synbiotiques complémentaires et synergiques. D'après Swanson et al., 2020 [573].

Les **postbiotiques** ont récemment été redéfinis par l'ISAPP en 2021. Un postbiotique correspond alors à une « *préparation de micro-organismes inanimés et/ou de leurs composants qui confère un avantage pour la santé de l'hôte* » [536]. Les postbiotiques comprennent donc les cellules microbiennes délibérément inactivées (bactéries tuées ou lysats bactériens) avec ou sans métabolites ou composants cellulaires. Par contre, les métabolites microbiens tels que les AGCC ou

exopolysaccharides purifiés et sans les composants cellulaires, ne sont pas considérés comme des postbiotiques selon ce consensus international – contrairement à ce qui peut être fréquemment dit dans la littérature. À noter que les postbiotiques peuvent partager certains mécanismes avec leurs homologues probiotiques vivants [415]. Ils permettraient ainsi de faciliter l'utilisation et la commercialisation des espèces les plus prometteuses mais absentes des listes positives de sécurité (GRAS, QPS). De cette manière, *Akkermansia muciniphila* Muc<sup>T</sup> devient la première bactérie probiotique de nouvelle génération à être autorisée sur le marché par l'EFSA en tant que complément alimentaire mais seulement lorsqu'elle est pasteurisée.

(<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6780>)

## 2- Études de la supplémentation sur le maintien de la fonction musculaire

Très peu d'études ont été réalisées chez le rongeur et l'humain âgés dans l'optique de démontrer les effets d'une supplémentation en prébiotiques ou en synbiotiques sur la fonction des muscles squelettiques (Tableau 11). Chez l'animal, divers prébiotiques (inuline, poly-oligosaccharides) ont été testés sur des souris cancéreuses mais n'ayant pas développé de cachexie [574,575]. L'effet des prébiotiques sur la fonte musculaire n'a donc pas pu être estimé [576]. Deux études récentes menées sur de jeunes souris ont démontré les effets antioxydant (ex., activité de l'enzyme superoxyde dismutase) et anti-fatigue (ex., endurance) de prébiotiques encore peu utilisés : le glucomannane [577] et l'acide hyaluronique [578]. De plus, la consommation de kimchi supplémenté (*Leuconostoc mesenteroides* et *Lactiplantibacillus plantarum*) – alors considéré comme un synbiotique dans l'étude – a préservé la masse des muscles et réduit l'expression des protéines musculaires Atrogin-1 et MuRF-1 dans un autre modèle rongeur de cachexie cancéreuse [579]. La problématique de cette étude est que le kimchi n'est pas un synbiotique conventionnel ; c'est un aliment riche en fibres fermentescibles mais les prébiotiques présents (composition, quantité) ne sont à priori pas connus.

La première étude chez l'Homme à évoquer, réalisée chez des patients âgés fragiles, a montré qu'un mélange de prébiotiques (FOS et inuline) améliorait significativement la force et la fatigue – deux critères diagnostics de la fragilité physique – et réduisait significativement l'indice de fragilité après 13 semaines de supplémentation [580,581]. Plus récemment, une seconde étude clinique

(mais sur seulement 6 personnes âgées) a démontré que la supplémentation en 1-kestose pendant 12 semaines augmentait la masse musculaire et pouvait ainsi réduire la sarcopénie [582]. Comme dernier exemple, nous pouvons citer l'étude de Brahe *et al.* dans laquelle la consommation de mucilage de graines de lin (très riches en polysaccharides) pendant 6 semaines a permis de réduire la résistance à l'insuline (OGTT, peptide-C, indice Matsuda) chez des femmes en surpoids âgées de 58 à 62 ans [583]. Pour rappel, l'insulino-résistance étant un fort prédicteur d'une faible fonction musculaire (indépendamment du diabète), améliorer la sensibilité des organes à cette hormone pourrait ralentir le développement de la sarcopénie au cours du vieillissement [584] (voir chapitre 1-III).

La seule étude de supplémentation en synbiotique chez l'humain dont les résultats ont été publiés n'a pas mis en évidence d'effet significativement bénéfique de l'intervention sur la composition corporelle et la force musculaire de patients âgés à risque de fragilité [585]. Les auteurs de cette étude, menée en 2010 et ne comptant que 17 sujets, précisent néanmoins que le synbiotique a permis de protéger les individus de la déshydratation, ce qui pourrait être protecteur pour la masse maigre mais à plus long-terme [585].

À ma connaissance, la souche heat-killed *Bifidobacterium breve* B-3 (un postbiotique) est la seule bactérie qui a été testée morte sur les aspects musculaires des rongeurs [586]. Ce postbiotique a permis d'améliorer la force musculaire des souris après 28 jours, en promouvant l'hypertrophie musculaire (*via* les voies de signalisation Akt/mTOR et AMPK). Un métabolite bactérien, l'urolithine A – considéré par les auteurs comme un postbiotique, a également été testé et a permis d'augmenter la force musculaire de personnes sédentaires en surpoids [587].

*Comme pour les probiotiques, nous disposons actuellement de très peu de données sur l'efficacité des pré- ou synbiotiques sur la fonction des muscles et la grande majorité des études sont très récentes. Un certain nombre d'essais cliniques est d'ailleurs en cours. Parmi eux, trois études ont pour objectif de déterminer les effets d'un prébiotique (inuline) ou d'un synbiotique (FOS et mélanges de souches probiotiques) sur la composition corporelle et la performance physique d'adultes obèses dont la mobilité est altérée [588,589] ou de patients cachectiques [590]. Des travaux supplémentaires permettraient de conforter les premiers résultats quant à l'efficacité réelle de ces nouveaux « -biotiques » à limiter la sarcopénie et/ou la fragilité chez l'âgé.*



Tableau 11. Études investiguant les effets de pré-, syn- et postbiotiques sur la fonction musculaire et les performances physiques.

	Modèles	Interventions	Effets majeurs des interventions	Références
Prébiotiques	Souris BALB/c âgées de 8 semaines N = 12	Acide hyaluronique (gavage, 50 mg/kg/j) pendant 15 jours	↓ fatigue (↑ durée et ↓ chutes sur rotarod) ↑ activité SOD (muscle)	Huang <i>et al.</i> , 2022 [578]
	Souris Kunming âgées de 7 semaines N = 88	Konjac glucomannane (eau de boisson, 2 g/kg/j) pendant 35 jours	↑ AGCC caeaux ↓ fatigue, ↑ durée de nage ↑ activité SOD et GSH-Px	Zeng <i>et al.</i> , 2018 [577]
	Personnes âgées fragiles (75 ± 7 ans) N = 50	FOS (3488 mg/j) + inuline (3375 mg/j) pendant 13 sem.	↑ force musculaire ↓ fatigue ↓ indices de fragilité	Buigues <i>et al.</i> , 2016 [580] Theou <i>et al.</i> , 2019 [581]
	Personnes âgées sarcopéniques (90 ± 5 ans) N = 6	1-kétose 10 g/jour pendant 12 sem.	↑ index de masse musculaire (SMI)	Tominaga <i>et al.</i> , 2021 [582]
	Adultes IMC > 30 + ostéo-arthrite (30-75 ans) N = 60	Inuline (16 g/j) pendant 6 mois	<i>Étude en cours</i> : effet du prébiotique sur la qualité de vie, la compo. corporelle, la performance physique et le statut inflammatoire ?	Fortuna <i>et al.</i> , 2022 [588]
Synbiotiques	Souris BALB/c + carcinome du côlon (C26) âgées de 6 semaines N = 30	Kimchi + <i>L. mesenteroides</i> CJ LM119 et <i>L. plantarum</i> CJ LP133 pendant 3 sem. Témoins : kimchi « normal »	↑ masse musculaire des pattes ↓ taille des tumeurs ↓ expression Atrogin-1 et MuRF-1 ↓ inflammation (IL-6 plasmatique, NF-κB musculaire)	An <i>et al.</i> , 2019 [579]
	Personnes âgées avec une faible force musculaire (68 ± 4 ans) N = 17	FOS (6 g/j) + 10 <sup>8-9</sup> CFU/j <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>B. lactis</i> pendant 3 mois	Pas d'effet sur la composition corporelle, ni sur le profil inflammatoire (IL-6, TNF-α)	Valentini Neto <i>et al.</i> , 2013 [585]
	Femmes adultes IMC ≥ 25 (40-55 ans) N = 88	FOS (38,5 mg/j) + 10 <sup>8-9</sup> CFU/j <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> pendant 8 sem.	<i>Étude en cours</i> : effet du synbiotique sur la sarcopénie (force musculaire, compo. corporelle, performance physique) ?	Jamshidi <i>et al.</i> , 2022 [589]
	Patients en soins intensifs (18-65 ans) N = 40	FOS + 10 <sup>9-10</sup> CFU/j <i>B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>S. thermophilus</i> pendant 14 jours	<i>Étude en cours</i> : effet du synbiotique sur l'homéostasie énergétique, la fonte musculaire et la cachexie ?	Seifi <i>et al.</i> , 2020 [590]
Postbiotiques	Souris C57BL/6J âgées de 8 semaines + Rats Sprague-Dawley N = 50	Heat-killed <i>B. breve</i> B-3 (10 <sup>9</sup> CFU/j) pendant 4 sem.	↑ masse et force musculaires ↑ p-Akt, p-S6K, p-AMPK, PGC-1α (muscle)	Toda <i>et al.</i> , 2020 [586]
	Adultes sédentaires en surpoids (50-60 ans) N = 253	Urolithine A (500 ou 1 000 mg/j) pendant 4 mois	↑ performance physique (VO <sub>2</sub> max, 6 min walk test) ↑ fonction mitochondriale et ↓ inflammation (CRP)	Singh <i>et al.</i> , 2022 [587]

*Les changements du microbiote intestinal qui apparaissent avec l'âge semblent modifier le métabolisme et la fonction des muscles squelettiques. Cette relation est principalement médiée par l'altération de la perméabilité intestinale en lien avec une modulation de l'inflammation ainsi que par la production d'AGCC et autres métabolites bénéfiques ou néfastes. Certains métabolites bénéfiques sont capables, en plus d'exercer une action anti-inflammatoire au niveau de l'intestin, de moduler les réponses métaboliques de l'hôte au niveau de différents organes, dont les muscles squelettiques. Les AGCC pourraient augmenter la sensibilité à l'insuline, le débit sanguin, et préserver un phénotype oxydatif dans les muscles. Ainsi, la supplémentation en probiotiques pourrait être une stratégie intéressante pour prévenir la fonte musculaire chez la personne âgée en modulant ce dialogue intestin-muscle. Les probiotiques capables de limiter la perte de masse musculaire et d'améliorer les performances physiques chez les rongeurs âgés sont principalement des bactéries lactiques et des Bifidobactéries. Chez l'Homme (jeune, en général), les mêmes bactéries ont été testées, mais la rareté des études et la difficulté de mesurer avec précision et de manière reproductible la masse ou la fonction musculaire n'ont pas permis de mettre en évidence de manière claire des souches spécifiques capables d'optimiser ces paramètres. Les prébiotiques sont une autre approche ciblant le microbiote intestinal qui pourrait être complémentaire aux probiotiques (et constituer un synbiotique) mais trop peu de données sont actuellement disponibles à ce sujet. En effet, améliorer la fonction musculaire à l'aide de ces stratégies « -biotiques » est un domaine de recherche nouveau et en plein essor auquel ce travail de thèse pourra contribuer.*

**PARTIE 2 :**  
**ÉTUDE EXPÉRIMENTALE**



# Chapitre 1. Contexte, objectifs et stratégies expérimentales du travail de recherche

---

## I- Contexte et objectif généraux du projet

Le vieillissement de la population est inéluctable mais l'état de santé des individus est hétérogène. Certaines personnes âgées demeurent actives et en bon état nutritionnel tandis que d'autres, du même âge, peuvent souffrir de dénutrition souvent associée à une sarcopénie, les rendant plus susceptibles de développer des pathologies liées à l'âge ou une dépendance. Ces individus, qualifiés de fragiles et représentant entre 12 et 44 % des personnes de 60 ans et plus de nos pays industrialisés [322], ont fait l'objet de mon travail de thèse. En effet, c'est une population qui ne présente pas de pathologies identifiées mais qui est susceptible d'en développer. Les personnes fragiles peuvent ainsi faire l'objet de stratégies de prévention, en particulier les stratégies nutritionnelles, qui permettront d'éviter ou de retarder l'apparition de la dépendance et les pathologies qui sont plus complexes à traiter. Quelques stratégies nutritionnelles (supplémentations protéiques) ou des programmes d'exercice physique ont été décrits pour diminuer l'impact de la sarcopénie et de la fragilité physique sur la qualité de vie des séniors. Mais ces approches ne sont pas toujours adaptées ou efficaces chez une population présentant souvent une perte d'appétit et des difficultés à se déplacer [355,563]. Tout l'enjeu de mon travail de thèse est donc de développer de nouvelles stratégies complémentaires ou alternatives aux existantes (*via* des approches multimodales) ciblant les sujets âgés fragiles et leurs spécificités.

Le choix de stratégies innovantes ciblant les personnes âgées fragiles s'est basé sur l'observation que le microbiote intestinal des personnes âgées est altéré par rapport aux adultes jeunes, d'autant plus chez les individus en mauvais état de santé (sarcopéniques, dénutris, fragiles) [421,427]. Il est en effet bien connu qu'un déséquilibre dans la composition et la fonctionnalité du microbiote intestinal pourrait être en partie causal de l'inflammation chronique et de la résistance à l'insuline, initialement observées chez les sujets obèses et diabétiques [591,592]. Ces caractéristiques physiologiques et métaboliques, retrouvées chez les individus âgés, peuvent créer un contexte

délétère capable de générer une altération de la fonction et de la masse du muscle squelettique. Plusieurs auteurs ont ainsi montré un lien potentiellement causal entre une altération du microbiote intestinal et la sarcopénie (« interaction microbiote-intestin-muscle ») [190,510,593]. Ce lien causal étant établi, moduler la composition du microbiote intestinal à l'aide de probiotiques devient un levier d'action pertinent pour limiter la sarcopénie chez les personnes âgées. Par ailleurs, une multitude de travaux ont démontré des effets bénéfiques de différentes souches probiotiques sur les paramètres d'inflammation et d'insulino-sensibilité chez le rongeur et l'humain [594] ([Annexe 1](#)).

*Pour développer un/des probiotiques ciblant le muscle des individus âgés fragiles, mon travail de thèse s'est donc déroulé en plusieurs étapes. Dans un premier temps, j'ai isolé, caractérisé puis identifié des bactéries probiotiques potentiellement capables d'optimiser le métabolisme énergétique-protéique (insulino-sensibilité) par des méthodologies in vitro et pré-in vivo. Puis, ce potentiel effet probiotique visant à limiter la fonte musculaire a été validé chez un modèle rongeur fragile (en sous-nutrition). Plusieurs souches se sont révélées intéressantes suite à la réalisation de ces étapes de caractérisation et leurs utilisations ont ensuite été protégées par des brevets. Enfin, j'ai réalisé les premiers essais d'incorporation de la souche la plus prometteuse dans un aliment fermenté. J'ai ainsi réalisé de nombreuses étapes nécessaires au développement de souches probiotiques visant à limiter la fonte musculaire chez l'âge ; depuis l'isolement jusqu'à la validation de l'effet biologique et l'incorporation dans un aliment. L'ensemble de mes résultats sera une base solide permettant la réalisation de la dernière étape du travail : la validation par un/des étude(s) clinique(s) des effets de ces probiotiques chez les sujets âgés fragiles.*

## II- Stratégies expérimentales

Une originalité importante de mon travail de thèse repose sur l'origine des souches potentiellement probiotiques qui ont été isolées. En effet, au lieu de rechercher les souches bactériennes dans des aliments fermentés, nous avons utilisé le microbiote fécal de patient atteint du syndrome du grêle court.

### A) Pourquoi utiliser le microbiote intestinal des patients ayant subi une résection intestinale ?

Le syndrome du grêle court (SGC) se manifeste lorsque l'intestin grêle ne peut plus assurer l'absorption normale des macro et micronutriments suite à une résection (ablation par chirurgie d'une partie de l'intestin) laissant en place moins de 200 centimètres d'intestin grêle [595–597]. L'incidence de cette maladie serait de 2 cas pour 1 million d'habitants par an, en Europe [597]. En France, les causes les plus fréquentes du SGC et de la résection chez les adultes sont l'infarctus mésentérique et la maladie de Crohn [598]. L'intestin grêle, formé par le duodénum, le jéjunum et l'iléon, est indispensable au processus de digestion car il permet l'absorption de 90 % des nutriments (polysaccharides, protéines, lipides et vitamines liposolubles) [599]. Une résection de l'intestin grêle entraîne ainsi, selon la longueur ou le site où l'ablation a été réalisée, une malabsorption de vitamines, de nutriments (glucides principalement) et d'oligo-éléments (fer, calcium). Ces défauts d'absorption vont s'accompagner de diarrhées, d'une déshydratation et d'une perte de poids qui vont constituer le phénotype clinique du SGC [600]. L'insuffisance intestinale est toutefois réversible et peut rester transitoire dans 50 % des cas puisque des mécanismes adaptatifs se mettent en place après un ou deux ans suivant l'opération. Ces adaptations permettent aux patients de suppléer à l'insuffisance intestinale et, *in fine*, de se sevrer spontanément de la nutrition parentérale [595,601] (Figure 27).

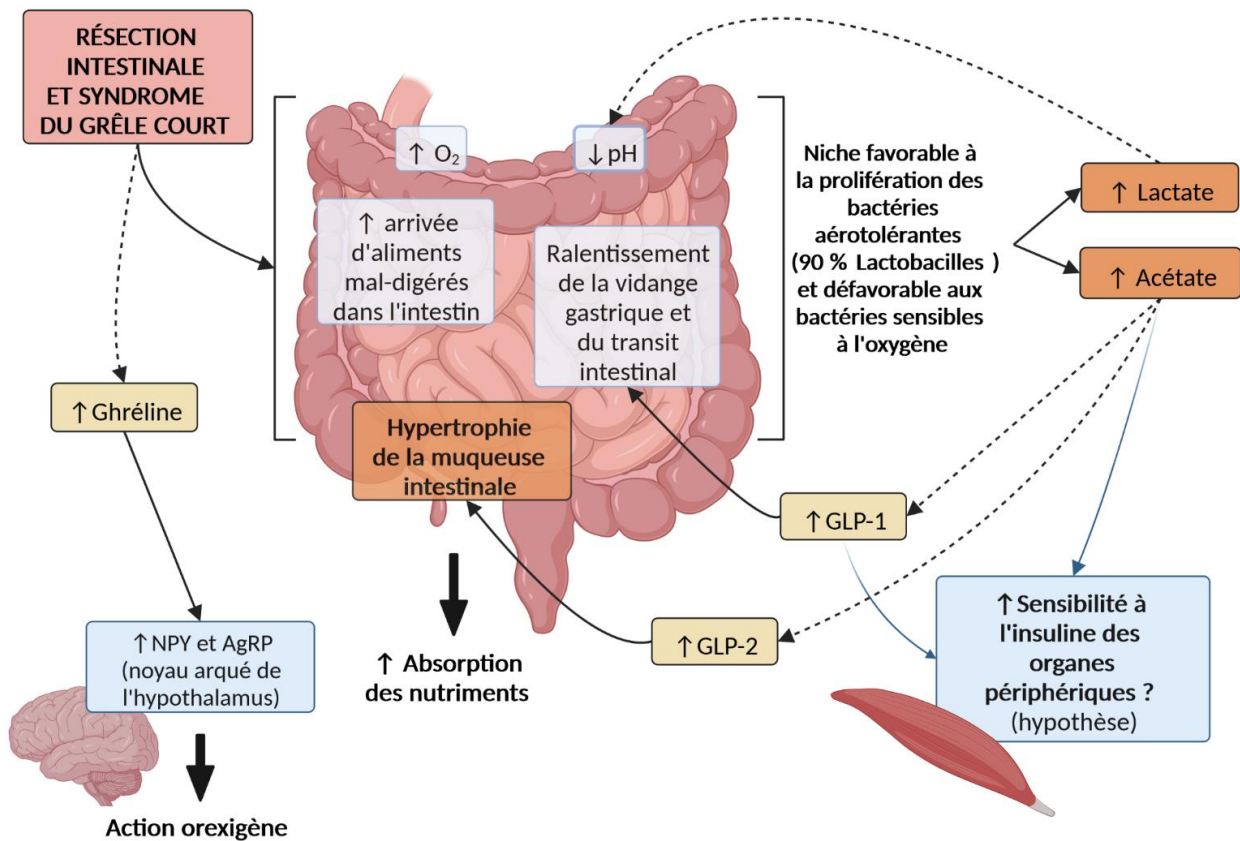


Figure 27. Schéma général représentant les différents mécanismes adaptatifs mis en place dans le syndrome du grêle court afin d'optimiser le métabolisme énergétique-azoté des patients. [600,602–605]

Les patients ainsi que les modèles animaux de SGC (ayant subi une résection de l'intestin grêle similaire à celle des patients) vont notamment présenter une adaptation de l'intestin et de ses capacités sécrétoires avec une élévation de sécrétion d'hormones gastro-intestinales (ghréline, GLP-1 et GLP-2), une hyperphagie et une augmentation de la surface d'absorption intestinale (hyperplasie des villosités). Par ailleurs, la composition du microbiote intestinal (mais pas la masse bactérienne totale) change considérablement ; les bactéries du genre *Clostridium* ou *Bacteroidetes* composant habituellement une grande partie du microbiote intestinal de l'adulte sont peu représentées et laissent place aux Lactobacilles, composant près de 90 % de l'écosystème intestinal, d'ailleurs parfois qualifié de « lactobiote » [602]. L'acidification, l'enrichissement en oxygène de la lumière intestinale, la rapidité du transit et l'arrivée importante d'aliments non digérés suite à la résection chirurgicale sont un terrain favorable à la croissance de ces bactéries lactiques [597]. Il a été montré que les individus SGC vont récupérer plus de 1 000 kilocalories chaque jour (avec une alimentation optimisée) au niveau colique, contre seulement 150 à 200 kilocalories chez les patients



sains [606]. Cette observation suppose que le lactobiotique est capable de fournir une quantité importante d'énergie aux patients.

La question qui a ensuite émergé de ces observations chez les patients SGC a donc été de savoir si le lactobiotique très spécifique pouvait jouer un rôle causal dans la phase d'adaptation physiologique et métabolique spontanée observées chez les patients SGC. L'étude de transfert du microbiote fécal d'un patient SGC à des rats axéniques menée par Gillard *et al.* a ainsi montré que les animaux inoculés présentaient une augmentation des hormones intestinales (ghréline, GLP-1) et de la leptine relativement aux rongeurs conventionnels. Puisque l'intestin des animaux receveurs était non résecué, ces résultats montrent que le lactobiotique peut envoyer des signaux inducteurs indépendamment de la résection [605]. Cette étude suggère donc que le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle causal dans le développement de certaines adaptations observées chez les patients SGC, et pourrait notamment être impliqué dans la capacité des animaux à réguler leur homéostasie métabolique comme suggéré par les augmentations de GLP-1 (régulant la sécrétion d'insuline et l'insulino sensibilité de certains tissus) ou de leptine (impliquée dans la régulation des réserves adipeuses).

*Au regard de ces résultats, les partenaires du projet (détails dans l'introduction générale du manuscrit) ont émis l'hypothèse que certaines bactéries du microbiote des patients SGC pourraient être intéressantes pour optimiser la récupération d'énergie à partir des aliments et finalement réduire la perte de masse musculaire chez le sujet âgé sous-alimenté pour lequel une optimisation de l'utilisation des nutriments est requise.*

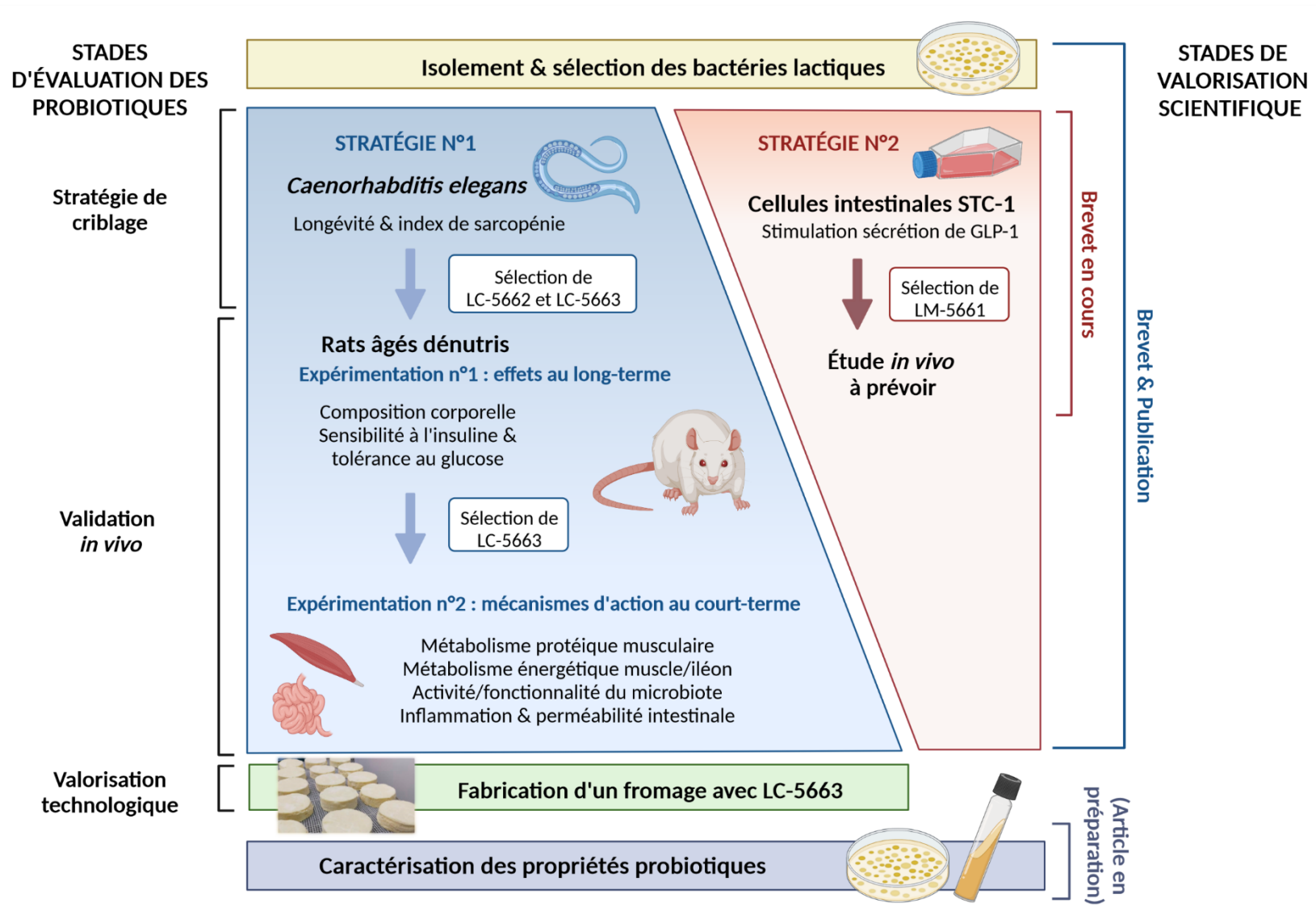


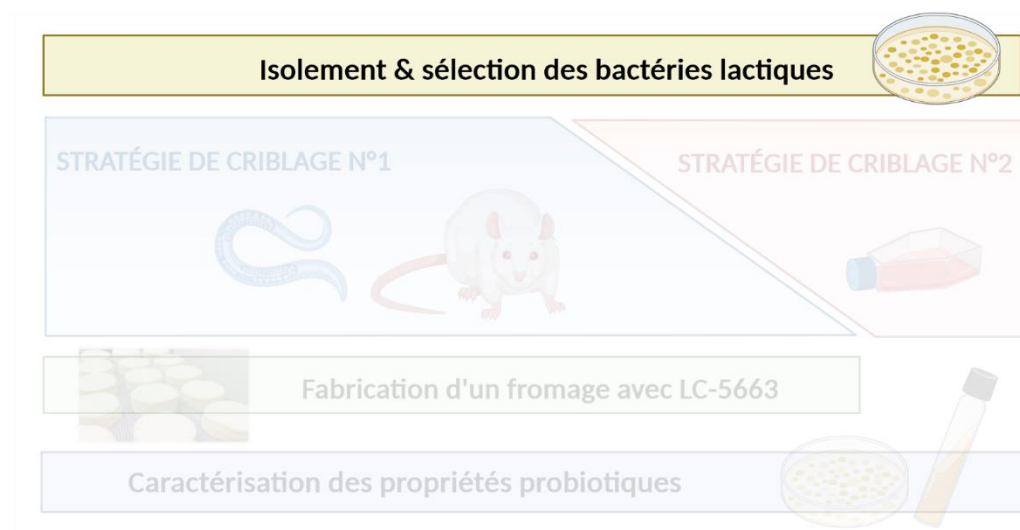
Figure 28. Démarche expérimentale globale du projet de recherche.

## B) Démarche expérimentale globale (Figure 28)

Notre démarche expérimentale a consisté en l'isolement, l'identification et la caractérisation de bactéries lactiques d'un échantillon fécal de rat inoculé avec le microbiote SGC. Ce travail antérieur à la thèse a porté sur le transfert de microbiote de patients SGC à des rats axéniques par l'équipe ProbiHôte (MICALIS), partenaire du projet de thèse ainsi que du service Gastro-entérologie et Assistance Nutritive de l'Hôpital Beaujon (Dr F. Joly) [605]. Puis, les fèces des rats inoculés avec les matières fécales de patients ont été utilisées comme sources de bactéries. Des représentants de chaque genres/espèces ont été criblés en utilisant deux modèles simples : (1) *Caenorhabditis elegans* (modèle *in vivo*) pour tester l'effet des souches sur la longévité et l'intégrité mitochondriale musculaire (index de sarcopénie chez le nématode) [stratégie de criblage n°1] et (2) des cellules intestinales SCT-1 (modèle *in vitro*) pour leur capacité à induire la sécrétion de GLP-1 [stratégie de criblage n°2]. Les meilleurs candidats ont ensuite été testés sur un modèle rongeur afin de valider leurs effets sur le métabolisme protéo-énergétique et la sensibilité à l'insuline. Il s'agit d'un modèle de rat âgé en sous-nutrition (mimant le phénotype fragile chez l'humain). Enfin, la possibilité d'intégration de la souche probiotique dans un produit laitier fermenté a été testée dans le cadre d'essais de fabrication de matrices laitières de type « fromage lactique ».

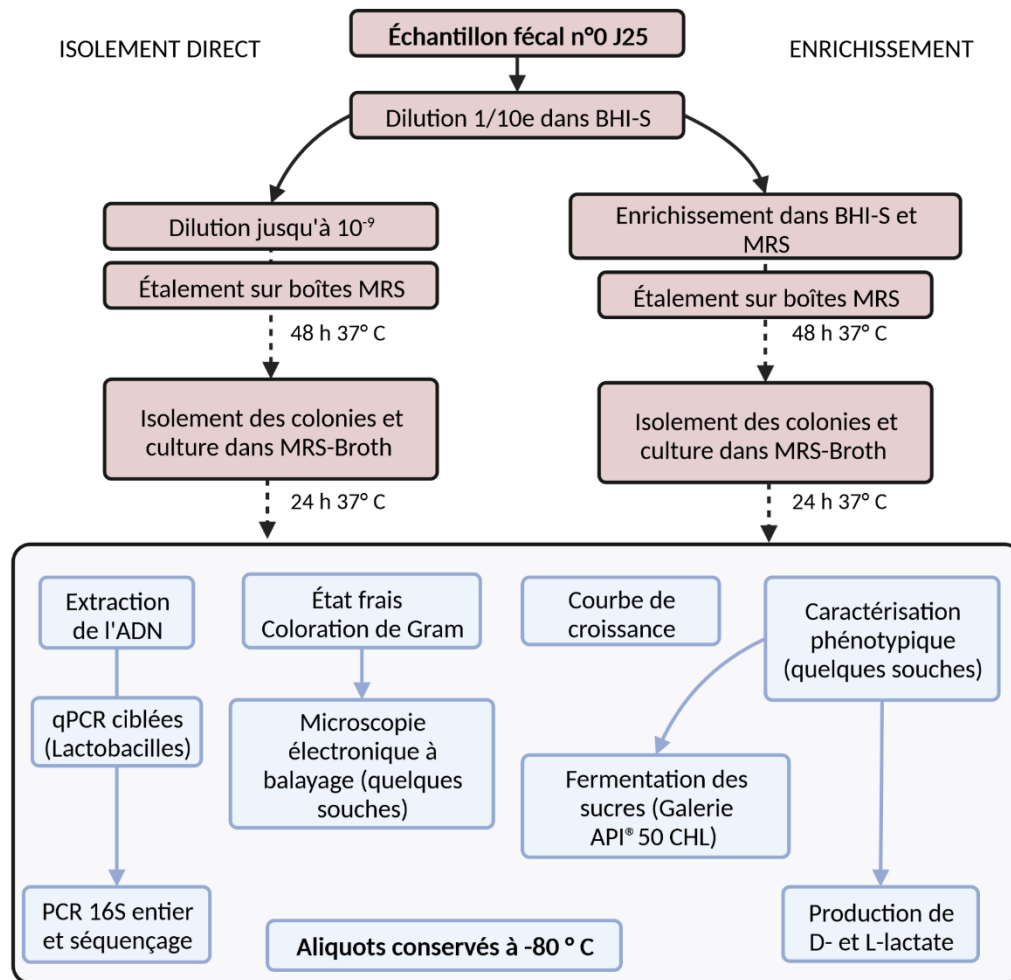


## Chapitre 2. Présentation des travaux de thèse



### I- Isolement des bactéries lactiques

L'étude de Gillard *et al.*, (2017) relative au transfert fécal du microbiote SGC, révèle que le microbiote des rongeurs receveurs s'est adapté en quelques jours et présente une composition proche de l'inoculum du départ (patient) et stable à partir du 3<sup>e</sup> jour et pendant 30 jours [605]. Pour notre projet, nous avons donc utilisé comme source de bactéries probiotiques l'échantillon fécal d'un rat inoculé depuis 25 jours (congelé à -80° C pendant deux ans). Cet échantillon a été dilué dans du milieu riche et non sélectif BHI-S (cœur-cervelle) puis deux approches ont été adoptées pour optimiser nos chances de récupérer des bactéries lactiques : (1) l'isolement direct sur boîte de Pétri MRS – milieu sélectif des bactéries lactiques – et (2) l'enrichissement préalable dans du bouillon MRS et BHI-S (Figure 29). L'isolement direct sur boîtes MRS a permis d'isoler des Lactobacilles plus rapidement mais en prenant le risque de sélectionner seulement les genres/espèces dominants. Au contraire, l'enrichissement préalable (d'autant plus dans un milieu non sélectif) permettait d'augmenter nos chances d'isoler les genres/espèces moins dominants et plus exigeants mais augmentait aussi le risque d'isoler d'autres types de micro-organismes que les bactéries lactiques ciblées (contaminants) et cette approche a nécessité une étape supplémentaire.



**Figure 29. Organigramme représentant les différentes étapes de manipulation réalisées sur l'échantillon fécal de rat n°0, collecté 25 jours après inoculation, dans le but d'isoler et de caractériser des bactéries lactiques.** Acronymes : BHI-S, brain heart infusion ; MRS, de Man Rogosa Sharpe ; CHL, Carbohydrates, Lactobacillus et apparentés.

Au total, plus de 60 isolats présentaient une forme bacillaire et un Gram positif (caractéristiques essentielles des bactéries lactiques) et ont été identifiés par qPCR ciblées (amorces spécifiques des Lactobacilles [607]) et séquençage de l'ADNr 16S entier. Une très grande majorité des isolats bactériens obtenus étaient du genre *Lacticaseibacillus rhamnosus* (> 50 % de l'ensemble des isolats) et les autres isolats étaient essentiellement du genre *Limosilactobacillus mucosae*, *Lacticaseibacillus camelliae*, *Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus reuteri* et *Ligilactobacillus salivarius* (Tableau 12). En pratique, l'approche d'enrichissement préalable dans le milieu non sélectif BHI-S s'est révélée peu pertinente puisqu'elle a permis d'isoler en grande majorité des bactéries *Escherichia*, un genre abondant dans les fèces mais que nous ne voulions pas cibler dans mon travail de thèse. L'étape d'enrichissement préalable dans le milieu MRS a, en revanche, permis d'isoler des espèces

de bactéries lactiques moins représentées dans l'échantillon et plus exigeantes telle que *Limosilactobacillus mucosae*.

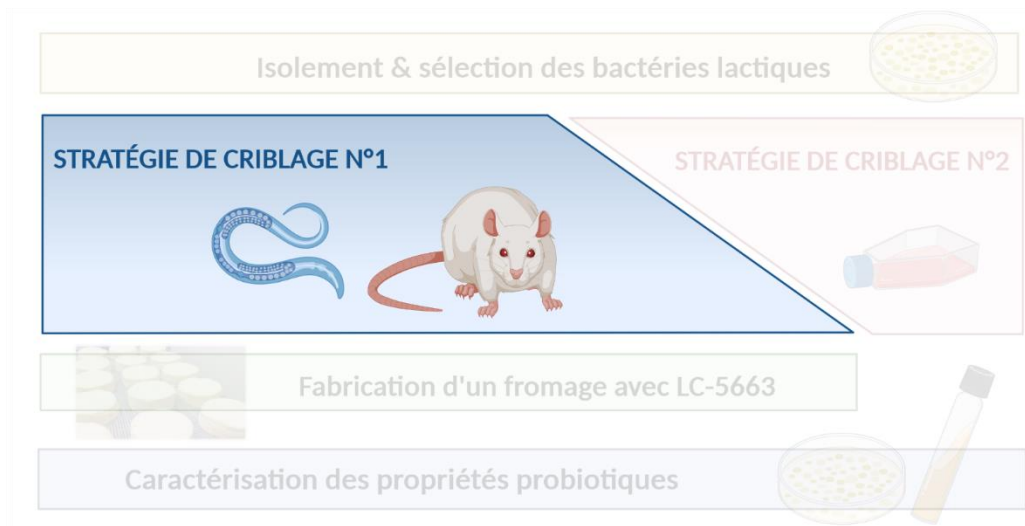
La diversité génétique à l'échelle de chaque espèce était très faible, voire nulle, avec des séquences 16S identiques, laissant penser qu'issue d'un unique volontaire, une même souche avait été isolée plusieurs fois pour chaque espèce. Pour la suite du travail de recherche, nous avons fait le choix de sélectionner les sept souches suivantes, avec au moins un représentant pour chaque genre et espèce isolés : LRh-36, LM-5661, LCam-05, LC-5662, LC-5663, LR-3a et LS-10 (Tableau 12).

**Tableau 12. Proportion des genres et espèces bactériens parmi les 60 isolats de l'échantillon fécal de rat, représentants sélectionnés et leurs principales caractéristiques morphologiques.**

Genres et espèces isolés	Proportions parmi les isolats	Représentants	Caractéristiques morphologiques
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	55 %	LRh-36	Colonies blanches opaques, 1 mm de diamètre, brillantes, lisses et bords nets (milieu MRS, 48h 37° C) Bacilles plutôt fins (2 µm de long et 0,5 µm de large) regroupés en chaînettes
<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	10 %	LM-5661	Petites colonies translucides, parfois entourées d'un halo irrégulier (milieu MRS, > 48h 37° C) Bacilles courts, trapus et polymorphes (1 à 1,5 µm de long) plutôt isolés
<i>Lacticaseibacillus camelliae</i>	10 %	LCam-05	Colonies blanches/translucides, ≤ 1 mm de diamètre, lisses et bords nets (milieu MRS, 48h 37° C) Bacilles courts (1 µm de long) et trapus regroupés en chaînettes ou en amas
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	5 %	LC-5662 et LC-5663	Colonies blanches opaques, entre 1 et 1,5 mm de diamètre, lisses et brillantes (milieu MRS, 48h 37° C) Bacilles courts (1 µm de long) et trapus généralement regroupés en chaînettes ou par deux
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	5 %	LR-3a	Colonies blanches/translucides, ≤ 1 mm de diamètre, lisses et bords nets (milieu MRS, 48h 37° C) Bacilles très courts et trapus (1 µm de long et 0,8 µm de large) regroupés en amas
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	5 %	LS-10	Colonies blanches/translucides, 1 mm de diamètre, lisses et bords nets (milieu MRS, 48h 37° C) Bacilles trapus (1 à 2 µm de long) généralement isolés
Autres ( <i>Escherichia</i> )	10 %	X	Ne rentrent pas dans le cadre de mon travail de thèse car nous recherchions des bactéries reconnues pour leur innocuité







## II- Stratégie de criblage n°1 : criblage *in vivo* sur *Caenorhabditis elegans* et validation de deux souches sélectionnées sur un modèle rongeur de fragilité

### A) *Caenorhabditis elegans*

#### 1- Généralités sur le modèle

Les sept bactéries candidates ont d'abord été criblées sur un premier modèle *in vivo* : le nématode *Caenorhabditis elegans*.

*Caenorhabditis elegans* est un invertébré multicellulaire vivant naturellement dans le sol, la végétation et les fruits en décomposition des régions tempérées où ils se nourrissent de micro-organismes. C'est à partir des années 1960 que cet animal devient un véritable modèle en biologie [608]. Ce petit ver d'un millimètre de long est un hermaphrodite (moins de 0,2 % de mâles) capable d'autofécondation et donc de produire une population de clones dépourvus de variabilité interindividuelle. Il dispose d'une durée de vie de deux à quatre semaines (en fonction des souches et des conditions d'élevage) et son développement embryonnaire est extrêmement rapide (environ trois jours) le rendant particulièrement pratique pour les études sur le vieillissement [609] (Figure 30). *C. elegans* est aussi facile d'entretien et peu onéreux puisqu'il est élevé sur des boîtes de Pétri gélosées ensemencées avec la souche de référence *E. coli* OP50. À noter que ce modèle, du fait d'un

système nerveux rudimentaire, ne fait pas partie de la liste des animaux soumis à une évaluation éthique pour son utilisation en expérimentation, contrairement aux modèles rongeurs par exemple. Enfin, le génome du nématode est entièrement séquencé et il existe une large panoplie de mutants (disponible sur CGC : *Caenorhabditis elegans* Genetics Center) permettant d'envisager des études mécanistiques approfondies pour évaluer des fonctions ou voies métaboliques spécifiques.

Concernant sa relevance en tant que modèle pour des études à visée humaine, près de 74 % des protéines humaines présentent un homologue chez cet animal, soulignant l'intérêt que les chercheurs portent à ce modèle pour la compréhension de la biologie des mammifères [610]. Certaines de ces ressemblances sont telles qu'elles ont donné lieu à des recherches chez le ver sur les maladies d'Alzheimer, de Parkinson [611], la sclérose latérale amyotrophique [612], ou encore la dystrophie de Duchenne [613].

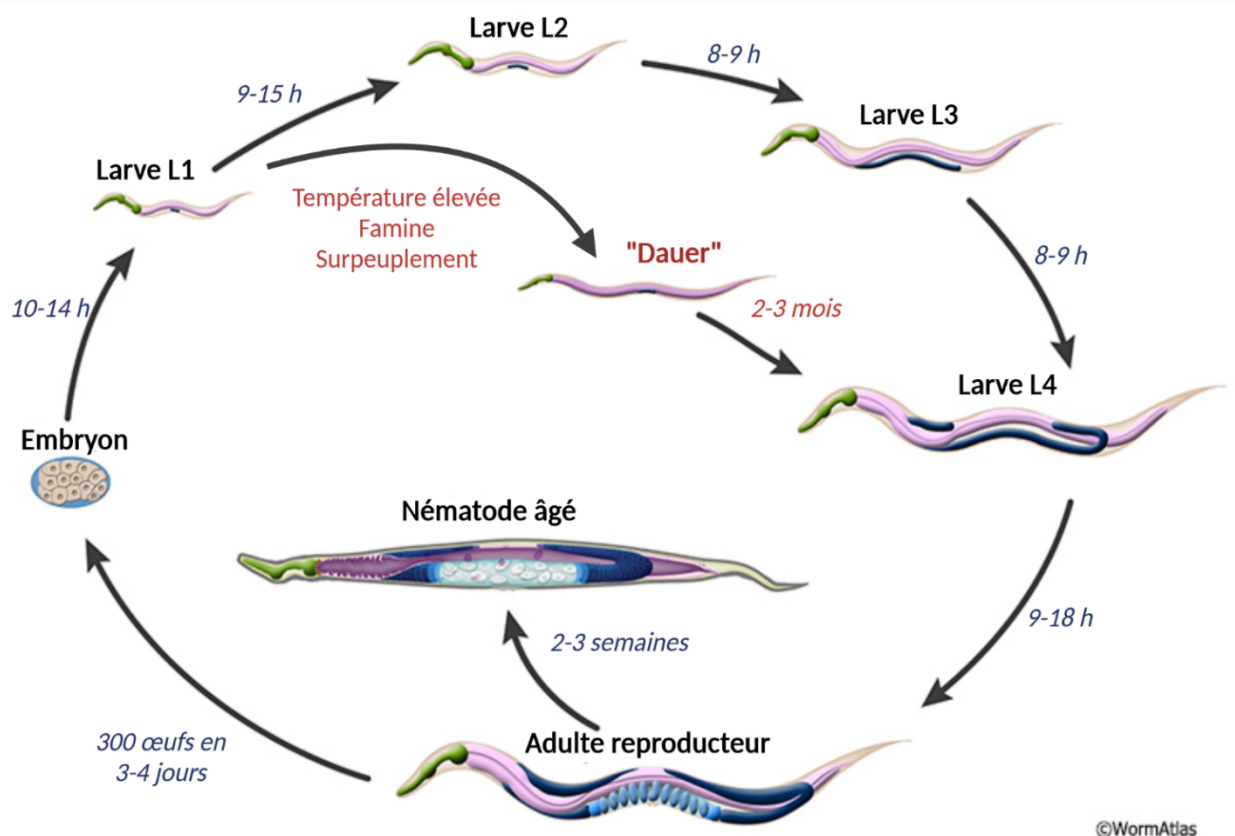


Figure 30. Cycle de vie hermaphrodite de *Caenorhabditis elegans* à 20 °C. [614]

## 2- Anatomie et physiologie

Ce nématode apparaît transparent au microscope et possède une anatomie relativement simple [608] qui permet de visualiser *in vivo*, et en évolution dans le temps, la localisation et le devenir des molécules ou micro-organismes colorés (fluorescents par exemple). Une coupe transversale du nématode montre son anatomie comme une intrication de tubes que sont : la cuticule protectrice, l'intestin, l'appareil reproducteur (gonades), les muscles et le système nerveux (Figure 31).

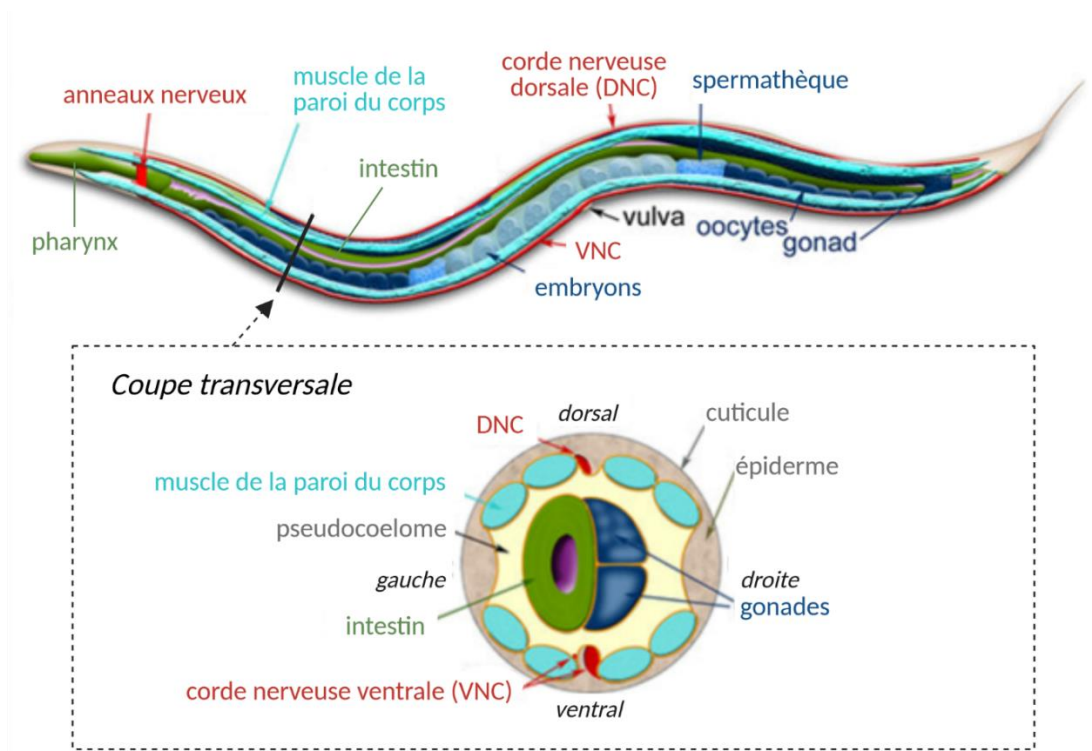
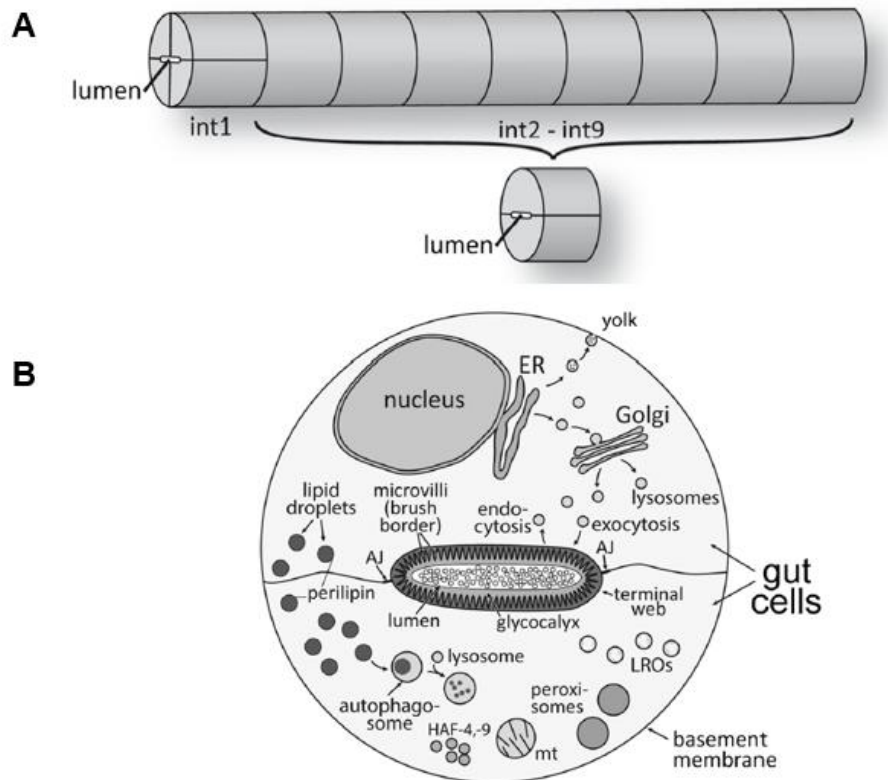


Figure 31. Principales caractéristiques anatomiques de *Caenorhabditis elegans* (hermaphrodite) vu latéralement et en coupe transversale (région antérieure). [615]

### a) L'intestin, la digestion des aliments et le microbiote

L'intestin du ver occupe dans sa globalité près de 80 % du corps de l'animal [616] et présente, sur le plan cellulaire, quelques similarités morphologiques et fonctionnelles avec celui des mammifères. Le domaine apical des cellules intestinales est également constitué de microvillosités formant la bordure en brosse [616,617]. Mais contrairement aux vertébrés, les entérocytes de *C. elegans* ne sont pas renouvelables, ce qui constitue un inconvénient pour le ver (modèle plus sensible

aux dommages cellulaires) et un avantage pour la recherche puisque les effets dus à l'âge persistent avec le temps et sont donc plus faciles à mettre en évidence [616]. Les cellules intestinales contiennent de nombreux organelles et granules intestinaux tels que des lysosomes, des peroxysomes, des mitochondries et des gouttelettes lipidiques (Figure 32).



**Figure 32. Organisation schématique de l'intestin de *Caenorhabditis elegans*. (A) structure de base de l'intestin comme un ensemble d'anneaux. (B) Le cytoplasme des entérocytes. Acronymes : AJ, jonction adhérente ; ER, réticulum endoplasmique ; LRO, organite lié au lysosome ou granule intestinal. [616]**

Les gouttelettes lipidiques jouent le rôle de tissu adipeux puisqu'elles sont le lieu de stockage des lipides du ver. Elles peuvent être détectées par diverses techniques telles que la coloration à l'Oil Red O [616]. Il a été montré que la restriction calorique augmentait le nombre de ces gouttelettes dans l'intestin et que cela serait associé à une meilleure longévité [616,618]. La  $\beta$ -oxydation, comme chez les mammifères, est à la fois mitochondriale et peroxysomale [617]. Ainsi, en plus d'assimiler les nutriments, l'intestin de *C. elegans* joue le rôle du foie (détoxification des métaux et des

métabolites), du tissu adipeux (stockage des lipides) et joue des rôles majeurs dans l'immunité innée (première ligne de défense contre les pathogènes) et la longévité [616].

La biologie de la digestion du ver n'est pas encore parfaitement comprise mais elle présente quelques similitudes avec les mammifères. À ce stade, il est à préciser que le ver ingère essentiellement des micro-organismes qui sont sa source majeure de nutriments. La première étape de digestion est le broyage mécanique des aliments au niveau du pharynx [616,619] puis, le broyat transite le long du tube digestif dans la lumière intestinale. Le lumen intestinal contient des enzymes qui dégradent la paroi des bactéries (lysozymes, saponines, lectines) ainsi que les macromolécules (protéases, lipases, amylases, désoxyribonucléases) [617]. Les bactéries ingérées par le ver sont donc des aliments, mais elles participeront également à la colonisation de l'intestin.

Les nématodes élevés sur des substrats différents (compost, fruits en décomposition, sols) présentent un « core » microbiote (microbiote principal) de 14 familles microbiennes [620,621]. Ces bactéries appartiennent principalement au phylum Proteobacteria (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Xanthomonadaceae*), et dans une moindre mesure aux Bacteroidetes (*Sphingobacteriaceae*, *Weeksellaceae*, *Flavobacteriaceae*) et Actinobacteria (*Microbacteriaceae*, *Actinomycetales*) [621–623]. Le microbiote intestinal des nématodes pourrait, comme chez les mammifères – bien que de composition en termes d'espèces très différente – jouer un rôle de protection contre les bactéries et champignons pathogènes (production de peptides antimicrobiens par exemple) mais pourrait également améliorer la croissance et la résistance au stress [621,624–626]. Cependant, en laboratoire, les nématodes sont élevés dans des conditions « stériles » et sont nourris avec une seule souche bactérienne (*E. coli* OP50). Ils n'ont donc pas de microbiote intestinal à proprement parlé.

### *b) Les muscles*

Les muscles de la paroi du corps (« body wall muscles ») du nématode sont indispensables à la locomotion du ver et peuvent être considérés comme les équivalents fonctionnels des muscles striés squelettiques des vertébrés [627]. La structure générale, la composition et la fonction de l'unité musculaire de base (le sarcomère) sont hautement conservées entre les nématodes et les vertébrés.

Les sarcomères sont formés par l'inter-digitation de filaments épais de myosine et de filaments fins d'actine, et la contraction musculaire est activée par le calcium intracellulaire [628]. Les muscles de la paroi du corps des vers constituent un tissu de choix pour étudier des processus cellulaires tels que l'autophagie, la biologie mitochondriale, le vieillissement et la dégénérescence musculaire [627]. Toutefois, contrairement aux mammifères, les muscles de *C. elegans* sont dépourvus de cellules satellites et donc de régénération musculaire. De plus, les muscles de la paroi du corps sont totalement post-mitotiques ; les cellules musculaires ne fusionnent pas et restent mononuclées [627]. Enfin, et contrairement à la plupart des organismes, les jonctions musculaires chez le ver sont constituées par des prolongements musculaires qui se projettent sur les axones des motoneurones, et non l'inverse [629,630].

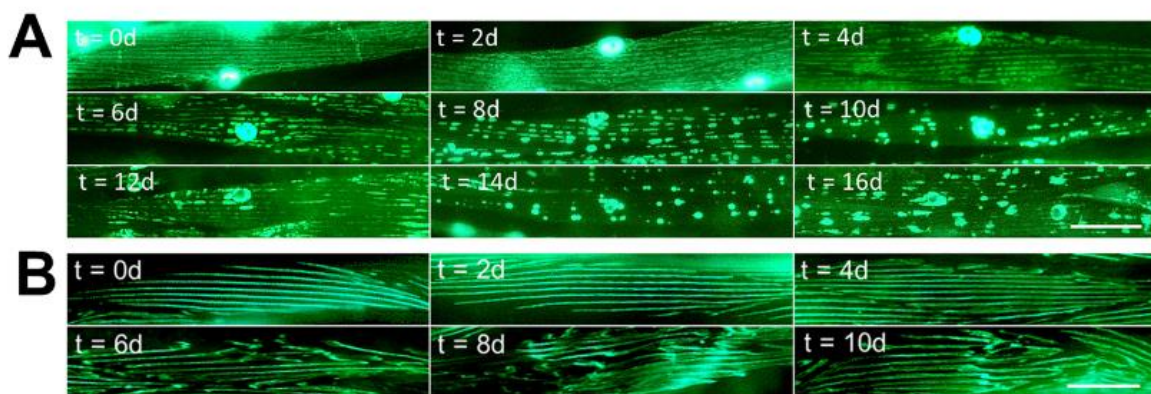
L'équipe du Dr Monica Driscoll fut la première à décrire la sarcopénie chez *C. elegans*. Comme chez l'humain, elle est associée à une réduction de la taille des cellules musculaires et à une altération de l'organisation des fibres conduisant progressivement et de manière irréversible à une altération de la mobilité à partir du 7<sup>e</sup> jour de l'âge adulte [631]. Et, fait important, la sarcopénie serait un excellent prédicteur de mortalité chez le ver, bien d'avantage que l'âge chronologique [632].

Il existe de nombreuses méthodes pour observer la structure des muscles comme la lumière polarisée, la microscopie électronique, et les protéines couplées à la GFP (Green Fluorescent Protein) [627]. La GFP est utilisée comme gène rapporteur dans une grande variété de souches de nématodes. Associée à un gène d'intérêt, elle permet l'observation directe de l'expression de ce gène dans la cellule à l'aide de la microscopie à fluorescence. Le gène codant la protéine GFP est incorporé dans le gène qui code la protéine d'intérêt, et qui sera ainsi contrôlée par la même séquence régulatrice (promoteur). Dans les cellules où le gène sera exprimé, et la protéine d'intérêt produite, la GFP sera synthétisée au même moment. Ainsi, ces cellules deviendront fluorescentes pendant que celles n'exprimant pas le gène d'intérêt resteront inertes sous la lumière de la microscopie à fluorescence.

Les vers utilisés pour la visualisation de l'état des muscles de la paroi du corps peuvent présenter un marquage par la GFP au niveau des sarcomères (ex., souche PJ727) ou des mitochondries (ex., souche PJ1277) en fonction des souches et de leur génotype [633–635]. Mais dans les deux cas, la séquence codant la protéine GFP est localisée entre le promoteur du gène *myo-3* et le gène *myo-3*

lui-même. Cela signifie que la GFP sera exprimée en même temps, au même endroit et à une intensité proportionnelle à celle de la protéine MYO-3. La protéine MYO-3, pour myosin-3 (aussi appelée MHA pour Myosin Heavy Chain A) est un orthologue humain de MYH6 et MYH7 (Myosin Heavy Chain 6 et 7). Elle est exprimée au niveau des filaments épais de myosine dans la musculature de la paroi du corps, et dans une moindre mesure dans les muscles intestinaux et vulvaires.

D'un point de vue architectural, les mitochondries (**Figure 33A**), tout comme les sarcomères (**Figure 33B**), sont disposés sous la forme d'un réseau tubulaire qui se déstructure progressivement avec l'âge des vers – à partir de 4 jours de vie pour les mitochondries et à partir de 6 jours pour les sarcomères [633,636].



**Figure 33.** Altération de la structure des fibres musculaires avec l'âge du ver. (A) Perte de la structure des réseaux mitochondriaux associée à l'âge chez des animaux élevés à 20°C. Les réseaux sont conservés jusqu'à 4 jours, moment où une fragmentation mineure est visible avant une fragmentation modérée (6 jours) et sévère (8 jours). (B) En revanche, les sarcomères conservent leur structure jusqu'à la 6ème journée où l'on observe une perte d'architecture. Images de Gaffney *et al.*, 2018 [637].

Yasuda *et al.*, ont montré par microscopie électronique (à plus fort grossissement), un élargissement et un gonflement progressif des mitochondries dans le muscle de la paroi corporelle des nématodes [638]. Une altération avec l'âge de la morphologie des mitochondries au niveau des muscles a également été observé chez le rat, la souris et des cellules musculaires humaines [197,639,640]. Il est désormais bien connu que le dysfonctionnement mitochondrial, en partie causé par une altération de la morphologie des mitochondries [633,641], est une caractéristique de

la dégénérescence des muscles squelettiques au cours du vieillissement [641]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'altération de la structure mitochondriale serait plus fortement associée à la perte de mouvement liée à l'âge (en quelque sorte, la sarcopénie) que l'altération de la structure des sarcomères selon les travaux de Gaffney *et al.*, 2018 [637]. Et donc, si un choix doit être fait entre ces deux types de modèles, les souches « GFP localisées au niveau des mitochondries musculaires » pourraient être privilégiées.

Finalement, et de manière surprenante et comme chez les mammifères, il a été démontré que l'exercice avait un effet positif sur la durée de vie et la fonction musculaire des vers [609,642,643]. Dans l'étude de Hartman *et al.*, l'exercice (nage) a clairement entraîné une diminution de la fragmentation des mitochondries dans les muscles de la paroi du corps par rapport aux vers « sédentaires » [643].

### 3- Criblage de probiotiques « pro-longévité » sur *C. elegans*

Les probiotiques peuvent exercer leurs effets bénéfiques sur la santé *via* différents mécanismes tels que la production de molécules antimicrobiennes, le renforcement de la barrière intestinale et l'immunomodulation. Dans le contexte du vieillissement, caractérisé notamment par des altérations physiologiques menant à un statut d'inflammation de bas-grade (inflammaging), de plus en plus de preuves suggèrent un rôle pro-longévité des probiotiques, et notamment des bactéries lactiques [644]. *C. elegans* a été utilisé à de nombreuses reprises dans la littérature pour l'étude de paramètres liés au vieillissement du fait de sa courte durée de vie, de sa transparence, de la similitude morphologique et fonctionnelle de certains de ses organes avec les mammifères et enfin des voies cellulaires impliquées dans la réponse au stress et l'immunité (ex., insulin-like growth factor-1 (IIS), p38 MAPK).

Différentes espèces de bactéries lactiques (ex., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*) aux origines variées (ex., aliments, fèces humain) ont montré un effet protecteur contre divers agents pathogènes [645–653]. Par exemple, l'ingestion de la souche *Lactobacillus fermentum* JDFM216 augmente la durée de vie des vers (par rapport aux témoins ingérant la souche de référence *E. coli* OP50) mais améliore également leur résistance anti-



pathogène lorsqu'ils sont exposés à *Staphylococcus aureus* et *E. coli* O157:H7 [651]. De la même manière, la souche *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35® permet de prévenir efficacement la candidose chez le ver [652]. Les mécanismes d'action des probiotiques ne sont pas encore totalement compris mais pourraient faire intervenir la stimulation de voies impliquées dans la réponse au stress, et la production de molécules anti-pathogènes (par la bactérie probiotique ou le nématode lui-même). Par ailleurs, il existe une forte association entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les dommages qu'elles ont induits et le vieillissement. Des doses importantes de ROS sont délétères chez *C. elegans*, comme chez les autres organismes vivants [654,655]. Nous pouvons donc nous demander si, comme pour la résistance anti-pathogène, l'administration de bactéries probiotiques pourraient permettre aux vers de résister davantage à un stress abiotique tel que le stress oxydatif [656]. En exemple, *Lactobacillus gasseri* SBT2055 permet, en plus d'augmenter la durée de vie des nématodes, de lutter efficacement contre le stress oxydatif. Des analyses de vers adultes de 10 jours nourris avec *L. gasseri* SBT2055 ont notamment montré une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la superoxyde dismutase (une enzyme antioxydante) par rapport aux vers nourris avec *E. coli* OP50 [657]. Comme autre exemple, *Lacticaseibacillus rhamnosus* CNCM I-3690 confère aux vers une protection contre le stress oxydatif en activant le facteur de transcription DAF-16, induisant alors une augmentation de la longévité et une résistance accrue au peroxyde d'hydrogène [658]. *C. elegans* se révèle ainsi être un modèle prometteur pour sélectionner relativement rapidement des souches probiotiques pour leurs effets antioxydants, anti-inflammatoires ou encore anti-infectieux.

*Puisque le ver vieillissant présente certaines altérations de ses capacités musculaires comparables à ce qui survient dans la sarcopénie des humains, le modèle C. elegans pourrait être un outil intéressant et pertinent pour tester l'influence de probiotiques sur la fonction des muscles.* À ma connaissance, très peu d'études s'intéressent aux potentiels effets des probiotiques sur le maintien de la fonction musculaire avec l'âge des nématodes, un paramètre pourtant majeur dans le cadre du vieillissement dans ce modèle. Seule une étude de Wang *et al.*, a mis en évidence un effet bénéfique d'une bactérie morte (*Lacticaseibacillus paracasei* D3-5) sur la longévité, la masse musculaire et la performance physique (mouvements) des vers, qui a, par ailleurs, été confirmé sur la force musculaire et les capacités cognitives de souris âgées [659].

#### 4- Limites du modèle nématode

Comme tout modèle, *C. elegans* présentent quelques limites qui doivent être prises en compte lors de l'interprétation des résultats [656]. Plus particulièrement, les limites de ce modèle dans le cadre d'une étude interactionnelle entre bactérie probiotique et hôte sont :

- L'absence d'interaction préalable entre le microbiote intestinal et le probiotique ingéré puisque les vers sont élevés dans des conditions stériles et avec comme unique apport alimentaire, la bactérie *E. coli* OP50.
- La température de maintenance des nématodes proche de 20° C. En effet, ces animaux tolèrent difficilement une température de 25° C et plus. Or, les probiotiques sont cultivés et exercent leurs effets dans l'organisme des mammifères à 37° C. L'activité des bactéries ingérées par les vers est donc possiblement ralentie.
- Les bactéries ingérées représentent l'unique source de nutriment pour les vers et est consommée *ad libitum*. Il n'y a donc pas de découplage possible entre l'effet observé de la souche bactérienne ingérée comme substrat alimentaire et l'effet probiotique.

## B) Modèles rongeurs de la fragilité

### 1- Les différents modèles retrouvés dans la littérature

Bien que les petits organismes tels que *Caenorhabditis elegans* présentent des avantages indéniables pour l'étude des maladies associées à l'âge, une étape de validation des effets et compréhension des mécanismes sur des modèles mammifères paraît indispensable avant de passer aux études chez l'Homme [660]. Le rongeur (souris et rat) est un bon modèle de biologie et le plus fréquemment utilisé pour plusieurs raisons :

- Les similitudes des fonctions et la structure des organes partagées avec l'humain ;
- La durée de vie des animaux relativement courte (2 à 3 ans) ;
- La facilité d'entretien (peu d'exigences nutritionnelles, animaux de petite taille) et leur vitesse de prolifération ;
- L'homogénéité génétique au sein des mêmes souches de rongeurs ;
- L'homogénéité des microbiotes pour les animaux élevés ensemble qui est bien plus élevée que ce qui peut être observé dans les populations humaines ;
- La facilité de manipulation génétique et l'existence de nombreux mutants (surtout pour la souris) ;
- La possibilité de récupérer des tissus à toutes les périodes du vieillissement (surtout pour le rat car les quantités prélevées chez la souris sont beaucoup plus limitées) ;
- Le prix des études relativement faible (par rapport aux essais cliniques).

En ce qui nous concerne plus particulièrement, différents types de modèles rongeurs du vieillissement et/ou d'atrophie musculaire peuvent être utilisés pour étudier la sarcopénie (**Tableau 13**).

Les rongeurs âgés constituent le modèle le plus représentatif du vieillissement chez l'Homme puisque ces animaux développent, comme les humains et spontanément, des cancers, une faiblesse musculaire, des anomalies immunitaires, des troubles cognitifs, etc. [660,661]. Néanmoins, ce modèle nécessite une anticipation lors de la réalisation des études car les animaux sont âgés lorsqu'ils ont environ 2 ans (pour les rats).

Tableau 13. Quelques modèles rongeurs pour l'étude du vieillissement et de la sarcopénie. [660–664]

Modèles	Descriptions, phénotypes	(+) Avantages et (-) limites
<b>Rats et souris âgés</b>	La durée de vie moyenne est propre à chaque souche. Cette durée est à connaître pour évaluer le caractère âgé ou non des individus.	(+) Modèle le plus proche de la réalité du vieillissement chez l'Homme (+) Respect éthique/bien-être animal (pas d'intervention pour induire le vieillissement) (-) Coût (prix, place, temps) : ~ 2 ans pour obtenir un rat âgé
<b>Modèles génétiques</b>		
<b>Souris SAMP (senescence-accelerated mouse prone)</b>	Développement de nombreuses pathologies liées à l'âge et associées au stress oxydatif et à la dysfonction mitochondriale	(+) Durée de vie courte (9 mois) (+) Développement déficiences musculo-squelettiques à partir de 6 mois pour SAMP-8, dès 3 mois pour SAMP-6 et SAMP-3 (-) Les mutations spécifiques contribuant à la sénescence sont mal définies
<b>Wrn -/- Terc -/-</b>	Vieillesse prématurée de quelques tissus (peau, ostéoporose) associés à des défauts de réplication de l'ADN et à la maintenance des télomères	(+) Durée de vie courte (24 semaines) (-) Développement de symptômes non liés à l'âge (spectre tumoral) (-) Ne développent pas tous les symptômes liés à l'âge
<b>Souris Klotho KO</b>	Développement de multiples troubles liés à l'âge (infertilité, ostéoporose...) à partir de 3-4 semaines (déficits hormonaux)	(+) Durée de vie courte (8 semaines) (-) Développement de symptômes non liés à l'âge (-) Ne développent pas tous les symptômes liés à l'âge (-) La régulation de l'hypervitaminose D réduit le phénotype de vieillissement
<b>Interventions chimique, diététique ou autre</b>		
<b>D-galactose</b>	Le D-galactose a forte concentration entraîne la génération de radicaux libres et induit le vieillissement des principaux organes (cerveau, foie, cœur, reins...)	(+) Relativement simple à mettre en place (+) Mime plutôt bien les phénotypes du vieillissement (-) Variabilité entre les rongeurs (espèces, âges) avec un protocole d'administration similaire
<b>Irradiation du corps entier (TBI) ou radiothérapie</b>	L'irradiation (ionisation et radicaux libres) sublétales induit une fragilité prématurée et progressive et endommage divers tissus et organes (cerveau, muscles, appareil reproducteur...)	(+) Développement d'une fragilité 2 fois plus précoce (+) Phénotypes similaires entre les souris irradiées et des souris non irradiées à un âge plus élevé (-) Relativement difficile à mettre en place (matériel, personnel, réglementation) (-) Méthode peu utilisée (peu d'études)
<b>Dexaméthasone</b>	Glucocorticoïde (à forte dose et traitement prolongé) qui sur-active le système protéolytique ubiquitine-protéasome dans le muscle	(+) Accélère l'atrophie musculaire (+) Approche communément utilisée et relativement simple à mettre en place (-/+ ) Induit de l'inflammation au niveau des muscles (voie NF-κB)
<b>Modèles d'hypoactivité</b>		
<b>Suspension par la queue (hindlimb suspension)</b>	Reproduit la fonte musculaire associée à la vie en apesanteur, la sarcopénie, l'inactivité et l'immobilisation	(+) Relativement simple à mettre en place (-) Appuis sur les pattes antérieures (-) Troubles de la miction (-) Respect éthique/bien-être animal
<b>Immobilisation d'une patte arrière (plâtre ou velcro)</b>	Reproduit la fonte musculaire causée par l'immobilisation	(+) Proche d'une situation clinique (+) Patte controlatérale : référence pour le membre immobilisé (-) Appuis sur les pattes antérieures (-) Coût (temps, compétences techniques)
<b>Dénervation (nerf tibial)</b>	Reproduit (excessivement) la dénervation des jonctions neuromusculaires observée avec l'âge	(+) Très efficace pour induire de l'atrophie musculaire (+) Patte controlatérale : référence pour le membre immobilisé (-) Opération chirurgicale (-) Modèle trop drastique (-) Respect éthique/bien-être animal

Par ailleurs, maintenir des animaux deux années en animalerie représente un coût important pour des études sur rongeurs. Enfin, il est important de déterminer à partir de quel âge un animal est « âgé » (et non un adulte qui a terminé sa croissance) car certains auteurs déclarent travailler sur des souris « âgées », alors qu'elles n'ont que 10 mois (donc un stade physiologique d'adulte d'âge moyen) [473]. Dans le même registre, il est nécessaire de prendre en compte les variabilités d'espérance de vie qui existent entre les différentes espèces et souches.

Des alternatives ont été développées afin de réduire la durée de vie et accélérer le vieillissement des rongeurs. Il existe notamment une multitude de modèles génétiques dont les souris modèles de la progéria humaine ( $Wn -/-$  par exemple), des souris knock-out (KO) pour le gène *Klotho* (implication de la protéine dans le vieillissement) ou encore les lignées consanguines SAMP (senescence-accelerated mouse/prone) [660]. Pour étudier le vieillissement musculaire plus spécifiquement, des souris KO pour la mitofusine 2 (une molécule clé de l'activité mitochondriale qui est progressivement diminuée dans le muscle squelettique âgé) ont été décrites – ces souris présentent un dysfonctionnement mitochondrial au niveau musculaire et une atrophie des fibres IIB [664,665]. Mais le vieillissement systémique peut également être « induit » par des interventions nutritionnelles ou des molécules chimiques telles que le D-galactose, la dexaméthasone (provoquant la sur-expression des ubiquitines ligases MAFbx et MuRF-1) ou encore par l'irradiation des animaux [664].

D'autres modèles expérimentaux mimant l'hypoactivité chez l'animal (suspension, immobilisation, dénervation) permettent aussi d'étudier les conséquences et les mécanismes de l'atrophie musculaire ainsi que les effets d'éventuels traitements anaboliques sur la fonte musculaire liée à l'âge (**Tableau 13**). Néanmoins, et comme cela a été montré par l'UNH ces dernières années, l'immobilisation peut surtout être considérée comme un « accident de vie » qui se sur-ajoute à la problématique du vieillissement, participe à la sarcopénie et rentre dans les facteurs aggravant de la fragilité [264,666–668].

Concernant l'effet de probiotiques sur le muscle sarcopénique, les auteurs ont principalement utilisé le modèle de vieillissement accéléré SAMP-8 (senescence-accelerated mouse prone-8). Les bactéries lactiques testées ont permis d'augmenter la masse et la force des muscles des souris après une période de traitement de 5 à 12 semaines, généralement en stimulant les capacités

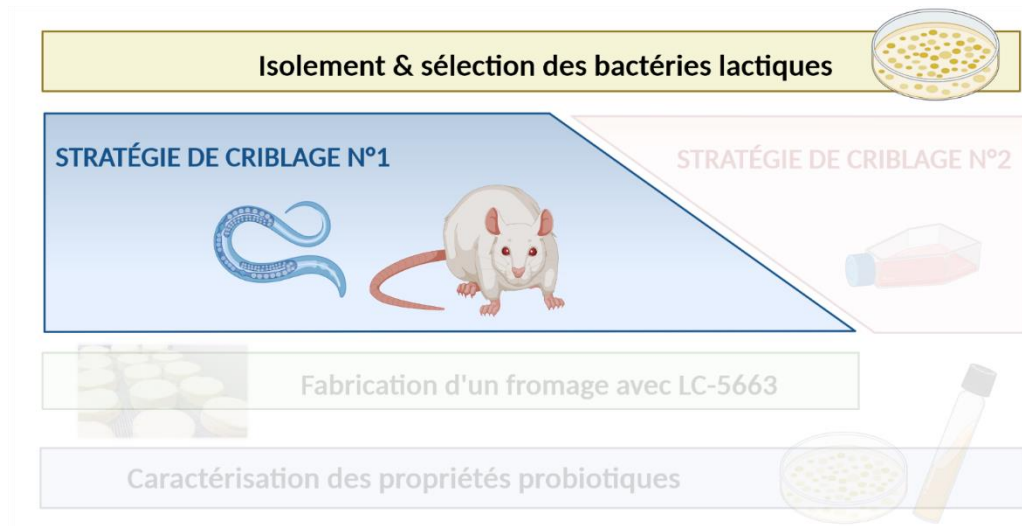
antioxydantes et/ou anti-inflammatoires au niveau musculaire (**voir synthèse bibliographique, chapitre 3-II Stratégie probiotique**). L'équipe du laboratoire a également étudié un modèle secondaire de fonte musculaire en supplémentant des rats âgés avec du DSS (Dextran Sulfate Sodium - dans l'eau de boisson à faible dose) afin d'induire une inflammation intestinale modérée se traduisant par une l'inflammation de bas-bruit systémique et une fonte musculaire, comme cela est également retrouvé chez l'humain âgé fragile. Grâce à ce modèle, les membres de l'équipe ont montré que la supplémentation avec une bactérie probiotique, *Streptococcus thermophilus* CNRZ160 pendant 4 semaines, limitait la fonte musculaire des animaux en atténuant l'inflammation et la protéolyse musculaire et en stimulant la synthèse protéique dans le muscle [669].

## 2- Le modèle que nous avons développé

Il n'existe pas réellement, à ce jour, de modèle rongeur de la fragilité, ce qui a nécessité le développement d'un modèle original dans le cadre de ce projet de thèse. Tout d'abord, nous avons choisi de travailler sur des rats naturellement âgés. Au sein de l'équipe iMPROVINg, des rats Wistar de 18-20 mois en début d'étude sont régulièrement utilisés [264,666–668]. Cet âge représente un bon compromis puisque la sarcopénie devient significative entre 16 et 20 mois selon les souches des rongeurs [550,553,554] mais l'espérance de vie des rats est encore de plusieurs mois.

D'autre part, nos animaux ont été soumis à une restriction alimentaire modérée afin de reproduire l'état de fragilité de l'âge associé à la dénutrition. Selon les données de la littérature, les personnes les plus à risque de devenir fragile sont celles dont les apports énergétiques et protéiques se situent à 75-80 % des niveaux recommandés (calories moyennes: 1300-1600 kcal/jour pour les femmes et 1400-1900 kcal/jour pour les hommes [302–304] ; protéines moyennes : 0,8 g/kg de masse corporelle/jour [299]) et les individus fragiles sont probablement en dessous de ces valeurs. Nos vieux rats ont donc été nourris avec 70-75 % de la quantité consommée par des rats du même âge ayant un régime *ad libitum*.

*La publication présentée ci-après présente les résultats majeurs obtenus au cours du travail de thèse, de l'isolement et de la sélection des bactéries lactiques sur le nématode C. elegans jusqu'aux effets des souches sélectionnées (LC-5663 et LC-5662) sur les métabolismes énergétique et protéique de notre modèle de rat âgé fragile.*



# Lacticaseibacillus casei CNCM I-5663 supplementation maintained muscle mass in a model of frail rodents

Giron Muriel, Thomas Muriel, Jarzaguet Marianne, Mayeur Camille, Ferrere Gladys,  
Noordine Marie-Louise, Bornes Stéphanie, Dardevet Dominique, Chassard Christophe and  
Savary-Auzeloux Isabelle

Article publié dans *Frontiers in Nutrition*.

## Introduction

Certaines stratégies basées sur la supplémentation nutritionnelle (protéines, essentiellement), associées ou non à l'exercice physique, sont efficaces pour limiter la sarcopénie mais elles ne sont pas toujours suffisantes et applicables chez les personnes âgées à faible appétit et/ou peu mobiles. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies innovantes et plus adaptées aux personnes âgées fragiles [355,563].

On sait depuis des années qu'une altération de la composition et de la fonction du microbiote intestinal est associée au développement des maladies métaboliques et de la résistance à l'insuline [591,592]. Un déséquilibre de ce microbiote a également été observé dans la population des personnes âgées, en particulier chez les personnes vivant en institution et/ou fragiles [421,427]. Des études récentes ayant mis en évidence l'existence d'un « dialogue » entre le microbiote intestinal et le muscle squelettique suggèrent que des stratégies ciblant le microbiote des sujets âgés fragiles pourraient rétablir leur santé musculaire [190,481,510,593]. Par ailleurs, certains probiotiques sont capables d'améliorer l'état inflammatoire et le métabolisme (par ex., sensibilité à l'insuline), eux-mêmes des modulateurs de la fonction musculaire chez le rongeur et l'humain, jeunes ou âgés [92].

De façon intéressante, des auteurs ont montré que les patients atteints du syndrome du grêle court (SGC) développaient des adaptations métaboliques optimisant l'absorption et l'efficacité de l'utilisation métabolique des nutriments [602,670]. Cette amélioration de l'efficacité d'utilisation des nutriments constatée chez les patients SGC pourrait être un levier intéressant s'il est transposable aux individus âgés qui mangent peu. Une partie de ces mécanismes d'adaptation observés chez les patients SGC pourrait être liée aux modifications du microbiote intestinal – composé à 90 % de Lactobacilles [602]. Pour conforter cette hypothèse, l'équipe de Muriel Thomas a montré que, transféré à des rats axéniques, le microbiote d'un patient SGC conduisait à une augmentation du GLP-1 et de la ghréline plasmatiques chez les rongeurs, des peptides impliqués dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et la régulation de l'appétit [605]. Ainsi, le transfert de ces bactéries à des populations âgées fragiles pourrait favoriser la sensibilité à l'insuline, l'efficacité métabolique et peut-être même l'anabolisme des protéines musculaires.



## Méthodes

Une fois isolées, caractérisées (évaluation de la croissance) puis identifiées, des bactéries lactiques candidates ont été criblées sur le modèle *Caenorhabditis elegans* pour leur effet sur la longévité et l'intégrité musculaire (réseaux mitochondriaux des muscles de la paroi du corps). Les deux souches bactériennes les plus prometteuses (LC-5663 et LC-5662) ont ensuite été testées sur les rongeurs âgés au cours de deux expérimentations successives (Figure 34).

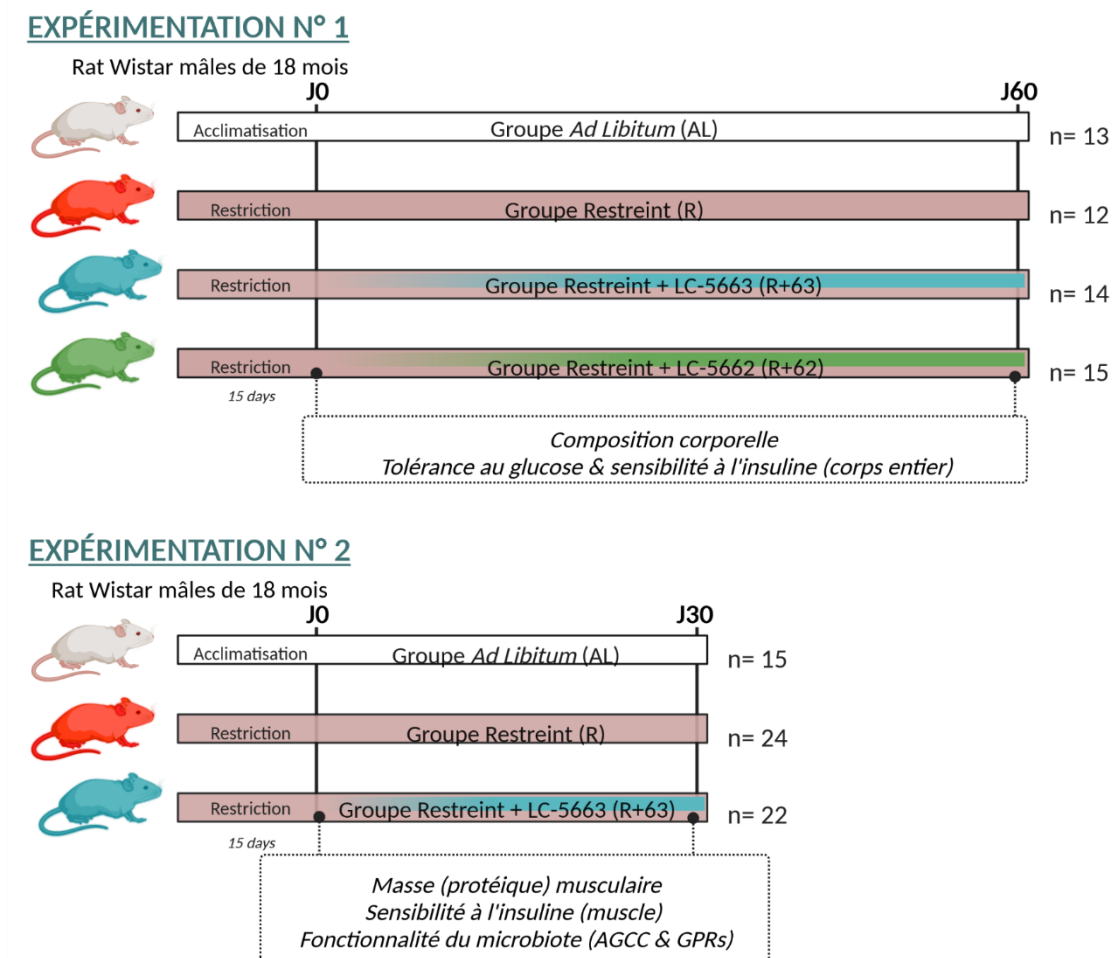


Figure 34. Schéma expérimental des deux études réalisées sur les rats âgés au cours de la thèse.

Des rats Wistar mâles de 18 mois étaient répartis en quatre groupes (expérimentation n°1) ou 3 groupes (expérimentation n°2) : les *ad libitum* (AL), les rats témoins en restriction alimentaire modérée (R) et ceux en restriction supplémentés avec les probiotique LC-5663 (R+63) ou LC-5662 (R+62). Les probiotiques n'ont pas été administrés par gavage ou dans l'eau de boisson comme c'est souvent le cas dans les études, mais ils ont été mélangé à de la poudre de croquette et servi aux

rongeurs avant la distribution du repas quotidien afin de limiter au maximum le stress des animaux. Les rats mangeaient la mixture en une dizaine de minutes et des tests préalables ont montré une bonne survie des bactéries sur la poudre à l'air ambiant après quelques heures. L'expérimentation n°1 avait pour principal objectif d'évaluer les effets des deux probiotiques sur la composition corporelle des animaux et la sensibilité à l'insuline au niveau du corps entier sur le long-terme (60 jours). L'expérimentation n°2 s'est davantage intéressée aux cibles et aux mécanismes potentiels des probiotiques au niveau du muscle squelettique et de l'intestin à plus court-terme (30 jours).

### Principaux résultats

Le candidat LC-5663 s'est démarqué des autres souches probiotiques de par ses effets bénéfiques sur la longévité et l'intégrité musculaire de *C. elegans* suggérant un effet protecteur contre la sarcopénie chez ce modèle. La supplémentation en LC-5663 chez les vieux rats pendant 60 jours a permis de limiter la fonte de masse maigre causée par la restriction alimentaire. En accord avec ce résultat, les animaux supplémentés présentaient une augmentation de leur masse musculaire (+13,0 % par rapport aux témoins restreints) après 30 jours d'étude, les plaçant à un niveau proche des rats AL. Le maintien de la masse protéique musculaire était associé à l'activation de la voie de signalisation Akt/mTOR/S6K (protéines p-S6 et p-eIF2 $\alpha$ ), une voie cellulaire sensible à l'action de l'insuline. La supplémentation en LC-5663 pendant 60 jours a, par ailleurs, diminué de 25 % la résistance à l'insuline au niveau du corps entier (index HOMA-IR). Bien que la supplémentation en probiotique pendant 30 jours n'a pas eu d'effet particulièrement notable sur la concentration des acides gras à chaîne courte – des métabolites impliqués dans les phénomènes d'insulino-sensibilité médiés par le microbiote sur l'hôte – l'expression des récepteurs à ces acides gras (GPR43 et 41) au niveau de l'iléon était supérieure chez les rats supplémentés. Ce résultat suggère que les animaux supplémentés étaient plus sensibles à l'action des AGCC au niveau iléal.

Même si le mécanisme d'action de LC-5663 reste à approfondir, cette bactérie est prometteuse pour limiter le développement de la sarcopénie chez le sujet âgé en sous-nutrition.



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Emma E. Hamilton-Williams,  
The University of Queensland, Australia

REVIEWED BY  
Firoz Mian,  
McMaster University, Canada  
Nathaniel J. Szwedczyk,  
Ohio University, United States  
Roberto de Sire,  
University of Naples Federico II, Italy

\*CORRESPONDENCE  
Isabelle Savary-Auzeloux  
isabelle.savary-auzeloux@inrae.fr

SPECIALTY SECTION  
This article was submitted to  
Nutrition and Microbes,  
a section of the journal  
Frontiers in Nutrition

RECEIVED 26 April 2022  
ACCEPTED 21 July 2022  
PUBLISHED 10 August 2022

CITATION  
Giron M, Thomas M, Jarzaguet M,  
Mayeur C, Ferrere G, Noordine M-L,  
Bornes S, Dardevet D, Chassard C and  
Savary-Auzeloux I (2022)  
*Lactocaseibacillus casei* CNCM I-5663  
supplementation maintained muscle  
mass in a model of frail rodents.  
*Front. Nutr.* 9:928798.  
doi: 10.3389/fnut.2022.928798

COPYRIGHT  
© 2022 Giron, Thomas, Jarzaguet,  
Mayeur, Ferrere, Noordine, Bornes,  
Dardevet, Chassard and  
Savary-Auzeloux. This is an  
open-access article distributed under  
the terms of the [Creative Commons  
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
distribution or reproduction in other  
forums is permitted, provided the  
original author(s) and the copyright  
owner(s) are credited and that the  
original publication in this journal is  
cited, in accordance with accepted  
academic practice. No use, distribution  
or reproduction is permitted which  
does not comply with these terms.

# *Lactocaseibacillus casei* CNCM I-5663 supplementation maintained muscle mass in a model of frail rodents

Muriel Giron<sup>1,2,3</sup>, Muriel Thomas<sup>3</sup>, Marianne Jarzaguet<sup>1</sup>,  
Camille Mayeur<sup>3</sup>, Gladys Ferrere<sup>3</sup>, Marie-Louise Noordine<sup>3</sup>,  
Stéphanie Bornes<sup>2</sup>, Dominique Dardevet<sup>1</sup>,  
Christophe Chassard<sup>2</sup> and Isabelle Savary-Auzeloux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>INRAE, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, Université Clermont Auvergne, Clermont-Ferrand, France, <sup>2</sup>Université Paris-Saclay, INRAE UMR 1319, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France, <sup>3</sup>INRAE UMR 0545, Unité Mixte de Recherche sur le Fromage, Université Clermont Auvergne, VetAgro Sup, Aurillac, France

The aim of this study was to identify a probiotic-based strategy for maintaining muscle anabolism in the elderly. In previous research, we found that individuals experiencing short bowel syndrome (SBS) after an intestinal resection displayed beneficial metabolic adjustments that were mediated by their gut microbes. Thus, these bacteria could potentially be used to elicit similar positive effects in elderly people, who often have low food intake and thus develop sarcopenia. Gut bacterial strains from an SBS patient were evaluated for their ability to (1) maintain *Caenorhabditis elegans* survival and muscle structure and (2) promote protein anabolism in a model of frail rodents (18-month-old rats on a food-restricted diet: 75% of *ad libitum* consumption). We screened a first set of bacteria in *C. elegans* and selected two *Lactocaseibacillus casei* strains (62 and 63) for further testing in the rat model. We had four experimental groups: control rats on an *ad libitum* diet (AL); non-supplemented rats on the food-restricted diet (R); and two sets of food-restricted rats that received a daily supplement of one of the strains (~10<sup>9</sup> CFU; R+62 and R+63). We measured lean mass, protein metabolism, insulin resistance, cecal short-chain fatty acids (SCFAs), and SCFA receptor expression in the gut. Food restriction led to decreased muscle mass [−10% vs. AL ( $p < 0.05$ )]. Supplementation with strain 63 tempered this effect [−2% vs. AL ( $p > 0.1$ )]. The mechanism appeared to be the stimulation of the insulin-sensitive p-S6/S6 and p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  ratios, which were similar in the R+63 and AL groups ( $p > 0.1$ ) but lower in the R group ( $p < 0.05$ ). We hypothesize that greater SCFA receptor sensitivity in the R+63 group promoted gut-muscle cross talk [GPR41: +40% and GPR43: +47% vs. R ( $p < 0.05$ )]. Hence, strain 63 could be used in association with other nutritional strategies and exercise regimes to limit sarcopenia in frail elderly people.

## KEYWORDS

muscle, sarcopenia, probiotic, lactic acid bacteria, insulin sensitivity, protein synthesis

## Introduction

Sarcopenia is an age-related decline in muscle mass and strength. It is namely characterized by a loss of leg mass (1–2% per year) and strength (1.5–5% per year) in people older than 50 years (1). The result is an increased risk of falls, hospitalization, and a state of frailty/dependence, making sarcopenia a major public health issue (2, 3). This condition partly develops because, over time, skeletal muscle has a less-effective anabolic response to food ingestion [i.e., resistance to insulin and other anabolic signals, such as leucine (4)] and experiences chronic low-grade inflammation (“inflammageing”) (5). Strategies based on protein/amino acid supplementation, sometimes paired with physical exercise, have been found to help counter the effects of sarcopenia (6, 7). However, these approaches are not always effective and could be more difficult to promulgate in older adults experiencing a loss of appetite or difficulties in exercising (2). It is therefore essential to develop innovative techniques that are better suited to the needs of frail elderly people and that could be combined with other strategies to boost their effectiveness.

Over the past 30 years, research on gut microbiota has greatly expanded, with many studies focusing on how gut microbes and host metabolism interact (8–10). It has been known for years that altered gut microbiota composition and functioning occur in tandem with various metabolic diseases and forms of insulin resistance (11, 12). Furthermore, gut microbiota composition is often imbalanced (i.e., dysbiosis) in older adults, especially in those who are frail and/or who have been institutionalized (13, 14). Compared to healthier individuals, these populations frequently have lower microbial diversity, larger numbers of opportunistic pathogens, and lower levels of species that produce anti-inflammatory and insulin-sensitizing metabolites (e.g., *Faecalibacterium prausnitzii*) (14, 15). Recent studies have found that the gut microbiota and skeletal muscle engage in cross-talk (5, 16–20), which leads us to hypothesize that strategies targeting gut community composition and function could help frail elderly individuals improve their skeletal muscle health. Indeed, some probiotics have been demonstrated to modulate inflammation, metabolic issues (e.g., age-related declines in insulin sensitivity), and muscle function in juvenile rodents (21–24), adult rodents (25), and humans of various ages (26–28) [for a review, see Giron et al. (29)]. The benefits of probiotics have also been investigated using rodent models of aging [SAMP-8 (30–32) and D-galactose (33)] and animal models of cachexia (34). However, researchers have rarely used healthy older rodents (35) and have never used “frail” rodents, such as older, food-restricted rats.

The elderly often struggle to achieve healthy levels of food intake, which suggests that complementary treatment strategies should focus on boosting the absorption of any nutrients consumed. Interestingly, research has shown that individuals who developed short bowel syndrome (SBS) following intestinal

resection displayed metabolic adjustments several months later: better nutrient absorption in the intestine and the effective metabolic use of nutrients (36–38). Mechanistically, these changes could be partially related to the microbiota. Indeed, people with SBS experience drastic changes in their gut communities, where the microbiota is 90% lactobacilli (36). Moreover, when the microbiota of a human with SBS was transferred to axenic rats, the latter showed increased levels of GLP-1 and ghrelin in their plasma, peptides known to improve insulin sensitivity and appetite regulation (37, 39). These findings, therefore, suggest that strategies involving probiotic supplementation could promote insulin sensitivity, metabolic efficiency, and, possibly, muscle protein anabolism in frail elderly people.

## Materials and methods

### Isolation and identification of lactic acid bacteria strains

#### Strain isolation

We collected feces from a germ-free rat inoculated with fecal microbiota from an SBS patient 30 days after the inoculation had taken place (37). The fecal sample displayed a stable microbial composition similar to that of the inoculum. In an anaerobic chamber, 250 mg of the fecal sample was diluted with a rich, non-selective BHI-S medium. The mixture was spread on Petri dishes and incubated at 37°C for 48 h under anaerobic conditions (GENBox Jar® and GENBag anaer®; Biomérieux, France). After the incubation period, at least three different colony types were observed. Sixty-one colonies were used to inoculate De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth and were then incubated at 37°C for 24 h under anaerobic conditions. Gram staining and microscopic observations showed that the bacterial cultures were pure, bacilliform, and Gram-positive. These cultures were placed in glycerol (final concentration: 16%) and frozen at –80°C. Aliquots of these cultures were centrifuged (10 min at 4,000 g), and the resulting pellets were stored at –20°C until molecular identification could occur. In tandem, the strains were visualized using scanning electron microscopy (MIMA2, INRAE, Jouy-en-Josas, France). To this end, culture samples were centrifuged (10 min at 4,000 g). The resulting pellets were resuspended in a fixative agent (glutaraldehyde sodium cacodylate buffer) and left at room temperature overnight before the observations.

#### Strain identification

The DNA in the pellets was extracted using Godon’s method (40). It was first screened using semi-quantitative real-time PCR and the specific primers for genus *Lactobacillus* described by Mayeur et al. (41). Then, we sequenced the isolates identified as

lactic acid bacteria (LAB)/*Lactobacillus*: we amplified 16S rDNA via PCR with the universal primers E8-F and U1492-R and the intermediate primers U519-F, U926-R, and U1053-F (Table 1).

The PCR mix was composed of 10.4  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O, 4  $\mu$ l of 5  $\times$  Phusion HF Buffer, 0.4  $\mu$ l of dNTP (10 mM), 1  $\mu$ l of each primer (10  $\mu$ M), and 0.2  $\mu$ l of Phusion High Fidelity Taq Polymerase (2 U/ $\mu$ l) (Thermo Fischer Scientific). Next, 20  $\mu$ l of the mix and 1  $\mu$ l of pure bacterial DNA were deposited in a 96-well PCR plate. The amplification cycle consisted of an initial 1-min denaturation step at 98°C, which was followed by 35 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 55°C, and 30 s at 72°C; there was a final 1-min extension step at 72°C (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad). The amplification results were verified via electrophoresis (1% agarose gel + 1X GelRed®). We used SmartLadder Sample® MW-1700-SA (Eurogentec, France) to confirm molecular weight. The PCR products were sequenced by the Eurofins Genomics platform (Île-de-France, France), and the nucleotide sequences were analyzed using NCBI BLAST® software and GenBank, resulting in the identification of known sequences (>98%).

## Strain growth conditions

All the LAB strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in their culture media with 16% glycerol (final concentration). They were then grown overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  in MRS broth (Biokar Diagnostics). To monitor their growth dynamics, cultures of each strain were normalized to reach an optical density (OD) of 0.1, and 200- $\mu$ l samples were placed in a 96-well plate. The experiments were performed at  $37^{\circ}\text{C}$  under aerobic conditions, which were mimicked by sealing the wells with paraffin oil. Samples were analyzed using a Spectra FLUOR Plus Microplate Fluorescence Reader (Tecan Life Sciences, Switzerland), which monitors microbial growth by measuring culture turbidity (i.e., OD at 600 nm) in the liquid growth medium. The experiments were run for 24 h, and turbidity was measured every 30 min. The two strains used in this work, *Lactocaseibacillus casei* 62 and 63, have been deposited in the Institut Pasteur's collection of microorganisms and cell cultures (reference numbers CNCM-I5662 and CNCM-I5663, respectively; patent application number FR2106084).

TABLE 1 Universal and intermediate primers used in 16S rDNA amplification.

Primers	Sequence (5'-3')
E8-F	AGAGTTTGATCCTGG CTCAG
U1492-R	ACGGTTACCTTGT TACGACTT
U519-F	CAGCMGCCGCGGTAATWC
U926-R	CCGTCAATTCCTT TRAGTTT
U1053-F	GCAATGGCYGYCGTCAG

## *Caenorhabditis elegans* rearing and synchronization

For our *Caenorhabditis elegans* strains, we used the CGC:N2 wild-type Bristol isolate and PJ1277 [ccIs4251 (Pmyo-3:Ngfp-lacZ; Pmyo-3:Mtgfp) I; him-8 (e1489) IV] (42). The strains were reared at  $20^{\circ}\text{C}$  on a nematode growth medium [plates of agar containing 4 g/L of yeast extract (NGMY)] that was seeded with *Escherichia coli* OP50 as described elsewhere (43). Our *E. coli* OP50 strain was obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (Minneapolis, MN, United States) and grown overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  in Luria broth (Fischer Scientific) the day before the experiment was conducted. During synchronization, eggs and gravid adults were washed with M9 buffer and centrifuged at 1,500 rpm for 2 min (Rotofix 32a, Hettich). The pellet was resuspended in 5 ml of worm bleach (2.5 mL of M9 buffer, 1.5 ml of pure sodium hypochlorite, and 1 ml of 5M sodium hydroxide) and mixed vigorously for 6 min until the bodies of the adult nematodes were disrupted. The action of the sodium hypochlorite was stopped using 20 ml of M9 buffer, and the mixture was centrifuged at 1,500 rpm for 2 min. The pellet containing the eggs was washed twice with M9 buffer and then resuspended in 20 ml of M9 buffer. Finally, the eggs were incubated at room temperature for 24 h using a tube rotator (10 rpm; Boekel Scientific). The resulting L1 larvae were transferred to an NGMY medium seeded with *E. coli* OP50 and then incubated for about 48 h (i.e., until the nematodes reached the L4/adult stage).

## *Caenorhabditis elegans* survival

The synchronized L4 worms were transferred to an NGMY medium containing 0.12 mM 5-fluorodeoxyuridine FUdR (Sigma, Saint-Louis, United States) in 6-well plates; there were about 20 worms per well. The plates had been seeded 24 h earlier with bacteria strains ( $\sim 10^9$  CFU per well): the control group was given *E. coli* OP50, one experimental group was given *L. casei* 62, and another experimental group was given *L. casei* 63. These groups are hereafter referred to as OP50, LAB62, and LAB63. There were three wells for each group, and the plates were incubated at  $20^{\circ}\text{C}$ . The number of living nematodes was counted daily until mortality reached 100%. A nematode was considered to be dead if it failed to respond to gentle movement. This assay was performed three separate times.

## *Caenorhabditis elegans* muscle structure

Thanks to green fluorescent protein (GFP) labeling, we were able to visualize mitochondria in the nematodes' body wall muscle *in vivo*. In this way, we could qualitatively assess the structure of the mitochondrial network using a method described elsewhere (44–46). All the images were captured using a fluorescence microscope (100 $\times$  magnification; Evos® FL, Invitrogen). About 20 worms were visualized at a time. Mitochondrial network structure was categorized as follows:

(1) “tubular”: networks were mostly long and interconnected; (2) “intermediate”: interconnected networks occurred in tandem with some smaller fragmented mitochondria; and (3) “fragmented”: the presence of sparse, small, and round mitochondria (44). Four different researchers carried out blind data analysis. They determined the percentages of tubular, intermediate, and fragmented networks over time (adult worms after 1, 4, 7, 11, and 13 days) and across groups (OP50, LAB63, or LAB62).

### Lactic acid bacteria ingestion by *Caenorhabditis elegans*

Lactic acid bacteria strains that had been cultured overnight were centrifuged (4,000 rpm for 10 min), and the resulting pellet was rinsed three times with M9 buffer. Then, the pellet was placed in 5 ml of M9 buffer + 10% BODIPY staining solution (50  $\mu$ g/mL of BODIPY<sup>TM</sup> in DMSO) and allowed to sit for 15 min. The resulting stained bacteria were rinsed twice, added to 5 ml of M9 buffer, and spread on a plate containing NGMY medium. A few nematodes were then placed on the plate. After 24 h, the nematodes' intestines were examined using a fluorescence microscope (Evos<sup>®</sup> FL, Invitrogen) to determine if the bacteria had been ingested.

### The model of frailty in rodent

This work was approved by the Animal Care and Use Committee of Auvergne (CEMEA Auvergne; Permit Number: C2EA-02) and the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation (# 20374-2019060714134169V3).

### Effects of probiotic supplementation on rat insulin resistance and body composition

A 2-month experiment was carried out using 18-month-old male Wistar rats (Janvier Labs, France). The rats were housed individually, kept under controlled conditions (22°C, 12:12 light-dark cycle), and fed pellets *ad libitum* (D05, SAFE, Augy, France). During the experiment, all the rats had *ad libitum* access to water. After an initial 2-week acclimation period, the rats were randomly assigned to one of the two groups: a control group, which had *ad libitum* access to food (AL,  $n = 13$ ), and a food-restricted group (R,  $n = 41$ ), which was given 75% of food levels consumed under AL conditions. This first experimental phase lasted 15 days. Then, rats in the R group were randomly assigned to one of the three subgroups: a control food-restricted group (R,  $n = 12$ ), a food-restricted group that was given *L. casei* 62 as a supplement (R+62,  $n = 15$ ), and a food-restricted group that was given *L. casei* 63 as a supplement (R+63,  $n = 14$ ) (Figure 1A). The treatment supplements ( $10^9$  CFU) and the control supplement (phosphate-buffered saline) were freshly prepared each day and added to 1 g of feed pellets, which were completely consumed by the rats within 15 min. The rats then

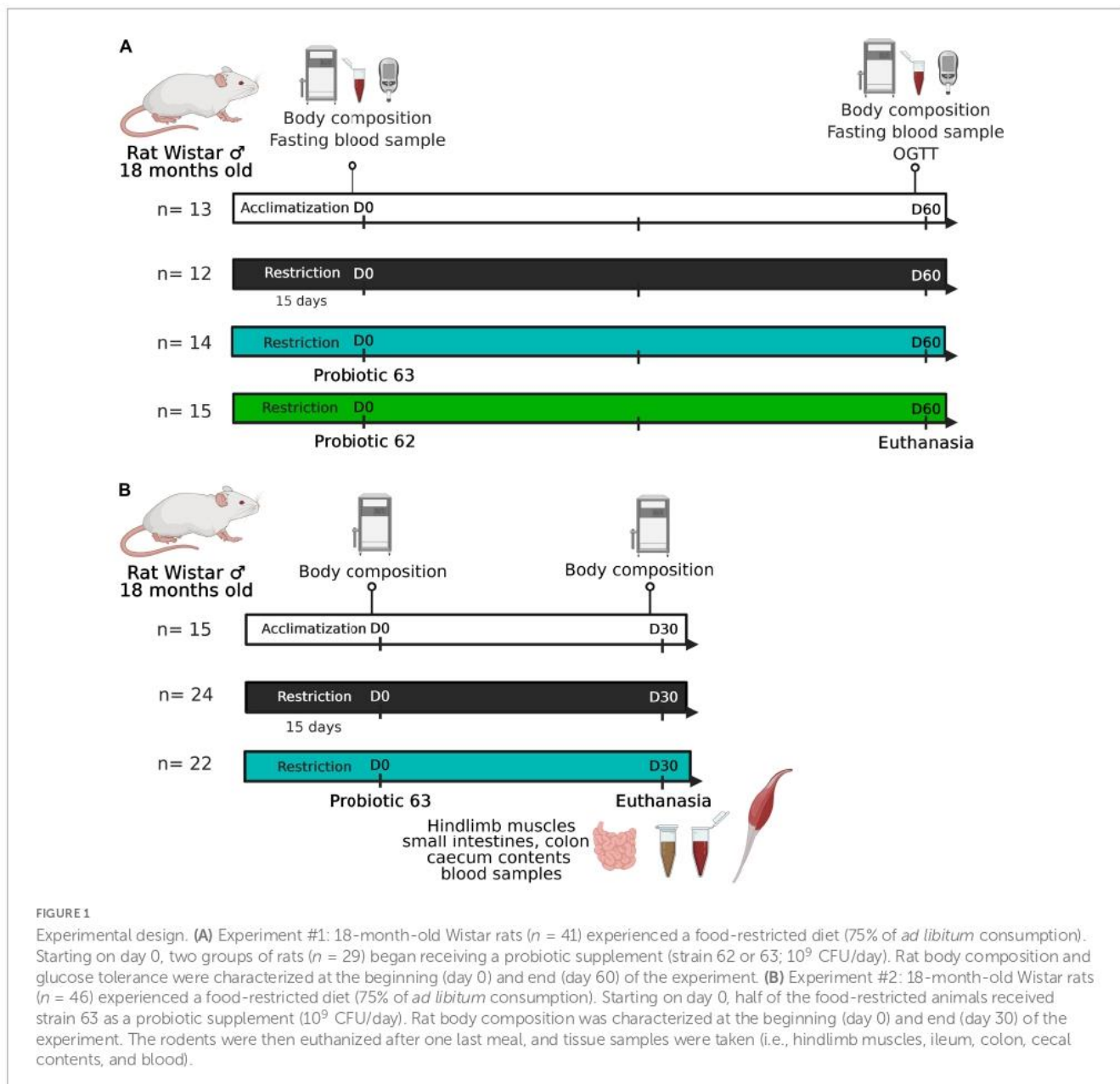
received their daily allotment of food. This second experimental phase lasted 60 days. We measured food consumption daily and body mass three times a week.

Rat body composition was assessed using magnetic resonance imaging (EchoMRI 4-in-1 system, EchoMRI, Houston, TX, United States) at the beginning (day 0) and the end (day 60) of the second experimental phase. An oral glucose tolerance test (OGTT) was also carried out at the end of the second experimental phase (day 60): rats were fasted for 16 h and then force-fed a glucose solution (dose: 1 g/kg BM) (Figure 1A). We took blood samples from the tail vein (anticoagulant: 200 mM EDTA) when rats were in the fasting state and then 15, 30, 60, 90, and 120 min after the administration of glucose. The plasma samples were frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the glucose and insulin analyses could be performed. Glucose levels were measured using GOD-PAP diagnostic reagent (BIOLABO SAS, France), and insulin levels were measured using a commercial ELISA kit in accordance with the manufacturer's instructions (Mercodia, Sweden). Each sample was analyzed in duplicate. The values of the insulin resistance index (HOMA-IR) were calculated as follows: fasting blood insulin (mU/L)  $\times$  fasting blood glucose (mM)/22.5 as determined from the tail blood samples on days 0 and 60.

### Effects of probiotic supplementation on rat intestinal physiology and muscle

A second experiment was performed that again used 18-month-old male Wistar rats (Janvier Labs, France) (Figure 1B). The design was similar to that of the first experiment, except that only the LAB strain showing the most promising results was tested (AL,  $n = 15$ ; R,  $n = 24$ ; R+63,  $n = 22$ ). As there was less measurement-related variability in the second experiment, it lasted 1 month instead of 2 months. By shortening the treatment duration, we limited animal mortality and loss of muscle mass. Food consumption was measured daily, and body mass was measured three times a week. Body composition was assessed *via* MRI before the beginning of the study (day  $-3$ ) and on day 25.

At the end of the second experiment, the animals were euthanized using isoflurane (Figure 1B). An abdominal incision was made, and blood samples were taken from the hepatic vein, portal vein, and abdominal aorta (anticoagulants: EDTA or heparin). The blood was used in biochemical assays (Supplementary Figure 1) that enzymatically measured glucose, lactate, urea, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and total cholesterol concentrations using commercial kits and an automated clinical chemistry analyzer (ABX Pentra 400; Horiba Medical, France). We rapidly removed the hindlimb muscles (gastrocnemius, soleus, tibialis anterior, and extensor digitorum longus). They were weighed, freeze-clamped in liquid nitrogen, and then stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Different parts of the intestines (i.e., the ileum and proximal colon) were cleaned, weighed,



freeze-clamped in liquid nitrogen, and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The contents of the cecum were removed and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for later analysis.

## Tissue analysis

### Gene expression

#### RNA extraction and reverse transcription

We isolated total RNA from 50 mg of ileum/colon tissue and 100 mg of gastrocnemius tissue using TRIzol Reagent (Invitrogen) and an RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions. RNA concentrations and purity were verified using a NanoDrop spectrophotometer

(ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., United States); RNA quality ( $1\ \mu\text{g}$ ) was verified using electrophoresis (1% agarose gel and ethidium bromide). cDNA was synthesized from  $2\ \mu\text{g}$  of DNase-treated RNA (ezDNase, Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific) in accordance with the manufacturer's instructions.

#### Semiquantitative real-time PCR

The cDNA was diluted at 1:50 in RNase-free water. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed using a Bio-Rad CFX-96 detection system and quantitative qPCR SYBR Green reagents. A total of  $10\ \mu\text{l}$  of 2X Power SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) was

mixed with 1  $\mu$ l of both forward and reverse primers (10  $\mu$ M) and 5  $\mu$ l of diluted cDNA (final volume: 20  $\mu$ L). The result was incubated at 95°C for 10 min to activate the polymerase. The primer sequences are provided in Table 2. All the PCRs were performed in duplicate under the following conditions: 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 45 s. The relative levels of the target genes were normalized using the mean expression of 36B4, Hprt1, and Ywhaz as a reference. Relative gene expression was quantified using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

## Western blot

The state of the proteins S6 and eIF2 $\alpha$  (i.e., phosphorylated/dephosphorylated) was assessed to estimate the activation level of the mTOR signaling pathway, which is involved in protein synthesis. To homogenize the fibrous muscle of the gastrocnemius, the tissues were sprinkled with liquid nitrogen in a ball mill (Dangoumeau, Prolabo, Paris, France) as described elsewhere (47). Briefly, a 50-mg aliquot of frozen gastrocnemius powder was homogenized in 10 volumes of lysis buffer. The homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The protein concentrations were determined using the BCA method (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). Protein samples (16  $\mu$ g) were diluted in sample buffer; separated using precast SDS-PAGE (Mini-PROTEAN TGX Precast Gels, BIO-RAD, France); and transferred to a PVDF membrane (Trans-Blot® Turbo™ Midi-size PVDF, BIO-RAD, France). We used the following primary antibodies: rabbit against p-S6 at S235/236 (Cell Signaling Technology 2211S); rabbit against S6 (Cell Signaling Technology 2217S); rabbit against p-eIF2 $\alpha$  at S51 (abcam 32157); and rabbit against eIF2 $\alpha$  (abcam 242148). The dilution ratios were either 1:1,000 or 1:2,000. Secondary anti-rabbit HRP-linked antibodies (Cell Signaling Technology 7074) were added (dilution ratio: 1:2,000). The signals displayed

TABLE 2 Real-time quantitative PCR primers used in analyses of rat muscle, ileum, and colon tissue.

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
<b>Reference genes</b>		
36B4	TTCTAGAGGGTGTCCGCAAT	GCAACAGTCGGGTAGCCAAT
Hprt1	GCAGACTTTGCTTTCCTTGG	TCCACTTTCGCTGATGACAC
Ywhaz	TTGAGCAGAAGACGGAAGGT	CCTCAGCCAAGTAGCGGTAG
<b>Gastrocnemius muscle</b>		
Murf-1	AATGCTCCAGTCGGCCCTG	AGCCCCGAACACCTTGACACA
Atrogin-1	ATCCAGATCAGCAGGCCGGC	CACATGCAGGTCTGGGGCTG
ATG16L	AGGAAGAGGCACGGACTTG	GCCCTCTCTACGCTCGTT
LC3B	CCGGAGCTTCGAACAAGAG	CAGCTGCTTCTCACCCCTGT
Cathepsin L	GGTGGGGCCTATTCTGTGTG	TCGAGGTCCTTGCTGCTACA
<b>Ileum and colon</b>		
GPR43	CTGCTGCCCTCCGGATCGTG	CAGGCCACCAGAGCAGCGAT
GPR41	GCTCTCCAACACTCTGCATCTGT	GCGACGCAGCTTGTTACAGA

36B4, acidic ribosomal phosphoprotein P0; Hprt1, hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase 1; Ywhaz, tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta; Murf-1, muscle RING-finger protein-1; LC3B, microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta; Atg 16L, autophagy related 16-like 1; GPR43, G-protein coupled receptor 43; GPR41, G-protein coupled receptor 41.

by the hybridized bands were estimated using GeneTools software (Syngene).

## Short-chain fatty acids concentrations

Short-chain fatty acid concentrations in the cecal contents were quantified after carrying out water extraction (2 vol/wt) and protein precipitation [10% vol/vol phosphotungstic acid (Sigma-Aldrich)] as described elsewhere (48). Briefly, the short-chain fatty acids (SCFAs) in the acidified supernatant (0.3  $\mu$ l) were separated using a 7890 Gas Chromatography System (Agilent, Les Ulis, France) equipped with a split/splitless injector (ALS7650), a flame-ionization detector, and a Nukol-SP-1000-capillary GC column (15 m  $\times$  0.53 mm, 0.5  $\mu$ m; FSCAP Nukol; Supelco, Saint-Quentin-Fallavier, France). Hydrogen was the carrier gas (flow rate = 10 ml/min). The inlet, column, and detector temperatures were 200, 100, and 240°C, respectively. We used 2-ethylbutyrate (Sigma-Aldrich) as the internal standard. Samples were analyzed in duplicate. The data were collected and the peaks were characterized using OpenLab ChemStation C.01.06 software (Agilent, Les Ulis, France).

## Statistical analysis

All the data were expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The survivorship of *C. elegans* was analyzed using the Kaplan–Meier method, and differences among groups were identified using the log-rank test [*survival* and *survminer* packages in R (43)]. The differences among the rat experimental groups were analyzed using a one-way ANOVA followed by Tukey's tests for *post hoc* analysis (R Studio, Version 1.2.5001, R Studio Inc.). When the data failed to meet the assumption of normality (Shapiro–Wilk normality test), differences among groups were assessed using a Kruskal–Wallis test followed by Dunn's tests for *post hoc* analysis (R Studio, Version 1.2.5001, R Studio Inc.). For all statistical analyses, the alpha level was 0.05; results were considered to represent a trend (t) if  $0.05 < p < 0.10$ .

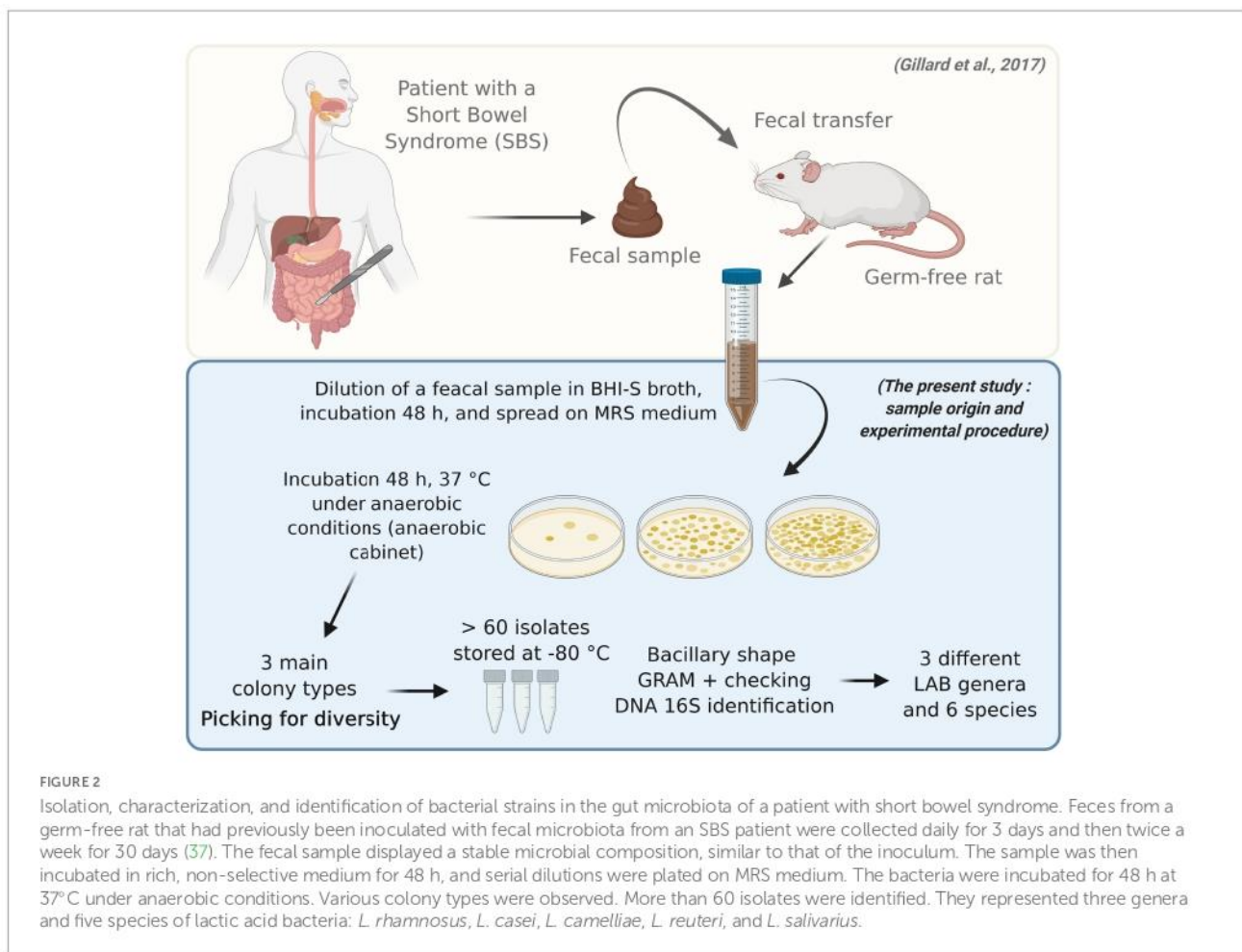
## Results

### Characteristics of the lactic acid bacteria strains

Six Gram-positive, bacilliform strains were isolated from the feces of the axenic rats that had been inoculated with the gut microbiota of an SBS patient (Figure 2). Using 16S sequencing, we identified the presence of the following species: *L. casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lacticaseibacillus camelliae*, *Limosilactobacillus reuteri*, and *Ligilactobacillus salivarius*.

The strains varied morphologically, with lengths ranging from 1 to 2  $\mu$ m (Figure 3A). Strains 3a, 36, 62, and 63





showed relatively similar growth patterns under both aerobic and anaerobic conditions; the lag phase lasted about 2 h, and the stationary phase was reached after 8–9 h (Figure 3B). Strain 10 grew more slowly under both aerobic and anaerobic conditions, reaching the stationary phase after 12 h. Strain 05 also displayed more limited growth: its final turbidity value, a proxy for growth, was 0.7 under anaerobic conditions and 0.3 under aerobic conditions, values were twofold and fivefold lower, respectively, than those seen for other strains (Figure 3B). Strains 10 (*L. salivarius*) and 05 (*L. camelliae*) were therefore excluded from further use. We retained strains 3a (*L. reuteri*), 36 (*L. rhamnosus*), 62 (*L. casei*), and 63 (*L. casei*) for further screening.

## Impacts of lactic acid bacteria on *Caenorhabditis elegans*

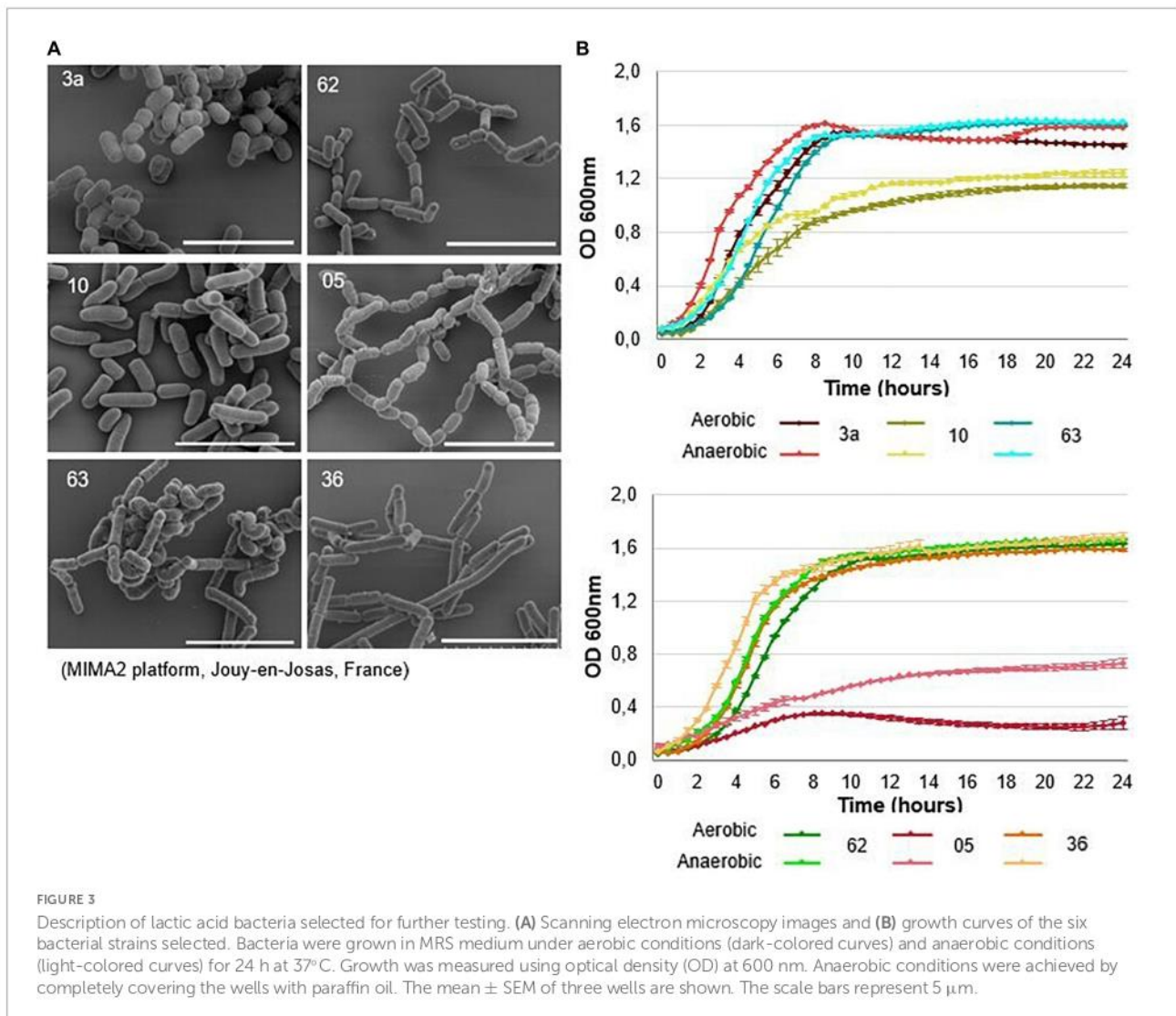
### Survival

Nematode survival differed among the control and treatment groups (Figure 4A). Nematodes fed strain 63 lived 38.5% longer, on average, than control nematodes (median

survival: 18 vs. 13 days, respectively,  $p < 2.10^{-16}$ ) and had 13.6% longer total lifespans (maximum survival: 25 vs. 22 days, respectively,  $p < 2.10^{-16}$ ). Nematodes given strain 62 displayed equivalent survival to the control nematodes. In contrast, nematodes given strains 3a and 36 had significantly lower median survival than the control (strain 3a:  $-72.2\%$ ,  $p < 2.10^{-16}$  and strain 36:  $-77.8\%$ ,  $p < 2.10^{-16}$ ). They were therefore excluded from further use. These results show that nematode survival was greatly affected by the bacterial strains. Among the LAB tested, only strain 63 significantly improved *C. elegans* survival. Because strain 62 yielded effects similar to those of the control, it was also used in further testing.

### Mitochondrial networks

In the body wall muscles of the nematodes, mitochondrial network structure was tubular, intermediate, or fragmented (Figure 4B). As also seen in previous research (44, 46), mitochondrial networks became more fragmented as nematodes aged (day 1 vs. day 13,  $p < 0.001$ ) across all treatment groups (Figure 4C). However, in nematodes fed strain 63, this pattern was delayed compared to the control (individuals with fragmented structure at day 13: 45.3 vs. 78.5%, respectively,



$p < 0.001$ ). Nematodes in this treatment group also conserved tubular structure for longer than did the control nematodes (individuals with tubular structure at day 4: 31.9 vs. 21.1%, respectively,  $p < 0.001$ ). Similarly, in nematodes fed strain 62, 61.5% of individuals displayed fragmented structure on day 13, and 41.7% displayed tubular structure on day 4 ( $p < 0.01$  when compared with the control). These results suggest that strains 62 and 63 slowed down the aging of nematode muscle cells.

By staining the LAB, we were able to confirm that the nematodes had ingested the bacteria (see Figure 4D) and that the bacteria were able to colonize the gut 24 h after ingestion.

## Effects of probiotic supplementation on “frail” rats

We explored the potential positive impacts of probiotic supplementation with LAB using a model of frailty in rats, where

we mimicked a loss of muscle mass induced by decreased food intake, one of the mechanisms responsible for sarcopenia and frailty in elderly humans.

### Experiment #1: Effects of strain 62 and 63 supplementation on “frail” rats

The AL group ate  $29.47 \pm 1.42$  g of food per day (Table 3). In the R, R+62, and R+63 groups, food intake was 71.3, 71.4, and 70.8% of that in the AL group, respectively. Because the three food-restricted groups had equivalent levels of food intake, any differences observed could be attributed to LAB supplementation. The food-restriction treatment decreased rat body mass (BM) at similar levels in all three groups [−11.9, −13.3, and −15.0% compared to initial BM for the R, R+63, and R+62 groups, respectively;  $p < 0.001$  when compared to the AL group (−3.9%)] (Table 3).

In the AL group, fat mass remained stable throughout the experiment (−1.4% of initial fat mass), but lean mass decreased

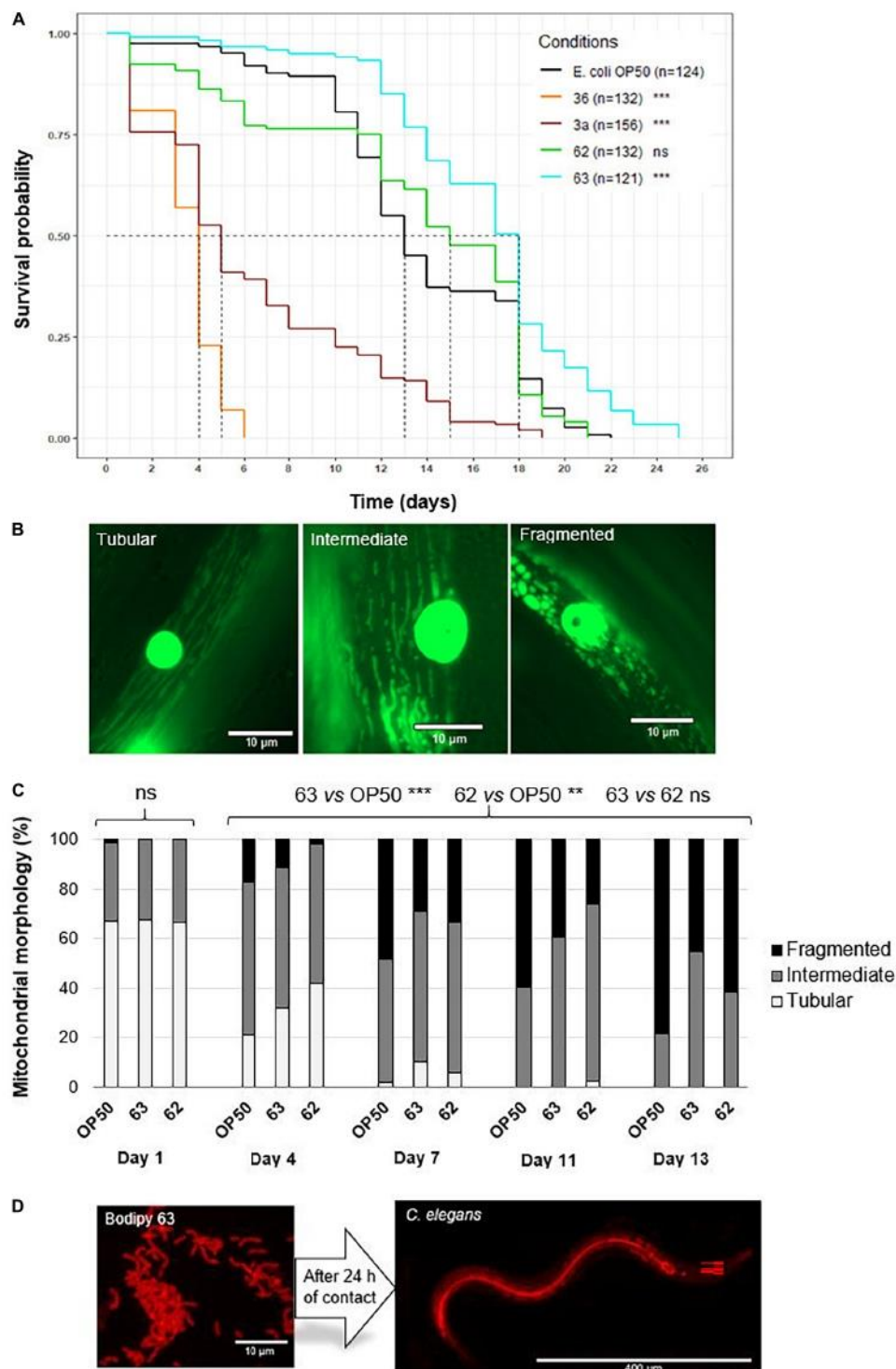


FIGURE 4

Effect of probiotic supplementation on *Caenorhabditis elegans* survival and body wall muscle structure. (A) Median survival of wild-type *C. elegans* (N2 strain) fed *E. coli* OP50 (control group) or one of the six probiotic strains (treatment groups: 3a, 05, 10, 36, 62, and 63). The asterisks indicate the significance of the comparison between the treatment group and the control group (log-rank test; \*\* $p \leq 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns: not statistically significant). (B) Age-related decline in mitochondrial network structure in *C. elegans*. (C) Mitochondrial network structure in *C. elegans* (PJ1277 strain) fed *E. coli* OP50 ( $n = 175$  images), probiotic strain 62 ( $n = 76$  images), or probiotic strain 63 ( $n = 103$  images). Represented are the percentages of nematodes displaying structure that was tubular (white), intermediate (gray), or fragmented (black). (D) BODIPY-stained bacteria in the intestines of *C. elegans* 24 h after ingestion. Significant differences among nematodes over time (day 1, 4, 7, 11, and 13) as well as between the control and the probiotic supplementation groups (strains 62 and 63) were determined using Kruskal–Wallis and Dunn's *post hoc* tests.

**TABLE 3** Food intake, initial body mass, change in body mass, initial fat mass, change in fat mass, initial lean mass, and change in lean mass in the “frail” rat model during experiment #1.

Parameters	AL group	R group	R+63 group	R+62 group
Food intake (g/day)	29.47 ± 1.42 <sup>a</sup>	21.02 ± 0.18 <sup>b</sup>	20.87 ± 0.18 <sup>b</sup>	21.04 ± 0.16 <sup>b</sup>
Initial body mass (g)	615.31 ± 19.62 <sup>a</sup>	603.42 ± 21.76 <sup>a</sup>	588.07 ± 25.98 <sup>a</sup>	617.67 ± 19.82 <sup>a</sup>
Body mass change (g)	−23.92 ± 4.86 <sup>a</sup>	−71.67 ± 9.72 <sup>b</sup>	−78.50 ± 10.90 <sup>b</sup>	−92.33 ± 9.63 <sup>b</sup>
Initial fat mass (g)	114.23 ± 8.06 <sup>a</sup>	126.47 ± 14.88 <sup>a</sup>	133.48 ± 13.22 <sup>a</sup>	134.53 ± 10.73 <sup>a</sup>
Fat mass change (g)	−1.60 ± 3.13 <sup>a</sup>	−42.64 ± 6.86 <sup>b</sup>	−54.90 ± 8.85 <sup>b</sup>	−57.74 ± 7.44 <sup>b</sup>
Initial lean mass (g)	471.47 ± 14.76 <sup>a</sup>	459.65 ± 11.60 <sup>a</sup>	434.85 ± 13.79 <sup>a</sup>	465.09 ± 11.18 <sup>a</sup>
Lean mass change (g)	−20.95 ± 3.00 <sup>a</sup>	−45.57 ± 4.90 <sup>b</sup>	−30.37 ± 3.37 <sup>a</sup>	−43.00 ± 3.48 <sup>b</sup>

Values are means ± SEM. Differences in letters indicate a significant difference between groups (ANOVA and Tukey *post hoc* tests,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 54$  rats).

moderately (−4.4% of initial lean mass), which is a normal pattern in older rodents (49, 50). The food-restriction treatment induced a significant loss of both fat and lean mass (R, R+63, and R+62 groups vs. AL group:  $p < 0.05$ ) (Table 3). The loss of fat mass was similar across the three food-restricted groups (final fat mass range: 33.7–42.9% of initial fat mass). Interestingly, lean mass loss was significantly less pronounced in the R+63 group than in the R group (−45.6 ± 5.0 g vs. −30.4 ± 3.4 g respectively,  $p < 0.05$ ) (Table 3), yet it was equivalent in the R+62 and R groups. These results suggest that strain 63 could more efficiently limit lean mass loss in the face of food restriction.

The experimental groups differed in their insulin resistance at days 0 and 60 (Figure 5A). Because the rats went through a 15-day dietary acclimation period before the experiment began (i.e., food restriction for the R, R+62, and R+63 groups), the three food-restricted groups had 46.8% lower insulin resistance than the AL group at day 0 ( $p < 0.05$ ). Between days 0 and 60, insulin resistance decreased even further in the R+63 group ( $p = 0.056$ ) but not in the R or R+62 groups ( $p > 0.1$  in both). Of note, this difference stems from the fact that, relative to the R group, the R+63 group had slightly, but not significantly, higher insulin resistance at day 0 and slightly lower insulin resistance at day 60. Furthermore, on day 60, oral glucose tolerance at 30 min was 26.5% lower in the R+63 group than in the AL group (4.7 ± 0.4 vs. 6.4 ± 0.5 mM,  $p = 0.007$ ) (Figure 5B). The four groups did not differ significantly in the blood glucose levels (iAUC) measured 1 h after glucose ingestion (data not shown). Insulin levels were identical in the R, R+62, and R+63 groups (Figure 5C). These findings suggest that strain 63 could increase insulin sensitivity at the whole-body level.

At the end of the experiment, levels of glucose, lactate, urea, HDL cholesterol, LDL cholesterol, and total cholesterol did not differ among the four groups (Supplementary Figure 1).

## Experiment #2: Mechanistic action of strain 63 supplementation in rats

### Muscle protein synthesis and breakdown

Because it was the only strain with beneficial effects in the first experiment, strain 63 was the focus of the second,

1-month experiment exploring the bacterium’s mechanisms of action. The study duration was shortened because, during the first experiment, the 2 months of food restriction led to pronounced rat mortality.

As in the first experiment, food intake was 29% lower in both the R and R+63 groups compared to the AL group ( $p < 0.05$ ) (Table 4). The body mass of the AL group remained fairly stable throughout the experiment. Food restriction led to an equivalent decline in body mass in both treatment groups (−5.9 and −5.4% for R and R+63, respectively,  $p < 0.05$  compared to AL) (Table 4). This pattern resulted from the greater loss of both fat and lean mass in the food-restricted groups (R and R+63 vs. AL,  $p < 0.05$ ), with the R+63 group losing relatively more fat mass (R+63 vs. R and AL,  $p < 0.05$ ). Although the R group lost more absolute lean mass than did the R+63 group, the difference was not statistically significant ( $p > 0.1$ ), perhaps because of the experiment’s shorter duration.

However, strain 63 seemed to help preserve protein synthesis in the hindlimb muscles, given that protein levels were 8.0% higher in the R+63 group than in the R group ( $p = 0.02$ ) but similar between the R+63 and AL groups ( $p = 0.76$ ) (Figure 6A).

Losses of muscular protein mass could be explained by the altered activation of the mTOR signaling pathway: compared to the AL group, the R group’s p-S6 phosphorylation levels were 47.9% lower ( $p < 0.05$ ), and its p-eIF2 $\alpha$  levels were 47.6% lower ( $p < 0.01$ ) (Figure 6B). Interestingly, the p-S6/S6 and p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  ratios in the R+63 group were 90.3 and 83.5% of those in the AL group, respectively, indicating that they were partially maintained. The R+63 group occupied an intermediate position: its p-S6/S6 ratio was similar to those of the AL and R groups, but its p-eIF2 $\alpha$ /eIF2 $\alpha$  ratio was not. This result suggests that, when food is restricted, strain 63 could limit muscle atrophy by maintaining the Akt/mTOR/S6 protein synthesis-related pathway within muscles. With regards to protein breakdown, neither food restriction nor strain 63 supplementation affected the expression of genes involved in the ubiquitin proteasome pathway (Atrogin-1 and Murf-1) or autophagy (Lc3b, ATG 16L, and Cathepsin L) (Figure 6C).

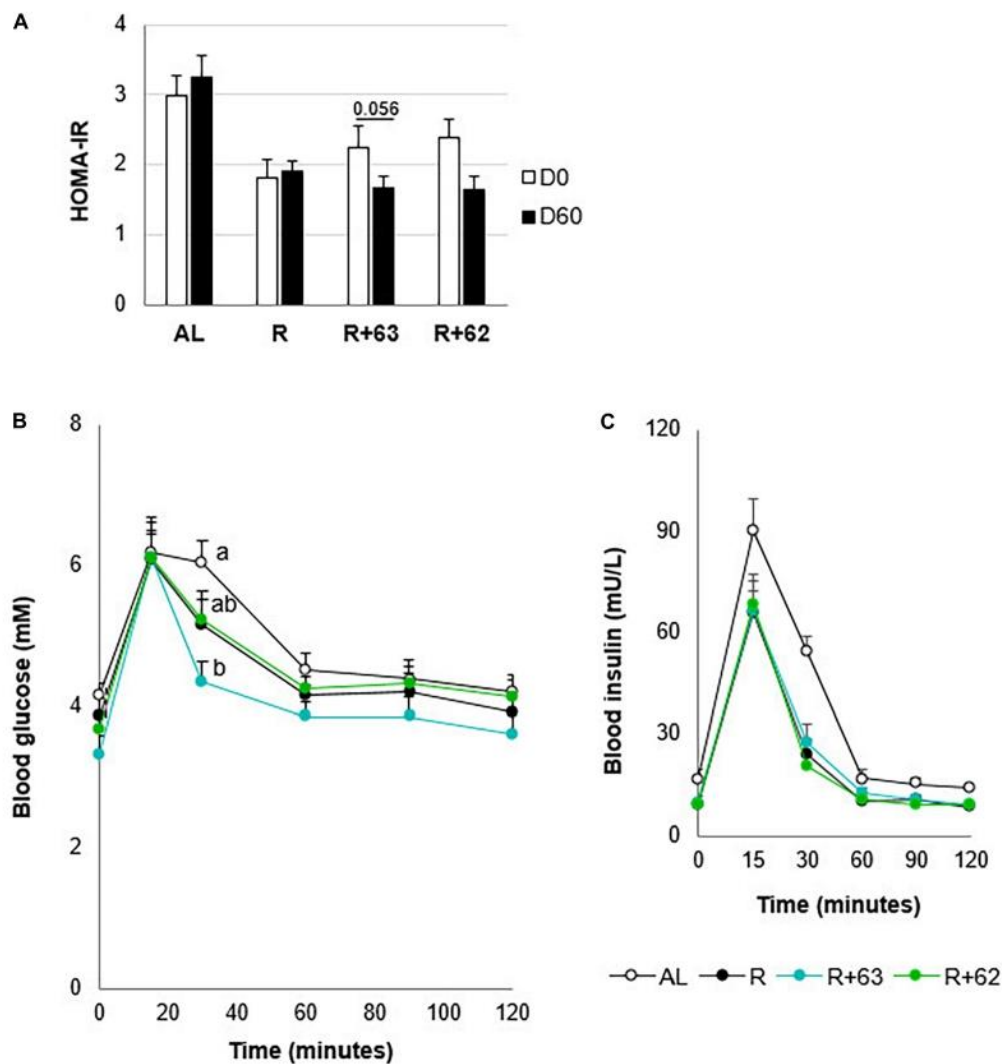


FIGURE 5

Insulin resistance and glucose tolerance in 18-month-old rats fed an *ad libitum* (AL) diet or a food-restricted (R) diet over a 2-month period; two food-restricted groups received a probiotic supplement – either strain 62 (R+62) or strain 63 (R+63). (A) Insulin resistance at the start (day 0) and end (day 60) of the experiment. (B) Plasma glucose levels measured during the oral glucose tolerance test on day 60. (C) Plasma insulin levels during the oral glucose tolerance test on day 60. Values are means  $\pm$  SEM. Differences in letters indicate a significant difference between groups (ANOVA and Tukey *post hoc* tests,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 54$  rats).

## Hindgut

Food restriction significantly decreased cecal levels of propionate (−26.9%), valerate (−21.7%), isovalerate (−34.5%), and isobutyrate (−32.5%) (R vs. AL,  $p < 0.05$ ) (Figure 7A). Only butyrate was unaffected. Valerate, isovalerate, and isobutyrate concentrations tended to be higher in the R+63 group than in the R group (+8.7, +13.8, and +10.0%, respectively,  $p = 0.1$ ). SCFAs interact with specific gut receptors (GPRs), whose expression within the hindgut can be measured. Here, groups did not differ in GPR expression within the colon (Figure 7C). That said, levels of mRNA for GPR43 and GPR41 were, respectively, 1.7-fold and 1.9-fold lower in the R group compared to the AL group ( $p < 0.05$ ) (Figure 7B). In the R+63

group, GPR43 expression was equivalent to that in the AL group; GPR41 expression was somewhat but not entirely similar.

## Discussion

Elderly people often experience a loss of appetite, decreased nutrient absorption, and/or a decline in metabolic efficiency. Such can put them at greater risk of sarcopenia, and they may enter into a state of frailty/dependence. In this study, we started with the gut microbiota of an individual with SBS, because, within the months following intestinal resection surgery, most patients have been found to compensate behaviorally,

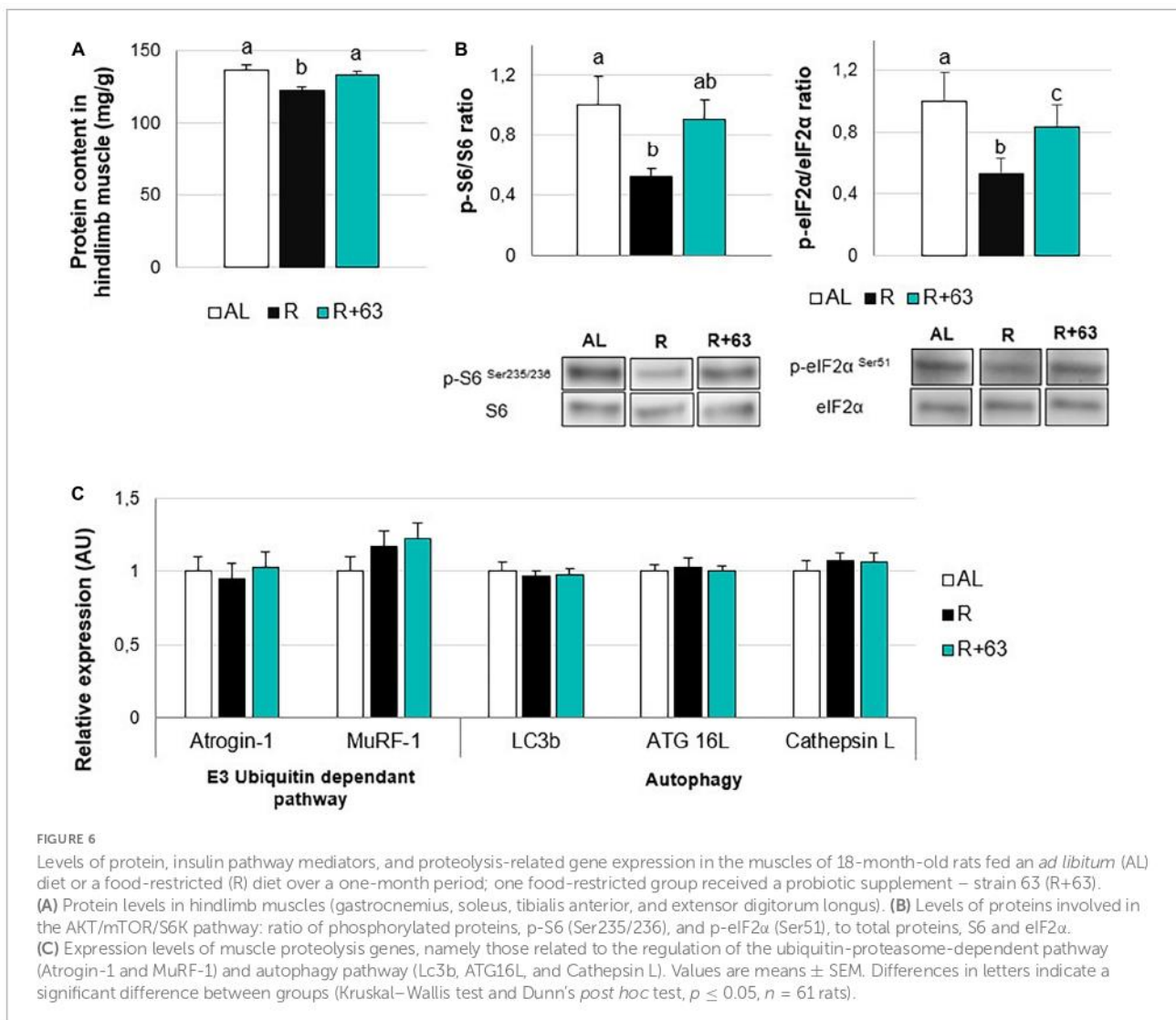
**TABLE 4** Food intake, initial body mass, change in body mass, initial fat mass, change in fat mass, initial lean mass, and change in lean mass in the “frail” rat model during experiment #2.

Parameters	AL group	R group	R+63 group
Food intake (g/day)	29.12 ± 0.30 <sup>a</sup>	20.61 ± 0.03 <sup>b</sup>	20.69 ± 0.05 <sup>b</sup>
Initial body mass (g)	563.47 ± 12.93 <sup>a</sup>	525.92 ± 8.00 <sup>a</sup>	532.73 ± 8.83 <sup>a</sup>
Body mass change (g)	7.53 ± 3.93 <sup>a</sup>	-31.08 ± 3.83 <sup>b</sup>	-28.55 ± 2.85 <sup>b</sup>
Initial fat mass (g)	82.32 ± 5.06 <sup>a</sup>	68.32 ± 3.56 <sup>b</sup>	71.61 ± 3.65 <sup>b</sup>
Fat mass change (g)	10.91 ± 2.44 <sup>a</sup>	-6.30 ± 1.43 <sup>b</sup>	-10.14 ± 1.41 <sup>c</sup>
Initial lean mass (g)	439.41 ± 11.30 <sup>a</sup>	415.78 ± 6.13 <sup>a</sup>	420.99 ± 9.71 <sup>a</sup>
Lean mass change (g)	-1.18 ± 2.79 <sup>a</sup>	-19.18 ± 2.22 <sup>b</sup>	-14.02 ± 2.40 <sup>b</sup>

Values are means ± SEM. Differences in letters indicate a significant difference between groups (ANOVA and Tukey *post hoc* tests,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 61$  rats).

physiologically, and metabolically, eventually restoring effective nutrient absorption (51). These responses include hyperphagia, gut wall hyperplasia, and increased secretion of gut hormones,

and they occur in tandem with changes in gut microbiota composition. Research has shown that the microbiota of SBS patients is quite different from what is seen in “healthy” individuals and is mainly composed of aerobic lactobacilli (36, 37). However, fecal transplants of this microbiota to axenic rats resulted in higher levels of GLP-1, ghrelin, and leptin, as well as the presence of deeper intestinal crypts (37). This research suggested that the SBS microbiota could prompt physiological and metabolic responses that improve nutrient bioavailability. Consequently, we hypothesize that certain members of the SBS microbiota could improve nutrient availability and anabolic effects in elderly people with decreased food intake and sarcopenia. Here, we showed that when one of these bacteria, *L. casei* CNCM I-5663 (strain 63), was ingested daily for 1 month, food-restricted rats were able to preserve muscle protein mass by improving both protein synthesis within the muscle tissue and insulin sensitivity within the muscle and whole body.



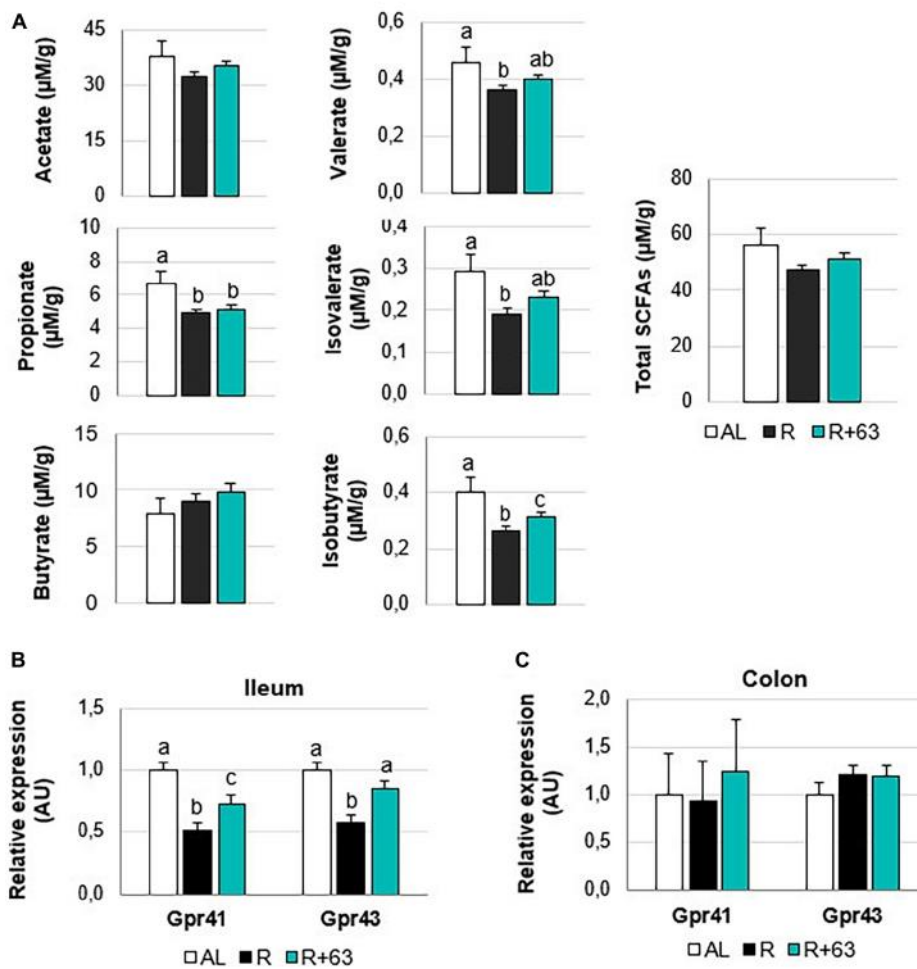


FIGURE 7

Short-chain fatty acids levels in the cecal contents and expression of GPR41 and GPR43 in the colon and ileum of 18-month-old rats fed an *ad libitum* (AL) diet or a food-restricted (R) diet over 1-month period; one food-restricted group received a probiotic supplement – strain 63 (R+63). (A) Levels of the SCFAs acetate, propionate, butyrate, valerate, isovalerate, and isobutyrate in the cecal contents of the R and R+63 groups. (B) GPR41 and GPR43 expression in the distal ileum. (C) GPR41 and GPR43 expression in the proximal colon. Values are means  $\pm$  SEM. Differences in letters indicate a significant difference between groups (Kruskal–Wallis test and Dunn's *post hoc* test,  $p \leq 0.05$ ,  $n = 61$  rats).

Research has already been exploring the use of human microbiota in probiotic treatments. To date, the focus has been on comparing the effects of gut microbiota from people with “healthy” phenotypes vs. “unhealthy” phenotypes. This work has been based on the assumption that a “healthy microbiota” is enriched in certain bacterial genera/species (i.e., symbionts) that have health benefits whereas an “unhealthy” microbiota lacks these same bacteria. For example, in humans, when the relative abundance of *Akkermansia muciniphila* is higher, the risk of metabolic syndrome is lower (52, 53). *Akkermansia* supplementation is effective in limiting the occurrence of metabolic disorders in both rodents (54) and humans (55). *Faecalibacterium prausnitzii* shows promise as a probiotic because of its anti-inflammatory effects (56, 57). On this same note, clinical work has found that levels of *F. prausnitzii* were lower in

people with chronic inflammatory bowel disease vs. healthy individuals (58).

In contrast, the SBS microbiota is extremely different from the above “healthy” microbiota because it is 90% composed of LAB (mainly the genera *Lactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, and *Limosilactobacillus*), a group with less than 1% representation in “healthy” individuals (36). To explore the potential probiotic properties of interest to us within this atypical microbiota, we employed an additional screening step that exploited a useful *in vivo* model, the nematode *C. elegans* (59, 60). Various screening parameters can be used with this model: colonization of the intestine, survival rate, oxidative stress, and levels of proteins or genes involved in metabolic pathway regulation (61–63). In probiotics testing, the *E. coli* strain OP50 is generally used as the control, as was the case here. In our study, we used survival as a key screening parameter.

We also used a *C. elegans* mutant from the Caenorhabditis Genetics Center that can be exploited to highlight muscle structure and function (60). With GFP-labeled nematodes, it is possible to visualize sarcomeres and mitochondria in the muscle tissue *via* fluorescence microscopy (64). Strains 62 and 63 maintained the muscle mitochondrial network in a less-fragmented state over time compared to control worms, suggesting that they had a positive effect on muscle integrity. Furthermore, nematode survival was maintained (strain 62) and even increased (strain 63) compared to OP50-fed worms. Because of these promising results, strains 62 and 63 were then tested in a model of frail rodents.

Our model consisted of elderly rats (18 months) subject to a moderate level of food restriction, which imitates a situation in which nutrient availability is limited, prompting a decrease in muscle mass. We showed that strain 63 helped preserve lean mass in the face of food restriction during both the 2-month and 1-month experiments. In contrast, we saw no tangible benefits arising from strain 62. Over recent years, several studies have tested the health effects of probiotic bacteria in elderly animals [see Giron et al. (29) for a recent review]. To our knowledge, none of this research has applied conditions of food restriction, even though lower food intake contributes to sarcopenia and frailty in elderly people (1, 65–69). Indeed, it has been estimated that those at greatest risk are those whose energy and protein intake are at 75–80% of recommended levels (energy: 1,300–1,600 kcal/day for women and 1,400–1,900 kcal/day for men (70–72); protein: 0.8 g/kg of body mass/day (68)). The rats in our model were therefore fed 70–75% of the quantity consumed by rats on an *ad libitum* diet.

A few studies have investigated microbiota–gut–muscle interactions in rodents. They have shown that probiotic supplementation regimes lasting from 3 to 12 weeks can positively influence muscle mass and/or function (e.g., grip strength, running time, and markers of fatigue) in young mice (21, 22, 73), rats (23, 24), or SAMP8 mice, a model of accelerated aging (30–32). There is even less research examining how probiotic supplementation impacts muscle mass and function in elderly humans. The single study performed to date found that *Lactobacillus plantarum* TWK10 had beneficial effects on muscle mass and strength in frail elderly people (74). Our study has confirmed that microbiota-based treatments could help limit sarcopenia in this population. Additionally, we would argue that our approach could be effective in challenging nutritional contexts in which dietary supplementation strategies would be difficult to implement. Finally, our results have shed light on the mechanisms by which the probiotic is likely acting.

First, we found that probiotic supplementation improved insulin sensitivity at the whole-body level and enhanced glucose tolerance. This discovery fits with past work showing that the gut microbiota in general, and certain bacteria and metabolites in particular, may be involved in glucose homeostasis (75). Indeed, alterations may underlie the development of metabolic disorders

and insulin resistance [for a review, see Régnier et al. (76)]. Additionally, recent studies on insulin-resistant rodents have shown that probiotic supplementation (mainly with *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Akkermansia* species) could dampen insulin resistance (77), a phenomenon that could be partially explained by changes in the microbial metabolites (i.e., SCFAs) interacting with gut epithelial cells. Here, we did not see an increase in cecal SCFA levels following probiotic supplementation, except in the case of minor SCFAs (isobutyrate and, to a lesser extent, valerate and isovalerate). However, within the ileum, there was an escalation in the expression of two insulin-sensitizing receptors (GPR41 and GPR43). This observation suggests that strain 63 improved insulin sensitivity by boosting receptor expression instead of SCFA production. It is possible to link the effects of strain 63 on GRP 41 and 43 to the increased secretion of incretin and, in particular, of GLP-1 (37, 39), whose secretory cells are located in the distal ileum (78). Contrary to previously tested probiotics, strain 63 did not appear to alter inflammatory targets, such as TNF- $\alpha$ , in the ileum and muscle tissues (Supplementary Figure 2). The effects we saw seemed to be independent of intestinal barrier integrity and permeability. Mechanistically, by increasing insulin sensitivity, strain 63 could positively influence protein metabolism in the muscles and promote a stronger anabolic response, which could, in turn, explain the better maintenance of muscle protein mass.

Muscle protein mass results from the balance between muscle protein synthesis and proteolysis, an interplay that is shaped by the presence of dietary amino acids and insulin and that can become dysregulated during aging (4, 7, 79). In this study, the food-restriction treatment lowered amino acid availability. Furthermore, strain 63 likely acted on the gut-muscle cross-talk by mediating insulin and its signaling pathway, thus affecting protein synthesis and proteolysis (i.e., the Akt/mTOR pathway). It seems unlikely that the strain operated by inhibiting muscle protein breakdown *via* the ATP-ubiquitin proteasome and autophagy-lysosome systems, which are the two main forces behind muscle protein degradation (80). This result contrasts with those of previous studies in which probiotic supplementation was found to inhibit proteolysis. This difference probably arises from the fact that such studies used models simulating situations of dramatic inflammation, such as cancer cachexia (81, 82). In our “frail” rat model, no increase was seen in either the markers of muscle proteolysis (mRNA for Atrogin-1, Murf-1, Lc3b, ATG16L, and Cathepsin L in gastrocnemius muscle) or the markers of inflammation (mRNA for TNF- $\alpha$  in the ileum and muscle tissue) in the non-supplemented food-restricted group (Supplementary Figure 2). These findings concur with those of past research: a dietary restriction treatment similar to ours had no effect on the expression of the muscle atrophy markers, Atrogin-1 and Murf-1 (83–85). It seems probable that further research using a different model of frailty (i.e., one that is not based on food restriction) is needed to better explore how



muscle proteolysis might be mediated by atrogenes. Here, it was apparent that probiotic supplementation functioned by increasing muscle protein synthesis: the treatment maintained the phosphorylation levels of proteins that help regulate protein synthesis *via* mTOR activation (S6 and eIF2 $\alpha$ ). The mTOR pathway is a strong driver of insulin-mediated protein synthesis (80), which can explain why probiotic supplementation had a long-term impact on muscle protein mass. Indeed, previous studies have found that probiotics can have stimulatory effects on mTOR pathway components (Akt, S6K, and mTOR) in both cachectic muscles (81) and non-cachectic muscles (23).

## Conclusion

In conclusion, using our model of frail rodents, we discovered that supplementation with *L. casei* 63 could limit muscle loss due to age and food restriction. Mechanistically, the strain acted by improving insulin sensitivity at the whole-body level and within muscles, which led to the maintenance of protein synthesis. In contrast to other probiotics we have tested, whose target is the immune response (Patent WO2020020540A1), *L. casei* 63 directly operates on protein anabolism along the gut–muscle axis *via* the insulin response, which is independent of inflammation status. This strain thus shows promise, and its use as a complementary tool for preventing sarcopenia in the elderly should be considered in the future. Indeed, *L. casei* 63 supplementation could be effective in individuals for which common strategies such as protein supplementation or physical exercise have failed.

## Data availability statement

The original contributions presented in this study are included in the article/**Supplementary material**, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee of Auvergne (CEMEA Auvergne; Permit Number: C2EA-02) and the Ministry of Higher Education and Research.

## Author contributions

IS-A, CC, and MT came up with the main research ideas. CM, MG, and CC isolated and identified the bacteria strains. MG performed the experimental work on *C. elegans*. IS-A, MJ, and DD designed the experimental work on rats. IS-A,

MJ, MG, DD, and CC collected samples from the rats. MG and MJ performed laboratory analyses on the samples. M-LN, GF, and CM provided technical support with the MS-GC and spectrophotometry. MG and IS-A carried out the data analysis and the statistical analysis, created the tables/figures, and wrote the manuscript. DD and CC helped revise and improve the manuscript. All authors have read the manuscript and agreed to its submission.

## Funding

This work was supported by the Carnot Institute Qualiment and the French National Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE).

## Acknowledgments

We thank the animal facility staff (at INRAE IEN, Clermont-Ferrand, France) for their technical assistance. We thank S. Bornes, P. Veisseire, and M. Bonnet (University of Clermont-Auvergne, INRAE UMRE, Aurillac, France) for their help in the lab and their nematode expertise. We thank P. Charlard and C. Michelin (University of Clermont-Auvergne, INP, CNRS, ICCF, Clermont-Ferrand, France) for providing us with BODIPY staining solution. Finally, we thank T. Meylheuc and the MIMA2 platform (INRAE Jouy-en-Josas, France) for the electron microscopy photographs. **Figures 1, 7** were created with **BioRender.com**.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

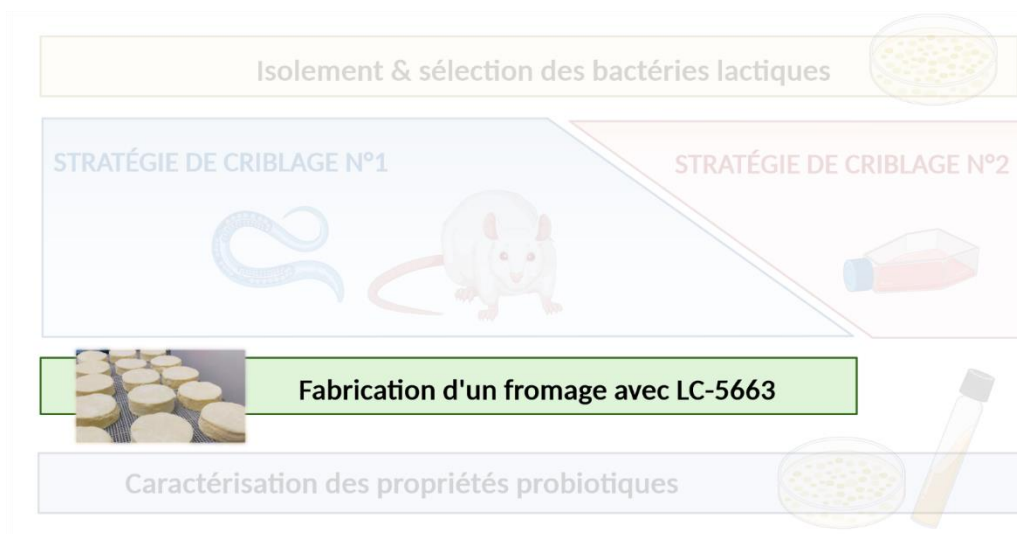
The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.928798/full#supplementary-material>

## References

- Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: Revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. (2019) 48:16–31. doi: 10.1093/ageing/afy169
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: Evidence for a phenotype. *J Gerontol Series A Biol Sci Med Sci*. (2001) 56:M146–57. doi: 10.1093/gerona/56.3.M146
- Marzetti E, Calvani R, Tosato M, Cesari M, Di Bari M, Cherubini A, et al. Sarcopenia: An overview. *Aging Clin Exp Res*. (2017) 29:11–7. doi: 10.1007/s40520-016-0704-5
- Dardevet D, Rémond D, Peyron M-A, Papet I, Savary-Auzeloux I, Mosoni L. Muscle wasting and resistance of muscle anabolism: The “anabolic threshold concept” for adapted nutritional strategies during sarcopenia. *Sci World J*. (2012) 2012:1–6. doi: 10.1100/2012/269531
- Casati M, Ferri E, Azzolino D, Cesari M, Arosio B. Gut microbiota and physical frailty through the mediation of sarcopenia. *Exp Gerontol*. (2019) 124:110639. doi: 10.1016/j.exger.2019.110639
- Cruz-Jentoft AJ, Dawson Hughes B, Scott D, Sanders KM, Rizzoli R. Nutritional strategies for maintaining muscle mass and strength from middle age to later life: A narrative review. *Maturitas*. (2020) 132:57–64. doi: 10.1016/j.maturitas.2019.11.007
- Dardevet D, Mosoni L, Savary-Auzeloux I, Peyron M-A, Polakof S, Rémond D. Important determinants to take into account to optimize protein nutrition in the elderly: Solutions to a complex equation. *Proc Nutr Soc*. (2020) 80:207–20. doi: 10.1017/S0029665120007934
- Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*. (2016) 65:330–9. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309990
- Schroeder BO, Bäckhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. (2016) 22:1079–89. doi: 10.1038/nm.4185
- Meng X, Zhang G, Cao H, Yu D, Fang X, de Vos WM, et al. Gut dysbiosis and intestinal disease: Mechanism and treatment. *J Appl Microbiol*. (2020) 129:787–805. doi: 10.1111/jam.14661
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. (2006) 444:1027–31. doi: 10.1038/nature05414
- Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *PNAS*. (2007) 104:979–84. doi: 10.1073/pnas.0605374104
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature*. (2012) 488:178–84. doi: 10.1038/nature11319
- Jackson MA, Jeffery IB, Beaumont M, Bell JT, Clark AG, Ley RE, et al. Signatures of early frailty in the gut microbiota. *Genome Med*. (2016) 8:8. doi: 10.1186/s13073-016-0262-7
- O'Toole PW, Claesson MJ. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *Int Dairy J*. (2010) 20:281–91. doi: 10.1016/j.idairyj.2009.11.010
- Ticinesi A, Lauretani F, Milani C, Nouvenne A, Tana C, Del Rio D, et al. Aging Gut microbiota at the cross-road between nutrition, physical frailty, and sarcopenia: Is there a gut-muscle axis? *Nutrients*. (2017) 9:1303. doi: 10.3390/nu9121303
- Grosicki GJ, Fielding RA, Lustgarten MS. Gut microbiota contribute to age-related changes in skeletal muscle size, composition, and function: Biological basis for a gut-muscle axis. *Calcif Tissue Int*. (2018) 102:433–42. doi: 10.1007/s00223-017-0345-5
- Lahiri S, Kim H, Garcia-Perez I, Reza MM, Martin KA, Kundu P, et al. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med*. (2019) 11:eaan5662. doi: 10.1126/scitranslmed.aan5662
- de Sire A, de Sire R, Curci C, Castiglione F, Wahli W. Role of dietary supplements and probiotics in modulating microbiota and bone health: The gut-bone axis. *Cells*. (2022) 11:743. doi: 10.3390/cells11040743
- Nardone OM, de Sire R, Petito V, Testa A, Villani G, Scalfaferrri F, et al. Inflammatory bowel diseases and sarcopenia: The role of inflammation and gut microbiota in the development of muscle failure. *Front Immunol*. (2021) 12:694217. doi: 10.3389/fimmu.2021.694217
- Lee M-C, Hsu Y-J, Ho H-H, Hsieh S-H, Kuo Y-W, Sung H-C, et al. *Lactobacillus salivarius* Subspecies *salicinii* SA-03 is a new probiotic capable of enhancing exercise performance and decreasing fatigue. *Microorganisms*. (2020) 8:545. doi: 10.3390/microorganisms8040545
- Lee M-C, Hsu Y-J, Chuang H-L, Hsieh P-S, Ho H-H, Chen W-L, et al. In Vivo ergogenic properties of the *Bifidobacterium longum* OLP-01 isolated from a weightlifting gold medalist. *Nutrients*. (2019) 11:2003. doi: 10.3390/nu11092003
- Toda K, Yamauchi Y, Tanaka A, Kuhara T, Odamaki T, Yoshimoto S, et al. Heat-Killed *Bifidobacterium breve* B-3 enhances muscle functions: Possible involvement of increases in muscle mass and mitochondrial biogenesis. *Nutrients*. (2020) 12:219. doi: 10.3390/nu12010219
- Soares ADN, Wanner SP, Morais ESS, Hudson ASR, Martins FS, Cardoso VN. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* Increases the Maximal Oxygen Consumption and Maximal Aerobic Speed Attained by Rats Subjected to an Incremental-Speed Exercise. *Nutrients*. (2019) 11:2352. doi: 10.3390/nu11102352
- Ni Y, Yang X, Zheng L, Wang Z, Wu L, Jiang J, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* improves physiological function and cognitive ability in aged mice by the regulation of gut microbiota. *Mol Nutr Food Res*. (2019) 63:1900603. doi: 10.1002/mnfr.201900603
- Przewłocka K, Folwarski M, Kaźmierczak-Siedlecka K, Skonieczna-Żydecka K, Kaczor JJ. Gut-muscle axis exists and may affect skeletal muscle adaptation to training. *Nutrients*. (2020) 12:1451. doi: 10.3390/nu12051451
- Duncan SH, Flint HJ. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*. (2013) 75:44–50. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.02.004
- Druart C, Alligier M, Salazar N, Neyrinck AM, Delzenne NM. Modulation of the gut microbiota by nutrients with prebiotic and probiotic properties. *Adv Nutr*. (2014) 5:624S–33S. doi: 10.3945/an.114.005835
- Giron M, Thomas M, Dardevet D, Chassard C, Savary-Auzeloux I. Gut microbes and muscle function: Can probiotics make our muscles stronger? *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. (2022) 13:1460–76. doi: 10.1002/jcsm.12964
- Chen L-H, Huang S-Y, Huang K-C, Hsu C-C, Yang K-C, Li L-A, et al. *Lactobacillus paracasei* PS23 decelerated age-related muscle loss by ensuring mitochondrial function in SAMP8 mice. *Aging*. (2019) 11:756–70. doi: 10.18632/aging.101782
- Chen L-H, Chang S-S, Chang H-Y, Wu C-H, Pan C-H, Chang C-C, et al. Probiotic supplementation attenuates age-related sarcopenia via the gut-muscle axis in SAMP8 mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. (2021) 13:515–31. doi: 10.1002/jcsm.12849
- Lin S-W, Tsai Y-S, Chen Y-L, Wang M-F, Chen C-C, Lin W-H, et al. An examination of *Lactobacillus paracasei* GKS6 and *Bifidobacterium lactis* GKK2 isolated from infant feces in an aged mouse model. *Evid Based Complement Alternat Med*. (2021) 2021:6692363. doi: 10.1155/2021/6692363
- Hor Y-Y, Ooi C-H, Khoo B-Y, Choi S-B, Seeni A, Shamsuddin S, et al. *Lactobacillus* strains alleviated aging symptoms and aging-induced metabolic disorders in aged rats. *J Med Food*. (2019) 22:1–13. doi: 10.1089/jmf.2018.4229
- Varian BJ, Goureshetti S, Poutahidis T, Lakritz JR, Levkovich T, Kwok C, et al. Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget*. (2016) 7:11803–16. doi: 10.18632/oncotarget.7730
- Lee K, Kim J, Park S-D, Shim J-J, Lee J-L. *Lactobacillus plantarum* HY7715 ameliorates sarcopenia by improving skeletal muscle mass and function in aged Balb/c mice. *Int J Mol Sci*. (2021) 22:10023. doi: 10.3390/ijms221810023
- Joly F, Mayeur C, Bruneau A, Noordine M-L, Meylheuc T, Langella P, et al. Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie*. (2010) 92:753–61. doi: 10.1016/j.biochi.2010.02.015
- Gillard L, Mayeur C, Robert V, Pingenot I, Le Beyec J, Bado A, et al. Microbiota is involved in post-resection adaptation in humans with short bowel syndrome. *Front Physiol*. (2017) 8:224. doi: 10.3389/fphys.2017.00224
- Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Hansen BS, Holst JJ, Poulsen SS, et al. Elevated plasma glucagon-like peptide 1 and 2 concentrations in ileum resected short bowel patients with a preserved colon. *Gut*. (2000) 47:370–6. doi: 10.1136/gut.47.3.370
- Gillard L, Billiauws L, Stan-Iuga B, Ribeiro-Parenti L, Jarry A-C, Cavin J-B, et al. Enhanced ghrelin levels and hypothalamic orexigenic AgRP and NPY neuropeptide expression in models of jejuno-colonic short bowel syndrome. *Sci Rep*. (2016) 6:28345. doi: 10.1038/srep28345
- Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol*. (1997) 63:2802–13.
- Mayeur C, Grataudoux J-J, Bridonneau C, Chegdani F, Larroque B, Kapel N, et al. Faecal D/L lactate ratio is a metabolic signature of microbiota imbalance in patients with short bowel syndrome. *PLoS One*. (2013) 8:e54335. doi: 10.1371/journal.pone.0054335

42. Gaffney CJ, Bass JJ, Barratt TF, Szewczyk NJ. Methods to assess subcellular compartments of muscle in *C. elegans*. *J Vis Exp*. (2014):e52043. doi: 10.3791/52043
43. Poupet C, Saraoui T, Veisseire P, Bonnet M, Dausset C, Gachinat M, et al. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. *PLoS One*. (2019) 14:e0216184. doi: 10.1371/journal.pone.0216184
44. Regmi SG, Rolland SG, Conrad B. Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan. *Aging*. (2014) 6:118–30. doi: 10.18632/aging.100639
45. Momma K, Homma T, Isaka R, Sudevan S, Higashitani A. Heat-induced calcium leakage causes mitochondrial damage in *Caenorhabditis elegans* body-wall muscles. *Genetics*. (2017) 206:1985–94. doi: 10.1534/genetics.117.202747
46. Gaffney CJ, Pollard A, Barratt TF, Constantin-Teodosiu D, Greenhaff PL, Szewczyk NJ. Greater loss of mitochondrial function with ageing is associated with earlier onset of sarcopenia in *C. elegans*. *Aging*. (2018) 10:3382–96. doi: 10.18632/aging.101654
47. Jarzaguet M, Polakof S, David J, Migné C, Joubrel G, Efstathiou T, et al. A meal with mixed soy/whey proteins is as efficient as a whey meal in counteracting the age-related muscle anabolic resistance only if the protein content and leucine levels are increased. *Food Funct*. (2018) 9:6526–34. doi: 10.1039/c8fo01903g
48. Lan A, Bruneau A, Bensaada M, Philippe C, Bellaud P, Rabot S, et al. Increased induction of apoptosis by *Propionibacterium freudenreichii* TL133 in colonic mucosal crypts of human microbiota-associated rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Br J Nutr*. (2008) 100:1251–9. doi: 10.1017/S0007114508978284
49. Wolden-Hanson T. Changes in body composition in response to challenges during aging in rats. *Interdiscip Top Gerontol*. (2010) 37:64–83. doi: 10.1159/000319995
50. Feely Rebecca S, Larkin LM, Halter JB, Dengel DR. Chemical versus dual energy x-ray absorptiometry for detecting age-associated body compositional changes in male rats. *Exp Gerontol*. (2000) 35:417–27.
51. Le Beyec J, Billiauw L, Bado A, Joly F, Le Gall M. Short bowel syndrome: A paradigm for intestinal adaptation to nutrition? *Annu Rev Nutr*. (2020) 40:299–321. doi: 10.1146/annurev-nutr-011720-122203
52. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. (2013) 8:e71108. doi: 10.1371/journal.pone.0071108
53. Dao MC, Everard A, Aron-Wisniewski J, Sokolovska N, Prifti E, Verger EO, et al. *Akkermansia muciniphila* and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*. (2016) 65:426–36. doi: 10.1136/gutjnl-2014-308778
54. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2013) 110:9066–71. doi: 10.1073/pnas.1219451110
55. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: A proof-of-concept exploratory study. *Nat Med*. (2019) 25:1096–103. doi: 10.1038/s41591-019-0495-2
56. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2008) 105:16731–6. doi: 10.1073/pnas.0804812105
57. He X, Zhao S, Li Y. *Faecalibacterium prausnitzii*: A next-generation probiotic in gut disease improvement. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. (2021) 2021:e6666114. doi: 10.1155/2021/6666114
58. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. (2009) 15:1183–9. doi: 10.1002/ibd.20903
59. Park MR, Yun HS, Son SJ, Oh S, Kim Y. Short communication: Development of a direct in vivo screening model to identify potential probiotic bacteria using *Caenorhabditis elegans*. *J Dairy Sci*. (2014) 97:6828–34. doi: 10.3168/jds.2014-8561
60. Poupet C, Chassard C, Nivoliez A, Bornes S. *Caenorhabditis elegans*, a host to investigate the probiotic properties of beneficial microorganisms. *Front Nutr*. (2020) 7:135. doi: 10.3389/fnut.2020.00135
61. Grompone G, Martorell P, Llopis S, González N, Genovés S, Mulet AP, et al. Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. (2012) 7:e52493. doi: 10.1371/journal.pone.0052493
62. Han B, Sivaramakrishnan P, Lin C-CJ, Neve IAA, He J, Tay LWR, et al. Microbial genetic composition tunes host longevity. *Cell*. (2017) 169:1249.e–62.e. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.036
63. Zhang J, Holdorf AD, Walhout AJ. *C. elegans* and its bacterial diet as a model for systems-level understanding of host–microbiota interactions. *Curr Opin Biotechnol*. (2017) 46:74–80. doi: 10.1016/j.copbio.2017.01.008
64. Wang S, Ahmadi S, Nagpal R, Jain S, Mishra SP, Kavanagh K, et al. Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed *Lactobacillus paracasei* D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: From *C. elegans* to mice. *GeroScience*. (2020) 42:333–52. doi: 10.1007/s11357-019-00137-4
65. Robinson S, Cooper C, Aihie Sayer A. Nutrition and sarcopenia: A review of the evidence and implications for preventive strategies. *J Aging Res*. (2012) 2012:e510801. doi: 10.1155/2012/510801
66. Tsutsumimoto K, Doi T, Nakakubo S, Kim M, Kurita S, Ishii H, et al. Association between anorexia of ageing and sarcopenia among Japanese older adults. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. (2020) 11:1250–7. doi: 10.1002/jcsm.12571
67. Merchant RA, Woo J, Morley JE. Anorexia of ageing: Pathway to frailty and sarcopenia. *J Nutr Health Aging*. (2022) 26:3–5. doi: 10.1007/s12603-021-1703-6
68. Sieber CC. Malnutrition and sarcopenia. *Aging Clin Exp Res*. (2019) 31:793–8. doi: 10.1007/s40520-019-01170-1
69. Tournadre A, Vial G, Capel F, Soubrier M, Boirie Y. Sarcopenia. *Joint Bone Spine*. (2019) 86:309–14. doi: 10.1016/j.jbspin.2018.08.001
70. Payette H, Gray-Donald K. Dietary intake and biochemical indices of nutritional status in an elderly population, with estimates of the precision of the 7-d food record. *Am J Clin Nutr*. (1991) 54:478–88. doi: 10.1093/ajcn/54.3.478
71. Wakimoto P, Block G. Dietary intake, dietary patterns, and changes with age: An epidemiological perspective. *J Gerontol Series A*. (2001) 56:65–80. doi: 10.1093/gerona/56.suppl\_2.65
72. Tieland M, den Berg KJB, Loon LV, Groot L. Dietary protein intake in community-dwelling, frail, and institutionalized elderly people: Scope for improvement. *Eur J Nutr*. (2011) 51:173–179. doi: 10.1007/s00394-011-0203-6
73. Chen Y-M, Wei L, Chiu Y-S, Hsu Y-J, Tsai T-Y, Wang M-F, et al. *Lactobacillus plantarum* TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice. *Nutrients*. (2016) 8:205. doi: 10.3390/nu8040205
74. Lee M-C, Tu Y-T, Lee C-C, Tsai S-C, Hsu H-Y, Tsai T-Y, et al. *Lactobacillus plantarum* TWK10 improves muscle mass and functional performance in frail older adults: A randomized. *Double Blind Clin Trial Microorg*. (2021) 9:1466. doi: 10.3390/microorganisms9071466
75. Krautkramer KA, Fan J, Bäckhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nat Rev Microbiol*. (2020) 19:77–94. doi: 10.1038/s41579-020-0438-4
76. Régnier M, Van Hul M, Knauf C, Cani PD. Gut microbiome, endocrine control of gut barrier function and metabolic diseases. *J Endocrinol*. (2021) 248:R67–82. doi: 10.1530/JOE-20-0473
77. Salles BIM, Cioffi D, Ferreira SRG. Probiotics supplementation and insulin resistance: A systematic review. *Diabetol Metab Syndr*. (2020) 12:98. doi: 10.1186/s13098-020-00603-6
78. Ahrén B. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): A gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *Bioessays*. (1998) 20:642–51. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8
79. Boirie Y, Gachon P, Cordat N, Ritz P, Beaufrère B. Differential insulin sensitivities of glucose, amino acid, and albumin metabolism in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. (2001) 86:638–44. doi: 10.1210/jcem.86.2.7193
80. Sartori R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: Implications in health and disease. *Nat Commun*. (2021) 12:330. doi: 10.1038/s41467-020-20123-1
81. An JM, Kang EA, Han Y-M, Oh JY, Lee DY, Choi SH, et al. Dietary intake of probiotic kimchi ameliorated IL-6-driven cancer cachexia. *J Clin Biochem Nutr*. (2019) 65:109–17. doi: 10.3164/jcbs.19-10
82. Bindels LB, Beck R, Schakman O, Martin JC, De Backer F, Sohet FM, et al. Restoring specific *Lactobacilli* levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PLoS One*. (2012) 7:e37971. doi: 10.1371/journal.pone.0037971
83. Lu Y, Bradley JS, McCoski SR, Gonzalez JM, Ealy AD, Johnson SE. Reduced skeletal muscle fiber size following caloric restriction is associated with calpain-mediated proteolysis and attenuation of IGF-1 signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. (2017) 312:R806–15. doi: 10.1152/ajpregu.00400.2016
84. Levolger S, van den Engel S, Ambagtsheer G, IJzermans JNM, de Bruin RWF. Caloric restriction is associated with preservation of muscle strength in experimental cancer cachexia. *Aging*. (2018) 10:4213–23. doi: 10.18632/aging.101724
85. Chen C-N, Liao Y-H, Tsai S-C, Thompson LV. Age-dependent effects of caloric restriction on mTOR and ubiquitin-proteasome pathways in skeletal muscles. *GeroScience*. (2019) 41:871–80. doi: 10.1007/s11357-019-00109-8





### III- Suite de la stratégie de criblage n°1 : étude de la faisabilité technologique d'une incorporation du probiotique dans un produit laitier fermenté

Suite au criblage *in vivo* et la validation sur modèle rongeur de l'effet protecteur de la souche LC-5663 sur la masse et le métabolisme musculaires, la souche a été étudiée plus avant sur ses caractéristiques en vue d'une utilisation dans l'industrie agro-alimentaire, et notamment la possibilité de l'intégrer dans un aliment.

#### A) Introduction

##### 1- Dans quel aliment intégrer la souche LC-5663 ?

Intégrer la souche probiotique à un aliment est une approche complémentaire à une approche plus traditionnelle qui consisterait à utiliser une forme galénique classique (gélule, poudre). En effet, l'apport par gélule d'un probiotique pourrait rebuter les personnes âgées du fait d'une polymédication fréquente. Concernant le choix de l'aliment, il faudrait que ce soit un aliment largement consommé par une population variée, appétant pour des personnes âgées et dans lequel notre souche d'intérêt puisse rester en bonne condition de conservation (idéalement vivante).

Le fromage nous a semblé un aliment de choix car il répond aux critères suivants :

- C'est un aliment riche en protéine (~20 g pour 100 g de produit), en calcium (200-1000 mg /100 g) et en vitamine D (~20 UI / 100 g), dont les ingérés chez les personnes âgées (surtout les plus fragiles) sont souvent inférieurs aux recommandations. Le fromage, en petites portions, combinerait donc l'apport en probiotique avec l'apport en protéines et micronutriments connus pour avoir également un effet bénéfique sur la masse et la fonction musculaires.
- C'est un aliment bien accepté et fréquemment consommé par les séniors de toutes zones géographiques et par toutes les classes socio-économiques ;
- Notre souche candidate, un *Lactocaseibacillus casei*, est parfaitement appropriée à la fabrication d'un produit laitier fermenté.

Il existerait 1 200 variétés de fromages en France (selon le Centre National Interprofessionnel de l'Économie Laitière, CNIEL), mais nous nous sommes orientés vers la production d'un fromage lactique au lait de vache pour plusieurs raisons :

- Fabrication rapide (en moins de deux semaines, les fromages peuvent être fabriqués, commercialisés et consommés) ;
- Fabrication à moindre coût (nécessité de peu de temps, d'espace, de matériels et d'ingrédients) ;
- Goût et odeur « neutres », mieux tolérés que les fromages au lait de chèvre ou de brebis ;
- Texture du fromage fondant, qui ne s'effrite pas, bien adaptée pour les personnes qui peuvent présenter à la fois des défauts de dentition et des troubles de la déglutition.

## 2- État des lieux de la consommation de fromage en France

Les Français consomment en moyenne 30 kg de fromage par an ; 90 % d'entre eux ont inclus ce produit dans leur diète habituelle et plus de 40 % en mangent tous les jours (*Statista Research Department 2021, Le Fromage en France*). Les individus de toutes les classes de revenus (modeste, moyenne, aisée), toutes les catégories d'âge et toutes les régions françaises achètent globalement la

même quantité de fromage chaque année, avec une préférence marquée (84 %) pour les fromages au lait de vache (*Rapport FranceAgriMer : La consommation de produits laitiers en 2020*).

## B) Matériel et méthodes

### 1- Fabrication des fromages

Les fromages ont été fabriqués en suivant le mode opératoire « Technologie lactique vache de type rapide » développé par René Lavigne (responsable du hall fromager, INRAE UMRF, Aurillac) selon les étapes présentées dans la **Figure 35**.

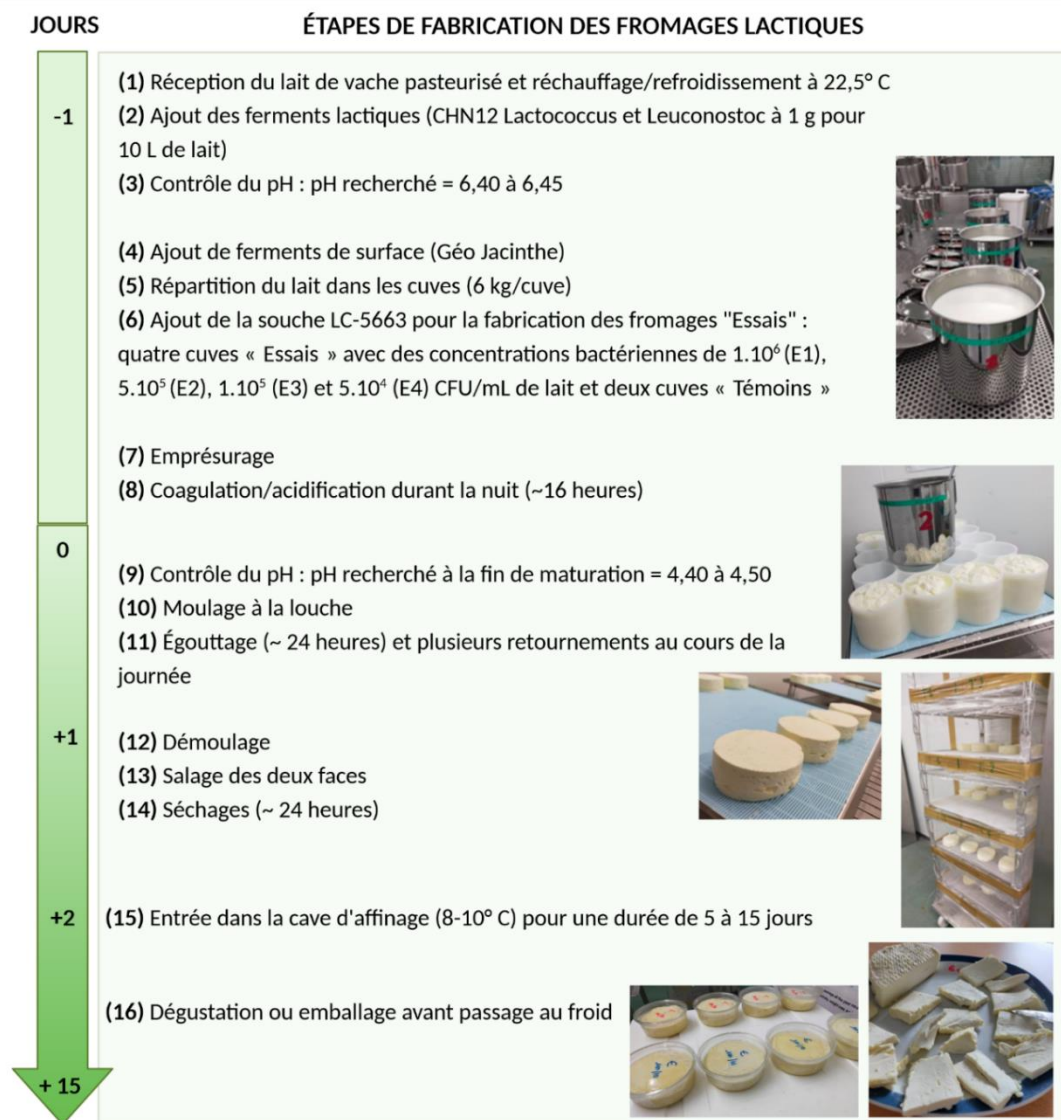


Figure 35. Mode opératoire utilisé pour la fabrication des fromages lactiques.

## 2- Dénombrement des bactéries lactiques

Des dénombrements des souches lactiques ont été réalisés dans le lait au moment de l'inoculation et dans les fromages après 12 jours d'affinage. Pour se faire, des échantillons de lait ont été prélevés et conservés à 4° C jusqu'à dilution et ensemencés sur boîtes MRS (spécifiques des Lactobacilles et apparentés). Des échantillons de fromage ont été broyés dans du tampon, dilués puis également ensemencés sur boîtes MRS. Après incubation des milieux à 37° C pendant au moins 48 heures, les colonies ont été comptées. Le dénombrement dans les fromages a permis de déterminer la proportion de bactéries inoculées encore vivantes, et même d'estimer leur capacité à se multiplier dans cette matrice.

## 3- Analyses sensorielles

L'analyse des propriétés organoleptiques des fromages a été conduite « à l'aveugle » après 12 jours d'affinage avec la participation de douze personnes de l'INRAE-UCA non experts et de tout âge pour chaque session ([Annexe 5](#)). L'analyse sensorielle consiste à étudier de manière structurée les propriétés d'un produit par les organes des sens (vue, odorat, goût) afin de pouvoir le décrire (consistance, odeurs, saveurs) et de l'améliorer de façon objective. Dans le cadre de ce travail, le principal objectif de cette analyse était de s'assurer que la bactérie probiotique n'apporte pas de défauts aux fromages. À noter que ces résultats n'ont fait l'objet d'aucune analyse statistique et restent très préliminaires.

## C) Résultats et discussion

### 1- Impact de la souche sur le processus de fabrication

La souche LC-5663 n'altère pas le processus de fabrication, c'est-à-dire que la vitesse d'acidification des fromages était identique entre les fromages Essais (avec la souche) et les fromages Témoins (sans la souche) et dépendent donc seulement des ferments lactiques utilisés. Toutefois, l'affinage des fromages Essais (couleur, texture, protéolyse) étaient légèrement plus rapide que celui



des fromages Témoins (de quelques jours), un atout potentiel pour les industriels qui cherchent à réduire les durées d'affinage afin de réduire les coûts de production.

## 2- Dénombrement des bactéries lactiques

Les quatre fromages Essais ont été inoculés avec une quantité de bactéries allant de  $1.10^6$  CFU/mL (E1) à  $5.10^4$  CFU/mL de lait (E4) (Tableau 14). La croissance de la souche dans les fromages après 12 jours d'affinage était relativement faible, avec une augmentation de leur concentration d'un facteur 10 environ (Tableau 14). Les échantillons de lait et de fromages Témoins n'ont révélé, comme attendu, aucune présence de bactéries poussant sur milieu MRS. Cela correspond donc, pour une portion de 10 grammes de fromage, à l'ingestion d'une quantité de  $10^7$  à  $10^8$  de la bactérie LC-5663. Ces valeurs sont dans la fourchette basse des doses qui sont usuellement utilisées pour obtenir des effets probiotiques avec des Lactobacilles chez l'Homme [671].

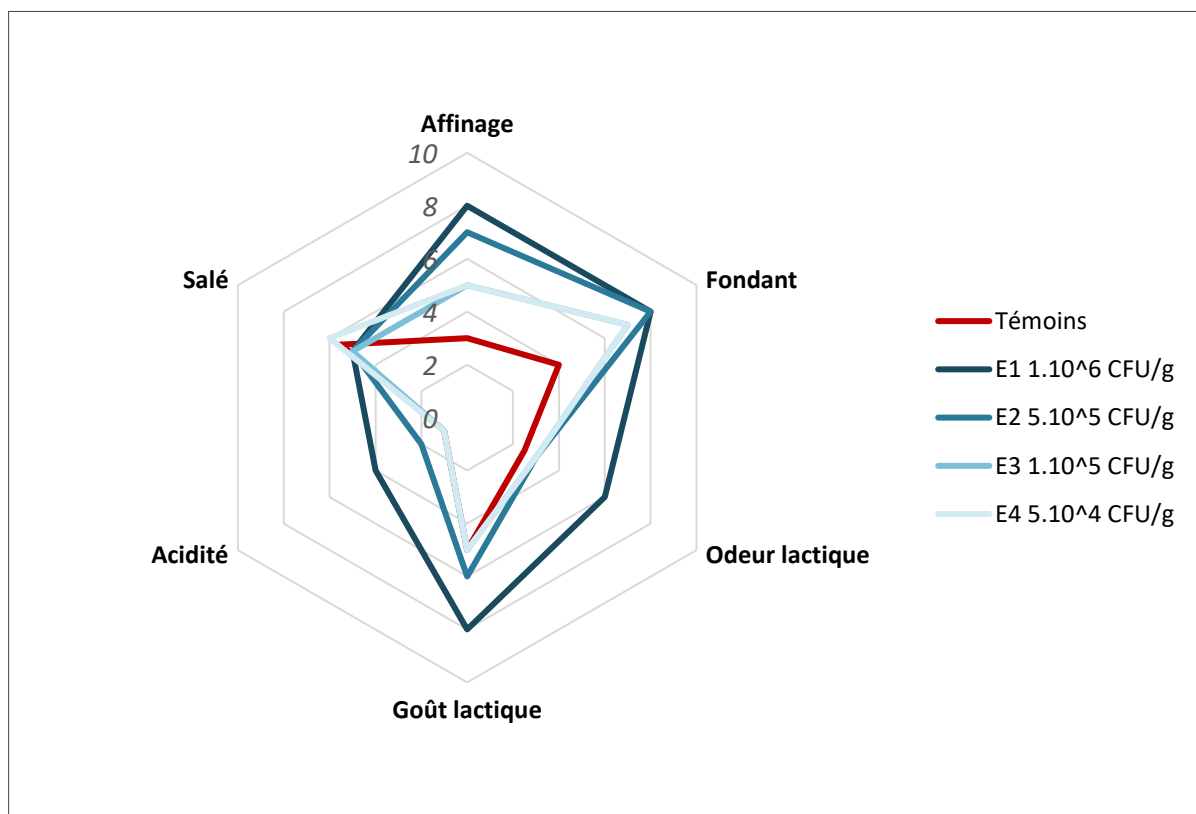
**Tableau 14. Quantités de bactéries lactiques (*Lacticaseibacillus*) inoculées dans le lait et quantité vivante dans les fromages après 12 jours d'affinage.**

Conditions	Dénombrements dans le lait (inoculum)	Dénombrements dans les fromages
Témoin 1	X	X
Témoin 2	X	X
Essai 1	$1.10^6$ CFU/mL	$2.10^7$ CFU/g
Essai 2	$5.10^5$ CFU/mL	$2.10^7$ CFU/g
Essai 3	$1.10^5$ CFU/mL	$3.10^6$ CFU/g
Essai 4	$5.10^4$ CFU/mL	$1.10^6$ CFU/g

## 3- Impact de la souche sur les propriétés organoleptiques

L'analyse sensorielle des fromages (Témoins et Essais) a porté sur des critères d'apparence et de texture (affinage, fondant), des odeurs et des saveurs (goût, acidité, sel) après 12 jours d'affinage (Figure 36). Globalement, les paramètres « affinage » (couleur, protéolyse) et « fondant » ont été évalués comme inférieurs pour les fromages Témoins par rapport aux Essais.

Il semblerait même que la souche probiotique ait présenté un effet dose-dépendant sur la texture des fromages. Les caractéristiques « lactiques » (goût, odeur et acidité) pourraient présenter un effet seuil à un niveau de  $1.10^6$  CFU/g, puisque le fromage E1, qui contient cette quantité de bactéries (la plus forte de tous les fromages testés), a une caractéristique lactique exacerbée relativement aux autres fromages Essais et des Témoins. La sensation « salée » légèrement plus importante observée dans les fromages Témoins et l'essai le moins riche en bactéries (E4) pourrait être liée au manque de maturité de ces produits (fromages « trop jeunes »).



**Figure 36. Paramètres organoleptiques des fromages lactiques Témoins et Essais (E1, E2, E3 et E4) après 12 jours d'affinage, scorés par des dégustateurs non experts.**

Par ailleurs, et en complément des paramètres précédents, les dégustateurs ont émis quelques commentaires hédoniques qui n'ont pas été évalués quantitativement : les fromages Essais présentaient davantage de « relief gustatif » et de « longueur en bouche » que les Témoins, et ce d'autant plus pour le fromage E1, en corrélation avec les notes attribuées aux caractères de texture et de goût.

*Pour conclure, le fromage lactique au lait de vache constitue une bonne stratégie d'administration de la souche probiotique. En effet, le procédé de fabrication du produit, rapide et à moindre coût, n'est pas altéré par l'ajout de notre bactérie LC-5663. Cette dernière accélérerait même l'affinage et améliorerait les propriétés organoleptiques des fromages. À l'analyse de ces données, il pourrait être intéressant d'augmenter la quantité de la souche LC-5663 dans l'inoculum (pour atteindre  $10^8$  ou  $10^9$  CFU/g dans le produit fini) et/ou multiplier la bactérie dans du lait, préalablement à son inoculation, pour optimiser sa croissance dans cette matrice particulière.*

En parallèle des aspects « probiotiques », moduler la nature des autres ingrédients dans les fromages tels que l'apport de certaines protéines pourrait également être une stratégie complémentaire intéressante. Par exemple, l'utilisation des protéines de lactosérum pourrait compléter les effets de la souche probiotique en augmentant l'anabolisme protéique musculaire, *via* un apport accru en leucine qui stimule l'anabolisme (le lactosérum étant une protéine particulièrement riche en leucine). Par ailleurs l'incorporation dans la matrice laitière de micronutriments issus de graines (type fenugrec) ou d'épices pourrait également avoir un effet synergique avec les protéines et les probiotiques du fromage de par leurs propriétés anti-inflammatoires, antioxydants, voire orexigènes [672].

Il reste à préciser qu'une dégustation par un panel d'experts entraînés plus conséquent (une vingtaine de personnes minimum) sera nécessaire pour valider les résultats présentés ici sur un panel limité (douze individus).





## IV- Stratégie de criblage n°2 : les études *in vitro*

### A) Introduction

La seconde stratégie utilisée pour cribler nos bactéries candidates a porté sur leur capacité à stimuler la sécrétion d'hormones intestinales, et tout particulièrement de GLP-1, un des déterminants majeurs des adaptations du syndrome du grêle court (SGC) et présentant des propriétés insulino-sensibilisatrices qui nous intéressent dans le cadre des patients fragiles.

Pour rappel, après avoir subi une résection d'une grosse partie de leur intestin grêle, la plupart des patients SGC vont présenter des adaptations à la fois morphologiques et métaboliques afin de contrecarrer l'insuffisance intestinale (**voir chapitre 1-II Stratégies expérimentales**). Les sécrétions, à jeun et post-prandiale des hormones digestives GLP-1, PYY et de la gréline sont augmentées chez ces patients [604,670], ce qui va favoriser la prise alimentaire et la trophicité intestinale par exemple (**Figure 37A**). Ce phénomène endocrinien a également été observé chez des rats ayant subi une résection intestinale similaire aux patients – anastomose jéjuno-colique [604] (**Figure 37B**). Par ailleurs, les patients présentent une modification considérable de leur microbiote intestinal puisque celui-ci est composé à 90 % de bactéries lactiques contre moins de 1 % pour celui d'adultes sains [602]. Toutes ces adaptations permettront finalement d'optimiser l'utilisation de l'aliment, de stimuler l'appétit et, au regard des peptides digestifs davantage sécrétés (GLP-1, PYY), nous émettons l'hypothèse que la sensibilité à l'insuline pourrait aussi être améliorée.

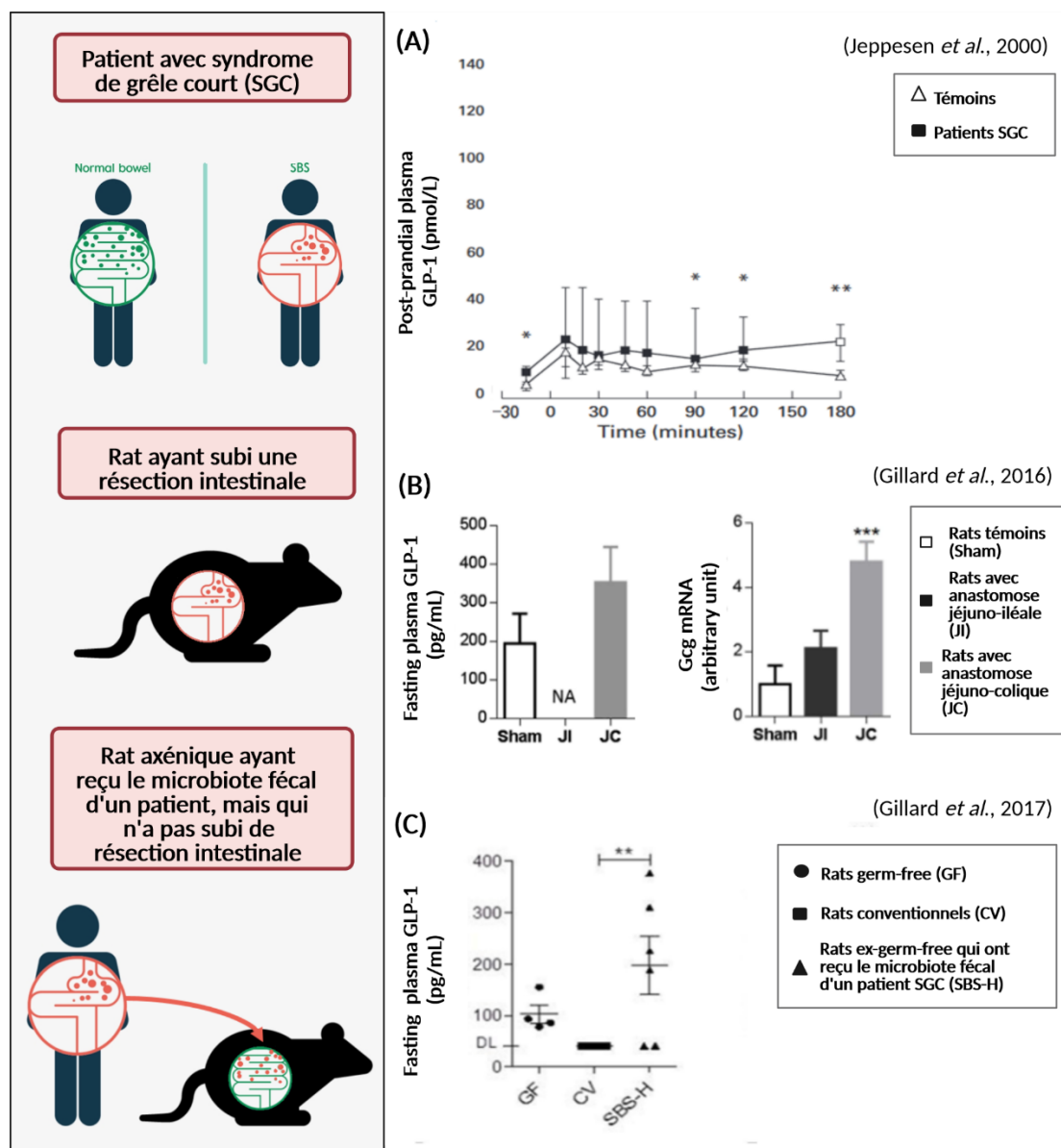


Figure 37. Le syndrome du grêle court, le microbiote intestinal et le GLP-1. (A) Concentration plasmatique de GLP-1 après un repas chez un patient SGC par rapport à un témoin sain. (B) Concentration plasmatique de GLP-1 à jeun et niveau de l'ARNm de Gcg au niveau du côlon en fonction du type de résection intestinale subi par les rats. (C) Concentration plasmatique de GLP-1 à jeun chez des rats axéniques ayant reçu le microbiote fécal d'un patient atteint du syndrome de grêle court. Graphiques de Jeppesen et al., 2000 et de Gillard et al., 2016 et 2017 [604,605,670].

Bien que les mécanismes d'adaptation mis en jeu après la résection ne soient pas parfaitement connus, ils pourraient faire intervenir le microbiote intestinal. En effet, les études de transfert de microbiote fécal de patients SGC à des rongeurs axéniques ont montré que ces animaux développaient des adaptations similaires à celles des patients, dont l'augmentation de sécrétion de

GLP-1, et indépendamment de la résection intestinale [605] (**Figure 37C**). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc un rôle causal des bactéries du microbiote intestinal dans la modulation du métabolisme énergétique des animaux *via* notamment une augmentation de sécrétion du peptide GLP-1.

Le GLP-1 est connu pour ses nombreux effets métaboliques bénéfiques sur l'organisme ; ce peptide digestif permet notamment de favoriser la sécrétion d'insuline par le pancréas et la sensibilité de plusieurs tissus (dont le muscle squelettique) à cette hormone. De plus, des agonistes du GLP-1 (inhibiteurs de la dipeptidyl-peptidase-4, agonistes du récepteur au GLP-1, metformine) ont déjà été décrits pour optimiser l'utilisation énergétique des nutriments et limiter la fonte musculaire, et en particulier chez des individus résistants à l'insuline [673,674]. Ainsi, le développement d'une souche probiotique capable de favoriser la sécrétion de GLP-1 pourrait être une méthode complémentaire aux médicaments précédemment cités pour améliorer la sensibilité à l'insuline (et la tolérance au glucose) chez des patients insulino-résistants, diabétiques, et/ou ne s'alimentant pas suffisamment, particulièrement susceptibles de devenir fragiles.

Pour se faire, notre stratégie a tout d'abord consisté au criblage des mêmes souches que celles employées pour le criblage sur *C. elegans* (LRh-36, LM-5661, LCam-05, LC-5662, LC-5663, LR-3a et LS-10) sur des cellules intestinales STC-1. Le glucose a été utilisé comme témoin positif puisqu'il induit théoriquement la sécrétion de GLP-1 par ces cellules [675]. Une souche particulière s'est nettement démarquée des autres pour son effet sur la sécrétion de GLP-1 : *Limosilactobacillus mucosae* LM-5661. Ainsi, une seconde expérimentation a été réalisée pour déterminer si cet effet observé précédemment était souche ou espèce-dépendant. D'autres souches de *L. mucosae* ont donc été testées sur les cellules STC-1 pour valider cette hypothèse.

## **B) Matériel et méthodes**

Nous avons utilisé les cellules entéroendocrines de souris STC-1, dérivées d'un carcinome de l'intestin grêle invasif et capables de sécréter tout un éventail d'hormones digestives dont notamment CCK, GLP-1 et PYY [676].

La première expérimentation (5 répliques biologiques) a consisté à la mise en contact des sept souches de bactéries lactiques (LRh-36, LM-5661, LCam-05, LC-5662, LC-5663, LR-3a et LS-10) sur un tapis cellulaire de STC-1 ( $5 \cdot 10^5$  à  $1 \cdot 10^6$  cellules) à une concentration de  $1 \cdot 10^9$  à  $2 \cdot 10^{10}$  CFU (en fonction des répliques) et pendant 4 heures à  $37^\circ \text{C}$  et 5 %  $\text{CO}_2$ . Des témoins négatif (milieu DMEM stérile) et « positif » (glucose à 20mM) ont été choisis. Après l'incubation, les surnageants cellulaires ont été récupérés, centrifugés (1 500 rpm, 10 min,  $4^\circ \text{C}$ ) pour éliminer les débris cellulaires et les surnageants clairs ont été conservés à  $-80^\circ \text{C}$  jusqu'au dosage du GLP-1 par méthode ELISA (instruction du fournisseur : Mouse GLP1 / Glucagon Like Peptide 1 ELISA kit, AssayGenie).

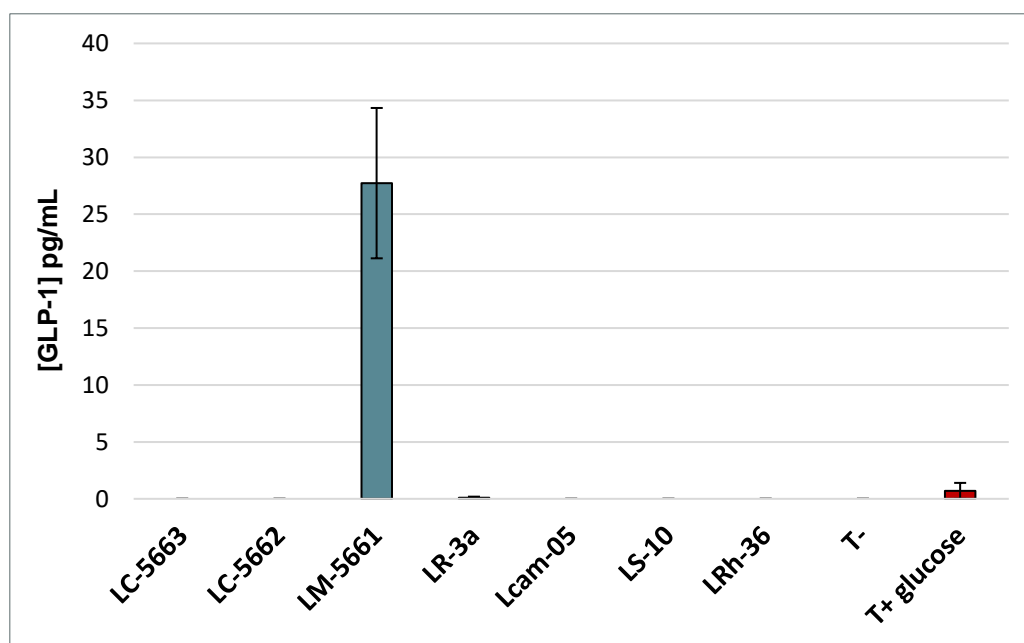
La seconde expérimentation (1 réplique biologique) a consisté à la mise en contact de différentes souches de *Limosilactobacillus mucosae*: LM-5661, souche type S32<sup>T</sup>, DSM 13 346 et DSM 102 820 (commandées à la collection DSMZ, German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) sur un tapis cellulaire de STC-1 ( $1 \cdot 10^6$  cellules) à une concentration de  $1 \cdot 10^9$  CFU pendant 3 heures à  $37^\circ \text{C}$  et 5 %  $\text{CO}_2$ . Un témoin négatif (milieu DMEM stérile) et trois témoins « positifs » (caséine à 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , peptone de caséine à 2  $\text{mg}/\text{mL}$  et albumine à 2  $\text{mg}/\text{mL}$ ) ont été choisis. Après l'incubation, les surnageants cellulaires ont été récupérés, centrifugés (1 500 rpm, 10 min,  $4^\circ \text{C}$ ) pour éliminer les débris cellulaires et les surnageants clairs ont été conservés à  $-80^\circ \text{C}$  jusqu'au dosage du GLP-1 par méthode ELISA (instruction du fournisseur : Mouse GLP1 / Glucagon Like Peptide 1 ELISA kit, AssayGenie).

## C) Résultats et discussion

La première étude de sélection a mis en évidence un effet stimulateur de la souche LM-5661, une bactérie lactique du genre *Limosilactobacillus* et de l'espèce *mucosae*, effet qui n'est retrouvé pour aucune des autres souches testées (*Lacticaseibacillus casei*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus camelliae*, *Ligilactobacillus salivarius* et *Lacticaseibacillus rhamnosus*) (Figure 38). La concentration moyenne de GLP-1 obtenue sur l'ensemble des répliques biologiques était de  $27,7 \pm 6,6$   $\text{pg}/\text{mL}$ . La variabilité dans les capacités de production de GLP-1 entre les répliques (écart-type relativement élevé) est liée à l'état des cellules (confluence, nombre de repiquage) et dépend de la



quantité de bactéries ajoutée (entre  $1.10^9$  et  $2.10^{10}$  CFU/mL). Une analyse de régression linéaire n'a pas permis de montrer un effet dose-dépendant évident de la souche ; d'autres répliques supplémentaires avec différentes concentrations bactériennes ( $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  et  $10^{10}$  CFU/mL par exemple) devraient être réalisés pour confirmer ce résultat.



**Figure 38.** Concentrations moyennes de GLP-1 sécrétées en pg/mL par les cellules STC-1 ( $10^5$ - $10^6$ ) après contact avec les sept souches de bactéries lactiques ( $1.10^9$  à  $2.10^{10}$  CFU) pendant 4 heures.

L'effet sur la sécrétion de GLP-1 par les cellules STC-1 n'ayant été observé que pour la bactérie de l'espèce *mucosae*, une deuxième expérimentation a été réalisée afin de déterminer si la capacité à stimuler la sécrétion de l'hormone GLP-1 était propre à notre souche LM-5661 ou plutôt une caractéristique de l'espèce. Nous avons commandé les souches DSM 13 345 ou la souche type S32<sup>T</sup>, DSM 13 346 et DSM 102 820 – les seuls candidats disponibles à la commande sur la collection allemande des micro-organismes et des cultures cellulaires (DSMZ). Cette étude a montré que les trois autres souches de *Limosilactobacillus mucosae* testées induisaient la même sécrétion de GLP-1 par les cellules intestinales que LM-5661, suggérant que cette capacité pourrait être extrapolée à l'ensemble des membres de l'espèce (Figure 39). Aucun des témoins « positifs » utilisés dans l'ensemble des manipulations n'ont permis une sécrétion de GLP-1 détectable dans les surnageants cellulaires. Il est à noter que ces derniers résultats sont préliminaires car l'expérience n'a été réalisée

qu'une seule fois et mériterait d'être reproduite, comme la précédente, pour que les résultats soient complètement validés.

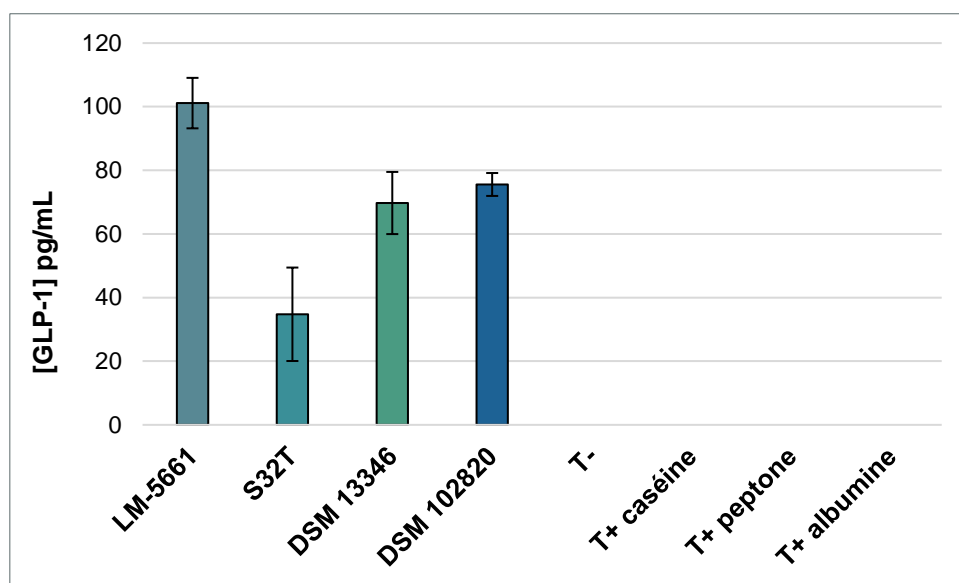


Figure 39. Concentrations moyennes de GLP-1 sécrétées en pg/mL par les cellules STC-1 ( $10^6$ ) après contact avec quatre souches de *Limosilactobacillus mucosae* ( $1.10^9$  CFU) pendant 3 heures.

*Cette approche de criblage in vitro a donc permis de mettre en avant une souche de bactérie lactique (LM-5661) qui présente un fort potentiel à stimuler la sécrétion de GLP-1 par ces cellules. Ces résultats font actuellement l'objet d'une soumission de brevet.*

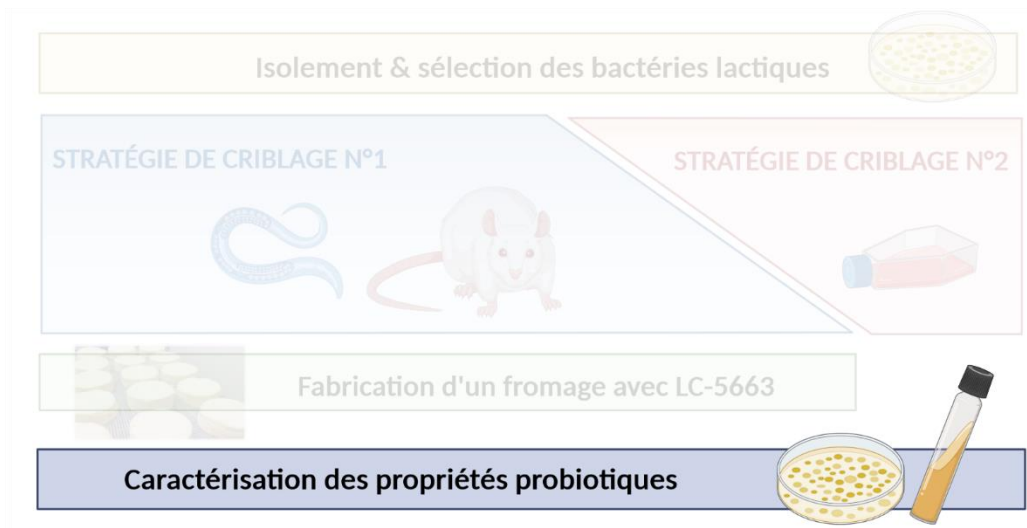
Il reste à déterminer par quel(s) mécanisme(s) la bactérie LM-5661 pourrait exercer cet effet stimulateur de GLP-1. La première souche de *L. mucosae* décrite (LM1), une nouvelle espèce phylogénétiquement très proche de *Limosilactobacillus reuteri*, a tout d'abord été isolée de l'intestin d'un porcelet en bonne santé au début des années 2000, et décrite pour sa capacité à adhérer à (et à protéger) la muqueuse intestinale [677,678]. De manière intéressante, la supplémentation en différentes souches de *L. reuteri* (ICVB395, SD5865) a été décrite pour stimuler spontanément la sécrétion de l'incrétine GLP-1 par les cellules intestinales STC-1 [679], mais également chez des patients tolérants au glucose [680]. Notre souche *L. reuteri* 3a (LR-3a) testées au cours des différents criblages n'a toutefois montré qu'un effet à peine détectable sur la sécrétion de GLP-1 ( $< 0,4$  pg/mL) et très hétérogène au cours de nos expérimentations, renforçant le fait que les effets des probiotiques sont bien généralement souche-dépendants. *Limosilactobacillus mucosae* est une espèce de bactérie lactique abondamment retrouvée dans l'intestin des patients atteints du syndrome du grêle court

mais elle n'est pas couramment détectée dans l'intestin des adultes sains [602]. Des auteurs ont néanmoins retrouvé des membres de cette espèce dans le microbiote fécal de Chinois très âgés (> 90 ans) en bonne santé, dont une souche s'est d'ailleurs révélée être un excellent probiotique pour réduire l'hypercholestérolémie chez le rat [681]. Suite à ces résultats, un brevet a par ailleurs été déposé en 2020 par des chercheurs de l'Université de Shanghai dans l'optique de protéger les *L. mucosae* dérivés de l'Homme pour leur efficacité à traiter/prévenir l'obésité et à réduire le poids et/ou les taux sanguins en lipides (CN202010790851). L'utilisation des mucines est un critère discriminant et intéressant. En dégradant les constituants principaux du mucus, l'espèce *L. mucosae* pourrait coloniser plus facilement l'intestin, se rapprocher de la paroi intestinale et interagir avec l'hôte en produisant une molécule spécifique impactant la sécrétion de GLP-1. Mais les mécanismes sont encore à préciser.

En théorie, de nombreuses molécules (monosaccharides, AA, acides gras) peuvent stimuler la sécrétion d'hormones par les cellules neuroendocrines STC-1 [676]. Toutefois, dans le cadre de ce travail, ni le glucose, la caséine, l'albumine, la peptone ou même la forskoline (données non montrées) dans les conditions testées, n'ont stimulé de manière détectable la sécrétion de GLP-1. Bien que je n'ai pas à ce jour d'éléments de réponse, des auteurs ont montré que ces cellules sont en réalité relativement peu sensibles aux stimuli nutritionnels [682] et que les niveaux de sécrétion des peptides digestifs dépendent fortement des laboratoires [676]. De plus, les cellules utilisées lors de ces expériences avaient subi un nombre de repiquage important, et n'étaient peut-être pas à leur « optimum » métabolique, ce qui a pu diminuer leur capacité de sécrétion de GLP-1. Des expérimentations complémentaires en utilisant d'autres souches intestinales (par ex., cellules GLUTag ou NCI-H716) pourraient donc être menées afin de confirmer l'effet de LM-5661 (et des autres *L. mucosae*) associé à un témoin « positif » capable de stimuler la sécrétion de GLP-1.

Contrairement aux souches LC-5663 et LC-5662, précédemment sélectionnées sur *C. elegans*, le temps a manqué pour valider les effets de LM-5661 sur le modèle rongeur fragile, à la fois sur la sécrétion intestinale de GLP-1 mais aussi sur la masse musculaire et l'insulino-sensibilité.





## V- Caractérisation des propriétés probiotiques pour leur utilisation future chez l'Homme

Afin d'utiliser les bactéries sélectionnées dans le cadre de stratégies nutritionnelles de prévention de la sarcopénie des personnes âgées, il est nécessaire de mieux connaître certaines caractéristiques des souches comme leur capacité à survivre aux diverses conditions physico-chimiques intestinales et à adhérer à l'épithélium. Cette caractérisation a concerné uniquement les trois souches qui se sont révélées intéressantes suite aux étapes de sélection sur *C. elegans* et sur cellules STC-1 (LC-5663, LC-5662 et LM-5661).

### A) Résistance à l'acidité gastrique et aux sels biliaires

#### 1- Principes et méthodes

Une étape importante de sélection de candidats probiotiques potentiels consiste à évaluer leur résistance à certaines conditions extrêmes du tube digestif et notamment au pH de l'estomac, aux enzymes digestives (par ex., la pepsine dans l'estomac) et à la bile sécrétée dans l'intestin proximal.

Ainsi, deux milieux acides pH 2,5 et 3 ont été testés (peptone bactériologique 30g/L, NaCl à 15g/L, ajustement du pH à l'aide d'HCl 0,1M) additionnés de pepsine (3,2 g/L) et ont permis de reconstituer un milieu gastrique artificiel [683,684]. Une quantité connue de bactérie (CFU) a été

inoculée aux deux milieux puis des dénombrements (sur milieu MRS) ont été réalisés après 45 et 90 minutes d'incubation à 37° C sous agitation. La résistance au milieu gastrique calculée correspond au nombre moyen de CFU au temps d'intérêt (à 45 et 90 minutes) divisé par le nombre moyen de CFU initial, exprimée en pourcentage de résistance : % résistance =  $\frac{\bar{m}UFC_t}{\bar{m}UFC_{t_0}} \times 100$ .

En parallèle de la tolérance à l'acidité, des milieux MRS additionnés de sels biliaries à 3 % ont permis d'estimer la résistance des souches d'intérêt à la bile [683,684]. Une quantité connue de bactérie (CFU) a été inoculée au milieu puis des dénombrements (sur milieu MRS) ont été réalisés après 1, 2, 3 et 4 heures d'incubation à 37° C sous agitation. La résistance à la bile correspond au nombre moyen de CFU à un temps donné dans le milieu avec bile divisé par le nombre moyen de CFU au même temps dans le milieu témoin (MRS sans bile), exprimée en pourcentage de résistance : % résistance =  $\frac{\bar{m}UFC_{bile}}{\bar{m}UFC_{témoin}} \times 100$ .

## 2- Résultats et discussion

Les trois souches bactériennes testées présentaient une résistance à l'acidité gastrique – et à la pepsine – de plus de 99 % après 90 minutes au pH le plus acide (pH 2,5) (Tableau 15). La résistance aux sels biliaries était de plus de 82 % après 4 heures (Tableau 16), sans aucune différence significative entre les souches, les pH et le temps d'incubation ( $p > 0,05$  ; test de Fisher).

**Tableau 15. Résistance en pourcentage des trois souches d'intérêt à l'acidité gastrique après 45 et 90 minutes d'incubation à 37°C.**

	Milieu gastrique à pH=2,5		Milieu gastrique à pH=3	
	45 minutes	90 minutes	45 minutes	90 minutes
<b>LC-5663</b>	99,23 ± 0,68%	99,92 ± 0,41%	100,45 ± 0,45%	101,00 ± 0,69%
<b>LC-5662</b>	99,82 ± 0,54%	99,73 ± 0,50%	100,31 ± 0,59%	100,35 ± 0,25%
<b>LM-5661</b>	101,54 ± 0,97%	102,92 ± 1,43%	103,67 ± 1,29%	104,27 ± 2,07%

*Chaque valeur est la moyenne de trois expériences indépendantes ± l'écart-type de la moyenne.*

**Tableau 16. Résistance en pourcentage des trois souches d'intérêt aux sels biliaires après 1h, 2h, 3h et 4 heures d'incubation à 37°C.**

	1 heure	2 heures	3 heures	4 heures
<b>LC-5663</b>	88,29 ± 5,43%	87,10 ± 2,91%	85,45 ± 3,86%	83,53 ± 4,52%
<b>LC-5662</b>	88,10 ± 8,01%	89,36 ± 5,05%	88,17 ± 5,27%	86,77 ± 5,29%
<b>LM-5661</b>	90,85 ± 2,28%	88,74 ± 2,44%	87,75 ± 1,46%	82,67 ± 1,77%

*Chaque valeur est la moyenne de trois expériences indépendantes ± l'écart-type de la moyenne.*

Ces valeurs sont similaires (voire supérieures) à celles obtenues avec d'autres souches de bactéries lactiques et de levures (*Saccharomyces boulardii*) qui ont présenté des pourcentage de résistance au pH 2,5 de 91 % à 99 % et de tolérance à la bile de 73 % à 99 %, déterminés *via* des protocoles identiques [683,684] ou légèrement différents [685,686]. À ma connaissance, il n'y a pas de valeurs seuils de résistance établies par des lignes directrices sur lesquelles nous pourrions nous appuyer. Néanmoins, puisque certains auteurs estiment que des niveaux de résistance  $\geq 50$  % sont corrects, nous pouvons affirmer que les trois souches testées présentent, dans ce cas, une excellente tolérance à l'acidité gastrique, à la pepsine et aux sels biliaires.

## **B) Adhérence aux cellules intestinales**

### **1- Principes et méthodes**

L'adhérence aux cellules est supposée favoriser la proximité entre les bactéries et l'épithélium intestinal et ainsi « faciliter » les propriétés probiotiques. Bien que ce lien causal entre adhérence, proximité et efficacité fonctionnelle n'a pas été prouvé, ce critère est souvent étudié pour les probiotiques [687]. Ici, nous avons estimé la capacité des souches probiotiques à adhérer sur des cellules intestinales Caco-2, dérivant d'un adénocarcinome du côlon humain. Si d'autres lignées cellulaires existent, les cellules Caco-2 sont le modèle de cellules intestinales le plus couramment utilisé pour évaluer l'adhérence intestinale d'un micro-organisme (probiotique, mais également pathogène), sa capacité à induire la sécrétion de cytokines ou pour prédire l'absorption intestinale

d'une molécule par exemple [687–691]. En effet, ce modèle cellulaire exprime une différenciation morphologique et fonctionnelle et présente les caractéristiques des entérocytes matures [691]. De plus, ces cellules sont peu exigeantes (conditions de culture) et se développent très rapidement.

Différents tests ont été proposés pour évaluer la capacité d'adhérence bactérienne aux cellules Caco-2. Les plus courants sont la coloration de Gram, le radio-marquage et le dénombrement sur plaque mais toutes ces méthodes présentent des limites [692]. La coloration de Gram ne permet pas de différencier les bactéries de même Gram (dans le cas de compétition entre plusieurs bactéries lactiques par exemple) et la quantification par dénombrement au microscope optique est chronophage et est soumise à la subjectivité de l'opérateur (le comptage des bactéries individuelles est parfois complexe à réaliser). Le dosage par radio-marquage est plus précis mais il nécessite des autorisations spécifiques pour l'utilisation des molécules radio-marquées dans le laboratoire que nous ne possédions pas [692]. Le protocole que nous avons utilisé repose sur le principe de dénombrement des bactéries vivantes adhérentes et a été mis en place par l'équipe de l'IUT d'Aurillac [683,684]. Bien que dénombrer des cellules viables (c'est-à-dire des colonies) prenne aussi du temps, cette méthode est moins subjective que le dénombrement au microscope optique et plus simple à réaliser.

Ainsi, une quantité bactérienne connue est mise en contact avec un tapis cellulaire de Caco-2 (environ  $4.10^5$  cellules) dans des plaques 6 puits et incubée pendant 3 heures à 37° C et 5 % CO<sub>2</sub>. Les surnageants ont ensuite été éliminés, le tapis cellulaire a subi plusieurs rinçages (PBS) et les cellules ont été décrochées (trypsine) puisensemencées dans la masse (milieu MRS, spécifique des Lactobacilles et apparentés). Les boîtes ont été incubées au moins 48 heures à 37° C et les colonies caractéristiques ont été comptées. Cette méthode permet d'avoir une idée approximative du nombre de bactéries adhérentes sur les cellules, puisque les bactéries non adhérentes ont été éliminées dans les surnageants au moment des rinçages. Plusieurs concentrations bactériennes ont été réalisées afin de déterminer différents niveaux de MOI (Multiplicity Of Infection), c'est-à-dire le rapport entre la quantité de cellules bactériennes et les cellules eucaryotes intestinales. Le pourcentage d'adhérence est le rapport entre les bactéries adhérentes (CFU dénombrés) et le total de bactéries mises en contact avec les cellules (CFU initial) x 100.



## 2- Résultats et discussion

Les trois souches probiotiques testées présentaient une capacité d'adhérence aux cellules coliques comprise entre 3,3 et 9,6 % (Tableau 17). Il n'y a pas de différence significative entre les souches et les multiplicité d'infection, ou MOI ( $p > 0,05$  ; test de Fisher).

**Tableau 17. Résultats en pourcentage de l'adhérence des cellules des souches probiotiques aux cellules intestinales Caco-2 après 3 heures d'incubation en fonction de la MOI.**

	Multiplicité d'infection (MOI)			
	100	10	1	0,1
<b>LC-5663</b>	5,60 ± 1,82%	7,74 ± 2,31%	9,24 ± 0,71%	9,60 ± 2,81%
<b>LC-5662</b>	5,95 ± 0,29%	7,22 ± 0,82%	7,31 ± 0,41%	6,87 ± 0,82%
<b>LM-5661</b>	4,18 ± 0,65%	3,90 ± 0,30%	3,32 ± 0,07%	4,84 ± 0,24%

Chaque valeur est la moyenne de trois expériences ± l'écart-type de la moyenne.

Les valeurs d'adhérence obtenues peuvent paraître faibles mais elles sont comparables à ce qui a été observé par d'autres auteurs pour *Lactocaseibacillus rhamnosus* Lcr35<sup>®</sup> (1,3 % avec une MOI 1) ou des levures (entre 3,6 et 7,3 % avec une MOI 0,1) avec le même protocole [683,684]. Une équipe espagnole a mesuré des niveaux d'adhésion de différentes bactéries lactiques isolées du vin aux cellules Caco-2 qui variaient, pour une MOI 100, de 0,37 % pour *Lactocaseibacillus casei* CIAL-52 à 12,2 % pour *Pediococcus pentosaceus* CIAL-86 [691]. De manière intéressante, les trois souches *L. casei* testées au cours de cette étude présentaient des pourcentages d'adhérence faibles par rapport aux autres espèces [691]. Nous aurions ainsi pu espérer une capacité d'adhérence plus forte pour la souche *L. mucosae* LM-5661 par rapport aux *L. casei* LC-5663 et LC-5662 étant donné que cette espèce est connue, à la différence des *L. casei*, pour avoir une très bonne capacité d'adhérence à la mucine [678,693]. Néanmoins, les cellules Caco-2 présentent comme limite de ne pas pouvoir se différencier en cellules calciformes et ne sécrètent donc pas de mucus – composé essentiellement de mucine. Cette particularité des cellules Caco-2 peut donc expliquer pourquoi LM-5661 n'adhère pas mieux aux cellules que les *L. casei*. Enfin, il est essentiel de rappeler que ces résultats sont des

estimations *in vitro* sur des cellules cancéreuses coliques qui ne reproduisent pas certains paramètres existant *in vivo* tels que la sécrétion de mucus, le péristaltisme, la présence des autres micro-organismes locaux (et les écosystèmes associés) qui sont connus pour moduler la capacité d'une bactérie probiotique à adhérer.

### **C) Critères d'innocuité des souches**

Une souche probiotique doit présenter une totale innocuité pour le consommateur, c'est-à-dire être non toxique et exempt de toute pathogénicité. La plupart des micro-organismes couramment utilisés dans l'agro-alimentaire depuis des années possèdent le statut Européen QPS (Qualified Presumption of Safety), un gage de leur non dangerosité pour l'humain (**voir synthèse bibliographique, chapitre 3-II Stratégie probiotique**). Parmi les bactéries présentes sur la liste QPS, nous retrouvons tout un panel de bactéries lactiques dont *Lactocaseibacillus casei* et *Limosilactobacillus mucosae*. Néanmoins, quelques analyses supplémentaires doivent être réalisées pour caractériser au mieux une souche probiotique afin de garantir sa sécurité pour le consommateur.

Dans le cadre de ce travail de thèse, des analyses génomiques ont permis de mettre en évidence la présence/absence de gènes de résistance aux antibiotiques et de plasmides. Les séquences génomiques des souches LC-5663, LC-5662 et LM-5661 ont été comparées à des bases de données spécifiques : ARBD, CARD et NDARO (pour les gènes d'antibio-résistances) ainsi qu'ICEBERG et PLSDB (pour les plasmides). Pour des raisons évidentes, la résistance aux antibiotiques est à proscrire autant que possible. En effet, il est admis que certaines bactéries qui possèdent des gènes de résistance aux antibiotiques parfois présents sur des plasmides peuvent les transférer à d'autres micro-organismes au niveau intestinal et induire des résistances aux antibiotiques plus généralisées. Le plasmide peut aussi héberger des gènes codant une protéine impliquée dans le mécanisme d'action, et donc perdre ou transférer tout ou partie de l'activité bénéfique. L'absence de risque d'antibio-résistance est à confirmer par des tests phénotypiques (ex., antibiogramme, Etest®) afin de confirmer ces premières analyses génomiques *in silico* et permettre l'utilisation de la souche probiotique dans le cadre d'une étude clinique.

Les analyses des génomes ont également permis de s'assurer de l'absence de prophages complets chez nos trois souches lactiques, un paramètre important pour la production industrielle (bases de données PROPHET et PHASTER). En effet, les prophages pourraient alors s'activer (en phages) et tuer les bactéries cibles sous l'action d'un inducteur (stress ou autres). Des tests de provocation peuvent aussi compléter ces analyses (ex., test d'induction à la mitomycine pour induire l'activation des bactériophages). En ce qui concerne nos résultats, les analyses n'ont détecté aucun gène de résistance à un antibiotique et aucun gène de prophages dans les séquences génomiques des trois souches probiotiques.

D'autre part, aucun facteur de pathogénicité – la production de toxines notamment – chez nos trois souches candidates n'a été détecté *via* l'analyse de leur génome (sur la base de données VFDB). Fait non surprenant car, actuellement, aucune étude n'indique que les bactéries lactiques utilisées comme probiotiques puissent synthétiser des toxines nuisibles pour l'être humain.

Finalement, nous avons mesuré la production de D-lactate par nos souches, étant donné que cette molécule est potentiellement toxique pour l'Homme. Le D-lactate, la forme dextrogyre du lactate, n'est produite que par les bactéries endogènes puisque les mammifères sont dépourvus de D-lactate déshydrogénase (et ne produisent donc que du L-lactate). Les mammifères n'ont ainsi pas l'enzyme nécessaire à la conversion du D-lactate en pyruvate. Ainsi, une colonisation trop importante de bactéries productrices de lactate peut être responsable d'une accumulation de D-lactate dans l'organisme (acidose ou encéphalopathie D-lactique), un syndrome grave mais heureusement rare se produisant en particulier chez les patients avec syndrome du grêle court [694]. Le dosage du lactate dans les surnageants bactériens révèle que la souche LC-5663 produit  $127,8 \pm 9,6$  mM de L-lactate pour environ  $10^9$  bactéries, soit 3 fois plus que LM-5661 (Figure 40A). Par ailleurs, la production de D-lactate (la forme toxique) par LM-5661 atteint près de 40 % de la production d'acide lactique totale, alors qu'elle est négligeable pour LC-5663 (< 2 %) (Figure 40B). Ce résultat apporte un autre argument en faveur de l'innocuité de notre souche LC-5663. Mais le risque de toxicité du D-lactate produit par LM-5661 est à relativiser et peut être considéré comme extrêmement faible lorsque les bactéries lactiques du microbiote intestinal de la population cible ne sont pas sur-représentées (ce qui est le cas dans la majeure partie des individus).

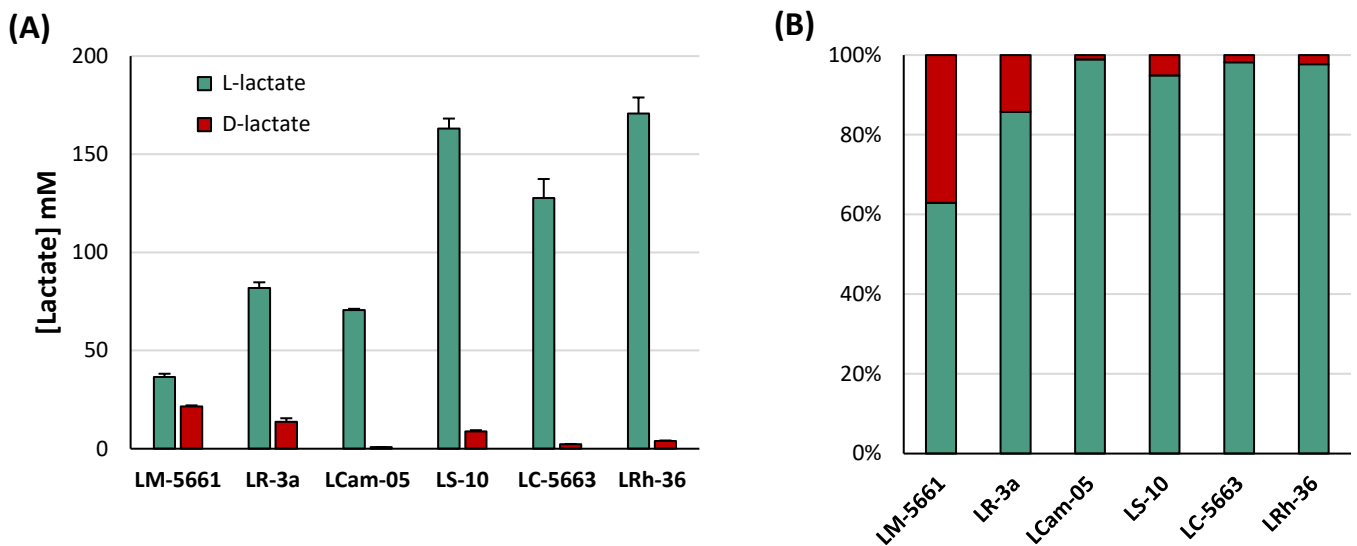


Figure 40. Production de lactate par six souches lactiques pré-sélectionnées. (A) Concentrations moyennes de D- et L-lactates en mmol.L<sup>-1</sup> produit par ~ 10<sup>9</sup> bactéries. (B) Répartitions en pourcentage de la production de D- et L-lactates.

*Pour résumer, les résultats obtenus sur la caractérisation plus précise de nos bactéries probiotiques en vue d'une utilisation en nutrition humaine montrent la capacité des trois souches d'intérêt (LC-5662, LC-5663 et LM-5661) à résister à l'environnement hostile du tractus intestinal, avec des valeurs de résistance au milieu gastrique et à la bile similaires ou supérieures à celles observées chez les souches probiotiques utilisées dans la littérature. En outre, les tests d'adhérence sur cellules intestinales mettent en évidence des niveaux d'adhérence comparables entre nos trois candidats et des probiotiques de référence déjà commercialisés. Finalement, des analyses génomiques ont permis d'exclure la présence de gènes de résistance aux antibiotiques, de prophages complets, de plasmides et de facteurs de pathogénicité chez nos trois souches candidates, des premiers éléments nécessaires pour valider leur innocuité. Ainsi, les bactéries lactiques testées présentent des propriétés probiotiques satisfaisantes qui ne devraient pas limiter leur utilisation chez l'humain.*

## DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

Entre les personnes âgées en bonne santé ou robustes et les personnes âgées totalement dépendantes, 30 à 40 % des individus de 65 ans et plus seraient fragiles en France [316]. La fragilité est un facteur de risque de chutes, d'hospitalisation, d'entrée en institution et de mortalité. L'âge est un déterminant majeur de fragilité mais il n'explique pas à lui seul ce syndrome ; la dénutrition protéo-énergétique et la sarcopénie sont également fortement associées au syndrome de fragilité. Le processus de la fragilité étant potentiellement réversible, la prise en charge des causes de ce syndrome pourrait réduire ses conséquences [695]. Néanmoins, les suppléments nutritionnels et les programmes d'exercice physique ne sont pas toujours applicables ou suffisants chez les personnes les plus fragiles.

L'objectif de mon travail de thèse a donc été de développer une stratégie nutritionnelle complémentaire de celles déjà utilisées en pratique (notamment les suppléments protéino-énergétiques [355]) pour limiter la sarcopénie chez les sujets âgés fragiles. Cette nouvelle stratégie est basée sur le fait que le microbiote intestinal est fortement suspecté d'impacter la masse et la fonction des muscles squelettiques. Nous nous sommes ainsi orientés vers une stratégie probiotique, en utilisant une approche de criblage innovante sur plusieurs aspects. Tout d'abord, nous avons fait appel à une stratégie de « reverse engineering » ayant consisté à observer le microbiote et les adaptations métaboliques mises en place chez les patients atteints du syndrome de grêle court (SGC). En effet, ces patients présentent des mécanismes adaptatifs leur permettant d'optimiser l'utilisation et l'absorption des aliments/nutriments du fait de la diminution de la longueur de leur intestin grêle. Comme précisé dans le premier chapitre (II- **Stratégies expérimentales**), ces patients présentent également une composition de leur microbiote très spécifique (90 % de Lactobacilles [602]) qui a été montrée comme au moins partiellement causale dans le développement de ces adaptations métaboliques (études de transfert de microbiote chez le rongeur [605]). Partant de cette

constatation, il a été émis l'hypothèse que ces adaptations métaboliques observées chez les patients SGC pourraient bénéficier aux sujets âgés en dénutrition, et éventuellement insulino-résistants. Ainsi, le microbiote de ces patients SGC peut être considéré comme une source potentielle de probiotiques pour les personnes âgées fragiles.

Pour rappel, mon travail de thèse a donc consisté à isoler et à cribler des souches bactériennes issues de patients SGC sur deux modèles biologiques : les cellules intestinales et le nématode *Caenorhabditis elegans*. J'ai réalisé l'isolement des souches à Jouy-en-Josas (Micalis – M. Thomas, C. Mayeur) et le criblage sur cellules STC-1 ainsi que sur les nématodes à Aurillac (UMRF – C. Chassard, S. Bornes). Ces deux modèles ont abouti à la sélection de bactéries selon leur capacité à (1) favoriser la longévité de *C. elegans* mais aussi son intégrité musculaire et à (2) stimuler la synthèse de GLP-1 par les cellules intestinales. Ces deux approches ont permis de restreindre le nombre de probiotiques candidats à tester *in vivo* sur les rongeurs (UNH – I. Savary-Auzeloux). J'ai contribué à la mise au point d'un modèle de rat âgé en sous-nutrition modérée, réalisé le suivi de l'étude animale et participé aux prélèvements tissulaires pendant et à la fin des expérimentations. J'ai réalisé la majeure partie des analyses sur plasma (dosages biochimiques et immunologiques) et tissus (RT-qPCR, Western Blots). Puis, j'ai généré l'ensemble de la mise en forme et de l'analyse des données/statistiques présentées.

## Résultats majeurs (Figure 41)

Le candidat *Lacticaseibacillus casei* CNCM I-5663 (LC-5663) s'est démarqué des autres souches lactiques du fait de son effet bénéfique sur la longévité et l'intégrité mitochondriale musculaire de *Caenorhabditis elegans*, laissant présager d'un effet protecteur sur le muscle chez ce modèle. Ceci a été confirmé chez le rat âgé avec une limitation significative de la fonte de masse maigre causée par la restriction alimentaire ainsi que de la masse musculaire. Cette protection de la masse protéique musculaire était associée à l'activation de la voie Akt/mTOR/S6K à l'état nourri, une voie de signalisation sensible à l'action de l'insuline. Cet effet a également été observé au niveau systémique avec une meilleure utilisation du glucose (suite à un OGTT) et un HOMA-IR à jeun légèrement amélioré.

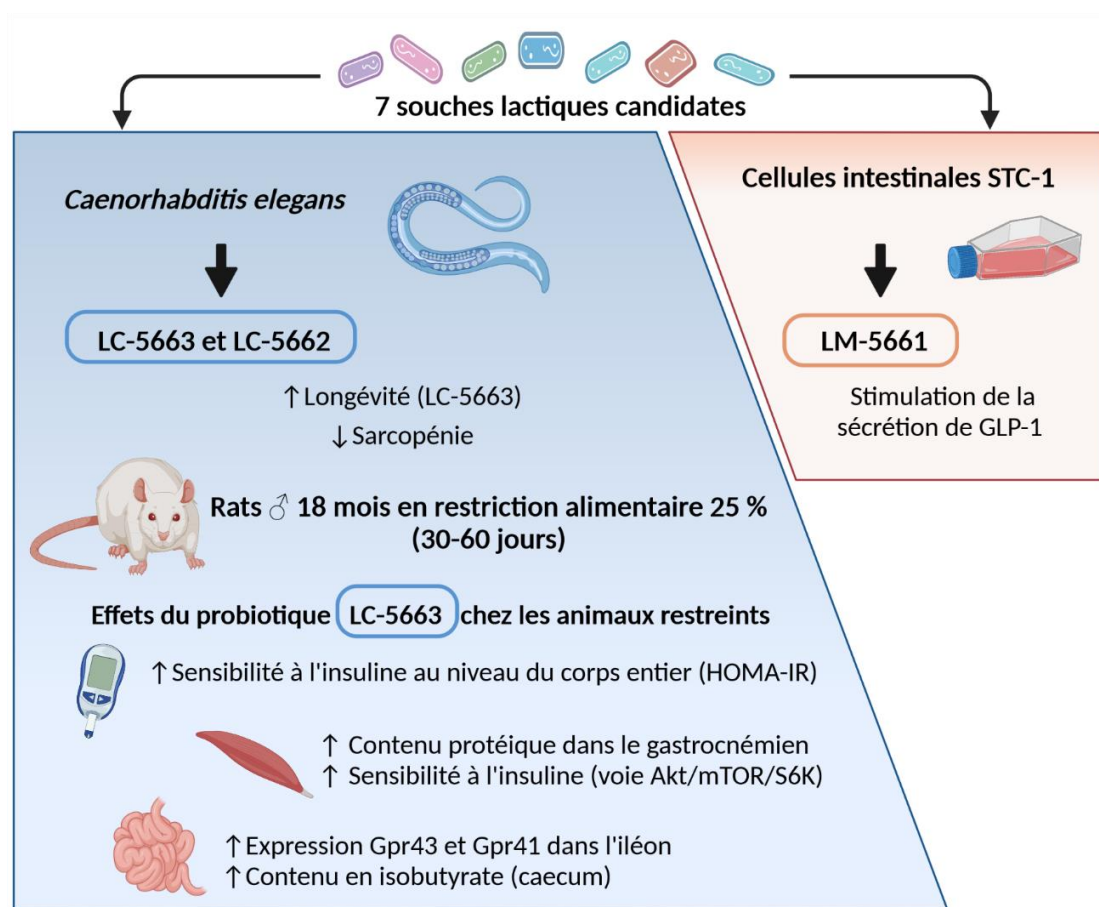


Figure 41. Synthèse des principaux résultats obtenus au cours du projet de thèse.

## Mécanismes d'action possibles de la souche LC-5663 sur la physiologie et le métabolisme de l'hôte

### 1- Quels médiateurs et mécanismes permettent à la souche LC-5663 de limiter la sarcopénie chez le rat fragile ?

S'il a été montré que le maintien de la masse protéique musculaire chez les rongeurs supplémentés en LC-5663 était associé à une activation de certains acteurs de la voie de signalisation Akt/mTOR/S6K (protéines p-S6 et p-eIF2 $\alpha$  toujours phosphorylées 2 heures après le repas), il reste des inconnus concernant les médiateurs et les mécanismes mis en jeu dans le dialogue entre le probiotique (au niveau intestinal) et le muscle. Des analyses complémentaires réalisées sur nos animaux nous permettent de suggérer ou d'invalider certaines hypothèses.

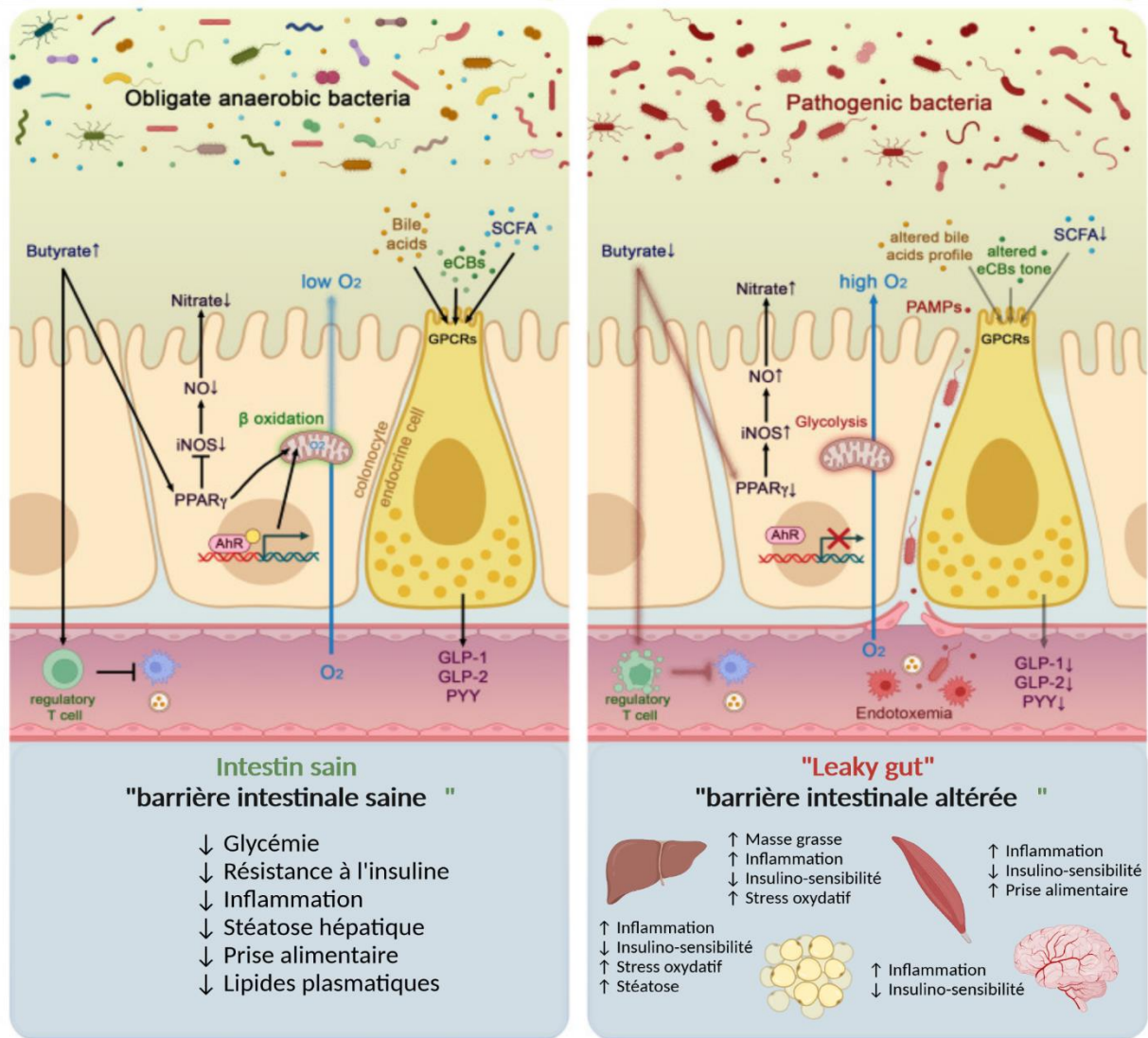
Tout d'abord, quel peut être le rôle des AGCC et de leurs récepteurs au niveau intestinal ? Les AGCC, et en particulier le butyrate et le propionate, sont des métabolites synthétisés exclusivement par les micro-organismes et sont connus pour être impliqués dans l'amélioration de l'insulino-sensibilité médiée par le microbiote sur l'hôte (**voir synthèse bibliographique, chapitre 3-I Le microbiote intestinal**). Nous avons donc mesuré les concentrations de ces molécules dans le contenu cæcal des rats. La restriction alimentaire a généré une diminution de 26 % de la concentration du propionate (**Figure 7 de la publication**) mais la supplémentation en probiotique n'a pas eu d'effet supplémentaire significatif sur la production de ce métabolite.

Bien que nous n'ayons pas d'élément suggérant une augmentation de production des AGCC par le microbiote des animaux supplémentés, qu'en est-il de la sensibilité de l'hôte à l'effet signal de ces métabolites ? Il semblerait que notre probiotique ait permis de modifier l'expression de certains récepteurs aux AGCC dans l'iléon. En effet, les expressions des récepteurs aux acides gras GPR43 (acétate = propionate > butyrate) et GPR41 (propionate = butyrate > acétate) [453,696] – qui étaient diminuées lors de la restriction dans notre modèle – ont été, au moins partiellement, maintenues chez les animaux supplémentés avec le probiotique. LC-5663 pourrait donc améliorer la sensibilité des cellules de l'iléon aux AGCC en stimulant l'expression des GPR plutôt qu'en augmentant la production de ces métabolites. Quelques bactéries probiotiques (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Bifidobacterium animalis*, *Clostridium butyricum*) ont été décrites dans la littérature comme capables d'activer les GPR43 et/ou GPR41 [697–700]. Mais cet effet dépendrait de la production importante en AGCC (butyrate essentiellement) induite par ces souches ; par le microbiote ou par la bactérie elle-même [697,698], ce qui ne semble pas être notre cas.

Parmi les molécules régulatrices du métabolisme de l'hôte qui sont associées à une stimulation des GPR, les plus étudiées sont les peptides gastro-intestinaux et notamment GLP-1, GLP-2 et PYY (**Figure 42**). Nous nous sommes particulièrement intéressés au GLP-1 qui est connu pour favoriser la sécrétion d'insuline et favoriser l'insulino-sensibilité. De plus, le microbiote des patients SGC favorise la sécrétion de cette hormone digestive [605].

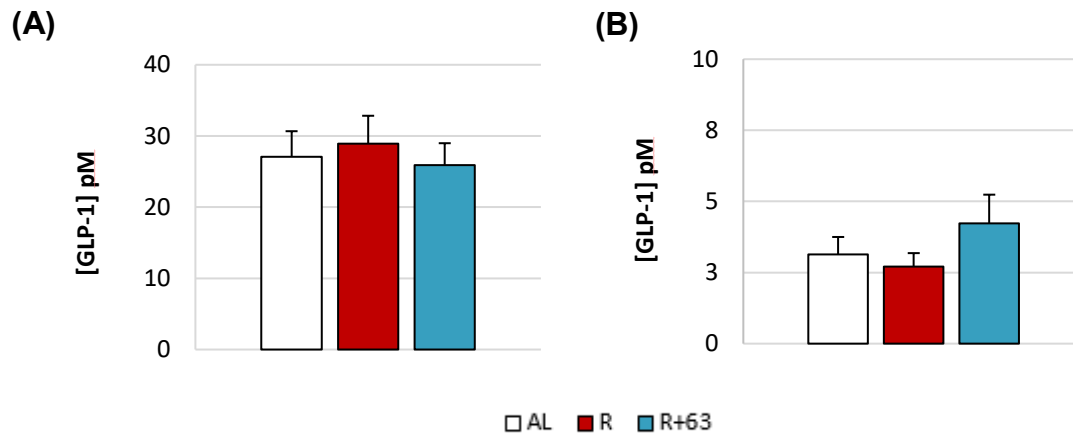


Pour rappel, la souche LC-5663 n'avait pas induit la synthèse de GLP-1 par les cellules SCT-1 *in vitro* (voir chapitre 2-IV Stratégie de criblage n°2).



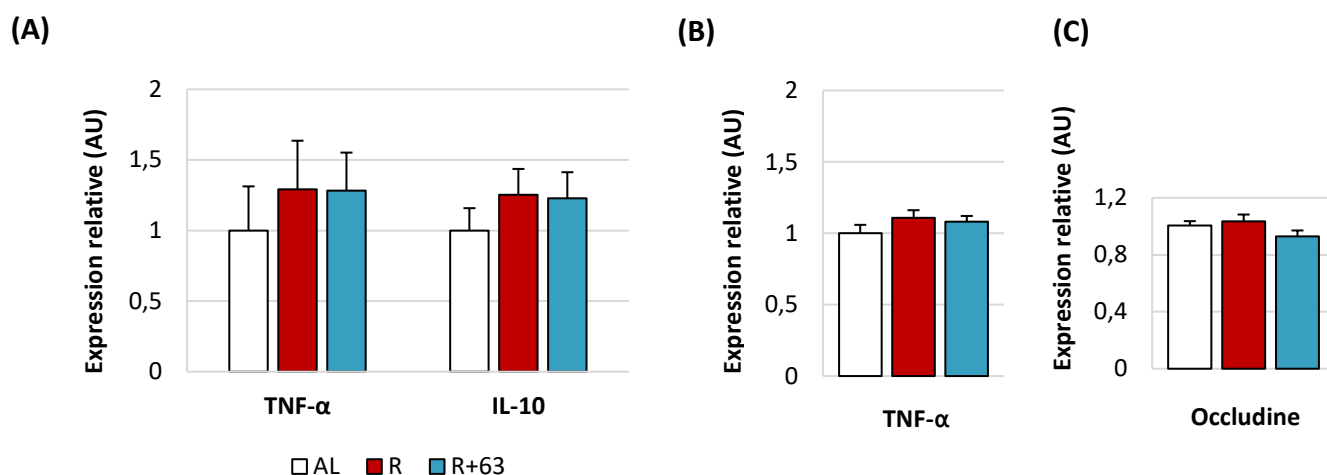
**Figure 42. Mécanismes moléculaires reliant le microbiote intestinal et la santé de l'hôte en situation saine et pathologique.** D'après de Vos *et al.*, 2022 [701]. Acronymes : Ahr, Aryl hydrocarbon receptor ; GPCRs, ; G protein-coupled receptors ; iNOS, oxyde nitrique synthase ; NO, monoxyde d'azote ; PPAR $\gamma$ , peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ; SCFA, short-chain fatty acids.

Nous avons dosé, au cours de l'expérimentation n°1, le GLP-1 plasmatique à jeun et 1 heure après l'ingestion d'un repas. Conformément à ce que nous avons observé *in vitro*, aucun effet significatif de la bactérie (ni même de la restriction alimentaire) n'a été observé sur la sécrétion de cette hormone chez les rats, y compris lorsque le site de prélèvement est proche du lieu de synthèse, c'est-à-dire en veine porte (Figure 43). Ces résultats suggèrent que l'effet insulino-sensibilisateur de LC-5663 ne passe probablement pas par une stimulation de production de GLP-1.



**Figure 43. Peptides intestinaux mesurés chez les rats après 2 mois de restriction alimentaire (R) ± supplémentation en LC-5663 (R+63).** (A) Concentration plasmatique de GLP-1 mesurée dans la veine porte 1 h post-prandiale. (B) Concentration plasmatique de GLP-1 mesurée dans la veine caudale à jeun. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 42 rats). Aucune différence significative entre AL, R et R+63  $p \leq 0,05$  (ANOVA).

Comme précisé dans la synthèse bibliographique, certains probiotiques peuvent également avoir un impact sur l'hôte *via* une action anti-inflammatoire. L'inflammation chronique (augmentation faible mais significative de protéines inflammatoires telles que CRP, ou de médiateurs systémiques comme IL-6 et TNF- $\alpha$ ) est connue pour favoriser la fonte musculaire et, elle est souvent associée à un état d'insulino-résistance [21]. L'inflammation systémique de bas-bruit serait en partie causée par l'augmentation de la perméabilité intestinale qui pourrait s'installer avec des comorbidités associées au vieillissement [9]. Nous avons donc mesuré quelques marqueurs de l'inflammation au niveau de l'iléon, du muscle ainsi qu'une protéine des jonctions serrées dans l'iléon. Bien que le nombre de marqueurs appréhendés soit limité (expression de TNF- $\alpha$  dans l'iléon et le tissu musculaire, IL-10 dans l'iléon), aucun d'entre eux n'a été modulé par la souche LC-5663 (Figures 44A et 44B). En ligne avec ces observations, l'expression de l'occludine n'a pas non plus été modulée, suggérant que la perméabilité intestinale ne semble pas modifiée (Figure 44C). Outre des expressions de gènes, il aurait été possible de mesurer le taux de certaines interleukines plasmatiques (par ex., IL-10, ratio IL-10/IL-12, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), des marqueurs plasmatiques de la perméabilité intestinale (par ex., ratio LPS binding protéine/sCD14) ainsi que la calprotectine fécale comme des marqueurs complémentaires d'une potentielle inflammation/perméabilité intestinale accrues chez nos rats.



**Figure 44. Expression des paramètres d'inflammation chez les rats après 1 mois de restriction alimentaire (R) ± supplémentation en LC-5663 (R+63).** (A) Niveaux d'ARNm de TNF- $\alpha$  et IL-10 dans l'iléon. (B) Niveaux d'ARNm de TNF- $\alpha$  dans le muscle gastrocnémien. (C) Niveau d'ARNm de l'occludine dans l'iléon. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 61 rats). Aucune différence significative entre AL, R et R+63  $p \leq 0,05$  (ANOVA).

Au regard de ces données, et du fait qu'il nous fallait prioriser les mesures (quantité limitée de tissus et de sang), nous n'avons pas poussé plus avant notre investigation de l'inflammation et de la perméabilité intestinale. Notre choix a été renforcé par le fait que notre modèle de rat âgé fragile ne présentait pas d'augmentation significative de l'inflammation sur les paramètres que nous avons mesurés ; le probiotique pouvait donc difficilement améliorer une inflammation étant déjà, au niveau basal, limitée.

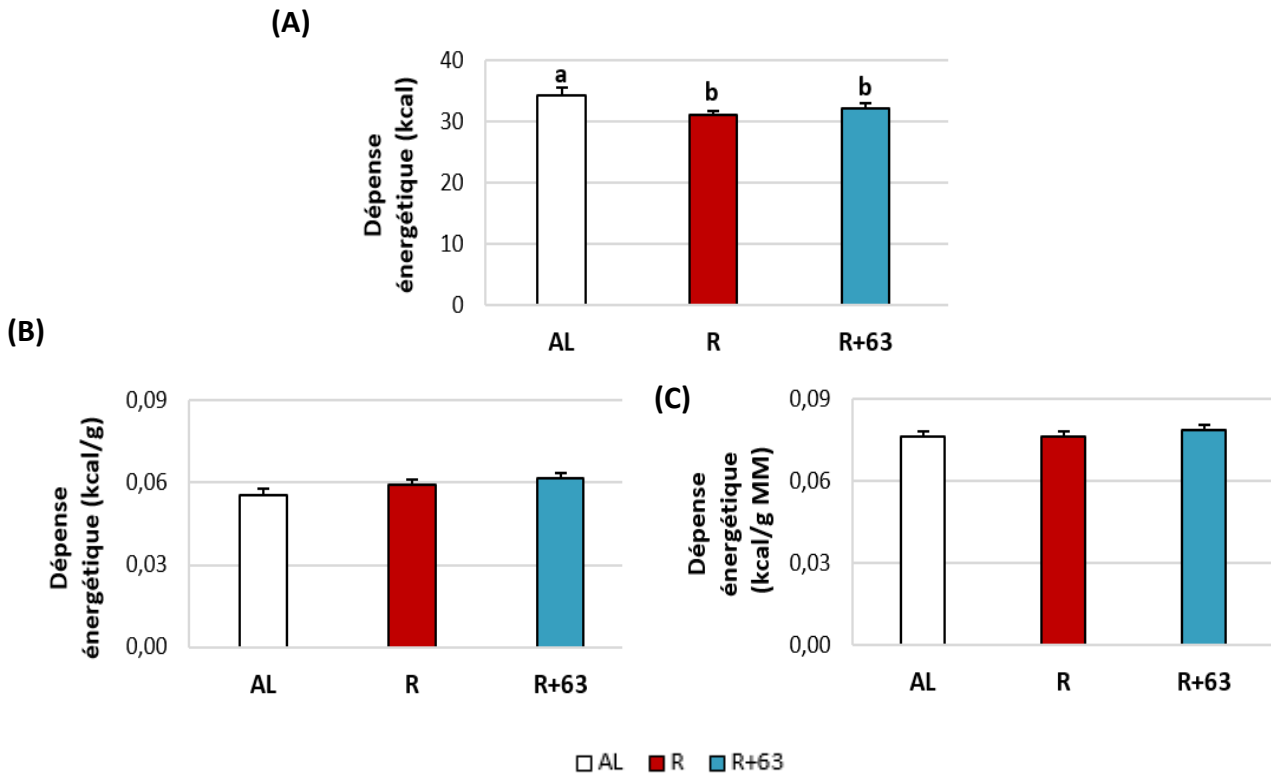
Le manque de stimulation de l'inflammation dans notre modèle peut également expliquer pourquoi ni la restriction alimentaire, ni la supplémentation en probiotique LC-5663 n'a eu d'effet significatif sur l'expression des protéines impliquées dans le système ubiquitine-protéasome (MuRF-1 et Atrogin-1) ou l'autophagie (Lc3b, Atg16L, Cathepsin L) (voir Figure 6 de la publication). En effet, la protéolyse et en particulier la protéolyse musculaire, est connue pour être particulièrement stimulée dans les situations inflammatoires caractérisées (cancers, infections généralisées) [702]. Il a récemment été montré à l'UNH que lorsque l'inflammation intestinale et systémique était stimulée, la protéolyse musculaire l'était également. Dans ce dernier travail, une bactérie probiotique anti-inflammatoire (*Streptococcus thermophilus* CNRZ 160) a été capable de limiter la stimulation de la protéolyse en limitant l'inflammation systémique [669].

## 2- Éléments de réflexion sur le métabolisme énergétique de l'hôte

### *Dépenses énergétiques totales*

Un des objectifs initiaux du projet de recherche était de sélectionner une bactérie capable d'optimiser la récupération de l'énergie issue des aliments (probiotique « energy saver ») comme cela a été observé chez les patients atteints du syndrome du grêle court. Nous avons donc mesuré la dépense énergétique des rats en utilisant des chambres calorimétriques (calorimétrie indirecte) qui permettent de mesurer les échanges gazeux respiratoires (consommation d'oxygène et production de dioxyde de carbone) de l'animal ainsi que sa consommation d'aliments, d'eau et son activité physique. Les animaux étaient installés dans les chambres pendant 48 heures en fin d'étude (après 2 mois).

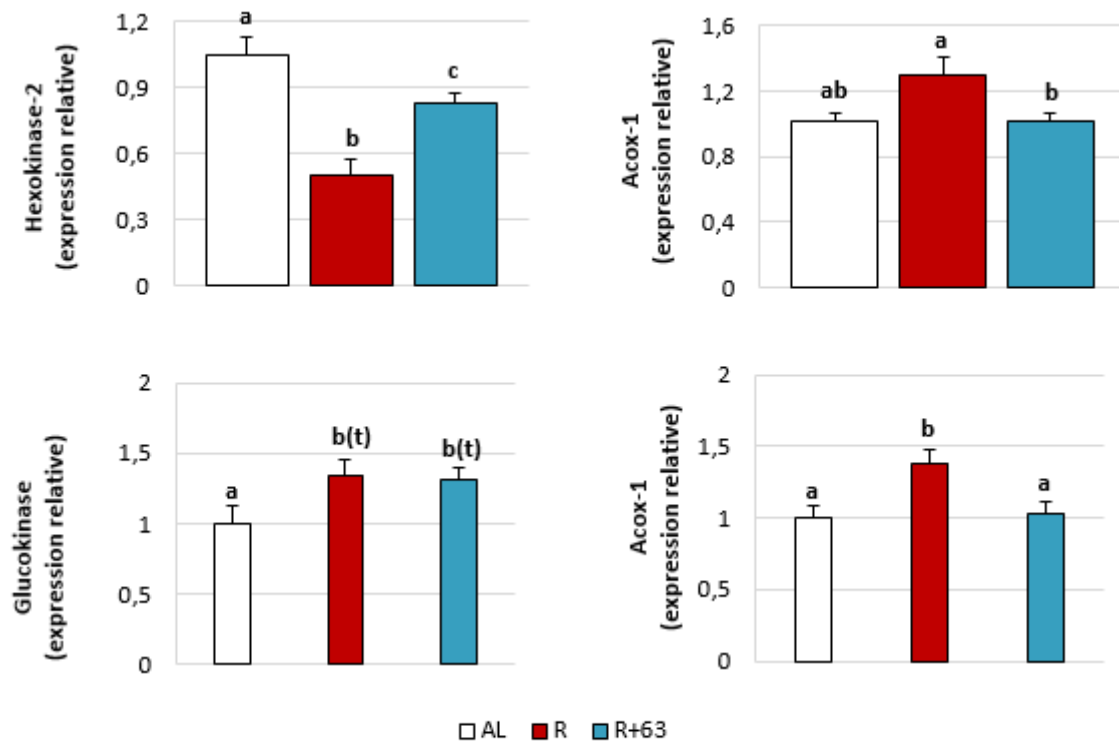
Les données de calorimétrie ont été analysées par Christophe Montaurier (plateforme « Indirect Calorimetry », INRAE de Clermont-Ferrand). Si une diminution des dépenses énergétiques totales des animaux est constatée pour les groupes restreints (par rapport aux rongeurs *ad libitum*), comme cela peut être attendu au regard de la littérature [703] (**Figure 45A**), nous n'avons pas montré d'effet régime significatif (et à fortiori pas d'effet probiotique) sur les dépenses énergétiques de nos animaux lorsque celles-ci sont ramenées aux masses corporelle ou maigre des animaux (**Figures 45B et 45C**). La composition corporelle (en particulier la masse maigre) est en effet un des déterminants majeurs connus pour moduler la dépense énergétique des individus [703].



**Figure 45. Dépense énergétique des rats *ad libitum* (AL), après 2 mois de restriction alimentaire (R) ± supplémentation en LC-5663 (R+63).** (A) Dépense énergétique totale (kcal), (B) dépense énergétique reportée à la masse corporelle et (C) dépense énergétique reportée à la masse maigre des animaux (kcal/g MM) à la fin de l'étude. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM (n = 34 rats). Un changement de lettre indique une différence significative  $p \leq 0,05$  (ANOVA et test *post-hoc* de Student).

### *Métabolisme énergétique tissulaire*

L'expression de gènes impliqués dans l'utilisation des nutriments à des fins énergétiques dans l'iléon suggère que la supplémentation en probiotique se traduit par une stimulation des voies métaboliques utilisant le glucose (glycolyse, suggéré par le gène hexokinase-2) et une diminution des voies utilisant les acides gras ( $\beta$ -oxydation, suggéré par le gène Acox-1) à des niveaux relativement similaires aux animaux *ad libitum* (Figure 46). Cet effet sur l'expression de l'enzyme Acox-1 est retrouvée dans le foie des rats supplémentés (mais pas d'effet sur l'expression de la glucokinase hépatique).



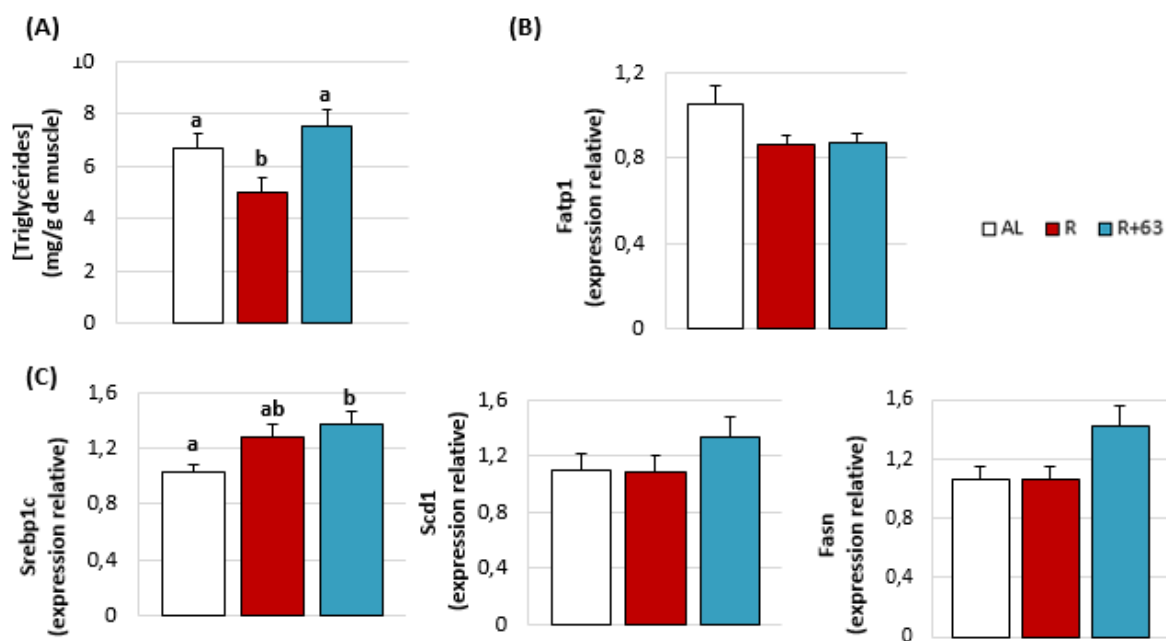
**Figure 46. Shift dans l'utilisation des nutriments au niveau de l'iléon et du foie.** Niveaux des ARNm de l'hexokinase-2 et de l'Acox-1 (acyl-coenzyme peroxydomale A oxydase 1) dans l'iléon. ARNm de la glucokinase et de l'Acox-1 dans le foie. Mesures après 1 mois de restriction alimentaire (R) ± supplémentation en LC-5663 (R+63). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 61 rats). Un changement de lettre indique une différence significative  $p \leq 0,05$  (ANOVA et test *post-hoc* de Dunn) ; (t) indique une tendance  $0,1 > p > 0,05$ .

L'intestin est connu pour être capable d'orienter l'utilisation des nutriments (notamment l'utilisation du glucose, par rapport aux lipides et aux acides aminés) à des fins énergétiques selon le profil alimentaire et les éventuelles restrictions, comme cela a été montré chez le porc soumis à une restriction protéique [704]. Cette plasticité énergétique intestinale a ainsi, par voie de conséquence, des effets sur la biodisponibilité en nutriments pour le muscle.

Il est maintenant bien décrit que la composition du microbiote intestinal conditionne fortement le métabolisme énergétique (Cf. les données obtenues sur le thème microbiote-obésité-syndrome métabolique). Quelques travaux suggèrent plus spécifiquement que des bactéries spécifiques ou consortia bactériens (probiotiques ou non), pourraient interagir sur les voies de synthèse, de stockage et sur le catabolisme du glucose ainsi que sur le métabolisme mitochondrial dans l'intestin [705,706] mais aussi dans les tissus cibles comme les muscles [485]. Par ailleurs, la stimulation des voies d'utilisation du glucose dans l'intestin chez les rats supplémentés en

probiotique pourrait être un élément explicatif de la meilleure tolérance au glucose observée au niveau du corps entier chez ces animaux au cours des OGTT (voir Figure 5 de la publication).

Au niveau musculaire, nous avons mis en évidence une concentration accrue de triglycérides (TG) dans les muscles gastrocnémiens en période post-prandiale (2h30 PP) chez les rongeurs supplémentés par rapport aux témoins restreints – et à un niveau identique aux rats *ad libitum* (Figure 47A). Ceci pourrait s’expliquer par une augmentation de l’absorption des TG dans les muscles avec le probiotique. Mais l’analyse de l’ARNm du transporteur Fatp1 ne soutient pas cette hypothèse (Figure 47B). Une autre hypothèse est la modulation de la synthèse des acides gras, notamment dans les adipocytes musculaires. Certaines de nos données suggèrent une tendance à l’augmentation de la synthèse post-prandiale d’acide gras dans les muscles avec le probiotique (gènes Srebp-1c, Scd1 et Fasn) (Figure 47C). La présence de formes de stockage d’énergie dans le muscle pourrait permettre de limiter la protéolyse musculaire à des fins énergétiques en situation de jeûne. Ainsi, et de manière globale, l’anabolisme énergéico-protéique semble être protégé dans le muscle avec la supplémentation en LC-5663.



**Figure 47. Paramètres relatifs au métabolisme lipidique dans le muscle squelettique. (A)** Mesures du contenu en triglycérides (mg/g de muscle) et **(B)** niveaux ARNm de Fatp1 (long-chain fatty acid transport protein 1), **(C)** Srebp-1c (sterol regulatory element-binding protein 1), Scd1 (stearoyl-coenzyme 1 desaturase 1) et Fasn (acide gras synthase) après 1 mois de restriction alimentaire (R) ± supplémentation en LC-5663 (R+63). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 61 rats). Un changement de lettre indique une différence significative  $p \leq 0,05$  (ANOVA et test *post-hoc* de Dunn).

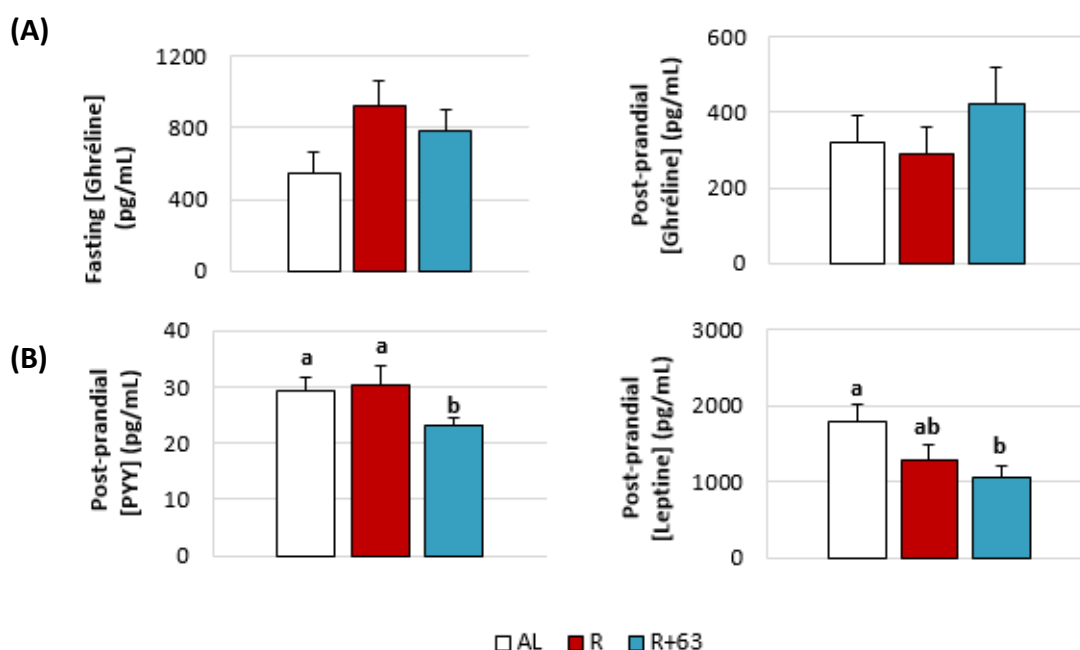
### 3- Quel effet du probiotique LC-5663 sur l'appétit ?

Développer une souche probiotique capable de favoriser l'appétit est une autre approche intéressante pour limiter le développement de la sarcopénie chez l'agé en dénutrition. La supplémentation en *Lacticaseibacillus paracasei* PS23 pendant 9 semaines permettait, par exemple, de diminuer l'atrophie musculaire des souris vieillissantes (traitées au D-galactose) en maintenant des niveaux de ghréline similaires aux rongeurs plus jeunes [707].

À ce stade, nous n'avons aucun moyen de déterminer si la souche bactérienne a pu avoir un effet sur la régulation de la prise alimentaire des animaux. En effet, les rongeurs supplémentés en probiotique étaient en restriction alimentaire, donc avec des ingérés contrôlés. Les analyses des différentes hormones impliquées dans l'appétit (ghréline, GLP-1, PYY et leptine) pourraient néanmoins apporter quelques éléments de réponse.

Chez nos rats, la concentration en ghréline (peptide orexigène) à jeun et 1 heure après l'ingestion d'un repas n'est significativement modulée ni par la restriction alimentaire d'une durée de 60 jours, ni par le probiotique (**Figure 48A**). Une heure après l'ingestion d'un repas, nous n'avons pas mis en évidence une diminution significative des hormones/peptides anorexigènes (leptine et PYY) chez les animaux soumis à la restriction alimentaire mais les concentrations plasmatiques de PYY (et de leptine dans une moindre mesure) des rats restreints supplémentés en probiotique étaient diminuées par rapport aux témoins (**Figure 48B**). Cette dernière observation soulève l'hypothèse que les animaux supplémentés pourraient « atteindre la satiété » plus tard après le repas que les témoins. Dans le cas de la leptine, il est connu qu'elle est corrélée à la masse des tissus adipeux et les animaux en restriction ont perdu entre 34 et 41 % de leur masse grasse initiale. Nous pouvons donc penser que la diminution de la leptine circulante est en grande partie causée par la fonte de masse grasse. L'analyse de ces données suggère néanmoins que la piste de la régulation de l'appétit par la souche LC-5663 mériterait d'être explorée plus avant. En particulier, il pourrait être intéressant d'évaluer les effets de la souche LC-5663 sur des modèles cellulaires capables de sécréter de la ghréline (par ex., cellules MGN-3) et PYY (par ex., cellules STC-1) puis poursuivre éventuellement avec une étude *in vivo* sur rongeurs qui ne seraient pas soumis à une restriction alimentaire et dont l'ingéré serait mesuré quotidiennement.





**Figure 48. Hormones gastro-intestinales mesurées chez les rats après 2 mois de restriction alimentaire (R) ± supplémentation en LC-5663 (R+63).** (A) Concentration plasmatique de ghréline mesurée dans à jeun dans la veine causale et dans la veine porte 1 h post-prandiale. (B) Concentrations plasmatiques de PYY mesurée dans la veine porte 1 h post-prandiale et de la leptine mesurée dans l'artère abdominale 1 h post-prandiale. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 42 rats). Un changement de lettre indique une différence significative  $p \leq 0,05$  (ANOVA et test *post-hoc* de Student).

*En résumé, nos données montrent que la souche LC-5663 limite la perte de masse musculaire en améliorant la sensibilité à l'insuline ainsi que l'utilisation des nutriments énergétiques au niveau du corps entier et des muscles squelettiques. Si les médiateurs permettant le dialogue entre intestin et muscle restent à identifier, nous avons éliminé un certain nombre d'hypothèses. La souche LC-5663 n'a pas eu d'impact sur :*

- *La sécrétion du peptide insulino-sensibilisateur GLP-1 in vivo ;*
- *L'inflammation systémique et intestinale ni la protéolyse dans les muscles squelettiques ;*
- *Les dépenses énergétiques des rongeurs en restriction alimentaire.*

*Néanmoins, une augmentation de l'expression des gènes Gpr41 et 43 a été mise en évidence dans l'iléon de nos animaux, laissant supposer une augmentation de la sensibilité aux AGCC, dans un contexte où ces derniers sont peu modulés. Par ailleurs des résultats préliminaires pourraient laisser supposer un effet de la souche sur la régulation de l'appétit (notamment via PYY). Ces effets spécifiques mériteraient d'être approfondis.*

## **Autres questions soulevées par les résultats de ma thèse concernant LC-5663 et qui mériteraient d'être approfondies : Quid du microbiote ?**

Comme cela a été montré dans la publication (Figure 7), l'expression des gènes Gpr41 et 43 est modulée par le probiotique dans l'iléon mais pas dans le côlon. Ceci peut s'expliquer par le fait que les bactéries lactiques sont aérotolérantes et tolèrent bien les pH acides. Elles sont dominantes dans l'intestin grêle et sous-dominantes dans le côlon, très majoritairement colonisé par des bactéries anaérobies strictes. Ce résultat suggère que l'intestin grêle est un environnement plus favorable pour la bactérie LC-5663 que le côlon et mérite ainsi d'être considéré comme un site d'action possible de notre probiotique.

Cette observation pose la question plus large de l'impact des probiotiques sur la composition du microbiote de l'hôte qui les ingère. Il est actuellement admis qu'un probiotique ne doit pas forcément modifier le microbiote pour être efficace (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, ISAPP). Il n'est en effet pas démontré (et pas souhaitable) que les probiotiques s'installent de façon permanente dans l'intestin, malgré des avantages documentés pour la santé de l'hôte [538]. Par contre, dans des sites plus en amont du côlon (et en particulier dans la partie basse de l'intestin grêle, l'iléon), il est possible que des bactéries probiotiques soient plus compétitives que les espèces résidentes pour, au moins, la simple raison de leur nombre. De plus, les bactéries se retrouvent dans des conditions de concentration et de viabilité qui pourraient être compatibles avec un effet majeur sur les cellules intestinales (notamment les cellules entéroendocrines comme les cellules L). Peu de données sur le microbiote intestinal des rats âgés est disponible, d'autant plus chez des sujets dénutris. La composition du microbiote dans différentes régions de l'intestin de ces animaux est également rarement étudiée ; en général, les études portent sur le microbiote fécal. De rares études ont montré une diversité  $\alpha$  plus élevée dans le cæcum et une abondance relative en *Lactobacillaceae* plus importante dans l'intestin grêle [708–710]. Mais ces résultats ne sont pas surprenants puisque l'intestin grêle est plus aérobie et favorise donc la croissance des bactéries aérotolérantes (bactéries lactiques par exemple) au dépit d'autres espèces anaérobies strictes qu'on ne retrouve que dans le cæcum/côlon [710]. Concernant la restriction *per se*, une étude qui a porté sur le microbiote fécal de jeunes rats en dénutrition (induite par le 5-fluorouracil – chimiothérapie) a montré que le microbiote de ces rongeurs présentait une diversité

$\alpha$  diminuée, une réduction de l'abondance relative des Firmicutes et une augmentation des Proteobacteria et Verrucomicrobia [711]. Au regard de ces données, il serait pertinent d'étudier la composition du microbiote de nos animaux, par des approches de métabarcoding 16S par exemple, pour évaluer l'abondance relative en phyla/familles/genres bactériens et conclure quant à l'effet (ou non) de notre probiotique sur la composition du microbiote des rats. Une attention devrait être portée sur le microbiote fécal mais aussi sur le microbiote présent tout le long du tube digestif (colon, cæcum, iléon, voire jéjunum), et en particulier sur le microbiote iléal qui est une zone du tube digestif dans laquelle se concentrent de nombreuses cellules entéroendocrines, lieux de sécrétion des peptides gastro-intestinaux.

## **Deuxième approche de criblage : la souche LM-5661**

La souche *Limosilactobacillus mucosae* CNCM I-5661 (LM-5661) s'est révélée être le seul candidat capable de stimuler la sécrétion de l'incrétine GLP-1 par les cellules intestinales STC-1. L'effet constaté sur cette souche semble s'étendre aux autres bactéries de l'espèce *L. mucosae* puisque cette propriété sécrétoire a également été observée avec les souches S32<sup>T</sup>, DSM 131346 et DSM 102820.

Les étapes de validation des effets potentiels de la souche LM-5661 sont moins avancées que pour la souche LC-5663. En effet, une première étape sera de valider l'effet GLP-1 sécréteur de la souche chez notre modèle de rat âgé fragile (dans l'état nutritionnel à jeun et nourri). Au cours de la même étude seront évalués les effets concomitants de la souche sur la physiologie et le métabolisme de l'hôte, en particulier la masse musculaire, la sécrétion de l'insuline, la sensibilité à l'insuline et sur la dépense énergétique des rongeurs âgés. Selon les données obtenues, des analyses de gènes cibles seront réalisées pour mettre en évidence les mécanismes putatifs d'interaction entre le probiotique, le microbiote et l'hôte. Une étude visant à étudier la régulation de l'appétit sera également à envisager (**voir perspectives**). Une demande d'invention a été déposée dans l'optique de protéger l'effet GLP-1 sécréteur de la souche LM-5661 et son éventuel bénéfice sur la masse musculaire.

## Perspectives du projet de thèse

### Perspectives propres à LC-5663

#### *Approfondir les mécanismes d'action*

La partie précédente a soulevé un certain nombre de questions sur les mécanismes d'action de la bactérie LC-5663 qui pourraient être investigués plus en détails chez le rongeur. Il sera pertinent d'approfondir la régulation de l'homéostasie des protéines et des acides aminés (absorption intestinale, extraction splanchnique, disponibilité pour le muscle) chez les animaux supplémentés avec le probiotique. Il en va de même de l'homéostasie des nutriments énergétiques et l'utilisation/synthèse/stockage des métabolites glucidiques et lipidiques qui peuvent également conditionner la biodisponibilité en acides aminés aux muscles. En effet, l'activation de la voie de signalisation Akt/mTOR/S6K, qui a été favorisée par le probiotique, pourrait dépendre de ces phénomènes, et notamment de la biodisponibilité en certains acides aminés signaux qui régulent cette voie cellulaire, de manière relativement similaire à l'insuline [586]. Indépendamment des mécanismes de régulation de l'homéostasie énergéico-protéique et des échanges de nutriments entre tissus, un simple bilan énergéico-azoté chez les animaux pourrait être judicieux pour évaluer si la digestibilité apparente des protéines est modulée par le probiotique.

Le volet « régulation de l'appétit » par la souche LC-5663 n'a pas été abordé au cours de ma thèse même si certains indicateurs mesurés (dont des peptides sécrétés par l'intestin), suggèrent que la souche pourrait agir à ce niveau. Une étude sur le comportement alimentaire pourrait ainsi être envisagée ; elle porterait sur des rats âgés mais sans restriction alimentaire, dans laquelle les ingérés seraient pesés quotidiennement et les peptides/hormones impliqués dans la régulation de l'appétit (ghréline, PYY, GLP-1, GLP-2 et leptine en particulier) dosés à jeun et en période post-prandiale. Une collaboration avec des experts en neurobiologie du comportement alimentaire sera nécessaire pour aborder de manière plus pertinente l'axe intestin-cerveau, et approfondir la régulation centrale (hypothalamique) de la prise alimentaire.

### *Tester des approches nutritionnelles intégrées : intérêt du fromage*

Afin de maximiser l'effet du probiotique, et comme j'ai montré qu'il était possible de produire un fromage frais enrichi en LC-5663, il serait intéressant de déterminer si la supplémentation conjointe de protéines et de probiotiques (sous forme d'un fromage – stratégie nutritionnelle intégrée) pouvait être plus efficace que le probiotique seul. La bactérie probiotique pourrait donc être administrée aux rongeurs sous plusieurs formes : en suspension bactérienne vivante ( $\sim 10^9$  CFU) sur de la poudre de croquettes avant la distribution du repas chaque matin (comme lors des deux études précédentes) et/ou avec une portion de fromage lactique (pour atteindre  $\sim 10^9$  CFU) en complément du repas. Une limite majeure néanmoins à évaluer pour la réalisation de l'étude proposée est la suivante : les aliments à texture molle sont parfois mal acceptés chez les rongeurs, qui présentent une dentition adaptée au « grignotage » (pas de molaires). Dans tous les cas, les bactéries utilisées pour l'étude décrite ci-dessus seraient ingérées vivantes. Mais il serait de propos dans le cadre d'un développement industriel de réaliser des études complémentaires visant à déterminer si la souche inactivée, ou certaines fractions de la souche, présentent une efficacité similaire à la bactérie vivante. Sur la même lancée, associer la bactérie probiotique à d'autres ingrédients tels que les prébiotiques (choisi en fonction des potentiels métaboliques du probiotique, pour former un synbiotique) pourrait également être envisagé.

### *Transposer nos données à l'Homme*

Enfin, l'objectif finalisé de toutes les études sur cellules, *C. elegans* et modèle rongeur est de déboucher sur une validation des concepts chez l'humain âgé. La difficulté majeure pour la réalisation d'un tel protocole chez l'Homme repose sur le fait que la population âgée est très hétérogène. Les patients âgés fragiles, potentiellement sarcopéniques et dénutris, sont difficiles à recruter. En effet, cette population ne répond pas facilement à un appel à recruter « classique » (par ex., journaux, flyers, radio locale) mais n'est pas assez malade ou dépendante pour être institutionnalisées. Une option intéressante pourrait être de travailler avec les maisons de repos et/ou les résidences sénior dans lesquelles peuvent vivre ces populations très spécifiques. Concernant la forme d'apport du probiotique chez l'Homme, une licence a été prise sur le Brevet INRAE relatif

à la souche LC-5663 par la start-up *Carembouche* co-dirigée par Muriel Thomas (co-encadrante de la thèse). L'administration du probiotique LC-5663 pourrait se faire *via* les bouchées protéinées développées par l'entreprise. Ces bouchées sont des collations étudiées et adaptées afin d'être appétissantes, préhensibles et suffisamment petites pour ne pas rebuter des personnes âgées de faible appétit. Des études sont en cours chez *Carembouche* pour évaluer la survie et la stabilisation de la souche dans ce type d'aliment. En absence de données supplémentaires, les sujets de l'étude devraient recevoir au minimum  $10^9$  bactéries vivantes chaque jour puisque c'est la quantité qui a démontré un effet bénéfique chez le rongeur. Des bouchées identiques mais non supplémentées en probiotique pourraient servir de placebo et permettre la réalisation d'un essai en double-aveugle. Pour évaluer les effets de la supplémentation, une durée minimale de 3 mois d'étude devrait être envisagée, avec comme critère principal de l'étude une amélioration de la masse maigre, et en critère secondaires l'insulino-sensibilité. Cette durée a été choisie dans une grande majorité d'essais cliniques sur personnes âgées et supplémentées en pro- ou prébiotiques (entre 20 jours et 6 mois) [564,580].

### Perspectives propres à LM-5661

Après validation des effets de LM-5661 sur les rongeurs âgés, nous devrions également réfléchir à une technique de supplémentation de la souche chez l'humain. Le fromage lactique pourrait sembler, là-encore et pour les mêmes raisons qu'avec LC-5663, un bon moyen d'administrer la souche aux patients âgés. Toutefois, *Limosilactobacillus mucosae* est une espèce majoritairement intestinale qui n'est pas utilisée comme supplément probiotique dans l'industrie agro-alimentaire à l'heure actuelle, contrairement à *Lactocaseibacillus casei*. Cette espèce n'est d'ailleurs pas listée par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) pour son usage sans dangers assurés dans les produits laitiers. Une étude approfondie du génome et de l'innocuité de la souche sera donc nécessaire avant toute utilisation éventuelle chez l'Homme. Il serait également possible, après vérification préalable que les effets sont conservés, de travailler sur des suppléments en bactéries inactivées ou sur des fractions bactériennes. La bactérie ne serait alors plus dépendante de la réglementation des probiotiques, mais de celle des postbiotiques. Quelle que soit la stratégie

retenue, ce ne sera que lorsque la bactérie (ou une fraction) aura prouvé toute son innocuité qu'une étude clinique pourra être envisagée.

## **Conclusion générale**

La stratégie d'isolement, de criblage et de caractérisation mise au point au cours du projet de thèse a parfaitement fonctionné pour proposer des micro-organismes probiotiques et des aliments fonctionnels d'intérêt. Le développement de ces produits doit être poursuivi afin de mettre à disposition, très bientôt, des solutions efficaces pour les personnes âgées fragiles en institution mais aussi pour celles vivant à domicile.





# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] FAO, WHO. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada. Food and Agriculture Organization (FAO) and World Health Organization (WHO); 2002
- [2] United Nations. World Population Prospects. 2022; Im Internet: <https://population.un.org/wpp/Graphs/Probabilistic/PopPerc/60plus/900>; Stand: 15.12.2021
- [3] Papon S, Beaumel C. Bilan démographique 2018 La fécondité baisse depuis quatre ans. Institut national de la statistique et des études économiques (INSEE); 2019
- [4] Robert-Bobée I. Projections de population 2005-2050 : vieillissement de la population en France métropolitaine. Institut national de la statistique et des études économiques (INSEE); 2007
- [5] Desrivierre D. D'ici 2050, la population augmenterait dans toutes les régions de métropole. 2017
- [6] Herr M, Sirven N, Grondin H, et al. Fragilité des personnes âgées et consommation de médicaments : polymédication et prescriptions inappropriées. Institut de Recherche et Documentation en économie de la Santé (IRDeS); 2018
- [7] Grangier J. Le vieillissement de la population entraîne une hausse des dépenses de santé liées aux affections de longue durée. Direction de la Recherche, des Études, de l'Évaluation et des Statistiques (DREES); 2018
- [8] World Health Organization. World report on ageing and health. World Health Organization; 2015
- [9] Milenkovic D, Capel F, Combaret L, et al. Targeting the gut to prevent and counteract metabolic disorders and pathologies during aging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022; 1–26. doi:10.1080/10408398.2022.2089870
- [10] Soto-Perez-de-Celis E, Li D, Yuan Y, et al. Functional versus chronological age: geriatric assessments to guide decision making in older patients with cancer. *Lancet Oncol* 2018; 19: e305–e316. doi:10.1016/S1470-2045(18)30348-6
- [11] Tian S, Morio B, Denis J-B, et al. Age-Related Changes in Segmental Body Composition by Ethnicity and History of Weight Change across the Adult Lifespan. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2016; 13: 821. doi:10.3390/ijerph13080821
- [12] He X, Li Z, Tang X, et al. Age- and sex-related differences in body composition in healthy subjects aged 18 to 82 years. *Medicine* 2018; 97: e11152. doi:10.1097/MD.00000000000011152
- [13] Macek P, Terek-Derszniak M, Biskup M, et al. Assessment of Age-Induced Changes in Body Fat Percentage and BMI Aided by Bayesian Modelling: A Cross-Sectional Cohort Study in Middle-Aged and Older Adults. *CIA* 2020; 15: 2301–2311. doi:10.2147/CIA.S277171
- [14] Zagaria MAE. Sarcopenia: Loss of Muscle Mass in Older Adults. [www.uspharmacist.com](http://www.uspharmacist.com). Im Internet: <https://www.uspharmacist.com/article/agerelated-sarcopenia>; Stand: 18.08.2022
- [15] Duda K, Majerczak J, Nieckarz Z, et al. Human Body Composition and Muscle Mass. In: *Muscle and Exercise Physiology*. Elsevier; 2019: 3–26

- [16] Ali AM, Kunugi H. Physical Frailty/Sarcopenia as a Key Predisposing Factor to Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Its Complications in Older Adults. *BioMed* 2021; 1: 11–40. doi:10.3390/biomed1010002
- [17] Keller K, Engelhardt M. Strength and muscle mass loss with aging process. Age and strength loss. *Muscles Ligaments Tendons J* 2014; 3: 346–350
- [18] Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* 2019; 48: 16–31. doi:10.1093/ageing/afy169
- [19] Doherty TJ. Invited Review: Aging and sarcopenia. *Journal of Applied Physiology* 2003; 95: 1717–1727. doi:10.1152/jappphysiol.00347.2003
- [20] Bischoff-Ferrari HA, Orav JE, Kanis JA, et al. Comparative performance of current definitions of sarcopenia against the prospective incidence of falls among community-dwelling seniors age 65 and older. *Osteoporos Int* 2015; 26: 2793–2802. doi:10.1007/s00198-015-3194-y
- [21] Tournadre A, Vial G, Capel F, et al. Sarcopenia. *Joint Bone Spine* 2019; 86: 309–314. doi:10.1016/j.jbspin.2018.08.001
- [22] Ethgen O, Beudart C, Buckinx F, et al. The Future Prevalence of Sarcopenia in Europe: A Claim for Public Health Action. *Calcif Tissue Int* 2017; 100: 229–234. doi:10.1007/s00223-016-0220-9
- [23] Izquierdo M, Casas-Herrero A, Zambom-Ferraresi F, et al. Vivifrail : le guide pratique pour la prescription d'un programme d'activités physiques pour la prévention de la fragilité et des chutes chez le sujet âgé | "Ensemble, prévenons la dépendance". 2017;
- [24] Rémond D, Shahar DR, Gille D, et al. Understanding the gastrointestinal tract of the elderly to develop dietary solutions that prevent malnutrition. *Oncotarget* 2015; 6: 13858–13898
- [25] Peyron MA, Woda A, Bourdiol P, et al. Age-related changes in mastication. *J Oral Rehabil* 2017; 44: 299–312. doi:10.1111/joor.12478
- [26] Okamoto N, Amano N, Nakamura T, et al. Relationship between tooth loss, low masticatory ability, and nutritional indices in the elderly: a cross-sectional study. *BMC Oral Health* 2019; 19: 110. doi:10.1186/s12903-019-0778-5
- [27] Barczy SR, Sullivan PA, Robbins J. How should dysphagia care of older adults differ? Establishing optimal practice patterns. *Semin Speech Lang* 2000; 21: 347–361. doi:10.1055/s-2000-8387
- [28] Christmas C, Rogus-Pulia N. Swallowing Disorders in the Older Population. *J Am Geriatr Soc* 2019; 67: 2643–2649. doi:10.1111/jgs.16137
- [29] Salles N. Is stomach spontaneously ageing? Pathophysiology of the ageing stomach. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 805–819. doi:10.1016/j.bpg.2009.09.002
- [30] Rayner CK, Horowitz M. Physiology of the ageing gut. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013; 16: 33–38. doi:10.1097/MCO.0b013e32835acaf4
- [31] Pilotto A, Franceschi M. Helicobacter pylori infection in older people. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6364–6373. doi:10.3748/wjg.v20.i21.6364
- [32] An R, Wilms E, Masclee AAM, et al. Age-dependent changes in GI physiology and microbiota: time to reconsider? *Gut* 2018; 67: 2213–2222. doi:10.1136/gutjnl-2017-315542

- [33] Bitar K, Greenwood-Van Meerveld B, Saad R, et al. Aging and gastrointestinal neuromuscular function: insights from within and outside the gut. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23: 490–501. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01678.x
- [34] Gallagher P, O'Mahony D. Constipation in old age. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 875–887. doi:10.1016/j.bpg.2009.09.001
- [35] Thomson ABR. Small intestinal disorders in the elderly. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 861–874. doi:10.1016/j.bpg.2009.10.009
- [36] Milan AM, Cameron-Smith D. Digestion and Postprandial Metabolism in the Elderly. *Adv Food Nutr Res* 2015; 76: 79–124. doi:10.1016/bs.afnr.2015.09.001
- [37] Boirie Y, Gachon P, Beaufrère B. Splanchnic and whole-body leucine kinetics in young and elderly men. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 489–495. doi:10.1093/ajcn/65.2.489
- [38] Volpi E, Mittendorfer B, Wolf SE, et al. Oral amino acids stimulate muscle protein anabolism in the elderly despite higher first-pass splanchnic extraction. *Am J Physiol* 1999; 277: E513–520. doi:10.1152/ajpendo.1999.277.3.E513
- [39] Dardevet D, Rémond D, Peyron M-A, et al. Muscle Wasting and Resistance of Muscle Anabolism: The “Anabolic Threshold Concept” for Adapted Nutritional Strategies during Sarcopenia. *The Scientific World Journal* 2012; 2012: 1–6. doi:10.1100/2012/269531
- [40] Drozdowski L, Thomson AB. Aging and the intestine. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12: 7578–7584. doi:10.3748/wjg.v12.i47.7578
- [41] Jang I, Jung K, Cho J. Influence of age on duodenal brush border membrane and specific activities of brush border membrane enzymes in Wistar rats. *Exp Anim* 2000; 49: 281–287. doi:10.1538/expanim.49.281
- [42] Rowe JW, Minaker KL, Pallotta JA, et al. Characterization of the insulin resistance of aging. *J Clin Invest* 1983; 71: 1581–1587. doi:10.1172/jci110914
- [43] Fink RI, Wallace P, Olefsky JM. Effects of aging on glucose-mediated glucose disposal and glucose transport. *J Clin Invest* 1986; 77: 2034–2041. doi:10.1172/JCI112533
- [44] Shimokata H, Muller DC, Fleg JL, et al. Age as independent determinant of glucose tolerance. *Diabetes* 1991; 40: 44–51. doi:10.2337/diab.40.1.44
- [45] Broughton DL, Taylor R. Review: deterioration of glucose tolerance with age: the role of insulin resistance. *Age Ageing* 1991; 20: 221–225. doi:10.1093/ageing/20.3.221
- [46] Petersen KF, Befroy D, Dufour S, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003; 300: 1140–1142. doi:10.1126/science.1082889
- [47] Delarue J. Métabolisme glucido-lipidique chez la personne âgée. In: Hébuterne X, Alix E, Raynaud-Simon A, et al., Hrsg. *Traité de nutrition de la personne âgée*. Paris: Springer; 2009: 17–21
- [48] Chang AM, Halter JB. Aging and insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2003; 284: E7–E12. doi:10.1152/ajpendo.00366.2002
- [49] Basu R, Breda E, Oberg AL, et al. Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance. *Diabetes* 2003; 52: 1738–1748. doi:10.2337/diabetes.52.7.1738

- [50] Basu R, Dalla Man C, Campioni M, et al. Effects of age and sex on postprandial glucose metabolism: differences in glucose turnover, insulin secretion, insulin action, and hepatic insulin extraction. *Diabetes* 2006; 55: 2001–2014. doi:10.2337/db05-1692
- [51] Marmentini C, Soares GM, Bronczek GA, et al. Aging Reduces Insulin Clearance in Mice. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021; 12: 679492. doi:10.3389/fendo.2021.679492
- [52] Imbeault P, Prins JB, Stolic M, et al. Aging per se does not influence glucose homeostasis: in vivo and in vitro evidence. *Diabetes Care* 2003; 26: 480–484. doi:10.2337/diacare.26.2.480
- [53] Bryhni B, Jenssen TG, Olafsen K, et al. Age or waist as determinant of insulin action? *Metabolism* 2003; 52: 850–857. doi:10.1016/s0026-0495(03)00100-8
- [54] Amati F, Dubé JJ, Coen PM, et al. Physical inactivity and obesity underlie the insulin resistance of aging. *Diabetes Care* 2009; 32: 1547–1549. doi:10.2337/dc09-0267
- [55] Woudstra T, Thomson ABR. Nutrient absorption and intestinal adaptation with ageing. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 1–15. doi:10.1053/bega.2001.0262
- [56] Coudray C, Feillet-Coudray C, Rambeau M, et al. The effect of aging on intestinal absorption and status of calcium, magnesium, zinc, and copper in rats: a stable isotope study. *J Trace Elem Med Biol* 2006; 20: 73–81. doi:10.1016/j.jtemb.2005.10.007
- [57] Khalil T, Walker JP, Wiener I, et al. Effect of aging on gallbladder contraction and release of cholecystokinin-33 in humans. *Surgery* 1985; 98: 423–429
- [58] MacIntosh CG, Andrews JM, Jones KL, et al. Effects of age on concentrations of plasma cholecystokinin, glucagon-like peptide 1, and peptide YY and their relation to appetite and pyloric motility. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 999–1006. doi:10.1093/ajcn/69.5.999
- [59] Sturm K, MacIntosh CG, Parker BA, et al. Appetite, food intake, and plasma concentrations of cholecystokinin, ghrelin, and other gastrointestinal hormones in undernourished older women and well-nourished young and older women. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 3747–3755. doi:10.1210/jc.2002-021656
- [60] MacIntosh CG, Morley JE, Wishart J, et al. Effect of exogenous cholecystokinin (CCK)-8 on food intake and plasma CCK, leptin, and insulin concentrations in older and young adults: evidence for increased CCK activity as a cause of the anorexia of aging. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5830–5837. doi:10.1210/jcem.86.12.8107
- [61] Masclee AAM, Geuskens LM, Driessen WMM, et al. Effect of aging on plasma cholecystokinin secretion and gallbladder emptying. *AGE* 1988; 11: 136–140. doi:10.1007/BF02432293
- [62] Di Francesco V, Zamboni M, Dioli A, et al. Delayed postprandial gastric emptying and impaired gallbladder contraction together with elevated cholecystokinin and peptide YY serum levels sustain satiety and inhibit hunger in healthy elderly persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005; 60: 1581–1585. doi:10.1093/gerona/60.12.1581
- [63] Atalayer D, Astbury NM. Anorexia of aging and gut hormones. *Aging Dis* 2013; 4: 264–275. doi:10.14336/AD.2013.0400264
- [64] Ranganath L, Sedgwick I, Morgan L, et al. The ageing entero-insular axis. *Diabetologia* 1998; 41: 1309–1313. doi:10.1007/s001250051070

- [65] Di Francesco V, Barazzoni R, Bissoli L, et al. The quantity of meal fat influences the profile of postprandial hormones as well as hunger sensation in healthy elderly people. *J Am Med Dir Assoc* 2010; 11: 188–193. doi:10.1016/j.jamda.2009.08.004
- [66] Korosi J, McIntosh CH, Pederson RA, et al. Effect of aging and diabetes on the enteroinsular axis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001; 56: M575-579. doi:10.1093/gerona/56.9.m575
- [67] Serra-Prat M, Mans E, Palomera E, et al. Gastrointestinal peptides, gastrointestinal motility, and anorexia of aging in frail elderly persons. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: 291-e245. doi:10.1111/nmo.12055
- [68] Geloneze B, de Oliveira M da S, Vasques ACJ, et al. Impaired incretin secretion and pancreatic dysfunction with older age and diabetes. *Metabolism* 2014; 63: 922–929. doi:10.1016/j.metabol.2014.04.004
- [69] Wu J, Ren W, Li L, et al. Effect of Aging and Glucagon-like Peptide 2 on Intestinal Microbiota in SD Rats. *Aging Dis* 2018; 9: 566–577. doi:10.14336/AD.2017.1001
- [70] Cooper JA. Factors affecting circulating levels of peptide YY in humans: a comprehensive review. *Nutr Res Rev* 2014; 27: 186–197. doi:10.1017/S0954422414000109
- [71] Kim B-J, Carlson OD, Jang H-J, et al. Peptide YY is secreted after oral glucose administration in a gender-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6665–6671. doi:10.1210/jc.2005-0409
- [72] Fujitsuka N, Asakawa A, Morinaga A, et al. Increased ghrelin signaling prolongs survival in mouse models of human aging through activation of sirtuin1. *Mol Psychiatry* 2016; 21: 1613–1623. doi:10.1038/mp.2015.220
- [73] Dardzińska JA, Wernio E, Małgorzewicz S. Fasting and postprandial ghrelin changes in older and younger volunteers. *Minerva Endocrinol (Torino)* 2021; doi:10.23736/S2724-6507.21.03407-6
- [74] Ilić M, Pašić F, Kirigin L, et al. Changes in Gut Hormones After Roux en Y Gastric bypass, Sleeve Gastrectomy, and Adjustable Gastric Banding. *Endocr oncol metab* 2015; 1: 25–36. doi:10.21040/eom/2016.1.1.3
- [75] Hope DCD, Tan TMM, Bloom SR. No Guts, No Loss: Toward the Ideal Treatment for Obesity in the Twenty-First Century. *Front Endocrinol* 2018; 9: 442. doi:10.3389/fendo.2018.00442
- [76] Amitani M, Amitani H, Cheng K-C, et al. The Role of Ghrelin and Ghrelin Signaling in Aging. *Int J Mol Sci* 2017; 18: E1511. doi:10.3390/ijms18071511
- [77] Sun Y. Thrifty Hormone Ghrelin: The Secret of Aging Muscularly. *J Aging Sci* 2020; 8: 005
- [78] Serra-Prat M, Palomera E, Clave P, et al. Effect of age and frailty on ghrelin and cholecystokinin responses to a meal test. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1410–1417. doi:10.3945/ajcn.2008.27076
- [79] Bauer JM, Haack A, Winning K, et al. Impaired postprandial response of active ghrelin and prolonged suppression of hunger sensation in the elderly. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010; 65: 307–311. doi:10.1093/gerona/65.3.glp174
- [80] Rigamonti AE, Pincelli AI, Corrà B, et al. Plasma ghrelin concentrations in elderly subjects: comparison with anorexic and obese patients. *J Endocrinol* 2002; 175: R1-5. doi:10.1677/joe.0.175r001
- [81] Jain D, Jain R, Eberhard D, et al. Age- and diet-dependent requirement of DJ-1 for glucose homeostasis in mice with implications for human type 2 diabetes. *Journal of Molecular Cell Biology* 2012; 4: 221–230. doi:10.1093/jmcb/mjs025

- [82] Supale S, Thorel F, Merkwirth C, et al. Loss of Prohibitin Induces Mitochondrial Damages Altering  $\beta$ -Cell Function and Survival and Is Responsible for Gradual Diabetes Development. *Diabetes* 2013; 62: 3488–3499. doi:10.2337/db13-0152
- [83] Irwin N, McClean PL, Harriott P, et al. Beneficial effects of sub-chronic activation of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors on deterioration of glucose homeostasis and insulin secretion in aging mice. *Experimental Gerontology* 2007; 42: 296–300. doi:10.1016/j.exger.2006.10.017
- [84] Trahair LG, Horowitz M, Rayner CK, et al. Comparative Effects of Variations in Duodenal Glucose Load on Glycemic, Insulinemic, and Incretin Responses in Healthy Young and Older Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012; 97: 844–851. doi:10.1210/jc.2011-2583
- [85] Simonson DC, DeFronzo RA. Glucagon physiology and aging: Evidence for enhanced hepatic sensitivity. *Diabetologia* 1983; 25: 1–7. doi:10.1007/BF00251887
- [86] Man AL, Bertelli E, Rentini S, et al. Age-associated modifications of intestinal permeability and innate immunity in human small intestine. *Clin Sci (Lond)* 2015; 129: 515–527. doi:10.1042/CS20150046
- [87] Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014; 69 Suppl 1: S4-9. doi:10.1093/gerona/glu057
- [88] Nicoletti C. Age-associated changes of the intestinal epithelial barrier: local and systemic implications. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015; 9: 1467–1469. doi:10.1586/17474124.2015.1092872
- [89] Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, et al. Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. *Cell Host Microbe* 2017; 21: 455-466.e4. doi:10.1016/j.chom.2017.03.002
- [90] Kundu P, Blacher E, Elinav E, et al. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell* 2017; 171: 1481–1493. doi:10.1016/j.cell.2017.11.024
- [91] Vanuytsel T, Tack J, Farre R. The Role of Intestinal Permeability in Gastrointestinal Disorders and Current Methods of Evaluation. *Frontiers in Nutrition* 2021; 8
- [92] Giron M, Thomas M, Dardevet D, et al. Gut microbes and muscle function: can probiotics make our muscles stronger? *J cachexia sarcopenia muscle* 2022; jcsm.12964. doi:10.1002/jcsm.12964
- [93] Schoultz I, Keita ÅV. The Intestinal Barrier and Current Techniques for the Assessment of Gut Permeability. *Cells* 2020; 9: 1909. doi:10.3390/cells9081909
- [94] Valentini L, Ramminger S, Haas V, et al. Small intestinal permeability in older adults. *Physiol Rep* 2014; 2: e00281. doi:10.14814/phy2.281
- [95] Wilms E, Troost FJ, Elizalde M, et al. Intestinal barrier function is maintained with aging – a comprehensive study in healthy subjects and irritable bowel syndrome patients. *Sci Rep* 2020; 10: 475. doi:10.1038/s41598-019-57106-2
- [96] Tran L, Greenwood-Van Meerveld B. Age-Associated Remodeling of the Intestinal Epithelial Barrier. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68: 1045–1056. doi:10.1093/gerona/glt106
- [97] Ren W, Wu K, Li X, et al. Age-related changes in small intestinal mucosa epithelium architecture and epithelial tight junction in rat models. *Aging Clin Exp Res* 2014; 26: 183–191. doi:10.1007/s40520-013-0148-0

- [98] Wysokiński A, Sobów T, Kłoszewska I, et al. Mechanisms of the anorexia of aging—a review. *Age (Dordr)* 2015; 37: 9821. doi:10.1007/s11357-015-9821-x
- [99] Fluitman KS, Hesp AC, Kaihatu RF, et al. Poor Taste and Smell Are Associated with Poor Appetite, Macronutrient Intake, and Dietary Quality but Not with Undernutrition in Older Adults. *The Journal of Nutrition* 2021; 151: 605–614. doi:10.1093/jn/nxaa400
- [100] de Jaeger C. *Physiologie du vieillissement*. EM-Consulte Traité de Médecine AKOS 2017;
- [101] Chang AY, Skirbekk VF, Tyrovolas S, et al. Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Public Health* 2019; 4: e159–e167. doi:10.1016/S2468-2667(19)30019-2
- [102] Li Z, Zhang Z, Ren Y, et al. Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. *Biogerontology* 2021; 22: 165–187. doi:10.1007/s10522-021-09910-5
- [103] Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 1997; 127: 990S-991S. doi:10.1093/jn/127.5.990S
- [104] Morley JE. Anorexia, sarcopenia, and aging. *Nutrition* 2001; 17: 660–663. doi:10.1016/s0899-9007(01)00574-3
- [105] Fielding RA, Vellas B, Evans WJ, et al. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Current consensus definition: prevalence, etiology, and consequences. International working group on sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc* 2011; 12: 249–256. doi:10.1016/j.jamda.2011.01.003
- [106] Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 755–763. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a009520
- [107] Janssen I, Heymsfield SB, Ross R. Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 889–896. doi:10.1046/j.1532-5415.2002.50216.x
- [108] Chen L-K, Liu L-K, Woo J, et al. Sarcopenia in Asia: Consensus Report of the Asian Working Group for Sarcopenia. *Journal of the American Medical Directors Association* 2014; 15: 95–101. doi:10.1016/j.jamda.2013.11.025
- [109] Newman AB, Kupelian V, Visser M, et al. Strength, but not muscle mass, is associated with mortality in the health, aging and body composition study cohort. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61: 72–77. doi:10.1093/gerona/61.1.72
- [110] Visser M, Kritchevsky SB, Goodpaster BH, et al. Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the health, aging and body composition study. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 897–904. doi:10.1046/j.1532-5415.2002.50217.x
- [111] Schaap LA, Koster A, Visser M. Adiposity, muscle mass, and muscle strength in relation to functional decline in older persons. *Epidemiol Rev* 2013; 35: 51–65. doi:10.1093/epirev/mxs006
- [112] Visser M, Deeg DJ, Lips P, et al. Skeletal muscle mass and muscle strength in relation to lower-extremity performance in older men and women. *J Am Geriatr Soc* 2000; 48: 381–386. doi:10.1111/j.1532-5415.2000.tb04694.x
- [113] Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 2010; 39: 412–423. doi:10.1093/ageing/afq034

- [114] Cao L, Morley JE. Sarcopenia Is Recognized as an Independent Condition by an International Classification of Disease, Tenth Revision, Clinical Modification (ICD-10-CM) Code. *J Am Med Dir Assoc* 2016; 17: 675–677. doi:10.1016/j.jamda.2016.06.001
- [115] Cruz-Jentoft AJ, Sayer AA. Sarcopenia. *Lancet* 2019; 393: 2636–2646. doi:10.1016/S0140-6736(19)31138-9
- [116] Saggini R, Carmignano SM, Cosenza L, et al. Sarcopenia in Chronic Illness and Rehabilitative Approaches. IntechOpen; 2017
- [117] Zamboni M, Rubele S, Rossi AP. Sarcopenia and obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2019; 22: 13–19. doi:10.1097/MCO.0000000000000519
- [118] Iannuzzi-Sucich M, Prestwood KM, Kenny AM. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: M772-777. doi:10.1093/gerona/57.12.m772
- [119] Patel HP, Clift E, Lewis L, et al. Epidemiology of Sarcopenia and Frailty. In: Dionysiou Y, Hrsg. *Frailty and Sarcopenia - Onset, Development and Clinical Challenges*. InTech; 2017
- [120] Mayhew AJ, Amog K, Phillips S, et al. The prevalence of sarcopenia in community-dwelling older adults, an exploration of differences between studies and within definitions: a systematic review and meta-analyses. *Age and Ageing* 2019; 48: 48–56. doi:10.1093/ageing/afy106
- [121] Petermann-Rocha F, Balntzi V, Gray SR, et al. Global prevalence of sarcopenia and severe sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2022; 13: 86–99. doi:10.1002/jcsm.12783
- [122] Malmstrom TK, Miller DK, Simonsick EM, et al. SARC-F: a symptom score to predict persons with sarcopenia at risk for poor functional outcomes. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2016; 7: 28–36. doi:10.1002/jcsm.12048
- [123] Larsson L, Degens H, Li M, et al. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. *Physiol Rev* 2019; 99: 427–511. doi:10.1152/physrev.00061.2017
- [124] de D. Beas-Jiménez J, López-Lluch G, Sánchez-Martínez I, et al. Sarcopenia, implications of physical exercise in its pathophysiology. prevention and treatment. *Rev Andal Med Deporte* 2011; 4: 158–166
- [125] Ziaaldini MM, Marzetti E, Picca A, et al. Biochemical Pathways of Sarcopenia and Their Modulation by Physical Exercise: A Narrative Review. *Frontiers in Medicine* 2017; 4
- [126] Magne H. Atrophie et récupération musculaire chez le rat âgé immobilisé : rôle de la nutrition. *Clermont-Ferrand* 1; 2011
- [127] Proctor DN, Sinning WE, Walro JM, et al. Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol* (1985) 1995; 78: 2033–2038. doi:10.1152/jappl.1995.78.6.2033
- [128] Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50 Spec No: 11–16. doi:10.1093/gerona/50a.special\_issue.11
- [129] Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, et al. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E151-157. doi:10.1152/ajpendo.00278.2006



- [130] Nilwik R, Snijders T, Leenders M, et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Experimental Gerontology* 2013; 48: 492–498. doi:10.1016/j.exger.2013.02.012
- [131] Petrella JK, Kim J, Cross JM, et al. Efficacy of myonuclear addition may explain differential myofiber growth among resistance-trained young and older men and women. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 2006; 291: E937–E946. doi:10.1152/ajpendo.00190.2006
- [132] Lexell J, Taylor CC, Sjöström M. What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* 1988; 84: 275–294. doi:10.1016/0022-510x(88)90132-3
- [133] Murgia M, Toniolo L, Nagaraj N, et al. Single Muscle Fiber Proteomics Reveals Fiber-Type-Specific Features of Human Muscle Aging. *Cell Reports* 2017; 19: 2396–2409. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.054
- [134] Hunt LC, Graca FA, Pagala V, et al. Integrated genomic and proteomic analyses identify stimulus-dependent molecular changes associated with distinct modes of skeletal muscle atrophy. *Cell Reports* 2021; 37: 109971. doi:10.1016/j.celrep.2021.109971
- [135] Tieland M, Trouwborst I, Clark BC. Skeletal muscle performance and ageing: Skeletal muscle performance and ageing. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2018; 9: 3–19. doi:10.1002/jcsm.12238
- [136] Andersen JL. Muscle fibre type adaptation in the elderly human muscle. *Scand J Med Sci Sports* 2003; 13: 40–47. doi:10.1034/j.1600-0838.2003.00299.x
- [137] Siu PM, Pistilli EE, Alway SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289: R1015-1026. doi:10.1152/ajpregu.00198.2005
- [138] Chung L, Ng Y-C. Age-related alterations in expression of apoptosis regulatory proteins and heat shock proteins in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1762: 103–109. doi:10.1016/j.bbadis.2005.08.003
- [139] Marzetti E, Wohlgemuth SE, Lees HA, et al. Age-related activation of mitochondrial caspase-independent apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle. *Mech Ageing Dev* 2008; 129: 542–549. doi:10.1016/j.mad.2008.05.005
- [140] Marzetti E, Calvani R, Bernabei R, et al. Apoptosis in skeletal myocytes: a potential target for interventions against sarcopenia and physical frailty - a mini-review. *Gerontology* 2012; 58: 99–106. doi:10.1159/000330064
- [141] Gueugneau M, Coudy-Gandilhon C, Chambon C, et al. Muscle Proteomic and Transcriptomic Profiling of Healthy Aging and Metabolic Syndrome in Men. *IJMS* 2021; 22: 4205. doi:10.3390/ijms22084205
- [142] Tumasian RA, Harish A, Kundu G, et al. Skeletal muscle transcriptome in healthy aging. *Nat Commun* 2021; 12: 2014. doi:10.1038/s41467-021-22168-2
- [143] Mamoshina P, Volosnikova M, Ozerov IV, et al. Machine Learning on Human Muscle Transcriptomic Data for Biomarker Discovery and Tissue-Specific Drug Target Identification. *Frontiers in Genetics* 2018; 9
- [144] Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol Aspects Med* 2016; 50: 109–117. doi:10.1016/j.mam.2016.02.002
- [145] Aversa Z, Zhang X, Fielding RA, et al. The clinical impact and biological mechanisms of skeletal muscle aging. *Bone* 2019; 127: 26–36. doi:10.1016/j.bone.2019.05.021

- [146] Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, et al. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 2014; 506: 316–321. doi:10.1038/nature13013
- [147] Verdijk LB, Snijders T, Drost M, et al. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age (Dordr)* 2014; 36: 545–547. doi:10.1007/s11357-013-9583-2
- [148] Pascual-Fernández J, Fernández-Montero A, Córdova-Martínez A, et al. Sarcopenia: Molecular Pathways and Potential Targets for Intervention. *Int J Mol Sci* 2020; 21: E8844. doi:10.3390/ijms21228844
- [149] Domingues-Faria C, Vasson M-P, Goncalves-Mendes N, et al. Skeletal muscle regeneration and impact of aging and nutrition. *Ageing Research Reviews* 2016; 26: 22–36. doi:10.1016/j.arr.2015.12.004
- [150] Wiedmer P, Jung T, Castro JP, et al. Sarcopenia - Molecular mechanisms and open questions. *Ageing Res Rev* 2021; 65: 101200. doi:10.1016/j.arr.2020.101200
- [151] Deschenes MR, Flannery R, Hawbaker A, et al. Adaptive Remodeling of the Neuromuscular Junction with Aging. *Cells* 2022; 11: 1150. doi:10.3390/cells11071150
- [152] Taetzsch T, Valdez G. NMJ maintenance and repair in aging. *Curr Opin Physiol* 2018; 4: 57–64. doi:10.1016/j.cophys.2018.05.007
- [153] Wokke JH, Jennekens FG, van den Oord CJ, et al. Morphological changes in the human end plate with age. *J Neurol Sci* 1990; 95: 291–310. doi:10.1016/0022-510x(90)90076-y
- [154] Fuertes-Alvarez S, Izeta A. Terminal Schwann Cell Aging: Implications for Age-Associated Neuromuscular Dysfunction. *Ageing Dis* 2021; 12: 494–514. doi:10.14336/AD.2020.0708
- [155] Prakash YS, Sieck GC. Age-related remodeling of neuromuscular junctions on type-identified diaphragm fibers. *Muscle Nerve* 1998; 21: 887–895. doi:10.1002/(sici)1097-4598(199807)21:7<887::aid-mus6>3.0.co;2-2
- [156] Landers-Ramos RQ, Prior SJ. The Microvasculature and Skeletal Muscle Health in Aging. *Exerc Sport Sci Rev* 2018; 46: 172–179. doi:10.1249/JES.0000000000000151
- [157] Dardevet D, Rieu I, Fafournoux P, et al. Leucine: a key amino acid in ageing-associated sarcopenia? *Nutr Res Rev* 2003; 16: 61–70. doi:10.1079/NRR200252
- [158] Guillet C, Boirie Y. Insulin resistance: a contributing factor to age-related muscle mass loss? *Diabetes Metab* 2005; 31 Spec No 2: 5S20-25S26. doi:10.1016/s1262-3636(05)73648-x
- [159] Paulussen KJM, McKenna CF, Beals JW, et al. Anabolic Resistance of Muscle Protein Turnover Comes in Various Shapes and Sizes. *Front Nutr* 2021; 8: 615849. doi:10.3389/fnut.2021.615849
- [160] Dardevet D, Sornet C, Balage M, et al. Stimulation of in vitro rat muscle protein synthesis by leucine decreases with age. *J Nutr* 2000; 130: 2630–2635. doi:10.1093/jn/130.11.2630
- [161] Guillet C, Prod'homme M, Balage M, et al. Impaired anabolic response of muscle protein synthesis is associated with S6K1 dysregulation in elderly humans. *FASEB J* 2004; 18: 1586–1587. doi:10.1096/fj.03-1341fje
- [162] Kimball SR, Jefferson LS. Control of protein synthesis by amino acid availability: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 2002; 5: 63–67. doi:10.1097/00075197-200201000-00012
- [163] Bohé J, Low A, Wolfe RR, et al. Human Muscle Protein Synthesis is Modulated by Extracellular, Not Intramuscular Amino Acid Availability: A Dose-Response Study. *The Journal of Physiology* 2003; 552: 315–324. doi:10.1113/jphysiol.2003.050674

- [164] Phillips BE, Atherton PJ, Varadhan K, et al. The effects of resistance exercise training on macro- and micro-circulatory responses to feeding and skeletal muscle protein anabolism in older men: Exercise, blood flow and muscle anabolism. *J Physiol* 2015; 593: 2721–2734. doi:10.1113/JP270343
- [165] Prokopidis K, Chambers E, Ni Lochlainn M, et al. Mechanisms Linking the Gut-Muscle Axis With Muscle Protein Metabolism and Anabolic Resistance: Implications for Older Adults at Risk of Sarcopenia. *Front Physiol* 2021; 12: 770455. doi:10.3389/fphys.2021.770455
- [166] Ticinesi A, Nouvenne A, Cerundolo N, et al. Gut Microbiota, Muscle Mass and Function in Aging: A Focus on Physical Frailty and Sarcopenia. *Nutrients* 2019; 11: 1633. doi:10.3390/nu11071633
- [167] Newman E, Heslin MJ, Wolf RF, et al. The effect of systemic hyperinsulinemia with concomitant amino acid infusion on skeletal muscle protein turnover in the human forearm. *Metabolism* 1994; 43: 70–78. doi:10.1016/0026-0495(94)90159-7
- [168] Biolo G, Declan Fleming RY, Wolfe RR. Physiologic hyperinsulinemia stimulates protein synthesis and enhances transport of selected amino acids in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 1995; 95: 811–819
- [169] Fujita S, Rasmussen BB, Cadenas JG, et al. Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006; 291: E745–754. doi:10.1152/ajpendo.00271.2005
- [170] Timmerman KL, Lee JL, Dreyer HC, et al. Insulin Stimulates Human Skeletal Muscle Protein Synthesis via an Indirect Mechanism Involving Endothelial-Dependent Vasodilation and Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 Signaling. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95: 3848–3857. doi:10.1210/jc.2009-2696
- [171] Boirie Y, Gachon P, Cordat N, et al. Differential insulin sensitivities of glucose, amino acid, and albumin metabolism in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 638–644. doi:10.1210/jcem.86.2.7193
- [172] Rasmussen BB, Fujita S, Wolfe RR, et al. Insulin resistance of muscle protein metabolism in aging. *FASEB J* 2006; 20: 768–769. doi:10.1096/fj.05-4607fje
- [173] Guillet C, Delcourt I, Rance M, et al. Changes in basal and insulin and amino acid response of whole body and skeletal muscle proteins in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 3044–3050. doi:10.1210/jc.2008-2216
- [174] Cleasby ME, Jamieson PM, Atherton PJ. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *Journal of Endocrinology* 2016; 229: R67–R81. doi:10.1530/JOE-15-0533
- [175] Tardif N, Salles J, Landrier J-F, et al. Oleate-enriched diet improves insulin sensitivity and restores muscle protein synthesis in old rats. *Clinical Nutrition* 2011; 30: 799–806. doi:10.1016/j.clnu.2011.05.009
- [176] Barazzoni R, Zanetti M, Gortan Cappellari G, et al. Fatty acids acutely enhance insulin-induced oxidative stress and cause insulin resistance by increasing mitochondrial reactive oxygen species (ROS) generation and nuclear factor- $\kappa$ B inhibitor (I $\kappa$ B)-nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activation in rat muscle, in the absence of mitochondrial dysfunction. *Diabetologia* 2012; 55: 773–782. doi:10.1007/s00125-011-2396-x
- [177] Tardif N, Salles J, Guillet C, et al. Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 $\alpha$  activation. *Aging Cell* 2014; 13: 1001. doi:10.1111/acel.12263
- [178] Volpi E, Mittendorfer B, Rasmussen BB, et al. The response of muscle protein anabolism to combined hyperaminoacidemia and glucose-induced hyperinsulinemia is impaired in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4481–4490. doi:10.1210/jcem.85.12.7021

- [179] Shou J, Chen P-J, Xiao W-H. Mechanism of increased risk of insulin resistance in aging skeletal muscle. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2020; 12: 14. doi:10.1186/s13098-020-0523-x
- [180] Franceschi C, Capri M, Monti D, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development* 2007; 128: 92–105. doi:10.1016/j.mad.2006.11.016
- [181] Webster JM, Kempen LJAP, Hardy RS, et al. Inflammation and Skeletal Muscle Wasting During Cachexia. *Front Physiol* 2020; 11. doi:10.3389/fphys.2020.597675
- [182] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761–1772. doi:10.2337/db06-1491
- [183] Bleau C, Karelis AD, St-Pierre DH, et al. Crosstalk between intestinal microbiota, adipose tissue and skeletal muscle as an early event in systemic low-grade inflammation and the development of obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2015; 31: 545–561. doi:10.1002/dmrr.2617
- [184] Picca A, Fanelli F, Calvani R, et al. Gut Dysbiosis and Muscle Aging: Searching for Novel Targets against Sarcopenia. *Mediators of Inflammation* 2018; 2018: 1–15. doi:10.1155/2018/7026198
- [185] Dalle S, Rossmeislova L, Koppo K. The Role of Inflammation in Age-Related Sarcopenia. *Front Physiol* 2017; 8. doi:10.3389/fphys.2017.01045
- [186] Li Y-P, Chen Y, John J, et al. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 2005; 19: 362–370. doi:10.1096/fj.04-2364com
- [187] Lang CH, Frost RA. Sepsis-induced suppression of skeletal muscle translation initiation mediated by tumor necrosis factor alpha. *Metabolism* 2007; 56: 49–57. doi:10.1016/j.metabol.2006.08.025
- [188] Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, et al. Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *J Physiol* 2009; 587: 5483–5492. doi:10.1113/jphysiol.2009.178319
- [189] Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, et al. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J* 2013; 280: 4131–4148. doi:10.1111/febs.12338
- [190] Grosicki GJ, Fielding RA, Lustgarten MS. Gut Microbiota Contribute to Age-Related Changes in Skeletal Muscle Size, Composition, and Function: Biological Basis for a Gut-Muscle Axis. *Calcif Tissue Int* 2018; 102: 433–442. doi:10.1007/s00223-017-0345-5
- [191] Argilés JM. The 2015 ESPEN Sir David Cuthbertson lecture: Inflammation as the driving force of muscle wasting in cancer. *Clinical Nutrition* 2017; 36: 798–803. doi:10.1016/j.clnu.2016.05.010
- [192] Degens H. Age-related skeletal muscle dysfunction: causes and mechanisms. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7: 246–252
- [193] Liang H, Hussey SE, Sanchez-Avila A, et al. Effect of Lipopolysaccharide on Inflammation and Insulin Action in Human Muscle. *PLoS One* 2013; 8. doi:10.1371/journal.pone.0063983
- [194] Nelke C, Dziewas R, Minnerup J, et al. Skeletal muscle as potential central link between sarcopenia and immune senescence. *EBioMedicine* 2019; 49: 381–388. doi:10.1016/j.ebiom.2019.10.034
- [195] Anagnostou M-E, Hepple RT. Mitochondrial Mechanisms of Neuromuscular Junction Degeneration with Aging. *Cells* 2020; 9: E197. doi:10.3390/cells9010197

- [196] Alway SE, Mohamed JS, Myers MJ. Mitochondria Initiate and Regulate Sarcopenia. *Exerc Sport Sci Rev* 2017; 45: 58–69. doi:10.1249/JES.0000000000000101
- [197] Leduc-Gaudet J-P, Picard M, St-Jean Pelletier F, et al. Mitochondrial morphology is altered in atrophied skeletal muscle of aged mice. *Oncotarget* 2015; 6: 17923–17937. doi:10.18632/oncotarget.4235
- [198] Chabi B, Ljubicic V, Menzies KJ, et al. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* 2008; 7: 2–12. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00347.x
- [199] Karakelides H, Irving BA, Short KR, et al. Age, Obesity, and Sex Effects on Insulin Sensitivity and Skeletal Muscle Mitochondrial Function. *Diabetes* 2010; 59: 89–97. doi:10.2337/db09-0591
- [200] Okumura N, Toda T, Ozawa Y, et al. Royal Jelly Delays Motor Functional Impairment During Aging in Genetically Heterogeneous Male Mice. *Nutrients* 2018; 10: 1191. doi:10.3390/nu10091191
- [201] Rong S, Wang L, Peng Z, et al. The mechanisms and treatments for sarcopenia: could exosomes be a perspective research strategy in the future? *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2020; 11: 348–365. doi:10.1002/jcsm.12536
- [202] Safdar A, Hamadeh MJ, Kaczor JJ, et al. Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PLoS One* 2010; 5: e10778. doi:10.1371/journal.pone.0010778
- [203] Joseph A-M, Adihetty PJ, Buford TW, et al. The impact of aging on mitochondrial function and biogenesis pathways in skeletal muscle of sedentary high- and low-functioning elderly individuals. *Aging Cell* 2012; 11: 801–809. doi:10.1111/j.1474-9726.2012.00844.x
- [204] Viña J, Gomez-Cabrera MC, Borrás C, et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 1369–1374. doi:10.1016/j.addr.2009.06.006
- [205] Sriram S, Subramanian S, Sathiakumar D, et al. Modulation of reactive oxygen species in skeletal muscle by myostatin is mediated through NF- $\kappa$ B. *Aging Cell* 2011; 10: 931–948. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00734.x
- [206] Consitt LA, Clark BC. The Vicious Cycle of Myostatin Signaling in Sarcopenic Obesity: Myostatin Role in Skeletal Muscle Growth, Insulin Signaling and Implications for Clinical Trials. *J Frailty Aging* 2018; 7: 21–27. doi:10.14283/jfa.2017.33
- [207] Barreiro E. Role of Protein Carbonylation in Skeletal Muscle Mass Loss Associated with Chronic Conditions. *Proteomes* 2016; 4: 18. doi:10.3390/proteomes4020018
- [208] Lourenço Dos Santos S, Baraibar MA, Lundberg S, et al. Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing. *Redox Biol* 2015; 5: 267–274. doi:10.1016/j.redox.2015.05.006
- [209] Mitchell WK, Wilkinson DJ, Phillips BE, et al. Human Skeletal Muscle Protein Metabolism Responses to Amino Acid Nutrition. *Adv Nutr* 2016; 7: 828S-838S. doi:10.3945/an.115.011650
- [210] Frontera WR, Ochala J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int* 2015; 96: 183–195. doi:10.1007/s00223-014-9915-y
- [211] Welle S, Thornton C, Jozefowicz R, et al. Myofibrillar protein synthesis in young and old men. *Am J Physiol* 1993; 264: E693-698. doi:10.1152/ajpendo.1993.264.5.E693
- [212] Hasten DL, Pak-Loduca J, Obert KA, et al. Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32 yr olds. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E620-626. doi:10.1152/ajpendo.2000.278.4.E620

- [213] Wall BT, Gorissen SH, Pennings B, et al. Aging Is Accompanied by a Blunted Muscle Protein Synthetic Response to Protein Ingestion. *PLoS One* 2015; 10: e0140903. doi:10.1371/journal.pone.0140903
- [214] Cuthbertson D, Smith K, Babraj J, et al. Anabolic signaling deficits underlie amino acid resistance of wasting, aging muscle. *FASEB J* 2005; 19: 422–424. doi:10.1096/fj.04-2640fje
- [215] Rooyackers OE, Adey DB, Ades PA, et al. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996; 93: 15364. doi:10.1073/pnas.93.26.15364
- [216] Balagopal P, Rooyackers OE, Adey DB, et al. Effects of aging on in vivo synthesis of skeletal muscle myosin heavy-chain and sarcoplasmic protein in humans. *Am J Physiol* 1997; 273: E790-800. doi:10.1152/ajpendo.1997.273.4.E790
- [217] Cade WT, Yarasheski KE. Metabolic and molecular aspects of sarcopenia. *Principles of Molecular Medicine* 2006; 529–534. doi:10.1007/978-1-59259-963-9\_50
- [218] Kumar V, Selby A, Rankin D, et al. Age-related differences in the dose-response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. *J Physiol* 2009; 587: 211–217. doi:10.1113/jphysiol.2008.164483
- [219] Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 1014–1019. doi:10.1038/ncb1101-1014
- [220] Vainshtein A, Sandri M. Signaling Pathways That Control Muscle Mass. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21: 4759. doi:10.3390/ijms21134759
- [221] Sartori R, Romanello V, Sandri M. Mechanisms of muscle atrophy and hypertrophy: implications in health and disease. *Nature Communications* 2021; 12: 330. doi:10.1038/s41467-020-20123-1
- [222] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 132–141. doi:10.1038/ncb2152
- [223] Deleyto-Seldas N, Efeyan A. The mTOR–Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021; 9
- [224] Sandri M, Barberi L, Bijlsma AY, et al. Signalling pathways regulating muscle mass in ageing skeletal muscle: the role of the IGF1-Akt-mTOR-FoxO pathway. *Biogerontology* 2013; 14: 303–323. doi:10.1007/s10522-013-9432-9
- [225] Markofski MM, Dickinson JM, Drummond MJ, et al. Effect of age on basal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling in a large cohort of young and older men and women. *Experimental Gerontology* 2015; 65: 1–7. doi:10.1016/j.exger.2015.02.015
- [226] Guillén C, Benito M. mTORC1 Overactivation as a Key Aging Factor in the Progression to Type 2 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology* 2018; 9
- [227] Nunes EA, Stokes T, McKendry J, et al. Disuse-induced skeletal muscle atrophy in disease and non-disease states in humans: mechanisms, prevention, and recovery strategies. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2022; ajpcell.00425.2021. doi:10.1152/ajpcell.00425.2021
- [228] Ferrington DA, Husom AD, Thompson LV. Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J* 2005; 19: 644–646. doi:10.1096/fj.04-2578fje

- [229] Combaret L, Dardevet D, B chet D, et al. Skeletal muscle proteolysis in aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 2009; 12: 37–41. doi:10.1097/MCO.0b013e32831b9c31
- [230] Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2015; 6: 197–207. doi:10.1002/jcsm.12043
- [231] Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001; 294: 1704–1708. doi:10.1126/science.1065874
- [232] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425–479. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425
- [233] Deruisseau KC, Kavazis AN, Powers SK. Selective downregulation of ubiquitin conjugation cascade mRNA occurs in the senescent rat soleus muscle. *Exp Gerontol* 2005; 40: 526–531. doi:10.1016/j.exger.2005.04.005
- [234] Clavel S, Coldefy A-S, Kurkdjian E, et al. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 794–801. doi:10.1016/j.mad.2006.07.005
- [235] Altun M, Besche HC, Overkleeft HS, et al. Muscle wasting in aged, sarcopenic rats is associated with enhanced activity of the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 2010; 285: 39597–39608. doi:10.1074/jbc.M110.129718
- [236] Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, et al. Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiol Genomics* 2003; 14: 149–159. doi:10.1152/physiolgenomics.00049.2003
- [237] Whitman SA, Wacker MJ, Richmond SR, et al. Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch* 2005; 450: 437–446. doi:10.1007/s00424-005-1473-8
- [238] Edstr m E, Altun M, Hägglund M, et al. Atrogin-1/MAFbx and MuRF1 are downregulated in aging-related loss of skeletal muscle. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61: 663–674. doi:10.1093/gerona/61.7.663
- [239] Sandri M. Protein breakdown in muscle wasting: role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 2121–2129. doi:10.1016/j.biocel.2013.04.023
- [240] Li J, Zhang D, Wiersma M, et al. Role of Autophagy in Proteostasis: Friend and Foe in Cardiac Diseases. *Cells* 2018; 7: 279. doi:10.3390/cells7120279
- [241] Ho M, Patel A, Hanley C, et al. Exploiting autophagy in multiple myeloma. *JCMT* 2019; 2019. doi:10.20517/2394-4722.2019.25
- [242] Kitada M, Koya D. Autophagy in metabolic disease and ageing. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17: 647–661. doi:10.1038/s41574-021-00551-9
- [243] Douglas PM, Dillin A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol* 2010; 190: 719–729. doi:10.1083/jcb.201005144
- [244] Jiao J, Demontis F. Skeletal muscle autophagy and its role in sarcopenia and organismal aging. *Current Opinion in Pharmacology* 2017; 34: 1–6. doi:10.1016/j.coph.2017.03.009

- [245] Hütter E, Skovbro M, Lener B, et al. Oxidative stress and mitochondrial impairment can be separated from lipofuscin accumulation in aged human skeletal muscle. *Aging Cell* 2007; 6: 245–256. doi:10.1111/j.1474-9726.2007.00282.x
- [246] Masiero E, Agatea L, Mammucari C, et al. Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab* 2009; 10: 507–515. doi:10.1016/j.cmet.2009.10.008
- [247] O’Leary MF, Vainshtein A, Iqbal S, et al. Adaptive plasticity of autophagic proteins to denervation in aging skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304: C422-430. doi:10.1152/ajpcell.00240.2012
- [248] Carnio S, LoVerso F, Baraibar MA, et al. Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging. *Cell Rep* 2014; 8: 1509–1521. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.061
- [249] Russ DW, Boyd IM, McCoy KM, et al. Muscle-specificity of age-related changes in markers of autophagy and sphingolipid metabolism. *Biogerontology* 2015; 16: 747–759. doi:10.1007/s10522-015-9598-4
- [250] García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* 2016; 529: 37–42. doi:10.1038/nature16187
- [251] Jiao N, Baker SS, Nugent CA, et al. Gut microbiome may contribute to insulin resistance and systemic inflammation in obese rodents: a meta-analysis. *Physiol Genomics* 2018; 50: 244–254. doi:10.1152/physiolgenomics.00114.2017
- [252] Sandri M. Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298: C1291-1297. doi:10.1152/ajpcell.00531.2009
- [253] Thyfault JP, Du M, Kraus WE, et al. Physiology of sedentary behavior and its relationship to health outcomes. *Med Sci Sports Exerc* 2015; 47: 1301–1305. doi:10.1249/MSS.0000000000000518
- [254] Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Compr Physiol* 2012; 2: 1143–1211. doi:10.1002/cphy.c110025
- [255] World Health Organization. WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour. 2020
- [256] Crosnier D. Les activités physiques et sportives des seniors. In: Canneva H, Hrsg. La pratique des activités physiques et sportives en France : Enquête 2003 – Ministère de la Jeunesse, des Sports et de la Vie associative Ministère de la Culture et de la Communication, Insee. Paris: INSEP-Éditions; 2018: 81–98
- [257] Sun F, Norman IJ, While AE. Physical activity in older people: a systematic review. *BMC Public Health* 2013; 13: 449. doi:10.1186/1471-2458-13-449
- [258] Bowden Davies KA, Sprung VS, Norman JA, et al. Short-term decreased physical activity with increased sedentary behaviour causes metabolic derangements and altered body composition: effects in individuals with and without a first-degree relative with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2018; 61: 1282–1294. doi:10.1007/s00125-018-4603-5
- [259] Mahmassani ZS, Reidy PT, McKenzie AI, et al. Disuse-induced insulin resistance susceptibility coincides with a dysregulated skeletal muscle metabolic transcriptome. *J Appl Physiol* (1985) 2019; 126: 1419–1429. doi:10.1152/jappphysiol.01093.2018
- [260] Breen L, Stokes KA, Churchward-Venne TA, et al. Two Weeks of Reduced Activity Decreases Leg Lean Mass and Induces “Anabolic Resistance” of Myofibrillar Protein Synthesis in Healthy Elderly. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013; 98: 2604–2612. doi:10.1210/jc.2013-1502



- [261] Rommersbach N, Wirth R, Lueg G, et al. The impact of disease-related immobilization on thigh muscle mass and strength in older hospitalized patients. *BMC Geriatrics* 2020; 20: 500. doi:10.1186/s12877-020-01873-5
- [262] Léger B, Cartoni R, Praz M, et al. Akt signalling through GSK-3beta, mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol* 2006; 576: 923–933. doi:10.1113/jphysiol.2006.116715
- [263] Moro T, Paoli A. When COVID-19 affects muscle: effects of quarantine in older adults. *Eur J Transl Myol* 2020; 30: 9069. doi:10.4081/ejtm.2019.9069
- [264] Magne H, Savary-Auzeloux I, Rémond D, et al. Nutritional strategies to counteract muscle atrophy caused by disuse and to improve recovery. *Nutr Res Rev* 2013; 26: 149–165. doi:10.1017/S0954422413000115
- [265] Bailey DM, McEneny J, Mathieu-Costello O, et al. Sedentary aging increases resting and exercise-induced intramuscular free radical formation. *Journal of Applied Physiology* 2010; 109: 449–456. doi:10.1152/jappphysiol.00354.2010
- [266] McKenna CF, Fry CS. Altered satellite cell dynamics accompany skeletal muscle atrophy during chronic illness, disuse, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2017; 20: 447–452. doi:10.1097/MCO.0000000000000409
- [267] Garmany A, Yamada S, Terzic A. Longevity leap: mind the healthspan gap. *npj Regen Med* 2021; 6: 1–7. doi:10.1038/s41536-021-00169-5
- [268] Insee. *Espérance de vie en bonne santé – Indicateurs de richesse nationale* | Insee. Institut national de la statistique et des études économiques (INSEE); 2021
- [269] Steves CJ, Spector TD, Jackson SHD. Ageing, genes, environment and epigenetics: what twin studies tell us now, and in the future. *Age and Ageing* 2012; 41: 581–586. doi:10.1093/ageing/afs097
- [270] Passarino G, De Rango F, Montesanto A. Human longevity: Genetics or Lifestyle? It takes two to tango. *Immunity & Ageing* 2016; 13: 12. doi:10.1186/s12979-016-0066-z
- [271] van den Berg N, Beekman M, Smith KR, et al. Historical demography and longevity genetics: Back to the future. *Ageing Res Rev* 2017; 38: 28–39. doi:10.1016/j.arr.2017.06.005
- [272] Partridge L, Deelen J, Slagboom PE. Facing up to the global challenges of ageing. *Nature* 2018; 561: 45–56. doi:10.1038/s41586-018-0457-8
- [273] Sathyan S, Verghese J. Genetics of frailty: A longevity perspective. *Transl Res* 2020; 221: 83–96. doi:10.1016/j.trsl.2020.03.005
- [274] Dato S, Montesanto A, Lagani V, et al. Frailty phenotypes in the elderly based on cluster analysis: a longitudinal study of two Danish cohorts. Evidence for a genetic influence on frailty. *Age (Dordr)* 2012; 34: 571–582. doi:10.1007/s11357-011-9257-x
- [275] Lorenzo-López L, Maseda A, de Labra C, et al. Nutritional determinants of frailty in older adults: A systematic review. *BMC Geriatr* 2017; 17: 108. doi:10.1186/s12877-017-0496-2
- [276] Feart C. Nutrition and frailty: Current knowledge. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2019; 95: 109703. doi:10.1016/j.pnpbp.2019.109703
- [277] Ni Lochlainn M, Cox NJ, Wilson T, et al. Nutrition and Frailty: Opportunities for Prevention and Treatment. *Nutrients* 2021; 13: 2349. doi:10.3390/nu13072349

- [278] Montiel-Rojas D, Nilsson A, Santoro A, et al. Dietary Fibre May Mitigate Sarcopenia Risk: Findings from the NU-AGE Cohort of Older European Adults. *Nutrients* 2020; 12. doi:10.3390/nu12041075
- [279] Kehler DS, Theou O. The impact of physical activity and sedentary behaviors on frailty levels. *Mechanisms of Ageing and Development* 2019; 180: 29–41. doi:10.1016/j.mad.2019.03.004
- [280] da Silva VD, Tribess S, Meneguci J, et al. Association between frailty and the combination of physical activity level and sedentary behavior in older adults. *BMC Public Health* 2019; 19: 709. doi:10.1186/s12889-019-7062-0
- [281] Mañas A, Del Pozo-Cruz B, Rodríguez-Gómez I, et al. Dose-response association between physical activity and sedentary time categories on ageing biomarkers. *BMC Geriatr* 2019; 19: 270. doi:10.1186/s12877-019-1284-y
- [282] Amiri S, Behnezhad S. Systematic review and meta-analysis of the association between smoking and the incidence of frailty. *Neuropsychiatr* 2019; 33: 198–206. doi:10.1007/s40211-019-0315-4
- [283] Shin J, Kim KJ, Choi J. Smoking, alcohol intake, and frailty in older Korean adult men: cross-sectional study with nationwide data. *Eur Geriatr Med* 2020; 11: 269–277. doi:10.1007/s41999-019-00271-4
- [284] Kojima G, Jivraj S, Iliffe S, et al. Alcohol Consumption and Risk of Incident Frailty: The English Longitudinal Study of Aging. *J Am Med Dir Assoc* 2019; 20: 725–729. doi:10.1016/j.jamda.2018.10.011
- [285] Jazbar J, Locatelli I, Kos M. The association between medication or alcohol use and the incidence of frailty: a retrospective cohort study. *BMC Geriatr* 2021; 21: 25. doi:10.1186/s12877-020-01969-y
- [286] Sirven N, Dumontet M, Rapp T. The dynamics of frailty and change in socio-economic conditions: evidence for the 65+ in Europe. *Eur J Public Health* 2020; 30: 715–719. doi:10.1093/eurpub/ckaa068
- [287] GBD 2016 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 2017; 390: 1345–1422. doi:10.1016/S0140-6736(17)32366-8
- [288] Verstraeten LMG, van Wijngaarden JP, Pacifico J, et al. Association between malnutrition and stages of sarcopenia in geriatric rehabilitation inpatients: RESORT. *Clinical Nutrition* 2021; 40: 4090–4096. doi:10.1016/j.clnu.2021.02.007
- [289] de van der Schueren M a. E, Keller H, GLIM Consortium, et al. Global Leadership Initiative on Malnutrition (GLIM): Guidance on validation of the operational criteria for the diagnosis of protein-energy malnutrition in adults. *Clin Nutr* 2020; 39: 2872–2880. doi:10.1016/j.clnu.2019.12.022
- [290] Beaudart C, Sanchez-Rodriguez D, Locquet M, et al. Malnutrition as a Strong Predictor of the Onset of Sarcopenia. *Nutrients* 2019; 11: E2883. doi:10.3390/nu11122883
- [291] HAS. Stratégie de prise en charge en cas de dénutrition protéino-énergétique chez la personne âgée. Haute Autorité de Santé (HAS); 2007
- [292] HAS. Diagnostic de la dénutrition de l'enfant et de l'adulte. Haute Autorité de Santé (HAS); 2019
- [293] HAS. Diagnostic de la dénutrition chez la personne de 70 ans et plus. 2021
- [294] Raynaud-Simon A. Dénutrition de la personne âgée: épidémiologie et conséquences. In: *Traité de nutrition de la personne âgée*. Paris: Springer Paris; 2009: 165–174
- [295] Morisod J. Dénutrition de la personne âgée. *Rev Med Suisse* 2011; 7: 209–210

- [296] Rousset S, Patureau Mirand P, Brandolini M, et al. Daily protein intakes and eating patterns in young and elderly French. *Br J Nutr* 2003; 90: 1107–1115. doi:10.1079/BJN20031004
- [297] Hébel P. Evolution de la consommation de viande en France : les nouvelles données de l'enquête CCAF 2010. Centre de Recherche pour l'Étude et l'Observation des Conditions de vie (CRÉDOC); 2012
- [298] Volpi E, Campbell WW, Dwyer JT, et al. Is the optimal level of protein intake for older adults greater than the recommended dietary allowance? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68: 677–681. doi:10.1093/gerona/gls229
- [299] Sieber CC. Malnutrition and sarcopenia. *Aging Clin Exp Res* 2019; 31: 793–798. doi:10.1007/s40520-019-01170-1
- [300] Rizzoli R. Nutrition and Sarcopenia. *J Clin Densitom* 2015; 18: 483–487. doi:10.1016/j.jocd.2015.04.014
- [301] Ferry M. Nutrition de la personne âgée. Issy-les-Moulineaux [France: Elsevier Masson; 2012
- [302] Payette H, Gray-Donald K. Dietary intake and biochemical indices of nutritional status in an elderly population, with estimates of the precision of the 7-d food record. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 478–488. doi:10.1093/ajcn/54.3.478
- [303] Wakimoto P, Block G. Dietary Intake, Dietary Patterns, and Changes With Age: An Epidemiological Perspective. *The Journals of Gerontology: Series A* 2001; 56: 65–80. doi:10.1093/gerona/56.suppl\_2.65
- [304] Tieland M, Berg KJB den, Loon LV, et al. Dietary protein intake in community-dwelling, frail, and institutionalized elderly people: scope for improvement. *European Journal of Nutrition* 2011; doi:10.1007/s00394-011-0203-6
- [305] Cederholm T, Nouvenne A, Ticinesi A, et al. The role of malnutrition in older persons with mobility limitations. *Curr Pharm Des* 2014; 20: 3173–3177. doi:10.2174/13816128113196660689
- [306] Feldblum I, German L, Bilenko N, et al. Nutritional risk and health care use before and after an acute hospitalization among the elderly. *Nutrition* 2009; 25: 415–420. doi:10.1016/j.nut.2008.10.016
- [307] Fried LP, Tangen CM, Walston J, et al. Frailty in Older Adults: Evidence for a Phenotype. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2001; 56: M146–M157. doi:10.1093/gerona/56.3.M146
- [308] Morley JE, Vellas B, van Kan GA, et al. Frailty consensus: a call to action. *J Am Med Dir Assoc* 2013; 14: 392–397. doi:10.1016/j.jamda.2013.03.022
- [309] Collard RM, Boter H, Schoevers RA, et al. Prevalence of frailty in community-dwelling older persons: a systematic review. *J Am Geriatr Soc* 2012; 60: 1487–1492. doi:10.1111/j.1532-5415.2012.04054.x
- [310] Junius-Walker U, Onder G, Soleymani D, et al. The essence of frailty: A systematic review and qualitative synthesis on frailty concepts and definitions. *Eur J Intern Med* 2018; 56: 3–10. doi:10.1016/j.ejim.2018.04.023
- [311] Clegg A, Young J, Iliffe S, et al. Frailty in elderly people. *Lancet* 2013; 381: 752–762. doi:10.1016/S0140-6736(12)62167-9
- [312] Vermeiren S, Vella-Azzopardi R, Beckwée D, et al. Frailty and the Prediction of Negative Health Outcomes: A Meta-Analysis. *J Am Med Dir Assoc* 2016; 17: 1163.e1-1163.e17. doi:10.1016/j.jamda.2016.09.010
- [313] Dent E, Martin FC, Bergman H, et al. Management of frailty: opportunities, challenges, and future directions. *The Lancet* 2019; 394: 1376–1386. doi:10.1016/S0140-6736(19)31785-4

- [314] Coulongeat M, Pambet M, Chassagne P, et al. Le concept de fragilité chez la personne âgée : implications pour le rhumatologue. *Revue du Rhumatisme Monographies* 2019; 86: 164–171. doi:10.1016/j.monrhu.2019.01.005
- [315] Santos-Eggimann B, Cuenoud P, Spagnoli J, et al. Prevalence of Frailty in Middle-Aged and Older Community-Dwelling Europeans Living in 10 Countries. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2009; 64A: 675–681. doi:10.1093/gerona/glp012
- [316] Vellas B. Livre Blanc de la Fragilité « Repérage et maintien de l'autonomie des personnes âgées fragiles » | "Ensemble, prévenons la dépendance".
- [317] Mitnitski AB, Mogilner AJ, Rockwood K. Accumulation of deficits as a proxy measure of aging. *ScientificWorldJournal* 2001; 1: 323–336. doi:10.1100/tsw.2001.58
- [318] Rockwood K, Mitnitski A. Frailty in relation to the accumulation of deficits. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2007; 62: 722–727. doi:10.1093/gerona/62.7.722
- [319] Searle SD, Mitnitski A, Gahbauer EA, et al. A standard procedure for creating a frailty index. *BMC Geriatrics* 2008; 8: 24. doi:10.1186/1471-2318-8-24
- [320] Santos-Eggimann B. Évaluer la fragilité en pratique clinique: est-ce recommandable? 2013 :12 2013;
- [321] Dent E, Morley JE, Cruz-Jentoft AJ, et al. Physical Frailty: ICFSR International Clinical Practice Guidelines for Identification and Management. *J Nutr Health Aging* 2019; 23: 771–787. doi:10.1007/s12603-019-1273-z
- [322] Theou O, Brothers TD, Mitnitski A, et al. Operationalization of frailty using eight commonly used scales and comparison of their ability to predict all-cause mortality. *J Am Geriatr Soc* 2013; 61: 1537–1551. doi:10.1111/jgs.12420
- [323] Lopez D, Flicker L, Dobson A. Validation of the frail scale in a cohort of older Australian women. *J Am Geriatr Soc* 2012; 60: 171–173. doi:10.1111/j.1532-5415.2011.03746.x
- [324] Morley JE, Malmstrom TK, Miller DK. A simple frailty questionnaire (FRAIL) predicts outcomes in middle aged African Americans. *J Nutr Health Aging* 2012; 16: 601–608. doi:10.1007/s12603-012-0084-2
- [325] Subra J, Gillette-Guyonnet S, Cesari M, et al. The integration of frailty into clinical practice: preliminary results from the Gérontopôle. *J Nutr Health Aging* 2012; 16: 714–720. doi:10.1007/s12603-012-0391-7
- [326] Vellas B, Balardy L, Gillette-Guyonnet S, et al. Looking for frailty in community-dwelling older persons: the Gérontopôle Frailty Screening Tool (GFST). *J Nutr Health Aging* 2013; 17: 629–631. doi:10.1007/s12603-013-0363-6
- [327] Steverink N, Slaets J, Schuurmans H, et al. Measuring frailty: Developing and testing the GFI (Groningen frailty indicator). undefined 2001;
- [328] Rockwood K, Song X, MacKnight C, et al. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people. *CMAJ* 2005; 173: 489–495. doi:10.1503/cmaj.050051
- [329] Rolfson DB, Majumdar SR, Tsuyuki RT, et al. Validity and reliability of the Edmonton Frail Scale. *Age Ageing* 2006; 35: 526–529. doi:10.1093/ageing/afl041
- [330] WHO. Integrated care for older people: guidelines on community-level interventions to manage declines in intrinsic capacity. World Health Organization; 2017

- [331] Lazarus NR, Izquierdo M, Higginson IJ, et al. Exercise Deficiency Diseases of Ageing: The Primacy of Exercise and Muscle Strengthening as First-Line Therapeutic Agents to Combat Frailty. *J Am Med Dir Assoc* 2018; 19: 741–743. doi:10.1016/j.jamda.2018.04.014
- [332] Izquierdo M, Merchant RA, Morley JE, et al. International Exercise Recommendations in Older Adults (ICFSR): Expert Consensus Guidelines. *J Nutr Health Aging* 2021; 25: 824–853. doi:10.1007/s12603-021-1665-8
- [333] Aguirre LE, Villareal DT. Physical Exercise as Therapy for Frailty. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2015; 83: 83–92. doi:10.1159/000382065
- [334] Distefano G, Goodpaster BH. Effects of Exercise and Aging on Skeletal Muscle. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8: a029785. doi:10.1101/cshperspect.a029785
- [335] Nascimento CM, Ingles M, Salvador-Pascual A, et al. Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise. *Free Radic Biol Med* 2019; 132: 42–49. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.035
- [336] Billot M, Calvani R, Urtamo A, et al. Preserving Mobility in Older Adults with Physical Frailty and Sarcopenia: Opportunities, Challenges, and Recommendations for Physical Activity Interventions. *Clin Interv Aging* 2020; 15: 1675–1690. doi:10.2147/CIA.S253535
- [337] Angulo J, El Assar M, Álvarez-Bustos A, et al. Physical activity and exercise: Strategies to manage frailty. *Redox Biol* 2020; 35: 101513. doi:10.1016/j.redox.2020.101513
- [338] Cadore EL, Rodríguez-Mañas L, Sinclair A, et al. Effects of different exercise interventions on risk of falls, gait ability, and balance in physically frail older adults: a systematic review. *Rejuvenation Res* 2013; 16: 105–114. doi:10.1089/rej.2012.1397
- [339] Tarazona-Santabalbina FJ, Gómez-Cabrera MC, Pérez-Ros P, et al. A Multicomponent Exercise Intervention that Reverses Frailty and Improves Cognition, Emotion, and Social Networking in the Community-Dwelling Frail Elderly: A Randomized Clinical Trial. *Journal of the American Medical Directors Association* 2016; 17: 426–433. doi:10.1016/j.jamda.2016.01.019
- [340] Manor B, Lough M, Gagnon MM, et al. Functional benefits of tai chi training in senior housing facilities. *J Am Geriatr Soc* 2014; 62: 1484–1489. doi:10.1111/jgs.12946
- [341] Fairhall N, Aggar C, Kurrle SE, et al. Frailty Intervention Trial (FIT). *BMC Geriatr* 2008; 8: 27. doi:10.1186/1471-2318-8-27
- [342] Fairhall N, Sherrington C, Lord SR, et al. Effect of a multifactorial, interdisciplinary intervention on risk factors for falls and fall rate in frail older people: a randomised controlled trial. *Age Ageing* 2014; 43: 616–622. doi:10.1093/ageing/aft204
- [343] Cesari M, Vellas B, Hsu F-C, et al. A Physical Activity Intervention to Treat the Frailty Syndrome in Older Persons--Results From the LIFE-P Study. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 2015; 70: 216–222. doi:10.1093/gerona/glu099
- [344] Martínez-Velilla N, Casas-Herrero A, Zambom-Ferraresi F, et al. Effect of Exercise Intervention on Functional Decline in Very Elderly Patients During Acute Hospitalization: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med* 2019; 179: 28–36. doi:10.1001/jamainternmed.2018.4869
- [345] Sadjapong U, Yodkeeree S, Sungkarat S, et al. Multicomponent Exercise Program Reduces Frailty and Inflammatory Biomarkers and Improves Physical Performance in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized Controlled Trial. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17: E3760. doi:10.3390/ijerph17113760

- [346] Wolfe RR, Miller SL, Miller KB. Optimal protein intake in the elderly. *Clin Nutr* 2008; 27: 675–684. doi:10.1016/j.clnu.2008.06.008
- [347] ANSES. Actualisation des repères du PNNS : élaboration des références nutritionnelles. 2016
- [348] Milne AC, Potter J, Vivanti A, et al. Protein and energy supplementation in elderly people at risk from malnutrition. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; CD003288. doi:10.1002/14651858.CD003288.pub3
- [349] Bon F. Mise en place de moyens adaptés pour améliorer l'état nutritionnel des personnes âgées. Dijon; 2013
- [350] Potter JM, Roberts MA, McColl JH, et al. Protein energy supplements in unwell elderly patients--a randomized controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2001; 25: 323–329. doi:10.1177/0148607101025006323
- [351] Cawood AL, Elia M, Stratton RJ. Systematic review and meta-analysis of the effects of high protein oral nutritional supplements. *Ageing Research Reviews* 2012; 11: 278–296. doi:10.1016/j.arr.2011.12.008
- [352] Cramer JT, Cruz-Jentoft AJ, Landi F, et al. Impacts of High-Protein Oral Nutritional Supplements Among Malnourished Men and Women with Sarcopenia: A Multicenter, Randomized, Double-Blinded, Controlled Trial. *J Am Med Dir Assoc* 2016; 17: 1044–1055. doi:10.1016/j.jamda.2016.08.009
- [353] Seguy D, Hubert H, Robert J, et al. Compliance to oral nutritional supplementation decreases the risk of hospitalisation in malnourished older adults without extra health care cost: Prospective observational cohort study. *Clinical Nutrition* 2020; 39: 1900–1907. doi:10.1016/j.clnu.2019.08.005
- [354] Ganapathy A, Nieves JW. Nutrition and Sarcopenia-What Do We Know? *Nutrients* 2020; 12: E1755. doi:10.3390/nu12061755
- [355] Dardevet D, Mosoni L, Savary-Auzeloux I, et al. Important determinants to take into account to optimize protein nutrition in the elderly: solutions to a complex equation. *Proc Nutr Soc* 2020; 1–14. doi:10.1017/S0029665120007934
- [356] Gielen E, Beckwée D, Delaere A, et al. Nutritional interventions to improve muscle mass, muscle strength, and physical performance in older people: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Nutr Rev* 2021; 79: 121–147. doi:10.1093/nutrit/nuaa011
- [357] Hickson M. Nutritional interventions in sarcopenia: a critical review. *Proceedings of the Nutrition Society* 2015; 74: 378–386. doi:10.1017/S0029665115002049
- [358] Fujita S, Volpi E. Amino acids and muscle loss with aging. *J Nutr* 2006; 136: 277S–80S. doi:10.1093/jn/136.1.277S
- [359] Rieu I, Balage M, Sornet C, et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. *J Physiol* 2006; 575: 305–315. doi:10.1113/jphysiol.2006.110742
- [360] Combaret L, Dardevet D, Rieu I, et al. A leucine-supplemented diet restores the defective postprandial inhibition of proteasome-dependent proteolysis in aged rat skeletal muscle. *J Physiol* 2005; 569: 489–499. doi:10.1113/jphysiol.2005.098004
- [361] Zeanandin G, Balage M, Schneider SM, et al. Differential effect of long-term leucine supplementation on skeletal muscle and adipose tissue in old rats: an insulin signaling pathway approach. *Age (Dordr)* 2012; 34: 371–387. doi:10.1007/s11357-011-9246-0

- [362] Verhoeven S, Vanschoonbeek K, Verdijk LB, et al. Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 1468–1475. doi:10.3945/ajcn.2008.26668
- [363] Bunout D, Barrera G, de la Maza P, et al. The impact of nutritional supplementation and resistance training on the health functioning of free-living Chilean elders: results of 18 months of follow-up. *J Nutr* 2001; 131: 2441S–6S. doi:10.1093/jn/131.9.2441S
- [364] Bonnefoy M, Cornu C, Normand S, et al. The effects of exercise and protein-energy supplements on body composition and muscle function in frail elderly individuals: a long-term controlled randomised study. *Br J Nutr* 2003; 89: 731–739. doi:10.1079/BJN2003836
- [365] Tieland M, van de Rest O, Dirks ML, et al. Protein supplementation improves physical performance in frail elderly people: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Med Dir Assoc* 2012; 13: 720–726. doi:10.1016/j.jamda.2012.07.005
- [366] Chalé A, Cloutier GJ, Hau C, et al. Efficacy of whey protein supplementation on resistance exercise-induced changes in lean mass, muscle strength, and physical function in mobility-limited older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68: 682–690. doi:10.1093/gerona/gls221
- [367] Bauer JM, Verlaan S, Bautmans I, et al. Effects of a vitamin D and leucine-enriched whey protein nutritional supplement on measures of sarcopenia in older adults, the PROVIDE study: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Med Dir Assoc* 2015; 16: 740–747. doi:10.1016/j.jamda.2015.05.021
- [368] Park Y, Choi J-E, Hwang H-S. Protein supplementation improves muscle mass and physical performance in undernourished prefrail and frail elderly subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2018; 108: 1026–1033. doi:10.1093/ajcn/nqy214
- [369] Yamada M, Kimura Y, Ishiyama D, et al. Synergistic effect of bodyweight resistance exercise and protein supplementation on skeletal muscle in sarcopenic or dynapenic older adults. *Geriatrics & Gerontology International* 2019; 19: 429–437. doi:10.1111/ggi.13643
- [370] Kang L, Gao Y, Liu X, et al. Effects of whey protein nutritional supplement on muscle function among community-dwelling frail older people: A multicenter study in China. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 2019; 83: 7–12. doi:10.1016/j.archger.2019.03.012
- [371] Amasene M, Besga A, Echeverria I, et al. Effects of Leucine-Enriched Whey Protein Supplementation on Physical Function in Post-Hospitalized Older Adults Participating in 12-Weeks of Resistance Training Program: A Randomized Controlled Trial. *Nutrients* 2019; 11: 2337. doi:10.3390/nu11102337
- [372] Björkman MP, Suominen MH, Kautiainen H, et al. Effect of Protein Supplementation on Physical Performance in Older People With Sarcopenia-A Randomized Controlled Trial. *J Am Med Dir Assoc* 2020; 21: 226-232.e1. doi:10.1016/j.jamda.2019.09.006
- [373] Robinson SM, Reginster JY, Rizzoli R, et al. Does nutrition play a role in the prevention and management of sarcopenia? *Clin Nutr* 2018; 37: 1121–1132. doi:10.1016/j.clnu.2017.08.016
- [374] Valenzuela PL, Morales JS, Emanuele E, et al. Supplements with purported effects on muscle mass and strength. *Eur J Nutr* 2019; 58: 2983–3008. doi:10.1007/s00394-018-1882-z
- [375] Wacker M, Holick MF. Vitamin D—Effects on Skeletal and Extraskelatal Health and the Need for Supplementation. *Nutrients* 2013; 5: 111–148. doi:10.3390/nu5010111
- [376] Halfon M, Phan O, Teta D. Vitamin D: A Review on Its Effects on Muscle Strength, the Risk of Fall, and Frailty. *BioMed Research International* 2015; 2015: e953241. doi:10.1155/2015/953241

- [377] Bischoff-Ferrari HA, Borchers M, Gudat F, et al. Vitamin D receptor expression in human muscle tissue decreases with age. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 265–269. doi:10.1359/jbmr.2004.19.2.265
- [378] Walrand S. Les effets musculaires de la vitamine D : application à la perte musculaire liée à l'âge. *OCL* 2014; 21: D310. doi:10.1051/ocl/2014011
- [379] Zhang R, Naughton DP. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Nutrition Journal* 2010; 9: 65. doi:10.1186/1475-2891-9-65
- [380] Marcos-Pérez D, Sánchez-Flores M, Proietti S, et al. Low Vitamin D Levels and Frailty Status in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2020; 12: 2286. doi:10.3390/nu12082286
- [381] Lips P, Binkley N, Pfeifer M, et al. Once-weekly dose of 8400 IU vitamin D3 compared with placebo: effects on neuromuscular function and tolerability in older adults with vitamin D insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2010; 91: 985–991. doi:10.3945/ajcn.2009.28113
- [382] Cai Y, Wanigatunga AA, Mitchell CM, et al. The effects of vitamin D supplementation on frailty in older adults at risk for falls. *BMC Geriatrics* 2022; 22: 312. doi:10.1186/s12877-022-02888-w
- [383] Bolzetta F, Stubbs B, Noale M, et al. Low-dose vitamin D supplementation and incident frailty in older people: An eight year longitudinal study. *Exp Gerontol* 2018; 101: 1–6. doi:10.1016/j.exger.2017.11.007
- [384] Zhu K, Austin N, Devine A, et al. A randomized controlled trial of the effects of vitamin D on muscle strength and mobility in older women with vitamin D insufficiency. *J Am Geriatr Soc* 2010; 58: 2063–2068. doi:10.1111/j.1532-5415.2010.03142.x
- [385] Cangussu LM, Nahas-Neto J, Orsatti CL, et al. Effect of vitamin D supplementation alone on muscle function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Osteoporos Int* 2015; 26: 2413–2421. doi:10.1007/s00198-015-3151-9
- [386] Chanet A, Verlaan S, Salles J, et al. Supplementing Breakfast with a Vitamin D and Leucine-Enriched Whey Protein Medical Nutrition Drink Enhances Postprandial Muscle Protein Synthesis and Muscle Mass in Healthy Older Men. *J Nutr* 2017; 147: 2262–2271. doi:10.3945/jn.117.252510
- [387] Kamolrat T, Gray SR, Carole Thivierge M. Fish oil positively regulates anabolic signalling alongside an increase in whole-body gluconeogenesis in ageing skeletal muscle. *Eur J Nutr* 2013; 52: 647–657. doi:10.1007/s00394-012-0368-7
- [388] Gingras A-A, White PJ, Chouinard PY, et al. Long-chain omega-3 fatty acids regulate bovine whole-body protein metabolism by promoting muscle insulin signalling to the Akt–mTOR–S6K1 pathway and insulin sensitivity. *The Journal of Physiology* 2007; 579: 269–284. doi:10.1113/jphysiol.2006.121079
- [389] Smith GI, Atherton P, Reeds DN, et al. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 402–412. doi:10.3945/ajcn.110.005611
- [390] Smith GI, Julliard S, Reeds DN, et al. Fish oil-derived n-3 PUFA therapy increases muscle mass and function in healthy older adults. *Am J Clin Nutr* 2015; 102: 115–122. doi:10.3945/ajcn.114.105833
- [391] Cornish SM, Cordingley DM, Shaw KA, et al. Effects of Omega-3 Supplementation Alone and Combined with Resistance Exercise on Skeletal Muscle in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 2022; 14: 2221. doi:10.3390/nu14112221
- [392] Berchtold MW, Brinkmeier H, Müntener M. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev* 2000; 80: 1215–1265. doi:10.1152/physrev.2000.80.3.1215



- [393] Mosqueira M, Brinkmeier H, Jaimovich E, Hrsg. Calcium Homeostasis in Skeletal Muscle Function, Plasticity and Disease. *Frontiers Media SA*; 2021
- [394] Seo MH, Kim MK, Park SE, et al. The association between daily calcium intake and sarcopenia in older, non-obese Korean adults: the fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES IV) 2009. *Endocr J* 2013; 60: 679–686. doi:10.1507/endocrj.ej12-0395
- [395] van Dronkelaar C, van Velzen A, Abdelrazek M, et al. Minerals and Sarcopenia; The Role of Calcium, Iron, Magnesium, Phosphorus, Potassium, Selenium, Sodium, and Zinc on Muscle Mass, Muscle Strength, and Physical Performance in Older Adults: A Systematic Review. *J Am Med Dir Assoc* 2018; 19: 6-11.e3. doi:10.1016/j.jamda.2017.05.026
- [396] Petermann-Rocha F, Chen M, Gray SR, et al. Factors associated with sarcopenia: A cross-sectional analysis using UK Biobank. *Maturitas* 2020; 133: 60–67. doi:10.1016/j.maturitas.2020.01.004
- [397] Ter Borg S, de Groot LCPGM, Mijnders DM, et al. Differences in Nutrient Intake and Biochemical Nutrient Status Between Sarcopenic and Nonsarcopenic Older Adults-Results From the Maastricht Sarcopenia Study. *J Am Med Dir Assoc* 2016; 17: 393–401. doi:10.1016/j.jamda.2015.12.015
- [398] Verlaan S, Aspray TJ, Bauer JM, et al. Nutritional status, body composition, and quality of life in community-dwelling sarcopenic and non-sarcopenic older adults: A case-control study. *Clin Nutr* 2017; 36: 267–274. doi:10.1016/j.clnu.2015.11.013
- [399] Pfeifer M, Begerow B, Minne HW, et al. Effects of a long-term vitamin D and calcium supplementation on falls and parameters of muscle function in community-dwelling older individuals. *Osteoporos Int* 2009; 20: 315–322. doi:10.1007/s00198-008-0662-7
- [400] Zhang Y, Xun P, Wang R, et al. Can Magnesium Enhance Exercise Performance? *Nutrients* 2017; 9: E946. doi:10.3390/nu9090946
- [401] Dominguez LJ, Barbagallo M, Lauretani F, et al. Magnesium and muscle performance in older persons: the InCHIANTI study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 84: 419–426. doi:10.1093/ajcn/84.2.419
- [402] Scott D, Blizzard L, Fell J, et al. Associations Between Dietary Nutrient Intake and Muscle Mass and Strength in Community-Dwelling Older Adults: The Tasmanian Older Adult Cohort Study. *Journal of the American Geriatrics Society* 2010; 58: 2129–2134. doi:10.1111/j.1532-5415.2010.03147.x
- [403] Santos DA, Matias CN, Monteiro CP, et al. Magnesium intake is associated with strength performance in elite basketball, handball and volleyball players. *Magnes Res* 2011; 24: 215–219. doi:10.1684/mrh.2011.0290
- [404] Wang R, Chen C, Liu W, et al. The effect of magnesium supplementation on muscle fitness: a meta-analysis and systematic review. *Magnes Res* 2017; 30: 120–132. doi:10.1684/mrh.2018.0430
- [405] Almeida A, Mitchell AL, Boland M, et al. A new genomic blueprint of the human gut microbiota. *Nature* 2019; 568: 499–504. doi:10.1038/s41586-019-0965-1
- [406] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59–65. doi:10.1038/nature08821
- [407] Li J, Jia H, Cai X, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 2014; 32: 834–841. doi:10.1038/nbt.2942

- [408] Zhu B, Wang X, Li L. Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein Cell* 2010; 1: 718–725. doi:10.1007/s13238-010-0093-z
- [409] Blaut M. Composition and Function of the Gut Microbiome. In: Haller D, Hrsg. *The Gut Microbiome in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing; 2018: 5–30
- [410] Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* 2019; 7. doi:10.3390/microorganisms7010014
- [411] Clarke G, Sandhu KV, Griffin BT, et al. Gut Reactions: Breaking Down Xenobiotic–Microbiome Interactions. *Pharmacol Rev* 2019; 71: 198–224. doi:10.1124/pr.118.015768
- [412] Wang J, Li D, Wang J, et al. Human oral microbiome characterization and its association with environmental microbiome revealed by the Earth Microbiome Project. *Microbiology*; 2019
- [413] Schmidt TSB, Raes J, Bork P. The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell* 2018; 172: 1198–1215. doi:10.1016/j.cell.2018.02.044
- [414] Milani C, Duranti S, Bottacini F, et al. The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017; 81: e00036-17. doi:10.1128/MMBR.00036-17
- [415] Cunningham M, Azcarate-Peril MA, Barnard A, et al. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology* 2021; 29: 667–685. doi:10.1016/j.tim.2021.01.003
- [416] Chong CYL, Bloomfield FH, O’Sullivan JM. Factors Affecting Gastrointestinal Microbiome Development in Neonates. *Nutrients* 2018; 10: 274. doi:10.3390/nu10030274
- [417] Vaiserman AM, Koliada AK, Marotta F. Gut microbiota: A player in aging and a target for anti-aging intervention. *Ageing Research Reviews* 2017; 35: 36–45. doi:10.1016/j.arr.2017.01.001
- [418] Ling Z, Liu X, Cheng Y, et al. Gut microbiota and aging. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2022; 62: 3509–3534. doi:10.1080/10408398.2020.1867054
- [419] Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 1178–1186. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03400.x
- [420] O’Toole PW, Claesson MJ. Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal* 2010; 20: 281–291. doi:10.1016/j.idairyj.2009.11.010
- [421] Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; 488: 178–184. doi:10.1038/nature11319
- [422] Bischoff SC. Microbiota and aging: Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 2016; 19: 26–30. doi:10.1097/MCO.0000000000000242
- [423] Biagi E, Nylund L, Candela M, et al. Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLoS ONE* 2010; 5: e10667. doi:10.1371/journal.pone.0010667
- [424] Claesson MJ, Cusack S, O’Sullivan O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108 Suppl 1: 4586–4591. doi:10.1073/pnas.1000097107
- [425] Salazar N, Valdés-Varela L, González S, et al. Nutrition and the gut microbiome in the elderly. *Gut Microbes* 2017; 8: 82–97. doi:10.1080/19490976.2016.1256525

- [426] van Tongeren SP, Slaets JPJ, Harmsen HJM, et al. Fecal Microbiota Composition and Frailty. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71: 6438–6442. doi:10.1128/AEM.71.10.6438-6442.2005
- [427] Jackson MA, Jeffery IB, Beaumont M, et al. Signatures of early frailty in the gut microbiota. *Genome Med* 2016; 8: 8. doi:10.1186/s13073-016-0262-7
- [428] Zhang L, Liao J, Chen Q, et al. Characterization of the gut microbiota in frail elderly patients. *Aging Clin Exp Res* 2019; doi:10.1007/s40520-019-01385-2
- [429] Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Current Biology* 2016; 26: 1480–1485. doi:10.1016/j.cub.2016.04.016
- [430] Badal VD, Vaccariello ED, Murray ER, et al. The Gut Microbiome, Aging, and Longevity: A Systematic Review. *Nutrients* 2020; 12: E3759. doi:10.3390/nu12123759
- [431] Salazar N, González S, Nogacka AM, et al. Microbiome: Effects of Ageing and Diet. *Curr Issues Mol Biol* 2020; 36: 33–62. doi:10.21775/cimb.036.033
- [432] Ghosh TS, Rampelli S, Jeffery IB, et al. Mediterranean diet intervention alters the gut microbiome in older people reducing frailty and improving health status: the NU-AGE 1-year dietary intervention across five European countries. *Gut* 2020; 69: 1218–1228. doi:10.1136/gutjnl-2019-319654
- [433] Granic A, Sayer A, Robinson S. Dietary Patterns, Skeletal Muscle Health, and Sarcopenia in Older Adults. *Nutrients* 2019; 11: 745. doi:10.3390/nu11040745
- [434] Tangestani H, Emamat H, Ghalandari H, et al. Whole Grains, Dietary Fibers and the Human Gut Microbiota: A Systematic Review of Existing Literature. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2020; 11: 235–248. doi:10.2174/2212798411666200316152252
- [435] Bolte LA, Vich Vila A, Imhann F, et al. Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. *Gut* 2021; 70: 1287–1298. doi:10.1136/gutjnl-2020-322670
- [436] Berding K, Vlckova K, Marx W, et al. Diet and the Microbiota–Gut–Brain Axis: Sowing the Seeds of Good Mental Health. *Advances in Nutrition* 2021; 12: 1239–1285. doi:10.1093/advances/nmaa181
- [437] Sonnenburg JL, Bäckhed F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 2016; 535: 56–64. doi:10.1038/nature18846
- [438] Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD, et al. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients* 2019; 11: 2862. doi:10.3390/nu11122862
- [439] Shanahan F, Ghosh TS, O’Toole PW. The Healthy Microbiome-What Is the Definition of a Healthy Gut Microbiome? *Gastroenterology* 2021; 160: 483–494. doi:10.1053/j.gastro.2020.09.057
- [440] Hooks KB, O’Malley MA. Dysbiosis and Its Discontents. *mBio* 2017; 8. doi:10.1128/mBio.01492-17
- [441] Valdes AM, Walter J, Segal E, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ* 2018; 361: k2179. doi:10.1136/bmj.k2179
- [442] Lecerf J-M, Delzenne N. *Microbiote intestinale et santé humaine*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2021
- [443] Landman C, Quévrain E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. *La Revue de Médecine Interne* 2016; 37: 418–423. doi:10.1016/j.revmed.2015.12.012

- [444] Hernandez MAG, Canfora EE, Jocken JWE, et al. The Short-Chain Fatty Acid Acetate in Body Weight Control and Insulin Sensitivity. *Nutrients* 2019; 11: 1943. doi:10.3390/nu11081943
- [445] Müller M, Hernández MAG, Goossens GH, et al. Circulating but not faecal short-chain fatty acids are related to insulin sensitivity, lipolysis and GLP-1 concentrations in humans. *Scientific Reports* 2019; 9: 12515. doi:10.1038/s41598-019-48775-0
- [446] Ardawi MS, Newsholme EA. Fuel utilization in colonocytes of the rat. *Biochem J* 1985; 231: 713–719
- [447] Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11: 577–591. doi:10.1038/nrendo.2015.128
- [448] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, et al. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 2016; 165: 1332–1345. doi:10.1016/j.cell.2016.05.041
- [449] den Besten G, Bleeker A, Gerding A, et al. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR $\gamma$ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes* 2015; 64: 2398–2408. doi:10.2337/db14-1213
- [450] Boets E, Gomand SV, Deroover L, et al. Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study. *J Physiol* 2017; 595: 541–555. doi:10.1113/JP272613
- [451] Sukkar AH, Lett AM, Frost G, et al. Regulation of energy expenditure and substrate oxidation by short-chain fatty acids. *Journal of Endocrinology* 2019; 242: R1–R8. doi:10.1530/JOE-19-0098
- [452] Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 2016; 7: 189–200. doi:10.1080/19490976.2015.1134082
- [453] Parada Venegas D, De la Fuente MK, Landskron G, et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Front Immunol* 2019; 10. doi:10.3389/fimmu.2019.00277
- [454] Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987; 28: 1221–1227
- [455] Krautkramer KA, Fan J, Bäckhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nat Rev Microbiol* 2020; doi:10.1038/s41579-020-0438-4
- [456] Frampton J, Murphy KG, Frost G, et al. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat Metab* 2020; 2: 840–848. doi:10.1038/s42255-020-0188-7
- [457] Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, et al. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc* 2015; 74: 13–22. doi:10.1017/S0029665114001463
- [458] Rowland I, Gibson G, Heinken A, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* 2018; 57: 1–24. doi:10.1007/s00394-017-1445-8
- [459] Gustafsson BE, Daft FS, Mcdaniel EG, et al. Effects of vitamin K-active compounds and intestinal microorganisms in vitamin K-deficient germfree rats. *J Nutr* 1962; 78: 461–468. doi:10.1093/jn/78.4.461
- [460] Bousselamti A, El Hasbaoui B, Echahdi H, et al. Psychomotor regression due to vitamin B12 deficiency. *Pan Afr Med J* 2018; 30. doi:10.11604/pamj.2018.30.152.12046
- [461] Ticinesi A, Tana C, Nouvenne A, et al. Human gut microbiome: the hypothesis of a gut-muscle axis in the elderly. *Dtsch Z Sportmed* 2018; 2018: 359–365. doi:10.5960/dzsm.2018.355

- [462] Yoshii K, Hosomi K, Sawane K, et al. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin B Family in the Regulation of Host Immunity. *Frontiers in Nutrition* 2019; 6: 48. doi:10.3389/fnut.2019.00048
- [463] Gizard F, Fernandez A, De Vadder F. Interactions between gut microbiota and skeletal muscle. *Nutr Metab Insights* 2020; 13: 1178638820980490. doi:10.1177/1178638820980490
- [464] Yang Q, Liang Q, Balakrishnan B, et al. Role of Dietary Nutrients in the Modulation of Gut Microbiota: A Narrative Review. *Nutrients* 2020; 12: 381. doi:10.3390/nu12020381
- [465] Tuddenham S, Sears CL. The intestinal microbiome and health: Current Opinion in Infectious Diseases 2015; 28: 464–470. doi:10.1097/QCO.000000000000196
- [466] Skrypnik K, Suliburska J. Association between the gut microbiota and mineral metabolism: Gut microbiota and mineral metabolism. *J Sci Food Agric* 2018; 98: 2449–2460. doi:10.1002/jsfa.8724
- [467] Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 159–169. doi:10.1038/nri2710
- [468] García-Cabrero R, Carbia C, O’Riordan KJ, et al. Microbiota-gut-brain axis as a regulator of reward processes. *J Neurochem* 2021; 157: 1495–1524. doi:10.1111/jnc.15284
- [469] Arentsen T, Raith H, Qian Y, et al. Host microbiota modulates development of social preference in mice. *Microb Ecol Health Dis* 2015; 26: 29719. doi:10.3402/mehd.v26.29719
- [470] Diaz Heijtz RD, Wang S, Anuar F, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108: 3047–3052. doi:10.1073/pnas.1010529108
- [471] Barros-Santos T, Silva KSO, Libarino-Santos M, et al. Effects of chronic treatment with new strains of *Lactobacillus plantarum* on cognitive, anxiety- and depressive-like behaviors in male mice. *PLoS One* 2020; 15: e0234037. doi:10.1371/journal.pone.0234037
- [472] Abildgaard A, Elfving B, Hokland M, et al. Probiotic treatment reduces depressive-like behaviour in rats independently of diet. *Psychoneuroendocrinology* 2017; 79: 40–48. doi:10.1016/j.psyneuen.2017.02.014
- [473] Ni Y, Yang X, Zheng L, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Improves Physiological Function and Cognitive Ability in Aged Mice by the Regulation of Gut Microbiota. *Mol Nutr Food Res* 2019; 63: 1900603. doi:10.1002/mnfr.201900603
- [474] Liu RT, Walsh RFL, Sheehan AE. Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neurosci Biobehav Rev* 2019; 102: 13–23. doi:10.1016/j.neubiorev.2019.03.023
- [475] Ticinesi A, Mancabelli L, Tagliaferri S, et al. The Gut-Muscle Axis in Older Subjects with Low Muscle Mass and Performance: A Proof of Concept Study Exploring Fecal Microbiota Composition and Function with Shotgun Metagenomics Sequencing. *Int J Mol Sci* 2020; 21: E8946. doi:10.3390/ijms21238946
- [476] Saint-Criq V, Lugo-Villarino G, Thomas M. Dysbiosis, malnutrition and enhanced gut-lung axis contribute to age-related respiratory diseases. *Ageing Research Reviews* 2021; 66: 101235. doi:10.1016/j.arr.2020.101235
- [477] Raj D, Tomar B, Lahiri A, et al. The gut-liver-kidney axis: Novel regulator of fatty liver associated chronic kidney disease. *Pharmacol Res* 2020; 152: 104617. doi:10.1016/j.phrs.2019.104617

- [478] Ahlawat S, Asha null, Sharma KK. Gut-organ axis: a microbial outreach and networking. *Lett Appl Microbiol* 2021; 72: 636–668. doi:10.1111/lam.13333
- [479] Olofsson LE, Bäckhed F. The Metabolic Role and Therapeutic Potential of the Microbiome. *Endocr Rev* 2022; bnac004. doi:10.1210/endrev/bnac004
- [480] Watson MD, Cross BL, Grosicki GJ. Evidence for the Contribution of Gut Microbiota to Age-Related Anabolic Resistance. *Nutrients* 2021; 13: 706. doi:10.3390/nu13020706
- [481] Lahiri S, Kim H, Garcia-Perez I, et al. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med* 2019; 11. doi:10.1126/scitranslmed.aan5662
- [482] Hsu YJ, Chiu CC, Li YP, et al. Effect of intestinal microbiota on exercise performance in mice. *J Strength Cond Res* 2015; 29: 552–558. doi:10.1519/JSC.0000000000000644
- [483] Hill JH, Round JL. SnapShot: Microbiota effects on host physiology. *Cell* 2021; 184: 2796-2796.e1. doi:10.1016/j.cell.2021.04.026
- [484] Okamoto T, Morino K, Ugi S, et al. Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019; 316: E956–E966. doi:10.1152/ajpendo.00510.2018
- [485] Nay K, Jollet M, Goustard B, et al. Gut bacteria are critical for optimal muscle function: a potential link with glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019; 317: E158–E171. doi:10.1152/ajpendo.00521.2018
- [486] Walter J, Armet AM, Finlay BB, et al. Establishing or Exaggerating Causality for the Gut Microbiome: Lessons from Human Microbiota-Associated Rodents. *Cell* 2020; 180: 221–232. doi:10.1016/j.cell.2019.12.025
- [487] Matsumoto M, Kibe R, Ooga T, et al. Impact of Intestinal Microbiota on Intestinal Luminal Metabolome. *Sci Rep* 2012; 2: 1–10. doi:10.1038/srep00233
- [488] Ragonnaud E, Biragyn A. Gut microbiota as the key controllers of “healthy” aging of elderly people. *Immunity & Ageing* 2021; 18: 2. doi:10.1186/s12979-020-00213-w
- [489] Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Aging Cell* 2015; 14: 957–970. doi:10.1111/acel.12387
- [490] Fushimi T, Tayama K, Fukaya M, et al. Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. *J Nutr* 2001; 131: 1973–1977. doi:10.1093/jn/131.7.1973
- [491] Liu L, Fu C, Li F. Acetate Affects the Process of Lipid Metabolism in Rabbit Liver, Skeletal Muscle and Adipose Tissue. *Animals (Basel)* 2019; 9. doi:10.3390/ani9100799
- [492] Yamashita H, Maruta H, Jozuka M, et al. Effects of acetate on lipid metabolism in muscles and adipose tissues of type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009; 73: 570–576. doi:10.1271/bbb.80634
- [493] Gonzalez A, Krieg R, Massey HD, et al. Sodium butyrate ameliorates insulin resistance and renal failure in CKD rats by modulating intestinal permeability and mucin expression. *Nephrol Dial Transplant* 2019; 34: 783–794. doi:10.1093/ndt/gfy238
- [494] Gao Z, Yin J, Zhang J, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 2009; 58: 1509–1517. doi:10.2337/db08-1637

- [495] Donohoe DR, Garge N, Zhang X, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* 2011; 13: 517–526. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.018
- [496] Henagan TM, Stefanska B, Fang Z, et al. Sodium butyrate epigenetically modulates high-fat diet-induced skeletal muscle mitochondrial adaptation, obesity and insulin resistance through nucleosome positioning. *Br J Pharmacol* 2015; 172: 2782–2798. doi:10.1111/bph.13058
- [497] Fielding RA, Reeves AR, Jasuja R, et al. Muscle strength is increased in mice that are colonized with microbiota from high-functioning older adults. *Experimental Gerontology* 2019; 127: 110722. doi:10.1016/j.exger.2019.110722
- [498] Siddharth J, Chakrabarti A, Pannérec A, et al. Aging and sarcopenia associate with specific interactions between gut microbes, serum biomarkers and host physiology in rats. *Aging* 2017; 9: 1698–1714
- [499] Wilson D, Jackson T, Sapey E, et al. Frailty and sarcopenia: The potential role of an aged immune system. *Ageing Research Reviews* 2017; 36: 1–10. doi:10.1016/j.arr.2017.01.006
- [500] Raj T, Dileep U, Vaz M, et al. Intestinal microbial contribution to metabolic leucine input in adult men. *J Nutr* 2008; 138: 2217–2221. doi:10.3945/jn.108.093021
- [501] Petersen LM, Bautista EJ, Nguyen H, et al. Community characteristics of the gut microbiomes of competitive cyclists. *Microbiome* 2017; 5: 98. doi:10.1186/s40168-017-0320-4
- [502] Stoll B, Burrin DG. Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers. *J Anim Sci* 2006; 84 Suppl: E60-72. doi:10.2527/2006.8413\_supple60x
- [503] Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr* 2000; 130: 1857S-64S. doi:10.1093/jn/130.7.1857S
- [504] Newsome SD, Feeser KL, Bradley CJ, et al. Isotopic and genetic methods reveal the role of the gut microbiome in mammalian host essential amino acid metabolism. *Proc R Soc B* 2020; 287: 20192995. doi:10.1098/rspb.2019.2995
- [505] Heimann E, Nyman M, Pålbrink A-K, et al. Branched short-chain fatty acids modulate glucose and lipid metabolism in primary adipocytes. *Adipocyte* 2016; 5: 359–368. doi:10.1080/21623945.2016.1252011
- [506] Su X, Magkos F, Zhou D, et al. Adipose tissue monomethyl branched-chain fatty acids and insulin sensitivity: Effects of obesity and weight loss. *Obesity (Silver Spring)* 2015; 23: 329–334. doi:10.1002/oby.20923
- [507] Salonen A, de Vos WM. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu Rev Food Sci Technol* 2014; 5: 239–262. doi:10.1146/annurev-food-030212-182554
- [508] Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, et al. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 2007; 33: 547–562. doi:10.1007/s00726-006-0477-9
- [509] Lin R, Liu W, Piao M, et al. A review of the relationship between the gut microbiota and amino acid metabolism. *Amino Acids* 2017; 49: 2083–2090. doi:10.1007/s00726-017-2493-3
- [510] Casati M, Ferri E, Azzolino D, et al. Gut microbiota and physical frailty through the mediation of sarcopenia. *Exp Gerontol* 2019; 124: 110639. doi:10.1016/j.exger.2019.110639

- [511] Wyczalkowska-Tomasik A, Czarkowska-Paczek B, Giebultowicz J, et al. Age-dependent increase in serum levels of indoxyl sulphate and p-cresol sulphate is not related to their precursors: Tryptophan and tyrosine. *Geriatr Gerontol Int* 2017; 17: 1022–1026. doi:10.1111/ggi.12811
- [512] Enoki Y, Watanabe H, Arake R, et al. Indoxyl sulfate potentiates skeletal muscle atrophy by inducing the oxidative stress-mediated expression of myostatin and atrogin-1. *Sci Rep* 2016; 6: 32084. doi:10.1038/srep32084
- [513] Caldiroli L, Armelloni S, Eskander A, et al. Association between the uremic toxins indoxyl-sulfate and p-cresyl-sulfate with sarcopenia and malnutrition in elderly patients with advanced chronic kidney disease. *Experimental Gerontology* 2021; 147: 111266. doi:10.1016/j.exger.2021.111266
- [514] Sato E, Mori T, Mishima E, et al. Metabolic alterations by indoxyl sulfate in skeletal muscle induce uremic sarcopenia in chronic kidney disease. *Sci Rep* 2016; 6: 36618. doi:10.1038/srep36618
- [515] Dalla Via A, Gargari G, Taverniti V, et al. Urinary TMAO Levels Are Associated with the Taxonomic Composition of the Gut Microbiota and with the Choline TMA-Lyase Gene (cutC) Harbored by Enterobacteriaceae. *Nutrients* 2019; 12. doi:10.3390/nu12010062
- [516] Koh A, Bäckhed F. From Association to Causality: the Role of the Gut Microbiota and Its Functional Products on Host Metabolism. *Molecular Cell* 2020; 78: 584–596. doi:10.1016/j.molcel.2020.03.005
- [517] Park K-Y, Kim B, Hyun C-K. *Lactobacillus rhamnosus* GG improves glucose tolerance through alleviating ER stress and suppressing macrophage activation in db/db mice. *J Clin Biochem Nutr* 2015; 56: 240–246. doi:10.3164/jcbn.14-116
- [518] Naghipour S, Cox AJ, Peart JN, et al. Trimethylamine N-oxide: heart of the microbiota-CVD nexus? *Nutr Res Rev* 2020; 1–22. doi:10.1017/S0954422420000177
- [519] MacDonald PE, El-kholy W, Riedel MJ, et al. The Multiple Actions of GLP-1 on the Process of Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes* 2002; 51: S434–S442. doi:10.2337/diabetes.51.2007.S434
- [520] Wahlström A, Sayin SI, Marschall H-U, et al. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab* 2016; 24: 41–50. doi:10.1016/j.cmet.2016.05.005
- [521] Di Ciaula A, Garruti G, Lunardi Baccetto R, et al. Bile Acid Physiology. *Ann Hepatol* 2017; 16: s4–s14. doi:10.5604/01.3001.0010.5493
- [522] Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 2009; 10: 167–177. doi:10.1016/j.cmet.2009.08.001
- [523] Guo C, Chen W-D, Wang Y-D. TGR5, Not Only a Metabolic Regulator. *Front Physiol* 2016; 7. doi:10.3389/fphys.2016.00646
- [524] Sasaki T, Kuboyama A, Mita M, et al. The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice. *J Biol Chem* 2018; 293: 10322–10332. doi:10.1074/jbc.RA118.002733
- [525] Salvatore D, Simonides W, Dentice M, et al. Thyroid hormones and skeletal muscle—new insights and potential implications. *Nature Reviews Endocrinology* 2014; doi:10.1038/nrendo.2013.238
- [526] Berdeaux R, Hutchins C. Anabolic and Pro-metabolic Functions of CREB-CRTC in Skeletal Muscle: Advantages and Obstacles for Type 2 Diabetes and Cancer Cachexia. *Front Endocrinol* 2019; 10. doi:10.3389/fendo.2019.00535



- [527] Bindels LB, Delzenne NM. Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target? *Int J Biochem Cell Biol* 2013; 45: 2186–2190. doi:10.1016/j.biocel.2013.06.021
- [528] Zommiti M, Feuilloy MGJ, Connil N. Update of Probiotics in Human World: A Nonstop Source of Benefactions till the End of Time. *Microorganisms* 2020; 8: 1907. doi:10.3390/microorganisms8121907
- [529] Ozen M, Dinleyici EC. The history of probiotics: the untold story. *Benef Microbes* 2015; 6: 159–165. doi:10.3920/BM2014.0103
- [530] Pasteur L. Mémoire sur la fermentation appelée lactique (Extrait par l'auteur). *Mol Med* 1995; 1: 599–601
- [531] Metchnikoff E. The Prolongation of Life. *Nature* 1908; 77: 289–290. doi:10.1038/077289b0
- [532] Clément M. Les probiotiques : les produits sur le marché français, formulation, mode d'action et procédés. Université Claude Bernad - Lyon 1; 2018
- [533] Coudeyras S, Forestier C. Microbiote et probiotiques : impact en santé humaine. *Can J Microbiol* 2010; 56: 611–650. doi:10.1139/W10-052
- [534] Lilly DM, Stillwell RH. PROBIOTICS: GROWTH-PROMOTING FACTORS PRODUCED BY MICROORGANISMS. *Science* 1965; 147: 747–748. doi:10.1126/science.147.3659.747
- [535] Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365–378
- [536] Salminen S, Collado MC, Endo A, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; 18: 649–667. doi:10.1038/s41575-021-00440-6
- [537] Lemetais G. Sélection et intégration d'une souche probiotique fonctionnelle dans une matrice sèche. Dijon; 2012
- [538] Hill C, Guarner F, Reid G, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506–514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66
- [539] Adams MR, Marteau P. On the safety of lactic acid bacteria from food. *Int J Food Microbiol* 1995; 27: 263–264. doi:10.1016/0168-1605(95)00067-t
- [540] Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010; 1: 164–185. doi:10.4161/gmic.1.3.12127
- [541] EFSA. Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA - Opinion of the Scientific Committee. *EFSA Journal* 2007; doi:10.2903/j.efsa.2007.587
- [542] EFSA EP on B, Koutsoumanis K, Allende A, et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 12: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2020. *EFSA Journal* 2020; 18: e06174. doi:10.2903/j.efsa.2020.6174
- [543] Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol* 2012; 154: 87–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030
- [544] EFSA. Anticipation of future notifications to EFSA of microbial taxonomic units intentionally introduced into the food chain. *EFSA Journal* 2013; doi:10.2903/j.efsa.2013.3340

- [545] Pot B, Grangette C. Les probiotiques : définition, sécurité et réglementation. *Pratiques en nutrition* 2015; 11: 10–16. doi:10.1016/j.pranut.2015.06.003
- [546] Bulletin of the IDF N° 514/2022: Inventory of microbial food cul... FIL-IDF. Im Internet: <https://shop.fil-idf.org/products/bulletin-of-the-idf-n-514-2022-inventory-of-microbial-food-cultures-with-safety-demonstration-in-fermented-food-products>; Stand: 20.09.2022
- [547] Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods* 2014; 9: 225–241. doi:10.1016/j.jff.2014.04.030
- [548] Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, et al. Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects of Probiotics in Gut Inflammation: A Door to the Body. *Frontiers in Immunology* 2021; 12: 178. doi:10.3389/fimmu.2021.578386
- [549] Croci S, D'Apolito LI, Gasperi V, et al. Dietary Strategies for Management of Metabolic Syndrome: Role of Gut Microbiota Metabolites. *Nutrients* 2021; 13: 1389. doi:10.3390/nu13051389
- [550] Xie W, He M, Yu D, et al. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2021; 12: 538–554. doi:10.1002/jcsm.12709
- [551] Lushaj EB, Johnson JK, McKenzie D, et al. Sarcopenia Accelerates at Advanced Ages in Fisher 344×Brown Norway Rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008; 63: 921–927
- [552] Ibebunjo C, Chick JM, Kendall T, et al. Genomic and proteomic profiling reveals reduced mitochondrial function and disruption of the neuromuscular junction driving rat sarcopenia. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 194–212. doi:10.1128/MCB.01036-12
- [553] Kob R, Fellner C, Bertsch T, et al. Gender-specific differences in the development of sarcopenia in the rodent model of the ageing high-fat rat: Development of sarcopenia in the rodent model of high-fat rat. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2015; 6: 181–191. doi:10.1002/jcsm.12019
- [554] Mobley CB, Mumford PW, Kephart WC, et al. Aging in Rats Differentially Affects Markers of Transcriptional and Translational Capacity in Soleus and Plantaris Muscle. *Frontiers in Physiology* 2017; 8
- [555] Börsch A, Ham DJ, Mittal N, et al. Molecular and phenotypic analysis of rodent models reveals conserved and species-specific modulators of human sarcopenia. *Commun Biol* 2021; 4: 1–15. doi:10.1038/s42003-021-01723-z
- [556] Varian BJ, Goureshetti S, Poutahidis T, et al. Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget* 2016; 7. doi:10.18632/oncotarget.7730
- [557] Lee K, Kim J, Park S-D, et al. *Lactobacillus plantarum* HY7715 Ameliorates Sarcopenia by Improving Skeletal Muscle Mass and Function in Aged Balb/c Mice. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 10023. doi:10.3390/ijms221810023
- [558] Chen L-H, Huang S-Y, Huang K-C, et al. *Lactobacillus paracasei* PS23 decelerated age-related muscle loss by ensuring mitochondrial function in SAMP8 mice. *aging* 2019; 11: 756–770. doi:10.18632/aging.101782
- [559] Chen L-H, Chang S-S, Chang H-Y, et al. Probiotic supplementation attenuates age-related sarcopenia via the gut-muscle axis in SAMP8 mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2021; 13: 515–531. doi:10.1002/jcsm.12849
- [560] Lin S-W, Tsai Y-S, Chen Y-L, et al. An Examination of *Lactobacillus paracasei* GKS6 and *Bifidobacterium lactis* GKK2 Isolated from Infant Feces in an Aged Mouse Model. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021: 6692363. doi:10.1155/2021/6692363

- [561] Hor Y-Y, Ooi C-H, Khoo B-Y, et al. Lactobacillus Strains Alleviated Aging Symptoms and Aging-Induced Metabolic Disorders in Aged Rats. *J Med Food* 2019; 22: 1–13. doi:10.1089/jmf.2018.4229
- [562] Jeong J-J, Kim KA, Hwang Y-J, et al. Anti-inflammaging effects of *Lactobacillus brevis* OW38 in aged mice. *Beneficial Microbes* 2016; 7: 707–718. doi:10.3920/BM2016.0016
- [563] Cruz-Jentoft AJ, Dawson Hughes B, Scott D, et al. Nutritional strategies for maintaining muscle mass and strength from middle age to later life: A narrative review. *Maturitas* 2020; 132: 57–64. doi:10.1016/j.maturitas.2019.11.007
- [564] Jayanama K, Theou O. Effects of Probiotics and Prebiotics on Frailty and Ageing: A Narrative Review. *Curr Clin Pharmacol* 2019; doi:10.2174/1574884714666191120124548
- [565] Rondanelli M. Review on microbiota and effectiveness of probiotics use in older. *WJCC* 2015; 3: 156. doi:10.12998/wjcc.v3.i2.156
- [566] Ale EC, Binetti AG. Role of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics in the Elderly: Insights Into Their Applications. *Front Microbiol* 2021; 12: 631254. doi:10.3389/fmicb.2021.631254
- [567] Kim C-S, Cha L, Sim M, et al. Probiotic Supplementation Improves Cognitive Function and Mood with Changes in Gut Microbiota in Community-Dwelling Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2021; 76: 32–40. doi:10.1093/gerona/glaa090
- [568] Ford AL, Nagulesapillai V, Piano A, et al. Microbiota Stability and Gastrointestinal Tolerance in Response to a High-Protein Diet with and without a Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial in Older Women. *J Acad Nutr Diet* 2020; 120: 500-516.e10. doi:10.1016/j.jand.2019.12.009
- [569] Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, et al. Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; 59: 53–59. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00658.x
- [570] Spaiser SJ, Culpepper T, Nieves C, et al. *Lactobacillus gasseri* KS-13, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, and *Bifidobacterium longum* MM-2 Ingestion Induces a Less Inflammatory Cytokine Profile and a Potentially Beneficial Shift in Gut Microbiota in Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Journal of the American College of Nutrition* 2015; 34: 459–469. doi:10.1080/07315724.2014.983249
- [571] Lee M-C, Tu Y-T, Lee C-C, et al. Lactobacillus plantarum TWK10 Improves Muscle Mass and Functional Performance in Frail Older Adults: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. *Microorganisms* 2021; 9: 1466. doi:10.3390/microorganisms9071466
- [572] Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14: 491–502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- [573] Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2020; 17: 687–701. doi:10.1038/s41575-020-0344-2
- [574] Obermüller B, Singer G, Kienesberger B, et al. The Effects of Prebiotic Supplementation with OMNi-LOGiC® FIBRE on Fecal Microbiome, Fecal Volatile Organic Compounds, and Gut Permeability in Murine Neuroblastoma-Induced Tumor-Associated Cachexia. *Nutrients* 2020; 12: E2029. doi:10.3390/nu12072029

- [575] Bindels LB, Neyrinck AM, Salazar N, et al. Non Digestible Oligosaccharides Modulate the Gut Microbiota to Control the Development of Leukemia and Associated Cachexia in Mice. *PLoS One* 2015; 10: e0131009. doi:10.1371/journal.pone.0131009
- [576] van Krimpen SJ, Jansen FAC, Ottenheim VL, et al. The Effects of Pro-, Pre-, and Synbiotics on Muscle Wasting, a Systematic Review—Gut Permeability as Potential Treatment Target. *Nutrients* 2021; 13: 1115. doi:10.3390/nu13041115
- [577] Zeng Y, Zhang J, Zhang Y, et al. Prebiotic, Immunomodulating, and Antifatigue Effects of Konjac Oligosaccharide. *J Food Sci* 2018; 83: 3110–3117. doi:10.1111/1750-3841.14376
- [578] Huang G, Su L, Zhang N, et al. The prebiotic and anti-fatigue effects of hyaluronan. *Front Nutr* 2022; 9: 977556. doi:10.3389/fnut.2022.977556
- [579] An JM, Kang EA, Han Y-M, et al. Dietary intake of probiotic kimchi ameliorated IL-6-driven cancer cachexia. *J Clin Biochem Nutr* 2019; 65: 109–117. doi:10.3164/jcfn.19-10
- [580] Buigues C, Fernández-Garrido J, Pruijboom L, et al. Effect of a Prebiotic Formulation on Frailty Syndrome: A Randomized, Double-Blind Clinical Trial. *IJMS* 2016; 17: 932. doi:10.3390/ijms17060932
- [581] Theou O, Jayanama K, Fernandez J, et al. Can a prebiotic formulation reduce frailty levels in older people? *J Frailty Aging* 2019; 8: 48–52. doi:10.14283/jfa.2018.39
- [582] Tominaga K, Tsuchiya A, Nakano O, et al. Increase in muscle mass associated with the prebiotic effects of 1-kestose in super-elderly patients with sarcopenia. *Biosci Microbiota Food Health* 2021; 40: 150–155. doi:10.12938/bmfh.2020-063
- [583] Brahe LK, Le Chatelier E, Prifti E, et al. Dietary modulation of the gut microbiota – a randomised controlled trial in obese postmenopausal women. *Br J Nutr* 2015; 114: 406–417. doi:10.1017/S0007114515001786
- [584] Mesinovic J, Zengin A, De Courten B, et al. Sarcopenia and type 2 diabetes mellitus: a bidirectional relationship. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019; 12: 1057–1072. doi:10.2147/DMSO.S186600
- [585] Valentini Neto J, de Melo CM, Lima Ribeiro SM. Effects of Three-Month Intake of Synbiotic on Inflammation and Body Composition in the Elderly: A Pilot Study. *Nutrients* 2013; 5: 1276–1286. doi:10.3390/nu5041276
- [586] Toda K, Yamauchi Y, Tanaka A, et al. Heat-Killed *Bifidobacterium breve* B-3 Enhances Muscle Functions: Possible Involvement of Increases in Muscle Mass and Mitochondrial Biogenesis. *Nutrients* 2020; doi:10.3390/nu12010219
- [587] Singh A, D’Amico D, Andreux PA, et al. Urolithin A improves muscle strength, exercise performance, and biomarkers of mitochondrial health in a randomized trial in middle-aged adults. *Cell Rep Med* 2022; 3: 100633. doi:10.1016/j.xcrm.2022.100633
- [588] Fortuna R, Hart DA, Sharkey KA, et al. Effect of a prebiotic supplement on knee joint function, gut microbiota, and inflammation in adults with co-morbid obesity and knee osteoarthritis: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2021; 22: 255. doi:10.1186/s13063-021-05212-w
- [589] Jamshidi S, Masoumi SJ, Abiri B, et al. The effects of synbiotic and/or vitamin D supplementation on gut-muscle axis in overweight and obese women: a study protocol for a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Trials* 2022; 23: 631. doi:10.1186/s13063-022-06598-x

- [590] Seifi N, Safarian M, Nematy M, et al. Effects of synbiotic supplementation on energy and macronutrients homeostasis and muscle wasting of critical care patients: study protocol and a review of previous studies. *Trials* 2020; 21: 221. doi:10.1186/s13063-020-4136-3
- [591] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027–1031. doi:10.1038/nature05414
- [592] Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *PNAS* 2007; 104: 979–984. doi:10.1073/pnas.0605374104
- [593] Ticinesi A, Lauretani F, Milani C, et al. Aging Gut Microbiota at the Cross-Road between Nutrition, Physical Frailty, and Sarcopenia: Is There a Gut–Muscle Axis? *Nutrients* 2017; 9: 1303. doi:10.3390/nu9121303
- [594] Giron M, Thomas M, Dardevet D, et al. Gut microbes and muscle function: can probiotics make our muscles stronger? *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2022; 13: 1460–1476. doi:10.1002/jcsm.12964
- [595] Messing B, Crenn P, Beau P, et al. Long-term survival and parenteral nutrition dependence in adult patients with the short bowel syndrome. *Gastroenterology* 1999; 117: 1043–1050. doi:10.1016/s0016-5085(99)70388-4
- [596] Pironi L, Arends J, Baxter J, et al. ESPEN endorsed recommendations. Definition and classification of intestinal failure in adults. *Clin Nutr* 2015; 34: 171–180. doi:10.1016/j.clnu.2014.08.017
- [597] Dreuille B de, Fourati S, Joly F, et al. Le syndrome de grêle court chez l'adulte - De l'insuffisance intestinale à l'adaptation intestinale. *Med Sci (Paris)* 2021; 37: 742–751. doi:10.1051/medsci/2021110
- [598] Amiot A, Messing B, Corcos O, et al. Determinants of home parenteral nutrition dependence and survival of 268 patients with non-malignant short bowel syndrome. *Clin Nutr* 2013; 32: 368–374. doi:10.1016/j.clnu.2012.08.007
- [599] Bessaguet F, de Bandt J-P, Desmoulière A. L'intestin grêle et le gros intestin. *Actualités Pharmaceutiques* 2022; 61: 53–58. doi:10.1016/j.actpha.2021.12.029
- [600] Joly F, Mayeur C, Messing B, et al. Morphological adaptation with preserved proliferation/transporter content in the colon of patients with short bowel syndrome. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009; 297: G116–G123. doi:10.1152/ajpgi.90657.2008
- [601] Messing B, Corcos O, Amiot A, et al. [Intestinal failure: from adaptation to transplantation]. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 33: 648–659. doi:10.1016/j.gcb.2009.07.012
- [602] Joly F, Mayeur C, Bruneau A, et al. Drastic changes in fecal and mucosa-associated microbiota in adult patients with short bowel syndrome. *Biochimie* 2010; 92: 753–761. doi:10.1016/j.biochi.2010.02.015
- [603] Mayeur C, Gillard L, Le Beyec J, et al. Extensive Intestinal Resection Triggers Behavioral Adaptation, Intestinal Remodeling and Microbiota Transition in Short Bowel Syndrome. *Microorganisms* 2016; 4: 16. doi:10.3390/microorganisms4010016
- [604] Gillard L, Billiauws L, Stan-Iuga B, et al. Enhanced Ghrelin Levels and Hypothalamic Orexigenic AgRP and NPY Neuropeptide Expression in Models of Jejuno-Colonic Short Bowel Syndrome. *Sci Rep* 2016; 6: 28345. doi:10.1038/srep28345
- [605] Gillard L, Mayeur C, Robert V, et al. Microbiota Is Involved in Post-resection Adaptation in Humans with Short Bowel Syndrome. *Front Physiol* 2017; 8. doi:10.3389/fphys.2017.00224

- [606] Briet F, Flourié B, Achour L, et al. Bacterial adaptation in patients with short bowel and colon in continuity. *Gastroenterology* 1995; 109: 1446–1453. doi:10.1016/0016-5085(95)90629-0
- [607] Mayeur C, Gratadoux J-J, Bridonneau C, et al. Faecal D/L Lactate Ratio Is a Metabolic Signature of Microbiota Imbalance in Patients with Short Bowel Syndrome. *PLoS ONE* 2013; 8: e54335. doi:10.1371/journal.pone.0054335
- [608] Couillault C, Kurz C. Du nématode *Caenorhabditis elegans* et de son utilisation en laboratoire. *STAL* 2010; 36: 59–74
- [609] Christian CJ, Benian GM. Animal models of sarcopenia. *Aging Cell* 2020; 19: e13223. doi:10.1111/acel.13223
- [610] C. elegans Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 1998; 282: 2012–2018. doi:10.1126/science.282.5396.2012
- [611] Apfeld J, Alper S. What Can We Learn About Human Disease from the Nematode *C. elegans*? *Methods Mol Biol* 2018; 1706: 53–75. doi:10.1007/978-1-4939-7471-9\_4
- [612] Currey HN, Liachko NF. Evaluation of Motor Impairment in *C. elegans* Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Vis Exp* 2021; doi:10.3791/62699
- [613] Ellwood RA, Piasecki M, Szewczyk NJ. *Caenorhabditis elegans* as a Model System for Duchenne Muscular Dystrophy. *Int J Mol Sci* 2021; 22: 4891. doi:10.3390/ijms22094891
- [614] Ewald CY, Castillo-Quan JI, Blackwell TK. Untangling Longevity, Dauer, and Healthspan in *Caenorhabditis elegans* Insulin/IGF-1-Signalling. *Gerontology* 2018; 64: 96–104. doi:10.1159/000480504
- [615] Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 2015; 1–31. doi:10.1895/wormbook.1.177.1
- [616] Dimov I, Maduro MF. The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. *Cell Tissue Res* 2019; 377: 383–396. doi:10.1007/s00441-019-03036-4
- [617] McGhee J. The *C. elegans* intestine. *WormBook* 2007; doi:10.1895/wormbook.1.133.1
- [618] Wang MC, O'Rourke EJ, Ruvkun G. Fat metabolism links germline stem cells and longevity in *C. elegans*. *Science* 2008; 322: 957–960. doi:10.1126/science.1162011
- [619] Avery L, Shtonda BB. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *The Journal of experimental biology* 2003; 206: 2441. doi:10.1242/jeb.00433
- [620] Basic M, Dardevet D, Abuja PM, et al. Approaches to discern if microbiome associations reflect causation in metabolic and immune disorders. *Gut Microbes* 2022; 14: 2107386. doi:10.1080/19490976.2022.2107386
- [621] Zhang F, Berg M, Dierking K, et al. *Caenorhabditis elegans* as a Model for Microbiome Research. *Front Microbiol* 2017; 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00485
- [622] Berg M, Stenuit B, Ho J, et al. Assembly of the *Caenorhabditis elegans* gut microbiota from diverse soil microbial environments. *ISME J* 2016; 10: 1998–2009. doi:10.1038/ismej.2015.253
- [623] Dirksen P, Marsh SA, Braker I, et al. The native microbiome of the nematode *Caenorhabditis elegans*: gateway to a new host-microbiome model. *BMC Biol* 2016; 14: 38. doi:10.1186/s12915-016-0258-1
- [624] Montalvo-Katz S, Huang H, Appel MD, et al. Association with soil bacteria enhances p38-dependent infection resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun* 2013; 81: 514–520. doi:10.1128/IAI.00653-12

- [625] Jiang H, Wang D. The Microbial Zoo in the *C. elegans* Intestine: Bacteria, Fungi and Viruses. *Viruses* 2018; 10: 85. doi:10.3390/v10020085
- [626] Kumar A, Baruah A, Tomioka M, et al. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host-microbe interactions. *Cell Mol Life Sci* 2020; 77: 1229–1249. doi:10.1007/s00018-019-03319-7
- [627] Gieseler K. Development, structure, and maintenance of *C. elegans* body wall muscle. *WormBook* 2017; 1–59. doi:10.1895/wormbook.1.81.2
- [628] Fox RM, Watson JD, Von Stetina SE, et al. The embryonic muscle transcriptome of *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2007; 8: R188. doi:10.1186/gb-2007-8-9-r188
- [629] White JG, Southgate E, Thomson JN, et al. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1986; 314: 1–340. doi:10.1098/rstb.1986.0056
- [630] Giacomotto J. *C. elegans*, un outil de criblage pour la recherche de traitements contre les maladies rares. Université Claude Bernard - Lyon I; 2010
- [631] Herndon LA, Schmeissner PJ, Dudaronek JM, et al. Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*. *Nature* 2002; 419: 808–814. doi:10.1038/nature01135
- [632] Fisher AL. Of worms and women: sarcopenia and its role in disability and mortality. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52: 1185–1190. doi:10.1111/j.1532-5415.2004.52320.x
- [633] Regmi SG, Rolland SG, Conratt B. Age-dependent changes in mitochondrial morphology and volume are not predictors of lifespan. *Aging (Albany NY)* 2014; 6: 118–130. doi:10.18632/aging.100639
- [634] Gaffney CJ, Bass JJ, Barratt TF, et al. Methods to Assess Subcellular Compartments of Muscle in *C. elegans*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 2014; e52043. doi:10.3791/52043
- [635] Sarasija S, Norman KR. Analysis of Mitochondrial Structure in the Body Wall Muscle of *Caenorhabditis elegans*. *Bio-protocol* 2018; 8: e2801–e2801
- [636] Dhondt I, Verschuuren C, Zečić A, et al. Prediction of biological age by morphological staging of sarcopenia in *Caenorhabditis elegans*. *Dis Model Mech* 2021; 14: dmm049169. doi:10.1242/dmm.049169
- [637] Gaffney CJ, Pollard A, Barratt TF, et al. Greater loss of mitochondrial function with ageing is associated with earlier onset of sarcopenia in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)* 2018; 10: 3382–3396. doi:10.18632/aging.101654
- [638] Yasuda K, Ishii T, Suda H, et al. Age-related changes of mitochondrial structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 763–770. doi:10.1016/j.mad.2006.07.002
- [639] Iqbal S, Ostojic O, Singh K, et al. Expression of mitochondrial fission and fusion regulatory proteins in skeletal muscle during chronic use and disuse. *Muscle Nerve* 2013; 48: 963–970. doi:10.1002/mus.23838
- [640] Romanello V. The Interplay between Mitochondrial Morphology and Myomitokines in Aging Sarcopenia. *Int J Mol Sci* 2020; 22: 91. doi:10.3390/ijms22010091
- [641] Marzetti E, Calvani R, Cesari M, et al. Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: From signaling pathways to clinical trials. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013; 45: 2288–2301. doi:10.1016/j.biochel.2013.06.024
- [642] Chuang H-S, Kuo W-J, Lee C-L, et al. Exercise in an electrostatic flow chamber ameliorates age-related degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep* 2016; 6: 28064. doi:10.1038/srep28064

- [643] Hartman JH, Smith LL, Gordon KL, et al. Swimming Exercise and Transient Food Deprivation in *Caenorhabditis elegans* Promote Mitochondrial Maintenance and Protect Against Chemical-Induced Mitotoxicity. *Sci Rep* 2018; 8: 8359. doi:10.1038/s41598-018-26552-9
- [644] Roselli M, Schifano E, Guantario B, et al. *Caenorhabditis Elegans* and Probiotics Interactions from a Prolongevity Perspective. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 5020. doi:10.3390/ijms20205020
- [645] Ikeda T, Yasui C, Hoshino K, et al. Influence of lactic acid bacteria on longevity of *Caenorhabditis elegans* and host defense against salmonella enterica serovar enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 6404–6409. doi:10.1128/AEM.00704-07
- [646] Kim Y, Mylonakis E. *Caenorhabditis elegans* immune conditioning with the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* strain NCFM enhances gram-positive immune responses. *Infect Immun* 2012; 80: 2500–2508. doi:10.1128/IAI.06350-11
- [647] Zhou M, Yu H, Yin X, et al. *Lactobacillus zeae* Protects *Caenorhabditis elegans* from Enterotoxigenic *Escherichia coli*-Caused Death by Inhibiting Enterotoxin Gene Expression of the Pathogen. *PLOS ONE* 2014; 9: e89004. doi:10.1371/journal.pone.0089004
- [648] Kamaladevi A, Balamurugan K. *Lactobacillus casei* triggers a TLR mediated RACK-1 dependent p38 MAPK pathway in *Caenorhabditis elegans* to resist *Klebsiella pneumoniae* infection. *Food Funct* 2016; 7: 3211–3223. doi:10.1039/c6fo00510a
- [649] Guantario B, Zinno P, Schifano E, et al. In Vitro and in Vivo Selection of Potentially Probiotic Lactobacilli From Nocellara del Belice Table Olives. *Front Microbiol* 2018; 9: 595. doi:10.3389/fmicb.2018.00595
- [650] de Barros PP, Scorzoni L, Ribeiro F de C, et al. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microb Pathog* 2018; 117: 80–87. doi:10.1016/j.micpath.2018.02.019
- [651] Park MR, Ryu S, Maburutse BE, et al. Probiotic *Lactobacillus fermentum* strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. *Sci Rep* 2018; 8: 7441. doi:10.1038/s41598-018-25333-8
- [652] Poupet C, Saraoui T, Veisseire P, et al. *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 as an effective treatment for preventing *Candida albicans* infection in the invertebrate model *Caenorhabditis elegans*: First mechanistic insights. *PLoS One* 2019; 14: e0216184. doi:10.1371/journal.pone.0216184
- [653] Schifano E, Tomassini A, Preziosi A, et al. *Leuconostoc mesenteroides* Strains Isolated from Carrots Show Probiotic Features. *Microorganisms* 2021; 9: 2290. doi:10.3390/microorganisms9112290
- [654] Liguori I, Russo G, Curcio F, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging* 2018; 13: 757–772. doi:10.2147/CIA.S158513
- [655] Labuschagne CF, Stigter ECA, Hendriks MMWB, et al. Quantification of *in vivo* oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* during aging by endogenous F3-isoprostane measurement. *Aging Cell* 2013; 12: 214–223. doi:10.1111/acel.12043
- [656] Poupet C, Chassard C, Nivoliez A, et al. *Caenorhabditis elegans*, a Host to Investigate the Probiotic Properties of Beneficial Microorganisms. *Front Nutr* 2020; 7: 135. doi:10.3389/fnut.2020.00135
- [657] Kobatake E, Nakagawa H, Seki T, et al. Protective effects and functional mechanisms of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 against oxidative stress. *PLoS One* 2017; 12: e0177106. doi:10.1371/journal.pone.0177106



- [658] Grompone G, Martorell P, Llopis S, et al. Anti-inflammatory *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects against oxidative stress and increases lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 2012; 7: e52493. doi:10.1371/journal.pone.0052493
- [659] Wang S, Ahmadi S, Nagpal R, et al. Lipoteichoic acid from the cell wall of a heat killed *Lactobacillus paracasei* D3-5 ameliorates aging-related leaky gut, inflammation and improves physical and cognitive functions: from *C. elegans* to mice. *GeroScience* 2020; 42: 333–352. doi:10.1007/s11357-019-00137-4
- [660] Vanhooren V, Libert C. The mouse as a model organism in aging research: Usefulness, pitfalls and possibilities. *Ageing Research Reviews* 2013; 12: 8–21. doi:10.1016/j.arr.2012.03.010
- [661] Baek K-W, Jung Y-K, Kim J-S, et al. Rodent Model of Muscular Atrophy for Sarcopenia Study. *J Bone Metab* 2020; 27: 97. doi:10.11005/jbm.2020.27.2.97
- [662] Nay K. Le fer et le microbiote intestinal : deux nouvelles cibles pour améliorer les capacités fonctionnelles et musculaires en condition d'hypoactivité. Rennes 2; 2019
- [663] Hambright WS, Niedernhofer LJ, Huard J, et al. Murine models of accelerated aging and musculoskeletal disease. *Bone* 2019; 125: 122–127. doi:10.1016/j.bone.2019.03.002
- [664] Cai N, Wu Y, Huang Y. Induction of Accelerated Aging in a Mouse Model. *Cells* 2022; 11: 1418. doi:10.3390/cells11091418
- [665] Sebastián D, Sorianello E, Segalés J, et al. *Mfn2* deficiency links age-related sarcopenia and impaired autophagy to activation of an adaptive mitophagy pathway. *EMBO J* 2016; 35: 1677–1693. doi:10.15252/embj.201593084
- [666] Magne H, Savary-Auzeloux I, Vazeille E, et al. Lack of muscle recovery after immobilization in old rats does not result from a defect in normalization of the ubiquitin-proteasome and the caspase-dependent apoptotic pathways: Lack of muscle recovery after immobilization during ageing. *The Journal of Physiology* 2011; 589: 511–524. doi:10.1113/jphysiol.2010.201707
- [667] Savary-Auzeloux I, Magne H, Migné C, et al. A Dietary Supplementation with Leucine and Antioxidants Is Capable to Accelerate Muscle Mass Recovery after Immobilization in Adult Rats. *PLoS ONE* 2013; 8: e81495. doi:10.1371/journal.pone.0081495
- [668] Magne H, Savary-Auzeloux I, Migné C, et al. Contrarily to whey and high protein diets, dietary free leucine supplementation cannot reverse the lack of recovery of muscle mass after prolonged immobilization during ageing: Immobilization, recovery and nutrition during ageing. *The Journal of Physiology* 2012; 590: 2035–2049. doi:10.1113/jphysiol.2011.226266
- [669] Savary-Auzeloux I, Jarzaguet M, Migné C, et al. Anti-inflammatory *Streptococcus thermophilus* CNRZ160 limits sarcopenia induced by low-grade inflammation in older adult rats. *Frontiers in Nutrition* 2022; 9
- [670] Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, et al. Elevated plasma glucagon-like peptide 1 and 2 concentrations in ileum resected short bowel patients with a preserved colon. *Gut* 2000; 47: 370–376. doi:10.1136/gut.47.3.370
- [671] Bertazzoni E, Donelli G, Midtvedt T, et al. Probiotics and clinical effects: is the number what counts? *Journal of Chemotherapy* 2013; 25: 193–212. doi:10.1179/1973947813Y.0000000078
- [672] Emtiazy M, Oveidzadeh L, Habibi M, et al. Investigating the effectiveness of the *Trigonella foenum-graecum* L. (fenugreek) seeds in mild asthma: a randomized controlled trial. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology* 2018; 14: 19. doi:10.1186/s13223-018-0238-9

- [673] Hong Y, Lee JH, Jeong KW, et al. Amelioration of muscle wasting by glucagon-like peptide-1 receptor agonist in muscle atrophy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2019; 10: 903–918. doi:10.1002/jcsm.12434
- [674] Massimino E, Izzo A, Riccardi G, et al. The Impact of Glucose-Lowering Drugs on Sarcopenia in Type 2 Diabetes: Current Evidence and Underlying Mechanisms. *Cells* 2021; 10: 1958. doi:10.3390/cells10081958
- [675] Huang F, Zhang L, Song X, et al. The effects of different concentrations of glucose on glucose sensors and GLP-1 secretion in the enteroendocrine cell line STC-1. *gpb* 2020; 39: 79–87. doi:10.4149/gpb\_2019040
- [676] McCarthy T, Green BD, Calderwood D, et al. STC-1 Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al., Hrsg. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Cham (CH): Springer; 2015
- [677] Roos S, Karner F, Axelsson L, et al. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50 Pt 1: 251–258. doi:10.1099/00207713-50-1-251
- [678] Valeriano VD, Parungao-Balolong MM, Kang D-K. In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *J Appl Microbiol* 2014; 117: 485–497. doi:10.1111/jam.12539
- [679] Belguesmia Y, Alard J, Mendil R, et al. In vitro probiotic properties of selected lactobacilli and multi-strain consortium on immune function, gut barrier strengthening and gut hormone secretion. *Journal of Functional Foods* 2019; 57: 382–391. doi:10.1016/j.jff.2019.04.028
- [680] Simon M-C, Strassburger K, Nowotny B, et al. Intake of *Lactobacillus reuteri* improves incretin and insulin secretion in glucose-tolerant humans: a proof of concept. *Diabetes Care* 2015; 38: 1827–1834. doi:10.2337/dc14-2690
- [681] Jiang J, Feng N, Zhang C, et al. *Lactobacillus reuteri* A9 and *Lactobacillus mucosae* A13 isolated from Chinese superlongevity people modulate lipid metabolism in a hypercholesterolemia rat model. *FEMS Microbiol Lett* 2019; 366. doi:10.1093/femsle/fnz254
- [682] Kuhre RE, Wewer Albrechtsen NJ, Deacon CF, et al. Peptide production and secretion in GLUTag, NCI-H716, and STC-1 cells: a comparison to native L-cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 2016; 56: 201–211. doi:10.1530/JME-15-0293
- [683] Nivoliez A, Camares O, Paquet-Gachinat M, et al. Influence of manufacturing processes on in vitro properties of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35<sup>®</sup>. *J Biotechnol* 2012; 160: 236–241. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.04.005
- [684] Veisseire P, Bonnet M, Saraoui T, et al. Investigation into In Vitro and In Vivo *Caenorhabditis elegans* Models to Select Cheese Yeasts as Probiotic Candidates for their Preventive Effects against *Salmonella Typhimurium*. *Microorganisms* 2020; 8. doi:10.3390/microorganisms8060922
- [685] Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *J Dairy Sci* 2020; 103: 1223–1237. doi:10.3168/jds.2019-17092
- [686] Kwun SY, Bae YW, Yoon JA, et al. Isolation of acid tolerant lactic acid bacteria and evaluation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. *Food Sci Biotechnol* 2020; 29: 1125–1130. doi:10.1007/s10068-020-00760-4

- [687] Haeri A, Khodaii Z, Ghaderian SMH, et al. Comparison of adherence patterns of a selection of probiotic bacteria to Caco-2, HEp-2, and T84 cell lines. *Ann Microbiol* 2012; 62: 339–344. doi:10.1007/s13213-011-0267-9
- [688] Reddy S, Austin F. Adhesion and Invasion Assay Procedure Using Caco-2 Cells for *Listeria monocytogenes*. *Bio Protoc* 2017; 7: e2267. doi:10.21769/BioProtoc.2267
- [689] Morita H, He F, Fuse T, et al. Adhesion of Lactic Acid Bacteria to Caco-2 Cells and Their Effect on Cytokine Secretion. *Microbiology and Immunology* 2002; 46: 293–297. doi:10.1111/j.1348-0421.2002.tb02698.x
- [690] Dimitrov Z, Gotova I, Chorbadjiyska E. In vitro characterization of the adhesive factors of selected probiotics to Caco-2 epithelium cell line. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2014; 28: 1079–1083. doi:10.1080/13102818.2014.969948
- [691] García-Ruiz A, González de Llano D, Esteban-Fernández A, et al. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology* 2014; 44: 220–225. doi:10.1016/j.fm.2014.06.015
- [692] Le Blay G, Fliss I, Lacroix C. Comparative detection of bacterial adhesion to Caco-2 cells with ELISA, radioactivity and plate count methods. *Journal of Microbiological Methods* 2004; 59: 211–221. doi:10.1016/j.mimet.2004.07.006
- [693] Valeriano VDV, Oh JK, Bagon BB, et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus mucosae* LM1 identifies potential niche-specific genes and pathways for gastrointestinal adaptation. *Genomics* 2019; 111: 24–33. doi:10.1016/j.ygeno.2017.12.009
- [694] Joly F, Mayeur C, Thomas M, et al. Syndrome du grêle court et microbiote intestinal. *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue* 2011; XIV: 160–165
- [695] Rolland Y, Benetos A, Gentric A, et al. [Frailty in older population: a brief position paper from the French society of geriatrics and gerontology]. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil* 2011; 9: 387–390. doi:10.1684/pnv.2011.0311
- [696] He J, Zhang P, Shen L, et al. Short-Chain Fatty Acids and Their Association with Signalling Pathways in Inflammation, Glucose and Lipid Metabolism. *Int J Mol Sci* 2020; 21. doi:10.3390/ijms21176356
- [697] Horiuchi H, Kamikado K, Aoki R, et al. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 modulates host energy metabolism via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Sci Rep* 2020; 10: 4158. doi:10.1038/s41598-020-60984-6
- [698] Hayashi A, Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, et al. The Butyrate-Producing Bacterium *Clostridium butyricum* Suppresses *Clostridioides difficile* Infection via Neutrophil- and Antimicrobial Cytokine-Dependent but GPR43/109a-Independent Mechanisms. *J Immunol* 2021; 206: 1576–1585. doi:10.4049/jimmunol.2000353
- [699] Wang J-J, Zhang Q-M, Ni W-W, et al. Modulatory effect of *Lactobacillus acidophilus* KLDS 1.0738 on intestinal short-chain fatty acids metabolism and GPR41/43 expression in  $\beta$ -lactoglobulin-sensitized mice. *Microbiol Immunol* 2019; 63: 303–315. doi:10.1111/1348-0421.12723
- [700] Wang G, Song J, Huang Y, et al. *Lactobacillus plantarum* SHY130 isolated from yak yogurt attenuates hyperglycemia in C57BL/6J mice by regulating the enteroinsular axis. *Food Funct* 2022; 13: 675–687. doi:10.1039/D1FO02387J
- [701] de Vos WM, Tilg H, Hul MV, et al. Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut* 2022; 71: 1020–1032. doi:10.1136/gutjnl-2021-326789

- [702] Baracos VE, Martin L, Korc M, et al. Cancer-associated cachexia. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 17105. doi:10.1038/nrdp.2017.105
- [703] Westerterp KR. Control of energy expenditure in humans. *Eur J Clin Nutr* 2017; 71: 340–344. doi:10.1038/ejcn.2016.237
- [704] van der Schoor SR, van Goudoever JB, Stoll B, et al. The pattern of intestinal substrate oxidation is altered by protein restriction in pigs. *Gastroenterology* 2001; 121: 1167–1175. doi:10.1053/gast.2001.29334
- [705] Chen C, Fang S, Wei H, et al. *Prevotella copri* increases fat accumulation in pigs fed with formula diets. *Microbiome* 2021; 9: 175. doi:10.1186/s40168-021-01110-0
- [706] Nurrahma BA, Tsao S-P, Wu C-H, et al. Probiotic Supplementation Facilitates Recovery of 6-OHDA-Induced Motor Deficit via Improving Mitochondrial Function and Energy Metabolism. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2021; 13
- [707] Cheng L-H, Cheng S-H, Wu C-C, et al. *Lactobacillus paracasei* PS23 dietary supplementation alleviates muscle aging via ghrelin stimulation in d-galactose-induced aging mice. *Journal of Functional Foods* 2021; 85: 104651. doi:10.1016/j.jff.2021.104651
- [708] Xu H, Cao J, Li X, et al. Regional Differences in the Gut Microbiota and Gut-Associated Immunologic Factors in the Ileum and Cecum of Rats With Collagen-Induced Arthritis. *Frontiers in Pharmacology* 2020; 11
- [709] Triplett J, Ellis D, Braddock A, et al. Temporal and region-specific effects of sleep fragmentation on gut microbiota and intestinal morphology in Sprague Dawley rats. *Gut Microbes* 2020; 11: 706–720. doi:10.1080/19490976.2019.1701352
- [710] Lee SM, Kim N, Park JH, et al. Comparative Analysis of Ileal and Cecal Microbiota in Aged Rats. *J Cancer Prev* 2018; 23: 70–76. doi:10.15430/JCP.2018.23.2.70
- [711] Chen H, Xu C, Zhang F, et al. The gut microbiota attenuates muscle wasting by regulating energy metabolism in chemotherapy-induced malnutrition rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2020; 85: 1049–1062. doi:10.1007/s00280-020-04060-w

# ANNEXES

**Annexe 1.** Revue de synthèse « *Gut microbes an muscle function : can probiotics make our muscles stronger ?* »

**Annexe 2.** Grilles couramment utilisées pour diagnostiquer/évaluer la fragilité chez la personne âgée.

**Annexe 3.** Principales méthodes d'analyse du microbiote intestinal.

**Annexe 4.** Liste des micro-organismes possédant le statut QPS (révisée en juillet 2022).

**Annexe 5.** Fiche d'analyse sensorielle utilisée pour les dégustations des fromages.



# Annexe 1 : Revue de synthèse

---

## Gut microbes and muscle function: can probiotics make our muscles stronger?

Muriel Giron, Muriel Thomas, Dominique Dardevet, Christophe Chassard & Isabelle Savary-Auzeloux

### Résumé

La composition du microbiote intestinal pourrait jouer un rôle déterminant sur le métabolisme, la masse et la fonction des muscles squelettiques, aussi bien dans des situations cataboliques (sarcopénie, cachexie) qu'anaboliques (exercice). Les signaux générés par l'intestin et le microbiote (métabolites microbiens, hormones digestives, lipopolysaccharide et interleukines) relient l'activité du microbiote intestinal aux muscles et régulent la fonctionnalité musculaire *via* la modulation de l'inflammation systémique/tissulaire ainsi que la sensibilité à l'insuline. Les probiotiques capables de limiter la sarcopénie et la cachexie ou de promouvoir les performances physiques chez les rongeurs sont principalement des bactéries lactiques et des Bifidobactéries. Chez l'Homme, les mêmes bactéries ont été testées, mais la rareté des études, la variabilité des populations et la difficulté de mesurer avec précision et avec une grande reproductibilité la masse et la fonction musculaires n'ont pas permis de mettre en évidence des souches spécifiques capables d'optimiser la masse et la fonction musculaires. Des études complémentaires sont nécessaires sur des populations plus définies afin de concevoir une nutrition personnalisée. Pour les personnes âgées, il est essentiel de tester l'efficacité des probiotiques en fonction du degré de fragilité, de l'état nutritionnel ou du degré de sarcopénie avant la supplémentation. Pour l'exercice, la sélection de probiotiques capables d'être efficaces chez les athlètes récréatifs et/ou professionnels, pour les exercices de résistance et/ou d'endurance, nécessiterait également une attention particulière. Finalement, une combinaison de stratégies capables d'optimiser la fonction musculaire, y compris des bactéries (nouveaux microbes, écosystèmes bactériens ou mélange, plus enclins à coloniser un écosystème intestinal spécifique) associées à des prébiotiques et à d'autres suppléments « traditionnels » connus pour stimuler l'anabolisme musculaire (protéines), pourrait être un bon moyen de préserver la fonctionnalité musculaire chez les individus en bonne santé (quel que soit leur âge) ou des patients.

# Gut microbes and muscle function: can probiotics make our muscles stronger?

Muriel Giron<sup>1,2,3</sup> , Muriel Thomas<sup>2</sup>, Dominique Dardevet<sup>1</sup>, Christophe Chassard<sup>3</sup> & Isabelle Savary-Auzeloux<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Clermont-Ferrand, France; <sup>2</sup>Université Paris-Saclay, INRAE UMR1319, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France; <sup>3</sup>INRAE UMR0545, Unité Mixte de Recherche sur le Fromage, Aurillac, France

## Abstract

Evidence suggests that gut microbiota composition and diversity can be a determinant of skeletal muscle metabolism and functionality. This is true in catabolic (sarcopenia and cachexia) or anabolic (exercise or in athletes) situations. As gut microbiota is known to be causal in the development and worsening of metabolic dysregulation phenotypes such as obesity or insulin resistance, it can regulate, at least partially, skeletal muscle mass and function. Skeletal muscles are physiologically far from the gut. Signals generated by the gut due to its interaction with the gut microbiome (microbial metabolites, gut peptides, lipopolysaccharides, and interleukins) constitute links between gut microbiota activity and skeletal muscle and regulate muscle functionality via modulation of systemic/tissue inflammation as well as insulin sensitivity. The probiotics able to limit sarcopenia and cachexia or promote health performances in rodents are mainly lactic acid bacteria and bifidobacteria. In humans, the same bacteria have been tested, but the scarcity of the studies, the variability of the populations, and the difficulty to measure accurately and with high reproducibility muscle mass and function have not allowed to highlight specific strains able to optimize muscle mass and function. Further studies are required on more defined population, in order to design personalized nutrition. For elderly, testing the efficiency of probiotics according to the degree of frailty, nutritional state, or degree of sarcopenia before supplementation is essential. For exercise, selection of probiotics capable to be efficient in recreational and/or elite athletes, resistance, and/or endurance exercise would also require further attention. Ultimately, a combination of strategies capable to optimize muscle functionality, including bacteria (new microbes, bacterial ecosystems, or mix, more prone to colonize a specific gut ecosystem) associated with prebiotics and other 'traditional' supplements known to stimulate muscle anabolism (e.g. proteins), could be the best way to preserve muscle functionality in healthy individuals at all ages or patients.

**Keywords** Skeletal muscle; Probiotic; Ageing; Cachexia; Sarcopenia; Exercise; Athlete

Received: 22 September 2021; Revised: 7 January 2022; Accepted: 3 February 2022

\*Correspondence to: Isabelle Savary-Auzeloux, Université Clermont Auvergne, INRAE, UNH, Clermont-Ferrand 63000, France. Email: isabelle.savary-auzeloux@inrae.fr

## Introduction

Skeletal muscles represent 40% of the total mass in human beings and are involved in various fundamental functions such as mobility (locomotion and posture) and the maintenance of thermoregulation and glucose/amino acid metabolism.<sup>S1</sup> These tissues, accounting for 50–75% of all body proteins, can also be considered as the protein reservoir

that can be solicited in catabolic situations.<sup>S1</sup> Muscle protein status is the consequence of a tight regulation between protein synthesis and degradation leading to protein anabolism after meal intake that counterbalances the catabolism in the fasted state. The daily meal-related cycles of anabolism/catabolism can be modified on a longer-term basis by age, physiological state, and/or lifestyle and/or fitness, and either leads to muscle mass loss (sarcopenia and



cachexia) or gain (recovery after stress and resistance exercise). These factors are known to impact significantly on muscle mass within days, weeks, or months. Nutritional strategies have already been developed to improve muscle mass or limit loss.<sup>1</sup> This includes protein supplementation and micronutrients capable to increase insulin sensitivity or limit low-grade inflammation and oxidative stress.<sup>1,52</sup> These strategies, implemented alone or in association, have been proven to stimulate muscle mass and function, but their efficiency is not optimal and depends greatly on the targeted population.<sup>2,52</sup> In the case of the elderly population, muscle mass loss (sarcopenia) has been shown to be multifactorial<sup>3</sup> and potentiated by a loss of appetite and less physical activity. On the other hand, in the athletic population, muscles are highly solicited by effort, subjected to repeated (micro) damages and always along the ridgeline of the optimum anabolic condition necessary to recover from injuries.<sup>53</sup>

In these diverse populations, there is an increasing interest to develop more specific or novel strategies capable to optimize muscle anabolism complementary to the ones currently used. Some are based on gut microbiota, which is suspected to be causal in the development of several metabolic disorders. Indeed, microbiota changes have been shown to be correlated to and sometimes related to the development of obesity, diabetes, and cardiovascular diseases, all these pathologies being generally associated with the establishment of an insulin-resistant state and low-grade inflammation.<sup>54</sup> In parallel, it has been repeatedly demonstrated that muscle catabolism is frequently associated, in many physiological states, with inflammation and insulin resistance.

The coincidence between alteration of gut microbiota composition, physiological state impairment, and muscle catabolic states suggests that microbiota, directly or indirectly, could influence muscle mass status and regulation. The hypothesis of the 'gut–muscle axis' (i.e. the impact of gut microbiota and its interaction with the host gut on skeletal muscle metabolism and function) has therefore been proposed by several authors, particularly in sarcopenic older people.<sup>4–6,55</sup> Among potential mechanisms, gut microbiota could intervene in the regulation of the sensitivity of skeletal muscle to anabolic stimuli.<sup>4,7</sup> This explains why recent research projects have developed nutritional strategies including probiotics to target muscle mass and function. Probiotics are living microorganisms that have positive effects on health when ingested in adequate quantities. For a long time, marketed probiotics were mainly lactic acid bacteria (LAB) and bifidobacteria strains from a human or food origin, but current strategies are focusing more and more on the use of bacteria already present in the gut. The mechanisms of probiotics action are complex and often poorly understood, but one of their aims is to modulate the composition of an altered gut microbiota.

The aim of the present review is first to report the recent data on the interaction and underlying mechanisms that have

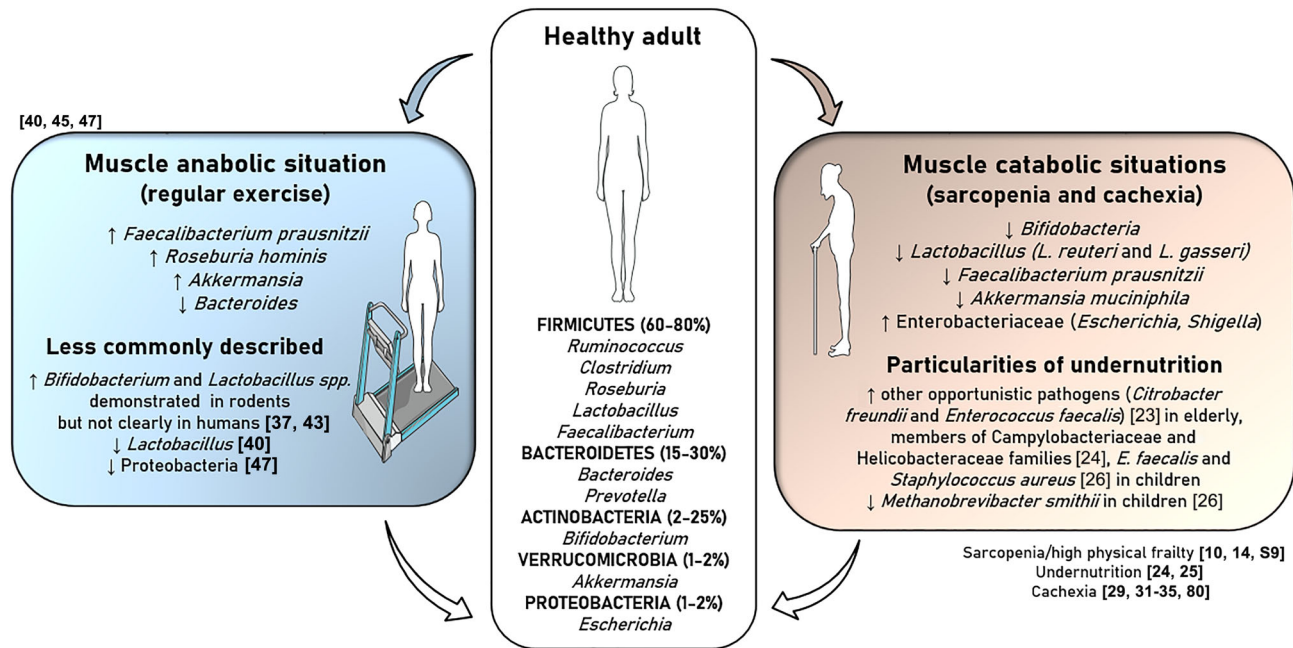
been demonstrated or hypothesized explaining the link between microbiota and muscle. Then, we will focus on probiotic strategies that have been developed so far to limit muscle mass loss or favour muscle mass gain in populations in catabolic or anabolic states.

## Shift in microbiota composition and alteration of muscle mass and function: what can be the link between microbiota, gut, and muscle?

### *Sarcopenia*

Sarcopenia is defined as the progressive and generalized loss of skeletal muscle mass and strength<sup>8</sup> and has recently been classified as a disease by the World Health Organization. This disease is still often associated with old age and can also occur earlier in life (inflammatory diseases and organ failure with cachexia). Its diagnosis requires the presence of low levels for three parameters: muscle strength, muscle quantity/quality, and physical performance as an indicator of severity.<sup>8</sup> As the number of elderly people and life expectancy increase, the proportion of sarcopenic elderly, although difficult to determine, could reach 20% of people over 60 years old.<sup>56</sup> Moreover, sarcopenia is recognized as a central factor in the pathophysiology of the frailty syndrome considered to be a major public health problem due to the numerous consequences it entails (e.g. risk of falls, hospitalizations, and dependency).<sup>9</sup> The frailty syndrome is multidimensional and characterized by a cumulative decline in several systems and functions of the body that include physical aspects (i.e. phenotype of frailty described by Fried *et al.*) and also cognitive and social aspects.<sup>57</sup> Consequently, part of frailty phenotype includes some characteristics of sarcopenia (significant weight loss, low handgrip strength, and gait speed).<sup>9</sup>

Several groups have studied microbiota composition in sarcopenic, frail, or more frequently elderly population over the last decade (*Figure 1*). It is now well established that the gut microbiota composition evolves with age and is characterized by a reduction of microbiota diversity with an important inter-individual variation.<sup>10,11,58</sup> The analysis of gut microbiota composition in cohorts of elderly people showed a shift in microbiota composition in function of their age with the health status playing an important part.<sup>12,13</sup> The gut microbiota composition of frail elderly people is more altered compared with people of the same age who are in a better health.<sup>10,14,15</sup> In accordance with this, individuals with high frailty scores (determined with Groningen Frailty Indicator or Rockwood Clinical Frailty Scale) showed a significant reduction in relative abundance of lactobacilli, *Bacteroides/*



**Figure 1** Major phyla and genera of the gut microbiota of healthy adult humans and impacts of physical exercise and sarcopenia/undernutrition and cachexia. The major phyla of the healthy intestinal microbiota are Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and to a lesser extent Verrucomicrobia and Proteobacteria. Exercise increases the proportion of *Faecalibacterium*, *Roseburia*, and *Akkermansia* genera. Studies in rodents have clearly shown an increase in *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. with exercise practice, a result more mitigated in humans. Frailty (and its major components: sarcopenia and undernutrition) and cachexia are associated with a decrease in these beneficial genera and an increase in opportunistic pathogens from Enterobacteriaceae family. Undernutrition (in both elderly and children) has the particularity to be associated with a strong increase in different pathogens.

*Prevotella*, and *Faecalibacterium prausnitzii* and increased Enterobacteriaceae compared with people with low frailty scores.<sup>14,16,59</sup> Note that *F. prausnitzii* particularly is recognized as an indicator of good intestine health as metabolites produced by *F. prausnitzii* (e.g. butyrate) present anti-inflammatory properties.<sup>510</sup> In parallel, studies using cohorts have shown that sarcopenia is associated with decreased short-chain fatty acid (SCFA—including acetate, propionate, and butyrate derive from fermentation of non-digestible food)-producing bacteria (*Roseburia*, *Eubacterium* for instance) relatively to non-sarcopenic controls.<sup>13,15</sup>

Experimental design/models such as germ-free mice have added valuable evidences on the potential causal role of microbiota on the control of muscle mass and function. Axenic and antibiotic-treated mice present a decreased muscle mass and strength compared with their conventional counterparts.<sup>17-19</sup> Interestingly, these alterations in muscle mass and function can be restored by the transplantation of a microbiota or after a natural reseeding.<sup>17,18</sup> Objectifying the causal role of the microbiota is complex in old individuals due to the numerous confounding factors that are known to modify microbiota composition: medication, lower appetite, and nutritional status or associated chronic pathologies.<sup>20,511</sup> However, increasing evidences suggest that the gut microbiota may play among other factors, a causal role in the devel-

opment of muscle mass loss and function in elderly.<sup>4,5,7</sup> Fecal microbial transplantation (FMT) from elderly volunteers in either good (HF) or bad (LF) physical function to germ-free animals showed that HF mice presented greater muscle strength compared with LF group.<sup>21</sup> HF microbiota was enriched in *Prevotella* and *Barnesiella* compared with LF. These bacterial genera contain genes coding for enzymes that produce SCFAs (i.e. acetate, propionate, and butyrate), which is the opposite of what was described earlier in the old sarcopenic population. These promising results should be confirmed in the diverse elderly population.

### Undernutrition

Partially connected with the issue of frailty described earlier, undernutrition (i.e. inadequate intake of dietary nutrients relatively to requirement) and its impact on microbiota have been investigated in two extreme populations in terms of age: children and elderly. In developed countries, the elderly population can suffer from undernutrition, particularly in frail and hospitalized people. The anorexia of ageing (i.e. decrease in appetite and/or food intake in old age) can worsen the age-related loss of muscle mass and precipitate the entry of elderly people into a phase of dependence.<sup>22</sup>

One study showed similarities between the microbiome of high frail nursing home residents ( $\geq 65$  years) and malnourished population.<sup>23</sup> These two populations both showed an increase in *Ruminococcus gnavus*, a species recently associated with inflammatory joint disease,<sup>512</sup> as well as a decrease in butyrate producers (*Roseburia intestinalis*) (Figure 1). A particularity of people at risk of malnutrition or malnourished is the significant increase of specific opportunistic pathogens, which can cause serious infections.<sup>23</sup> In severely malnourished children compared with healthy children from the same country and at the same age, the microbiota is enriched in Proteobacteria phylum (Enterobacteriaceae or Campylobacteriaceae and Helicobacteraceae families).<sup>24–26</sup>

This colonization can be responsible for the development of intestinal inflammation leading to an alteration of small intestine morphology (decreased surface area, increased permeability, and apoptosis of epithelial cells) and ultimately resulting in intestinal malabsorption.<sup>24</sup>

Smith *et al.* were the first to suggest a causal relationship between the gut microbiome in a state of extreme undernutrition, the kwashiorkor syndrome.<sup>27,513</sup> FMT from Malawian twin patients with or without a kwashiorkor syndrome to germ-free mice was performed. The combination of Malawian diet (plant-based diet deficient in proteins and in micronutrients, and usual diet of the targeted population) and microbiome from the kwashiorkor twin led to a phenotype of the undernourished children in the recipient mice (i.e. weight loss). Same conclusions were obtained by Blanton *et al.*<sup>28</sup> Refeeding kwashiorkor microbiota-transferred animals with ready-to-use therapeutic food did not help to improve significantly the rodent's health,<sup>27</sup> but the growth of these mice was restored when co-housed with mice having healthy microbiota.<sup>28</sup> Two taxa (*R. gnavus* and *Clostridium symbiosus*) have been highlighted as potential key determinants in the regulation of weight gain and growth in such nutritional situations, by promoting protein synthesis (and lean mass growth) rather than altering protein oxidation.<sup>28</sup> The role of these specific bacteria on growth rate and muscle mass as well as translation to humans requires further investigation.<sup>514,515</sup>

## Cachexia

A rapid muscle mass loss and a shift in gut microbiota composition also occur in cachectic population. Cachexia is a multifactorial syndrome characterized by a generalized fatigue, loss of body weight, skeletal muscle, and adipose mass, as well as reduced food intake; this term is being frequently used in context of cancer.<sup>29,30,516</sup> This syndrome is also associated with a systemic inflammatory state, characterized by high rates of pro-inflammatory markers such as C-reactive protein (CRP).<sup>30</sup> An altered microbiota is observed in cancer cachexia (Figure 1), and several hypothesized mechanisms

(systemic inflammation or gut barrier dysfunction) suggest a causal role of microbiota in cachexia development.<sup>29</sup> In cancer patients (colorectal, breast, and lung cancers), a decreased abundance of *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Faecalibacterium* genera is observed concomitantly with an increase of Enterobacteriaceae and *Enterococcus*.<sup>31–33</sup> Similar microbial colonic patterns are also found in other non-cancerous cachectic patients presenting chronic kidney, heart, or liver diseases.<sup>29,34,35</sup> The associated increase in circulating pro-inflammatory cytokines is then able to induce muscle atrophy by different mechanisms (insulin resistance, inflammation, and associated oxidative stress), which are detailed in the succeeding text.

## Physical activity

Physical activity and exercise are known to be strong determinants of health status. Even if a lack of physical activity is correlated to a poor health status and imbalanced microbiota, the causal role of microbiota to promote health in such a context remains to be studied in detail. Few studies, particularly in humans, have investigated the effects of exercise on gut microbiota composition and/or functions (Supporting Information, Table S1). But, as nutritional status and physical activity are generally tightly intertwined, the exact role of exercise *per se* on health outcomes remains complex to evaluate.<sup>36</sup> In rodent studies where exercise and nutrition are more controlled (Table S2), regular physical activity is associated with an elevated bacterial diversity and richness in the gut/faecal microbiota.<sup>37,38</sup>

Generally, a decrease of the Firmicutes/Bacteroidetes ratio is observed,<sup>37–40</sup> and basically, microorganisms altered in catabolic situations are changed the other way round with exercise or in athlete population (Figure 1). Still, the nature and/or intensity of exercises may alter differentially microbiota composition (voluntary exercise vs. forced exercised<sup>41,42</sup>). For instance, in rodents subjected to voluntary access wheel exercise, the bacterial diversity and main phyla abundance were not strongly altered, but forced exercise (treadmill) led to increased proportion of harmful and pro-inflammatory bacteria vs. free-exercised animals and sedentary controls.<sup>43,517</sup> A study demonstrated that forced treadmill exercise exacerbates inflammation and causes mortality while voluntary wheel training is protective in a mouse model of colitis.<sup>44</sup>

As said earlier, people exercising tend to have more 'healthy' diets, including a higher dietary fibre intake.<sup>36</sup> This can explain why some bacteria associated with good immunological and metabolic health such as *F. prausnitzii*, *Roseburia hominis* (i.e. butyrate producers) and *Akkermansia muciniphila* (i.e. acetate and propionate producer) tend to be more abundant with physical activity.<sup>45–47</sup> Likewise, exercise has been shown to be associated with the abundance of

other butyrate producers<sup>40,45</sup> or lactate producers,<sup>37,43</sup> and it is known that lactate is converted into butyrate by butyrate-producing bacteria in the gut.<sup>518</sup> This suggests that the combination of exercise and microbiota-targeted nutrition should be more closely investigated.

In this sense, and similarly to what was already performed in catabolic situations to assess the causal role of microbiota on muscle mass and function, studies have used FMT from exercised mice to axenic rodents. In high-fat-fed mice, the impact of FMT from normal-fed or exercised animals on recipient's phenotype has been studied.<sup>48</sup> Even if diet is more powerful than exercise to shape the gut microbiota, FMT from exercised animals (fed with normal or high-fat diet) led to a reduced fat mass and inflammation (TNF- $\alpha$  and IL-1 expression in liver), to an increased glucose tolerance, and to a decreased serum low-density lipoprotein (LDL) compared with sedentary animals fed with the high-fat diet.<sup>48</sup> The anti-inflammatory properties of the microbiota from exercised mice have been further proven by Allen *et al.* Indeed, FMT from mice having free access to running wheel during 6 weeks in germ-free mice subjected to inflamed colon (colitis)<sup>49</sup> allowed a higher microbiota diversity, limited colitis, and improved body mass compared with same animals transplanted with microbiota from sedentary mice.<sup>49</sup>

## Regular mechanisms of muscle function that could be recruited to explain microbiota–muscle axis

Many reviews summarize how microbiota can modulate health status in various physiological/pathological states. These covered metabolism regulation (e.g. energy expenditure, lipogenesis/lipolysis, and insulin secretion), appetite control, and cognitive function.<sup>50,510</sup> Among these functions, some of them concern muscle (inflammation, energy/nutrients metabolism, insulin resistance, and oxidative stress). A recent review also details how molecules synthesized by the microbiota could be considered as links between microbiota and regulation of whole-body metabolism.<sup>51</sup> We will focus on major microbiota-related regulatory mechanisms involved in muscle mass and functionality: insulin sensitivity and inflammation, both mechanisms being tightly connected with the presence of an oxidative stress and alterations of nutrients metabolism at the muscle level.

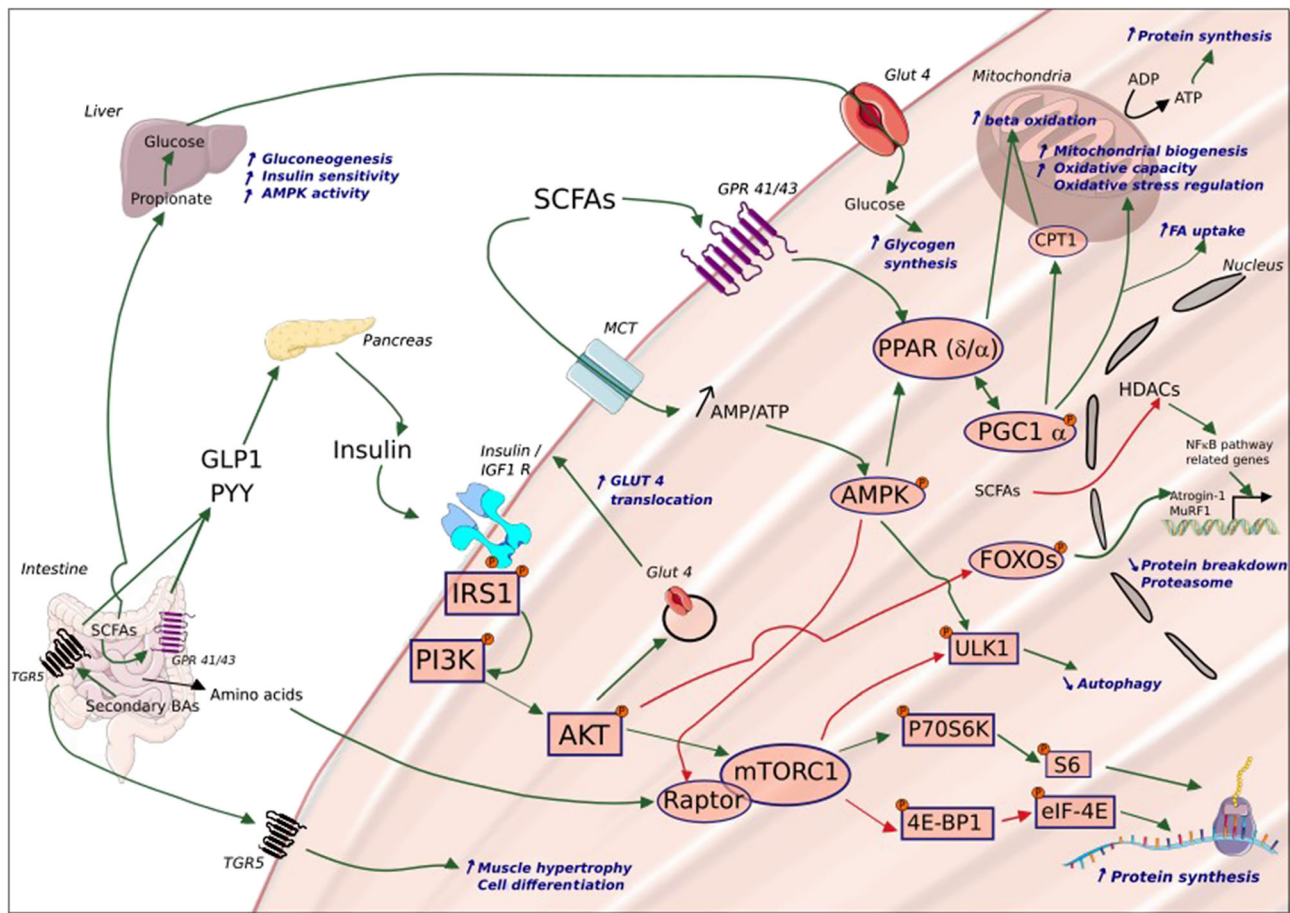
### *Insulin sensitivity—role of short-chain fatty acids*

Insulin is key in the regulation of skeletal muscle homeostasis as it stimulates the entry and use of glucose in muscle cells in the postprandial state and preserves muscle mass by inhibiting

protein breakdown.<sup>519</sup> It is known for decades that elderly people develop insulin resistance associated with a loss of muscle mass and strength.<sup>520</sup> The installation of a local/systemic inflammation and oxidative environment in a context of increased lipotoxicity are the most documented causes of decreased muscle insulin sensitivity in elderly or obese populations.<sup>519</sup> On the contrary, the practice of moderate physical activity improves insulin sensitivity and increases glucose uptake, glycogen synthesis, and protein anabolism in muscle.<sup>52</sup> Because of this, exercise training can be therefore considered to be a therapeutic strategy against insulin resistance and sarcopenia.<sup>521</sup> Many nutritional strategies have also been tested in that field such as micronutrients/anti-inflammatory/antioxidant substances (e.g. vitamins A and E, and polyphenols) and amino acid supplementation (leucine or leucine-rich proteins). A new paradigm arises from princeps studies from Bäckhed *et al.*<sup>522</sup> and Turnbaugh *et al.*,<sup>523</sup> in nutritionally induced insulin resistance rodent models that have shed light on the causal role of gut microbiota in tissue insulin sensitivity.<sup>53,54</sup> These data have been confirmed in humans with fecal microbial transplantation (FMT) from healthy patients to individuals with metabolic syndrome where peripheral insulin sensitivity was improved (using rate of glucose disappearance under hyperinsulinaemic–euglycaemic clamp).<sup>55</sup> However, the beneficial effect of FMT on insulin sensitivity parameters was not always observed.<sup>56</sup> The role of nutrition itself remains considered as the major driver of insulin sensitivity and entails the development of complementary studies on FMT implementation (donor effect).

Among the numerous metabolites produced by microbiota within the gut lumen and that could constitute links between microbiota, gut, and muscle insulin sensitivity, SCFAs have been extensively studied.<sup>57,524,525</sup> SCFA-producing bacteria have repeatedly been shown to be increased by exercise by contrast with individuals with sarcopenia and cachexia. Most of the SCFAs found in the gut lumen are terminal products of anaerobic fermentation of non-digestible dietary fibres by microbes and are mainly produced in the distal ileum and colon.<sup>524</sup> Molar ratios in the colon for acetate, propionate, and butyrate are approximately 3:1:1, and they account for  $\geq 95\%$  of the total SCFAs.<sup>524</sup> Then, SCFAs are absorbed by intestinal cells, and butyrate enters into the TCA cycle as acetyl-CoA to provide 60–70% of the colonocyte energy needs.<sup>57</sup> The remaining SCFAs are then found in the portal vein and reach the liver (~80% of propionates are taken up by the liver and ~40% for acetate), propionate being used as a substrate in gluconeogenesis pathways.<sup>57,58,524</sup> Ultimately, a small proportion of SCFAs (mainly acetate) reach skeletal muscles<sup>524</sup> (Figure 2).

Short-chain fatty acids are involved in glucose/lipid homeostasis, in the regulation of inflammation, and in the connection of gut with other distance tissues.<sup>57,59,524,525</sup> SCFA supplementation restored/improved muscle mass and/or strength, previously decreased in germ-free and



**Figure 2** How probiotic can be involved in maintaining skeletal muscle health: regulatory signals and metabolites. Probiotics can promote the production of metabolites such as short-chain fatty acids (SCFAs), secondary bile acids (BAs), and some amino acids that can ultimately modulate muscle function. SCFAs, via their interaction with G protein-coupled receptor (GPR) 41/13 receptors in the ileum and colon, promote the secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY) by intestinal L cells, which in turn stimulate insulin secretion by the pancreas and improve insulin sensitivity in peripheral organs. At the muscle level, acetate uptake and oxidation as well as its interaction with GPR receptors leads to phosphorylation of AMPK as well as activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  and  $\alpha$ . In parallel, insulin, IGF-1, and amino acids stimulate the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mTOR pathway, which increases glucose uptake [via glucose transporter type 4 (GLUT4)], promotes protein synthesis (via activation of S6K), and reduces muscle proteolysis via inhibition of forkhead box O (FOXO) and Unc-51 like autophagy activating kinase (ULK1) factors. SCFAs can also inhibit HDACs that participated in regulation of expression of various genes in the nucleus, including the expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway-related genes. Secondary BAs also promote GLP-1 secretion via activation of G protein-coupled bile acid receptor, Gprbar1 (TGR5), and play a role in muscle trophicity by mechanisms that still require to be further investigated. 4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; CPT1, carnitine palmitoyltransferase I; eIF-4E, eukaryotic translation initiation factor 4E; IGF1-R, insulin-like growth factor receptor; IRS1, insulin receptor substrate 1; MCT, monocarboxylate transporter; mTORC1, mechanistic target of rapamycin complex 1; P70S6K, p70S6 kinase; PGC-1 $\alpha$ , Pparg coactivator 1 alpha; PPAR $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ ; Raptor, regulatory-associated protein of mTOR. Green arrow: activation; red arrow: inhibition.

antibiotic-treated rodents.<sup>17–19,60</sup> Supplementation with acetate (in the diet or subcutaneous injection) promotes glucose uptake and glycogen content in skeletal muscles of rats and shown to decrease lipid intramuscular accumulation through increased fatty acid uptake and oxidation in rabbits.<sup>61</sup> Similarly, oral butyrate supplementation in mice prevents oxidative stress and muscle mass loss by increasing mitochondrial function and biogenesis as well as the number of type I (oxidative) fibres in skeletal muscles.<sup>60,62</sup> These metabolic effects

of SCFAs could be direct on skeletal muscles, for acetate as it is present in peripheral blood, but probably not for butyrate and propionate as they only marginally reach the peripheral blood stream. However, these effects could be also indirect via a stimulation of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) secretion, a gut hormone that is responsible for a stimulation of insulin secretion, glucose storage in the liver, and glucose uptake in skeletal muscles.<sup>63</sup> Other indirect effects of SCFAs on muscle include increased blood flow and anti-inflammatory

properties via epigenetic mechanisms.<sup>64</sup> Succinate is like propionate, a substrate for gluconeogenesis, and De Vadder *et al.* suggested that glucose produced from succinate by intestinal cells, when detected in the portal vein (portal signal), may increase satiety, energy expenditure, glucose tolerance, and insulin sensitivity.<sup>65,66</sup>

## Inflammation

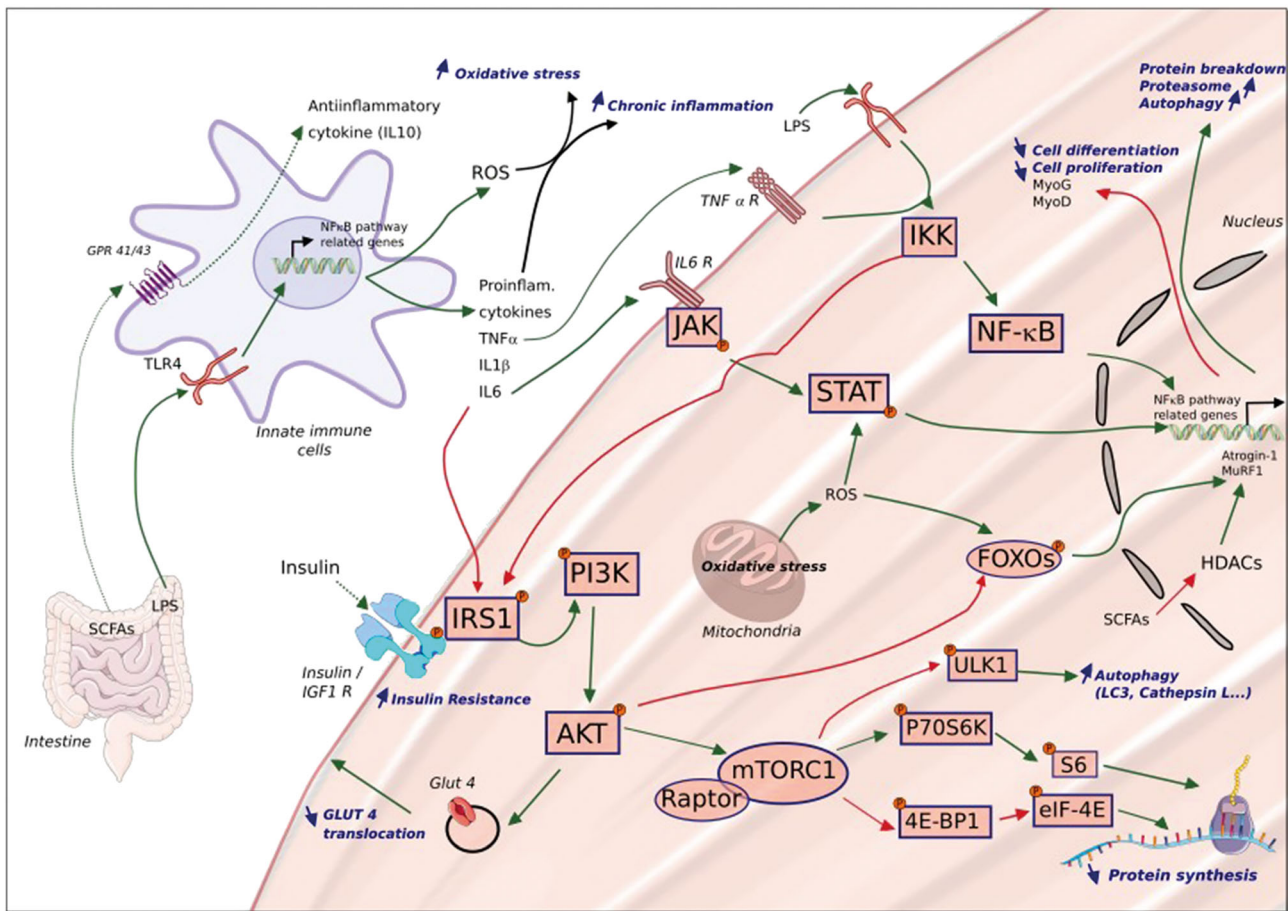
It has been postulated that an altered microbial ecosystem composition could be associated with an imbalance between intestinal anti-inflammatory and pro-inflammatory responses leading to a chronic systemic low-grade inflammation, also named 'inflammageing' in the elderly population.<sup>67</sup> One possible cause of inflammageing is the age-related deregulation of the immune system (immunosenescence) leading to a decrease in the ability to counteract intestinal colonization by pathogenic bacteria as well as by 'gut leaking', which generates a systemic inflammation<sup>68</sup> by enhancing circulating endotoxin levels (e.g. LPS). LPS is transported in the blood by the LPS binding protein and then recognized by the 'pattern recognition receptors' [including toll-like receptor 4 (TLR4)] localized on innate immune cells. The binding of LPS on TLR4 results in the recruitment of various intracellular moieties (e.g. MAPK) triggering cellular signalling cascades like the pro-inflammatory pathway NF- $\kappa$ B.<sup>69</sup> Of note, NF- $\kappa$ B pathway can be also activated by pro-inflammatory cytokines and ROS, molecules whose production is increased in cachexia, intense exercise training, or even sarcopenia. NF- $\kappa$ B has been shown to be involved in muscle atrophy by participating in muscle protein degradation (ubiquitin–proteasome pathway), inducing inflammation, and blocking muscle fibre regeneration<sup>70</sup> (Figure 3).

Ageing is associated with a progressive increase in inflammation markers including tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), CRP, and interleukin 6 (IL-6).<sup>528</sup> Plasma levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 are also elevated in rodent models of cancer cachexia<sup>71</sup> or cancer cachectic patients.<sup>72</sup> The elevation of these cytokines is known to be involved in weight and muscle loss and poorer outcomes in patients with cancer.<sup>71</sup> Likewise, obesity and diabetes induced by high-fat diet are associated with increased inflammatory markers levels, leading to deleterious impact on skeletal muscles anabolism.<sup>53,529</sup> By contrast, exercise can have either a positive or negative impact on the inflammatory status and points out that the balance between the different inflammatory markers has also to be taken into account.<sup>73</sup> Nevertheless, increased evidence suggests that regular physical exercise has an overall anti-inflammatory impact on sedentary and obese people.<sup>74</sup> However, when exercise is more intense, as for athletes, this could lead to an acute inflammatory response in skeletal muscle with release of pro-inflammatory cytokines.<sup>73</sup>

High circulating LPS is known to induce increased expression and production of pro-inflammatory cytokines by the immune cells and lead to muscle atrophy by regulating several metabolic pathways including protein homeostasis and mitochondrial function.<sup>530</sup> In animal models of acute inflammation, a stimulation of muscle proteolysis (ubiquitin–proteasome pathway), a decreased protein synthesis (via mTOR-regulated initiation of translation), but also induction of cell apoptosis and, or inhibition the differentiation of satellite stem cells are observed.<sup>75,531</sup> Such similar mechanisms may also occur even in a situation of low-grade inflammation as we have shown in rats presenting modest increased alpha-2 macroglobulin plasma levels (marker of systemic inflammation in rats) without any diagnosed or induced intestinal inflammation, an inhibition of muscle postprandial protein synthesis, whereas it is normally stimulated in adult or not inflamed old animals.<sup>76</sup> Interestingly, ibuprofen treatment of the same rats restored the blunted protein synthesis, suggesting that inflammatory status was the cause of the lack of response of protein synthesis to dietary anabolic stimuli.<sup>76</sup> Accordingly, in humans, IL-6 is also correlated to muscle atrophy when it is related to low-grade chronic inflammation as observed in elderly or certain cancerous patients with a down-regulation of protein synthesis.<sup>4,77</sup> Gut leaking and associated circulating LPS can also, during prolonged practice of intense exercise, promote an important ROS production responsible for oxidative stress that can generate insulin resistance within skeletal muscles with mitochondrial dysfunction, apoptosis, or autophagy.<sup>53,532</sup> In this sense, it is extremely complex to separate inflammation from oxidative stress and consequences on muscle insulin sensitivity. For instance, IL-6 effect can impact on insulin signalling pathways in muscle that is associated with an increased risk of T2D in humans.<sup>69</sup> However, the role of IL-6 is paradoxical and depends on the dose and the manner of administration in rodents and the presence of other cytokines.<sup>77</sup> IL-6 could have an anti-inflammatory effect and play a key role in muscle growth (effect on satellite cells) as a myokine when it is secreted by the muscle itself during physical exercise.

## How probiotics can modulate muscle mass and function in catabolic and anabolic states?

As we have developed earlier that microbiota activity and diversity could be a determinant in muscle mass and function in various physiological/pathological situations, strategies capable to target gut microbiota can then be considered as a lever of action to fight against muscle mass loss and function (sarcopenia and cachexia) or optimize muscle performance (athletes, sarcopenia, and recovery after a pathology). In such, probiotics could complement already existing strategies, and



**Figure 3** Interaction between microbiota and skeletal muscle in a context of increased inflammation. An altered composition of the gut microbiota ecosystem can lead to gut leaking and entry of bacterial endotoxins such as lipopolysaccharide (LPS) in peripheral blood. This is also associated with a decreased production of beneficial metabolites [e.g. short-chain fatty acids (SCFAs)] in the gut lumen. LPS can trigger the production of inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS) by macrophages via toll-like receptor 4 (TLR4) receptors. In skeletal muscle, tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) activates the expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway-related genes that decrease cell differentiation and proliferation (via inhibition of myogenin and myoD). Interleukin (IL)-6 and I $\kappa$ B kinase (IKK) can inhibit insulin receptor substrate 1 (IRS1), which, associated with an induction of insulin resistance, limits the activation of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and thus protein synthesis. In addition, because protein kinase B (AKT) is no longer activated, it can no longer exert its inhibitory role on forkhead box O (FOXO), which leads to an increased expression of the ubiquitin E3 ligases Atrogin-1 and MuRF1 and promotes muscle proteolysis. Similarly, Unc-51 like autophagy activating kinase (ULK1) that is not inhibited by mTORC1 cannot inhibit autophagy. When these regulatory mechanisms become chronic, an imbalance between protein breakdown/synthesis occurs and causes muscle atrophy. 4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1; eIF-4E, eukaryotic translation initiation factor 4E; GLUT4, glucose transporter type 4; GPR, G protein-coupled receptor; IGF1-R, insulin-like growth factor receptor; IL-6 R, interleukin-6 receptor; JAK, Janus kinase; P70S6K, p70S6 kinase; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; Raptor, regulatory-associated protein of mTOR; STAT, signal transducer and activator of transcription; TNF- $\alpha$  R, tumour necrosis factor- $\alpha$  receptor. Green arrow: activation; red arrow: inhibition.

they have been repeatedly demonstrating capability to limit the occurrence of insulin resistance, modulate metabolic pathways in various tissues, or limit inflammation and oxidative stress.<sup>78,533</sup> Additionally, some probiotics seem to be capable to target specifically some of these metabolic functions or regulatory mechanisms even in non-catabolic or anabolic situations. As an example, two different types of probiotics (*Lactobacillus casei* LC122 or *Bifidobacterium longum* BL986) have been tested in 10-month-old (i.e. adult, not old) mice for a 12 week period.<sup>79</sup> The two probiotic strains increased skeletal muscle mass and grip strength in these rats

compared with age-matched controls.<sup>79</sup> Interestingly, the two bacterial species seemed to act on different cellular pathways because *Lactobacillus casei* showed an antioxidant potential (increased SOD and GPx activities in muscle and intestines) while *B. longum* presented anti-inflammatory properties (decreased TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  levels in the muscle and colon).<sup>79</sup> The remaining question is to highlight whether or not these probiotics are capable to be also efficient on muscle when challenged, that is, in situations of muscle loss (sarcopenia and cachexia) or gain (following exercise) in animal models and humans.

## Probiotics in catabolic states

### Muscle catabolic conditions in rodents

**Cancer** Lactic acid bacteria have been tested in two experiments using rodents subjected to cancer-induced cachexia<sup>80,81</sup> (Table 1). A first experiment used leukaemic mice supplemented with *Limosilactobacillus reuteri* 100-23 and *Lactobacillus gasserii* 311476 for 2 weeks (in drinking water, 10<sup>8</sup> CFU/day).<sup>80</sup> The second experiment, in mice presenting intestinal polyposis, consisted in a daily supplementation in *L. reuteri* ATCC-PTA-6475 for 3 months at a lower dose (10<sup>5</sup> CFU) than the previous study. Both experiments showed that probiotics limited skeletal muscle mass loss,<sup>80,81</sup> which could be associated with an increased fibre size.<sup>81</sup> Here, an inhibition of proteolysis was observed (the ubiquitin–proteasome pathway with MuRF1 and Atrogin-1 decreased gene expression<sup>80</sup>). MuRF1 and Atrogin-1 were also down-regulated in muscle from mice presenting adenocarcinoma and supplemented with lyophilized kimchi containing *Leuconostoc mesenteroides* CJ LM119 and *Lactiplantibacillus plantarum* subsp. *plantarum* CJ LP133 vs. cancerous non-supplemented animals.<sup>82</sup> In all these experiments, inflammation associated with cancer implantation was down-regulated by probiotic supplementation.

Probiotics can also stimulate anabolism (protein synthesis) in mice with colon carcinoma as in An *et al.* (2019), where a positive impact on AKT and mTOR phosphorylation and a decreased AMPK phosphorylation were also observed. Lastly, Bindels *et al.* have also tested the effect of a symbiotic (*L. reuteri* 100-23 in association with oligofructose) for 2 weeks in leukaemic mice.<sup>83</sup> This led to a restoration of *Lactobacillus* population in the gut, maintenance of muscle mass, and expression of genes involved in permeability and immunity in the gut to the level of control animals. All these data confirm that some bacteria (mainly LAB)—associated or not with probiotics—could preserve anabolism in skeletal muscle via both an inhibition cancer-induced inflammation leading to decreased proteolysis and a potential stimulation of protein synthesis.

**Ageing** In the field of sarcopenia (Table 1), attention should be given to the age of rodents. Indeed, in rats, for instance, ageing-related muscle loss generally occurs significantly from 18 months of age onwards.<sup>84</sup> Any adult rat that is non-growing in terms of fat free mass (i.e. 12 months) cannot be considered as the equivalent of an elderly human individual but as a middle-aged adult. With these considerations

**Table 1** Studies assessing the effect of probiotics in cachectic and old rodent models

Reference	Model	Probiotic	Dosage	Results
(Bindels <i>et al.</i> , 2012)	BALB/c BaF3 leukaemic and cachectic mice (6 weeks)	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> 100-23 and <i>Lactobacillus gasserii</i> 311476	2 weeks (10 <sup>8</sup> CFU/day for each strain)	↑ tibialis mass ↓ systemic inflammation (IL-6) ↓ MuRF-1 and Atrogin-1
(Varian <i>et al.</i> , 2016)	C57BL/6 ApcMIN leukaemic and cachectic mice (8 weeks)	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC-PTA-6475	3 months (10 <sup>5</sup> CFU/day)	↑ muscle mass and fibre size
(Varian <i>et al.</i> , 2016)	CD-1 mice (8 weeks to 10 months)	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> ATCC-PTA-6475	10 months (10 <sup>5</sup> CFU/day)	↑ muscle mass and fibre size ↑ growth hormone ↑ survival rate
(An <i>et al.</i> , 2019)	Cachectic adenocarcinoma Balb/c mice (6 weeks)	Freeze-dried kimchi + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CJ LM119 and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CJ LP133	3 weeks	↑ leg muscle mass ↓ Atrogin-1 and MuRF-1 ↓ ubiquitin–proteasome ligase ↓ p-AMPK and ↑ pAKT and p-mTOR ↑ PGC-1 $\alpha$ ↓ NF- $\kappa$ B
(Chen <i>et al.</i> , 2019)	SAMP8 mice (7 months)	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i> PS23	12 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	↑ lean mass ↑ grip strength ↑ protein digestibility ↓ oxidative stress (protein carbonyl) ↑ SOD and GPx (muscles)
(Hor <i>et al.</i> , 2019)	Sprague–Dawley rats + D-galactose	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> DR9 or <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> OFS 0291	12 weeks (10 <sup>10</sup> CFU/day)	↑ running time, speed, work, and power (treadmill exhaustion test) ↑ p53 expression in gastrocnemius muscle
(Ni <i>et al.</i> , 2019)	C57BL/6 mice (10 months)	<i>Lactocaseibacillus casei</i> LC122 or <i>Bifidobacterium longum</i> BL986	12 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	↑ quadriceps and gastrocnemius mass ↑ grip strength ↑ intestinal barrier (mucus production, claudin-1, and ZO-1) ↓ muscle inflammation (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ) ↑ muscle antioxidant capacities (SOD and GPx) <i>Lactobacillus</i>



kept in mind, several studies have investigated the impact of probiotic supplementation of variable duration (from several weeks to entire life) in rodents. Varian *et al.* have tested the effect of a supplementation of the strain *L. reuteri* ATCC-PTA-6475 on the muscle characteristics and life expectancy in normal mice. Muscle weight, fibre size, and animals' survival were increased following probiotic treatment when it was ingested on a long time basis.<sup>81</sup> Of note, mice strain used in this study was CD1 that is characterized by a low life expectancy or an accelerated ageing process compared with other strains. Indeed, all CD1 animals were dead between 500 and 600 days of life. However, this effect has been found in other less specific strains (C57/BL6 mice) with even shorter duration of probiotic supplementation.

Models of accelerated ageing have also been used to demonstrate the impact of probiotic supplementations. This is the case for senescence-accelerated mouse prone-8 (SAMP8) and D-galactose-induced ageing rodents. A 12 week supplementation of *Lactobacillus paracasei* PS23 was performed in 26-week-old SAMP8 mice<sup>85</sup> and led to an increased lean mass and restored muscle strength (grip force) to the same level as 16 week SAMP8 mice. This was associated with an improved oxygen consumption rate in the muscle and mitochondrial biogenesis. In parallel, muscle protein carbonyl content, a marker of oxidative stress, was lower, and the expression of the antioxidant enzymes SOD and GPx in muscles increased in SAMP8 animals vs. controls. Inflammation state was also improved via a decreased pro-inflammatory/anti-inflammatory balance in both plasma and muscle (increased IL-10 levels and expression and decreased pro-inflammatory cytokines). In a model of D-galactose-induced premature ageing Sprague–Dawley rats, Hor *et al.* have shown that treatment with different LAB strains (*Limosilactobacillus fermentum* DR9, *L. paracasei* OFS 0291, or *Lactobacillus helveticus* OFS 1515) for 12 weeks led to an increased exercise performance following a treadmill exhaustion test compared with untreated rats.<sup>86</sup> Strength and physical endurance of the older rodents supplemented with each probiotic was increased at a level relatively similar to that of young rats without D-galactose treatment. This was explained by a decrease in senescence markers (p53 involved in apoptosis induction), increase of anabolic factors (IGF-1 mRNA) in muscle and bone,<sup>86</sup> and improved inflammatory status. Interestingly, all strains tested did not target the same muscle pathways: oxidation status, AMPKa2, and myogenic factors (e.g. Myf5/MyoD), suggesting that in anabolic situations, probiotic strains effects could target different signalling or metabolic pathways and tissues.

Taken together, data obtained after supplementation of probiotics in animal models subjected to catabolic states show that the effect is null or anabolic on muscle mass and function. An anti-inflammatory effect is generally observed, probably due to gut leaking, increased inflammation, and up-regulation of the NF- $\kappa$ B pathway at the gut then whole-body and muscle levels.<sup>87</sup> The muscle targets are nu-

merous and could differ between strains: stimulation of anabolic factors such as IGF-1, stimulation of myogenic factors or mTOR pathway, regulation of energy status in the muscle (via AMPK), and inhibition of proteolysis and oxidative status.

#### Muscle catabolic conditions in humans

As a prelude to this part, it should be said that studies investigating the impact of probiotics on muscle mass and function in cancer patients or the elderly are scarce if non-existent. Yet probiotics are beginning to be considered (alone or in association with other strategies) as very promising new tools to maintain muscle mass and function in both the elderly population<sup>88</sup> and cancer patients.<sup>89</sup>

**Cancer** In cancer patients, probiotic strategies most used are lactobacilli genera and more specifically *Lactobacillus rhamnosus* CG. Even if a majority of studies are related to colorectal cancer, the supplementation in probiotics was also studied in many varieties of cancers.<sup>89</sup> The most documented impact of probiotics on gut health is the limitation of occurrence of diarrhoea and improved global gut health and microbial composition that is compromised either by anticancer treatment or by the cancer itself (for colorectal for instance).<sup>90</sup> In colorectal cancer, probiotics have been shown to limit colonization of pathogenic bacteria, improve gut barrier function, and reduce inflammation and oxidative stress in humans.<sup>91,534</sup> A positive effect on muscle mass and function has only been hypothesized but not effectively measured.

A protocol using probiotic supplementation (*L. plantarum* 299v) in cancer patients receiving enteral nutrition has recently been published, but results are not yet available.<sup>92</sup> Such protocols may add some valuable information on nutritional status and life quality, indexes that can be linked to muscle health status. Still, it should be kept in mind that in cancer and immunosuppressed patients, care has to be taken on the risk/benefit ratio you can expect from a supplementation of bacteria in these patients, even if probiotics.

**Ageing** The vast majority of studies using probiotic supplementations in the elderly have targeted digestive health and immunomodulation and concerned mainly bifidobacteria and lactobacilli genera or a mix of different strains (VSL#3 mix).<sup>93</sup> Overall, the probiotic supplementation in the elderly population led, in some cases, to beneficial modifications of gut microbiota with a decrease in pathogens but with relatively minor effects on health status of the host.<sup>94,535</sup> The main effects were a slight increase in gut comfort and reduction in constipation,<sup>95</sup> but not always.<sup>536</sup> A few studies reported slight positive effects on increased innate immunity (increased cytotoxicity of NK cells<sup>96</sup> and improvement cytokine profile<sup>97</sup>). Taken together, the overall small effects observed or the inconsistency of the results observed in health parameters measured in the elderly population can lie on the large heterogeneity of this population in terms of health status, dependency (frail concept<sup>9</sup>), and life habits (community

dwellers vs. residential care), all these 'basal' parameters affecting the response of the host to the probiotic supplementation and finally the validity of parameters used to evaluate immune or health state. To our knowledge, as for cancer patients, no study has directly measured muscle mass and function in the elderly population supplemented with probiotics. Still, the observed slight improvement of immune status and microbiota composition are in line with a potential beneficial effect on muscle via a reduction of inflammation. Additionally, probiotic (fructooligosaccharides and inulin) supplementation (that also targets gut microbiota) in frail old adults resulted in a significant improvement in their state of exhaustion and grip strength as well as a significant reduction in frailty index after 13 weeks of daily supplementation.<sup>98,537</sup> These data suggest that a better assessment of the real impact of probiotics on muscle functionality in the old population is required.

### Probiotics during exercise or in athletes

#### Rodent models

The supplementation in probiotics has been tested in healthy animals (in interaction or not with exercise) (Table 2). The aim of these studies was to determine if probiotics were capable to optimize muscle function and physical performance in

models that could mimic metabolic/physiological responses of young athletes.

The probiotics used were generally, again, lactobacilli and bifidobacteria.<sup>99–102</sup> In all studies, muscle function and/or physical performances were improved. *L. plantarum* TWK10 supplementation for 6 weeks increased muscle mass (gastrocnemius muscle) and improved forelimb grip strength and swimming endurance vs. control mice. *Ligilactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* SA-03 and *Bifidobacterium* strain (*B. longum* OLP-01) treatment for 3–4 weeks also improved muscle mass and swimming endurance in young mice without any training intervention.<sup>100,102</sup> Lastly, heat-killed *Bifidobacterium breve* B-3 supplemented for 4 weeks improved muscle mass and grip strength in mice, the latter effect being already present after 2 weeks of treatment.<sup>101</sup> Two other probiotics: *Saccharomyces boulardii*<sup>103</sup> and *Veillonella atypica*,<sup>104</sup> have also been tested in rodents and improved VO<sub>2</sub>max/aerobic performance and exhaustive treadmill running time, respectively.

Metabolically, at the muscle level, the increased performance can be explained by an increased number of oxidative type I fibres,<sup>99</sup> increased glycogen content,<sup>100,102</sup> and decreased fatigue-associated variables (plasma lactate, ammonia, creatine kinase, and blood urea).<sup>99,100,102</sup> The observed decreased plasma lactate levels and increased blood glucose after exercise<sup>100,102</sup> may be explained by an improved hepatic

**Table 2** Studies investigating the effects of probiotics on muscle mass and function in young and healthy rodent models

Reference	Model	Probiotic	Dosage	Results
(Chen <i>et al.</i> , 2016)	ICR mice (6 weeks)	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> TWK10	6 weeks (10 <sup>8</sup> or 10 <sup>9</sup> CFU/day)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ gastrocnemius mass</li> <li>↑ type I fibres (gastrocnemius)</li> <li>↑ grip strength</li> <li>↑ swimming endurance</li> <li>↓ markers of fatigue (plasmatic lactate, ammonia, and creatine kinase after exercise)</li> </ul>
(Lee <i>et al.</i> , 2019)	ICR mice (8 weeks)	<i>Bifidobacterium longum</i> OLP-01	3 weeks (10 <sup>8</sup> or 10 <sup>9</sup> CFU/day)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ grip strength</li> <li>↑ swimming endurance</li> <li>↑ glycogen in muscle</li> <li>↓ markers of fatigue (plasmatic NH<sub>3</sub>, creatine kinase, and blood urea nitrogen after exercise)</li> </ul>
(Lee <i>et al.</i> , 2020)	ICR mice (6 weeks)	<i>Ligilactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> SA-03	4 weeks (10 <sup>9</sup> or 10 <sup>10</sup> CFU/day) of gavage	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ grip strength</li> <li>↑ swimming endurance</li> <li>↑ glycogen in muscle</li> <li>↓ markers of fatigue (plasmatic lactate, ammonia, creatine kinase, and blood urea nitrogen after exercise)</li> </ul>
(Toda <i>et al.</i> , 2020)	Sprague–Dawley rats and C57BL/6J mice (8 weeks)	Heat-killed <i>Bifidobacterium breve</i> B-3	4 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ soleus mass</li> <li>↑ grip strength (mice)</li> <li>↑ mTOR pathway (pAKT and pS6K)</li> <li>↑ p-AMPK and PGC-1α (rats)</li> </ul>
(Soares <i>et al.</i> , 2019)	Wistar rats (11 weeks)	<i>Saccharomyces boulardii</i>	10 days (10 <sup>8</sup> CFU/day)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ aerobic performance,</li> <li>↑ time to fatigue,</li> <li>↑ maximum speed attained, and</li> <li>↑ external work</li> </ul>
(Scheiman <i>et al.</i> , 2019)	C57BL/6 mice (12 weeks)	<i>Veillonella atypica</i>	2 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ exhaustive treadmill runtime</li> <li>↑ lactate utilization and Cori cycle efficiency</li> <li>↑ circulating SCFAs</li> </ul>

**Table 3** Studies investigating the effects of probiotics on physical performance and muscle recovery after training in humans

(A) Physical performance				
Reference	Model	Probiotic	Dosage	Results
(Shing et al., 2014)	Trained male runners (27 ± 2 years) N = 10	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> , <i>Limosilactobacillus fermentum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. bifidum</i> , and <i>Streptococcus thermophilus</i>	4 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	↑ runtime to fatigue in the heat
(Marshall et al., 2017)	Male and female endurance runners (23–53 years) N = 32	<i>L. acidophilus</i> CUL-60, <i>L. acidophilus</i> CUL-21, <i>B. bifidum</i> CUL-20, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CUL-34, and fructooligosaccharides + glutamine	12 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day for each strain)	No increase of exercise performance during an extreme marathon in the heat
(Huang et al., 2019a)	Amateur runners N = 16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> TWK10	6 weeks (10 <sup>10</sup> CFU/day)	↑ muscle mass ↑ endurance performance
(Toohey et al., 2020)	Collegiate female athletes (20 ± 1 years) N = 23	<i>Bacillus subtilis</i> DE111	10 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	No increase of exercise performance (muscle strength and power, and agility) ↓ body fat mass
(B) Muscle recovery				
Reference	Model	Probiotic	Dosage	Results
(Gepner et al., 2017)	Elite male soldiers (20 ± 0.7 years) N = 17	<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6,086 + hydroxymethylbutyrate calcium (CaHMB) 3 mg/day	40 days (10 <sup>9</sup> CFU/day)	↑ muscle integrity [↓ apparent diffusion coefficient (ADC) for the rectus femoris (RF)] with the combination of probiotic and CaHMB compared with CaHMB alone
(Komano et al., 2018)	Male athletes (19–21 years) N = 51	Heat-killed <i>Lactococcus lactis</i> JCM 5805	13 days (10 <sup>11</sup> CFU/day)	↑ physical condition ↓ cumulative days of fatigue ↓ cumulative illness days (common upper respiratory tract infection) ↓ articular pain No decrease of markers of muscle damage
(C) Muscle recovery + physical performance				
Reference	Model	Probiotic	Dosage	Results
(Lu et al., 2006)	Untrained male and female students (19–23 years) N = 16	<i>Spirulina platensis</i>	3 weeks— 15 g soy or spirulina/day	↑ time to exhaustion ↑ antioxidant capacities (blood glutathione peroxidase, SOD, and malondialdehyde lactate dehydrogenase) ↓ fatigue markers (serum lactic acid)
(Cox et al., 2010)	Elite male distance runners (27 ± 6 years) N = 20	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> VRI-033 (PCC)	4 months (10 <sup>10</sup> CFU/day)	No increase of exercise performance (VO <sub>2</sub> max and running time) Tendency to ↓ systemic inflammation (↓ IFN-γ) ↓ number of total illness days (common upper respiratory tract infection)
(West et al., 2011)	Competitive male and female cyclists (35 ± 9 years) N = 99	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> VRI-033 (PCC)	11 weeks (10 <sup>10</sup> CFU/day)	No increase of exercise performance (VO <sub>2</sub> max and training performance) ↓ systemic inflammation (↓ IFN-γ, TNF-α, IL-6, GM-CSF, and IL-1ra)
(Jäger et al., 2016)	Recreationally trained men (21 ± 3 years) N = 29	<i>Bacillus coagulans</i> GBI-30, 6086 + casein	2 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	Tendency to ↑ anaerobic power (vintage peak power) Tendency to ↓ muscle soreness (72 h post-exercise) ↑ perceived recovery (24 h post-exercise) Tendency to ↓ muscle damage markers (creatinase) With the combination of probiotic and casein compared with casein alone
(Carbuhn et al., 2018)	Collegiate female swimmers (age?) N = 16	<i>Bifidobacterium longum</i> 35624	6 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	No increase of exercise performance (swim time, force, and aerobic and anaerobic performances)

(Continues)

Table 3 (continued)

(C) Muscle recovery + physical performance				
Reference	Model	Probiotic	Dosage	Results
(Ibrahim <i>et al.</i> , 2018)	Healthy young men with a sedentary lifestyle (19–26 years) N = 21	<i>Lactobacillus acidophilus</i> BCMC 12130, <i>Lacticaseibacillus casei</i> BCMC 12313, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> BCMC 12451, <i>Bifidobacterium bifidum</i> BCMC 02290, <i>B. infantis</i> BCMC 02129, and <i>B. longum</i> BCMC 02120	12 weeks (10 <sup>10</sup> CFU/day)	No modulation of inflammation and immunity No increase of muscle performance (strength and power) Tendency to ↓ systemic inflammation (↑ IL-10)
(Townsend <i>et al.</i> , 2018)	Male baseball athletes (20 ± 1 years) N = 25	<i>Bacillus subtilis</i> DE111	12 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	No increase of exercise performance (muscle strength and power, agility, and anaerobic fitness) and body composition ↓ systemic inflammation (↓ TNF-α) ↑ mean jump power ↑ simulated casualty drag ↓ systemic inflammation (↓ TNF-α and IFN-γ and ↑ IL-10)
(Hoffman <i>et al.</i> , 2019)	Elite male soldiers (19–21 years) N = 16	<i>Bacillus coagulans</i>	2 weeks (10 <sup>9</sup> CFU/day)	↑ peak anaerobic power and mean power ↑ VO <sub>2</sub> max endurance ↓ systemic inflammation (↓ TNF-α and IL-6 and ↑ IL-10) ↓ fatigue index (bike) ↓ fatigue markers (creatine kinase index and kidney injury after exercise)
(Huang <i>et al.</i> , 2019b)	Triathletes N = 16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> PS128	3–4 weeks (10 <sup>10</sup> CFU/day)	

gluconeogenesis from lactate (Cori cycle) as well as an increased lactate catabolism in oxidative muscle fibres (larger number of type I fibres). In addition, Lee *et al.* showed that animals' physical performances and metabolic parameters responded to the probiotic supplementation in a dose-dependent manner and such a concept should require further investigation.<sup>100,102</sup>

These metabolic adaptations are explained by a stimulation of the AKT and AMPK phosphorylation and increased expression of PGC-1α, as shown following 4 weeks of supplementation with heat-killed *B. breve*.<sup>101</sup> As an increased VO<sub>2</sub>max as well as muscle oxidative capacity and glycogen content following exercise<sup>99,100,102,103</sup> are observed, an increased insulin sensitivity can be hypothesized in the probiotic-supplemented animals that explain improved performances.<sup>105</sup> Other mechanisms of action of probiotics are their anti-inflammatory role.<sup>99,103</sup> However, such mechanisms of action remain to be demonstrated in normal or exercised animals. Indeed, in the field of muscle performance, if studies exist on the impact of probiotics on muscle mass and function/performance (i.e. the primary goal), the mechanisms of action are less investigated.

### Humans

The improvement of muscle mass and function in athletes or soldiers via probiotic supplementation, in addition/combination to already existing strategies, is more documented (Table 3). Initially, the studies were mainly focused on the immunomodulatory and anti-inflammatory properties

of the probiotics to manage or prevent infections and digestive discomfort in athlete populations.<sup>106</sup> Recently, the purposes of probiotic supplementations have drifted on improvement of physical performance.<sup>107</sup>

Probiotic supplementation in athletes or soldiers was studied to address two distinct issues: (i) improvement of muscle performance (run speed and time to exhaustion, and muscle strength and power) and/or (ii) limitation of exercise-induced muscle damage after the practice of intense training. Supplementation of several probiotic strains (*Spirulina platensis* or *L. plantarum* or *Bacillus coagulans* or a multi-strain probiotic) a couple of weeks improved exhaustive endurance compared with placebo group.<sup>108–111,538</sup> In parallel, physical performance of elite soldiers determined by several tests including the mean jump power (evaluation the strength and velocity of each jump) and the simulated casualty drag (consists of walking fast 50 m by dragging a bag of 48 kg) was improved with *B. coagulans* supplementation for 2 weeks.<sup>110</sup> However, the probiotic supplementation did not improve performance following the other proposed exercises (60 s pull-ups and 100 m shuttle run). Other authors investigated the effects of *L. fermentum*, *Bacillus subtilis*, and *B. longum* supplementations, but they did not mention any significant effects on physical performance.<sup>112–118</sup> This does not allow us to conclude on a clear beneficial effect of probiotic supplementations in human muscle performance. This apparent discrepancy in the results of the experiments can be explained by various reasons. It is clear that the studies vary greatly in terms of type of athletes (from amateur runners to

elite), gender, and sport practised (cycling, running, triathlon, and soldiers) and also the strain of probiotic used, duration of treatment (from 2 weeks to 4 months), and number of participants selected in the study.<sup>108,117</sup> Indeed, as said previously, the impact of exercise on microbiota could vary greatly depending on the intensity of exercise. Consequently, the beneficial effect of probiotics may also vary depending on the population targeted and the intensity of the exercise they practice.<sup>111,113,115–118</sup>

In the same studies discussed earlier, the report is clearer concerning the anti-inflammatory properties of probiotics.<sup>115,117</sup> Supplementation with *L. fermentum*, *L. plantarum*, *B. coagulans*, and *B. subtilis* reduces the production of circulating pro-inflammatory cytokines (e.g. TNF- $\alpha$ , IL-6, and IFN- $\gamma$ ) and/or increases the production of anti-inflammatory cytokines such as IL-10.<sup>109,110,112,113</sup> Finally, some probiotic strains (*Spirulina platensis*, *B. coagulans*, and *L. plantarum*) have been shown to decrease muscle fatigue markers (e.g. creatine kinase and serum acid lactic) and thus could promote muscle recovery after exercise.<sup>109,119,538</sup> Hence, a combination of targeted markers of muscle performance and fatigue with muscle performance tests should be systematically considered to better evaluate the potential beneficial impact of probiotics in these populations.

## Conclusions—perspectives

To date, probiotic strains (and mix of strains) have been proven efficient to improve muscle mass and function in rodents in both anabolic and catabolic situations. When translated to humans, the picture is less clear because of the scarcity of studies, high variability of targeted populations, and/or difficulties to measure accurately and repeatedly muscle mass and function. A decreased efficiency of response of humans to probiotics tested in animal models cannot be excluded. So far, many studies have used LAB and bifidobacteria, but currently, it is possible, through a reverse engineering approach, to isolate bacterial strains from a particular human microbiota (e.g. athletes) so that supplementation with these

probiotic strains reproduces some phenotypic characteristics of the donor. Similarly, the use of strict anaerobic bacteria such as *Faecalibacterium* or *Roseburia* strains, which are under-represented in catabolic situations, could represent an interesting alternative strategy in this context. A mixture of probiotics or even FMT (transfer of a ‘complete’ microbiota) should be also investigated in the near future as they could settle more efficiently and durably the host microbial ecosystem. Finally, to improve muscle and host microbiota functions, probiotic strains could be combined with other nutritional factors that target microbiota (e.g. prebiotics and polyphenols) and the muscle (e.g. proteins and energy) to optimize the effects. The gut microbiota–muscle axis thus offers a wide range of research opportunities.

## Acknowledgements

The authors certify that they comply with the ethical guidelines for authorship and publishing of the *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*.

## Conflict of interest

None declared.

## Funding

The work was financed by core funding from Institut national de recherche pour l’agriculture, l’alimentation et l’environnement - INRAE.

## Online supplementary material

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

## References

- Dardevet D, Mosoni L, Savary-Auzeloux I, Peyron M-A, Polakof S, Rémond D. Important determinants to take into account to optimize protein nutrition in the elderly: solutions to a complex equation. *Proc Nutr Soc* 2020;1–14.
- Strasser B, Wolters M, Weyh C, Krüger K, Ticinesi A. The effects of lifestyle and diet on gut microbiota composition, inflammation and muscle performance in our aging society. *Nutrients* 2021;13:2045.
- Walston JD. Sarcopenia in older adults. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:623–627.
- Grosicki GJ, Fielding RA, Lustgarten MS. Gut microbiota contribute to age-related changes in skeletal muscle size, composition, and function: biological basis for a gut-muscle axis. *Calcif Tissue Int* 2018;102:433–442.
- Ticinesi A, Lauretani F, Milani C, Nouvenne A, Tana C, Del Rio D, et al. Aging gut microbiota at the cross-road between nutrition, physical frailty, and sarcopenia: is there a gut-muscle axis? *Nutrients* 2017;9:1303.
- Lustgarten MS. The role of the gut microbiome on skeletal muscle mass and physical function: 2019 update. *Front Physiol* 2019;10:1435.
- Casati M, Ferri E, Azzolino D, Cesari M, Arosio B. Gut microbiota and physical frailty through the mediation of sarcopenia. *Exp Gerontol* 2019;124:110639.
- Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing* 2019;48:16–31.
- Fried LP, Tangen CM, Walston J, Newman AB, Hirsch C, Gottdiener J, et al. Frailty in older adults: evidence for a phenotype. *J*

- Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;**56**:M146–M157.
10. Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012;**488**:178–184.
  11. Bischoff SC. Microbiota and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016;**19**:26–30.
  12. Maffei VJ, Kim S, Blanchard E, Luo M, Jazwinski SM, Taylor CM, et al. Biological aging and the human gut microbiota. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2017;**72**:1474–1482.
  13. Kang L, Li P, Wang D, Wang T, Hao D, Qu X. Alterations in intestinal microbiota diversity, composition, and function in patients with sarcopenia. *Sci Rep* 2021;**11**:4628.
  14. Jackson MA, Jeffery IB, Beaumont M, Bell JT, Clark AG, Ley RE, et al. Signatures of early frailty in the gut microbiota. *Genome Med* 2016;**8**:8.
  15. Ticinesi A, Mancabelli L, Tagliaferri S, Nouvenne A, Milani C, Del Rio D, et al. The gut-muscle axis in older subjects with low muscle mass and performance: a proof of concept study exploring fecal microbiota composition and function with shotgun metagenomics sequencing. *Int J Mol Sci* 2020;**21**:E8946.
  16. Zhang L, Liao J, Chen Q, Chen M, Kuang Y, Chen L, et al. Characterization of the gut microbiota in frail elderly patients. *Aging Clin Exp Res* 2019;**32**:2001–2011.
  17. Lahiri S, Kim H, Garcia-Perez I, Reza MM, Martin KA, Kundu P, et al. The gut microbiota influences skeletal muscle mass and function in mice. *Sci Transl Med* 2019;**11**:eaan5662.
  18. Nay K, Jollet M, Goustard B, Baati N, Vernus B, Pontones M, et al. Gut bacteria are critical for optimal muscle function: a potential link with glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019;**317**:E158–E171.
  19. Okamoto T, Morino K, Ugi S, Nakagawa F, Lemecha M, Ida S, et al. Microbiome potentiates endurance exercise through intestinal acetate production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019;**316**:E956–E966.
  20. An R, Wilms E, Masclee AAM, Smidt H, Zoetendal EG, Jonkers D. Age-dependent changes in GI physiology and microbiota: time to reconsider? *Gut* 2018;**67**:2213–2222.
  21. Fielding RA, Reeves AR, Jasuja R, Liu C, Barrett BB, Lustgarten MS. Muscle strength is increased in mice that are colonized with microbiota from high-functioning older adults. *Exp Gerontol* 2019;**127**:110722.
  22. Kurkcu M, Meijer RI, Lonterman S, Muller M, de van der Schueren MAE. The association between nutritional status and frailty characteristics among geriatric outpatients. *Clin Nutr ESPEN* 2018;**23**:112–116.
  23. Haran JP, Bucci V, Dutta P, Ward D, McCormick B. The nursing home elder microbiome stability and associations with age, frailty, nutrition and physical location. *J Med Microbiol* 2018;**67**:40–51.
  24. Gupta S, Mohammed M, Ghosh T, Kanungo S, Nair G, Mande SS. Metagenome of the gut of a malnourished child. *Gut Pathog* 2011;**3**:7.
  25. Monira S, Nakamura S, Gotoh K, Izutsu K, Watanabe H, Alam NH, et al. Gut microbiota of healthy and malnourished children in Bangladesh. *Front Microbiol* 2011;**2**:228.
  26. Million M, Tidjani Alou M, Khelaifia S, Bachar D, Lagier J-C, Dione N, et al. Increased gut redox and depletion of anaerobic and methanogenic prokaryotes in severe acute malnutrition. *Sci Rep* 2016;**6**:26051.
  27. Smith MI, Yatsunenkov T, Manary MJ, Trehan I, Mkakosya R, Cheng J, et al. Gut microbiomes of Malawian twin pairs discordant for kwashiorkor. *Science* 2013;**339**:548–554.
  28. Blanton LV, Charbonneau MR, Salih T, Barratt MJ, Venkatesh S, Ilkaveya O, et al. Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children. *Science* 2016;**351**:aad3311.
  29. Genton L, Mareschal J, Charretier Y, Lazarevic V, Bindels LB, Schrenzel J. Targeting the gut microbiota to treat cachexia. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;**9**:305.
  30. Ni J, Zhang L. Cancer cachexia: definition, staging, and emerging treatments. *Cancer Manag Res* 2020;**12**:5597–5605.
  31. Goedert JJ, Jones G, Hua X, Xu X, Yu G, Flores R, et al. Investigation of the association between the fecal microbiota and breast cancer in postmenopausal women: a population-based case-control pilot study. *J Natl Cancer Inst* 2015;**107**:dju147.
  32. Zou S, Fang L, Lee M-H. Dysbiosis of gut microbiota in promoting the development of colorectal cancer. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 2018;**6**:1–12.
  33. Zhuang H, Cheng L, Wang Y, Zhang Y-K, Zhao M-F, Liang G-D, et al. Dysbiosis of the gut microbiome in lung cancer. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;**9**:112.
  34. Ahluwalia V, Betrapally NS, Hylemon PB, White MB, Gillevet PM, Unser AB, et al. Impaired gut-liver-brain axis in patients with cirrhosis. *Sci Rep* 2016;**6**:26800.
  35. Kanbay M, Onal EM, Afsar B, Dagal T, Yerlikaya A, Covic A, et al. The crosstalk of gut microbiota and chronic kidney disease: role of inflammation, proteinuria, hypertension, and diabetes mellitus. *Int Urol Nephrol* 2018;**50**:1453–1466.
  36. O'Sullivan O, Cronin O, Clarke SF, Murphy EF, Molloy MG, Shanahan F, et al. Exercise and the microbiota. *Gut Microbes* 2015;**6**:131–136.
  37. Queipo-Ortuño MI, Seoane LM, Murri M, Pardo M, Gomez-Zumaquero JM, Cardona F, et al. Gut microbiota composition in male rat models under different nutritional status and physical activity and its association with serum leptin and ghrelin levels. *PLoS ONE* 2013;**8**:e65465.
  38. Kim D, Kang H. Exercise training modifies gut microbiota with attenuated host responses to sepsis in wild-type mice. *FASEB J* 2019;**33**:5772–5781.
  39. Evans CC, LePard KJ, Kwak JW, Stancukas MC, Laskowski S, Dougherty J, et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS ONE* 2014;**9**:e92193.
  40. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 2014;**63**:1913–1920.
  41. Allen JM, Berg Miller ME, Pence BD, Whitlock K, Nehra V, Gaskins HR, et al. Voluntary and forced exercise differentially alters the gut microbiome in C57BL/6J mice. *J Appl Physiol* 2015;**118**:1059–1066.
  42. Yuan X, Xu S, Huang H, Liang J, Wu Y, Li C, et al. Influence of excessive exercise on immunity, metabolism, and gut microbial diversity in an overtraining mice model. *Scand J Med Sci Sports* 2018;**28**:1541–1551.
  43. Lambert JE, Myslicki JP, Bomhof MR, Belke DD, Shearer J, Reimer RA. Exercise training modifies gut microbiota in normal and diabetic mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 2015;**40**:749–752.
  44. Cook MD, Martin SA, Williams C, Whitlock K, Wallig MA, Pence BD, et al. Forced treadmill exercise training exacerbates inflammation and causes mortality while voluntary wheel training is protective in a mouse model of colitis. *Brain Behav Immun* 2013;**33**:46–56.
  45. Bressa C, Bailén-Andrino M, Pérez-Santiago J, González-Soltero R, Pérez M, Montalvo-Lominchar MG, et al. Differences in gut microbiota profile between women with active lifestyle and sedentary women. *PLoS ONE* 2017;**12**:e0171352.
  46. Petersen LM, Bautista EJ, Nguyen H, Hanson BM, Chen L, Lek SH, et al. Community characteristics of the gut microbiomes of competitive cyclists. *Microbiome* 2017;**5**:98.
  47. Munukka E, Ahtiainen JP, Puigbó P, Jalkanen S, Pakkala K, Kesitalo A, et al. Six-week endurance exercise alters gut metagenome that is not reflected in systemic metabolism in over-weight women. *Front Microbiol* 2018;**9**:2323.
  48. Lai Z-L, Tseng C-H, Ho HJ, Cheung CKY, Lin J-Y, Chen Y-J, et al. Fecal microbiota transplantation confers beneficial metabolic effects of diet and exercise on diet-induced obese mice. *Sci Rep* 2018;**8**:15625.
  49. Allen JM, Mailing LJ, Cohrs J, Salmonson C, Fryer JD, Nehra V, et al. Exercise training-induced modification of the gut microbiota persists after microbiota colonization and attenuates the response to chemically-induced colitis in gnotobiotic mice. *Gut Microbes* 2018;**9**:115–130.

50. Illiano P, Brambilla R, Parolini C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. *FEBS J* 2020;**287**:833–855.
51. Krautkramer KA, Fan J, Bäckhed F. Gut microbial metabolites as multi-kingdom intermediates. *Nat Rev Microbiol* 2020;**19**:77–94.
52. Bird SR, Hawley JA. Update on the effects of physical activity on insulin sensitivity in humans. *BMJ Open Sport Exerc Med* 2017;**2**:e000143.
53. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;**56**:1761–1772.
54. Kreznar JH, Keller MP, Traeger LL, Rabaglia ME, Schueler KL, Stapleton DS, et al. Host genotype and gut microbiome modulate insulin secretion and diet-induced metabolic phenotypes. *Cell Rep* 2017;**18**:1739–1750.
55. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* 2012;**143**:913–916.e7.
56. Koopen AM, Almeida EL, Attaye I, Witjes JJ, Rampanelli, Majait S, et al. Effect of fecal microbiota transplantation combined with Mediterranean diet on insulin sensitivity in subjects with metabolic syndrome. *Front Microbiol* 2021;**12**:662159.
57. Canfora EE, Jocken JW, Blaak EE. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nat Rev Endocrinol* 2015;**11**:577–591.
58. Boets E, Gomand SV, Deroover L, Preston T, Vermeulen K, De Preter V, et al. Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study. *J Physiol* 2017;**595**:541–555.
59. Saint-Criq V, Lugo-Villarino G, Thomas M. Dysbiosis, malnutrition and enhanced gut-lung axis contribute to age-related respiratory diseases. *Ageing Res Rev* 2021;**66**:101235.
60. Walsh ME, Bhattacharya A, Sataranatarajan K, Qaisar R, Sloane L, Rahman MM, et al. The histone deacetylase inhibitor butyrate improves metabolism and reduces muscle atrophy during aging. *Ageing Cell* 2015;**14**:957–970.
61. Liu L, Fu C, Li F. Acetate affects the process of lipid metabolism in rabbit liver, skeletal muscle and adipose tissue. *Animals (Basel)* 2019;**9**:799.
62. Gao Z, Yin J, Zhang J, Ward RE, Martin RJ, Lefevre M, et al. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* 2009;**58**:1509–1517.
63. Gizard F, Fernandez A, De Vadder F. Interactions between gut microbiota and skeletal muscle. *Nutr Metab Insights* 2020;**13**:1178638820980490.
64. Frampton J, Murphy KG, Frost G, Chambers ES. Short-chain fatty acids as potential regulators of skeletal muscle metabolism and function. *Nat Metab* 2020;**2**:840–848.
65. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Zitoun C, Duchamp A, Bäckhed F, Mithieux G. Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell Metab* 2016;**24**:151–157.
66. Dardevet D, Moore MC, Remond D, Everett-Grueter CA, Cherrington AD. Regulation of hepatic metabolism by enteral delivery of nutrients. *Nutr Res Rev* 2006;**19**:161–173.
67. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 2007;**128**:92–105.
68. Picca A, Fanelli F, Calvani R, Mulè G, Pesce V, Sisto A, et al. Gut dysbiosis and muscle aging: searching for novel targets against sarcopenia. *Mediators Inflamm* 2018;**2018**:1–15.
69. Liang H, Hussey SE, Sanchez-Avila A, Tantiwong P, Musi N. Effect of lipopolysaccharide on inflammation and insulin action in human muscle. *PLoS ONE* 2013;**8**:e63983.
70. Li H, Malhotra S, Kumar A. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med (Berl)* 2008;**86**:1113–1126.
71. Webster JM, Kempen LJAP, Hardy RS, Langen RCJ. Inflammation and skeletal muscle wasting during cachexia. *Front Physiol* 2020;**11**:597675.
72. Riccardi DMDR, das Neves RX, de Matos-Neto EM, Camargo RG, Lima JDCC, Radloff K, et al. Plasma lipid profile and systemic inflammation in patients with cancer cachexia. *Front Nutr* 2020;**7**:4.
73. Luti S, Modesti A, Modesti PA. Inflammation, peripheral signals and redox homeostasis in athletes who practice different sports. *Antioxidants* 2020;**9**:1065.
74. Nieman DC, Wentz LM. The compelling link between physical activity and the body's defense system. *J Sport Health Sci* 2019;**8**:201–217.
75. Li Y-P, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, et al. TNF- $\alpha$  acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 2005;**19**:362–370.
76. Rieu I, Magne H, Savary-Auzeloux I, Averou J, Bos C, Peyron MA, et al. Reduction of low grade inflammation restores blunting of postprandial muscle anabolism and limits sarcopenia in old rats. *J Physiol* 2009;**587**:5483–5492.
77. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J* 2013;**280**:4131–4148.
78. Cristofori F, Dargenio VN, Dargenio C, Miniello VL, Barone M, Francavilla R. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: a door to the body. *Front Immunol* 2021;**12**:178.
79. Ni Y, Yang X, Zheng L, Wang Z, Wu L, Jiang J, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* improves physiological function and cognitive ability in aged mice by the regulation of gut microbiota. *Mol Nutr Food Res* 2019;**63**:1900603.
80. Bindels LB, Beck R, Schakman O, Martin JC, De Backer F, Sohet FM, et al. Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model. *PLoS ONE* 2012;**7**:e37971.
81. Varian BJ, Goureshetti S, Poutahidis T, Lakritz JR, Levkovich T, Kwok C, et al. Beneficial bacteria inhibit cachexia. *Oncotarget* 2016;**7**:11803–11816.
82. An JM, Kang EA, Han Y-M, Oh JY, Lee DY, Choi SH, et al. Dietary intake of probiotic kimchi ameliorated IL-6-driven cancer cachexia. *J Clin Biochem Nutr* 2019;**65**:109–117.
83. Bindels LB, Neyrinck AM, Claus SP, Le Roy CI, Grangette C, Pot B, et al. Synbiotic approach restores intestinal homeostasis and prolongs survival in leukaemic mice with cachexia. *ISME J* 2016;**10**:1456–1470.
84. Xie W, He M, Yu D, Wu Y, Wang X, Lv S, et al. Mouse models of sarcopenia: classification and evaluation. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2021;**12**:538–554.
85. Chen L-H, Huang S-Y, Huang K-C, Hsu C-C, Yang K-C, Li L-A, et al. *Lactobacillus paracasei* PS23 decelerated age-related muscle loss by ensuring mitochondrial function in SAMP8 mice. *Ageing* 2019;**11**:756–770.
86. Hor Y-Y, Ooi C-H, Khoo B-Y, Choi S-B, Seeni A, Shamsuddin S, et al. *Lactobacillus* strains alleviated aging symptoms and aging-induced metabolic disorders in aged rats. *J Med Food* 2019;**22**:1–13.
87. Jeong J-J, Kim KA, Hwang Y-J, Han MJ, Kim D-H. Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus brevis* OW38 in aged mice. *Beneficial Microbes* 2016;**7**:707–718.
88. Cruz-Jentoft AJ, Dawson Hughes B, Scott D, Sanders KM, Rizzoli R. Nutritional strategies for maintaining muscle mass and strength from middle age to later life: a narrative review. *Maturitas* 2020;**132**:57–64.
89. Vivarelli S, Salemi R, Candido S, Falzone L, Santagati M, Stefani S, et al. Gut microbiota and cancer: from pathogenesis to therapy. *Cancer* 2019;**11**:38.
90. Mego M, Holec V, Drgona L, Hainova K, Ciernikova S, Zajac V. Probiotic bacteria in cancer patients undergoing chemotherapy and radiation therapy. *Complement Ther Med* 2013;**21**:712–723.
91. Fong W, Li Q, Yu J. Gut microbiota modulation: a novel strategy for prevention and treatment of colorectal cancer. *Oncogene* 2020;**39**:4925–4943.
92. Kaźmierczak-Siedlecka K, Folwarski M, Skonieczna-Żydecka K, Ruszkowski J, Makarewicz W. The use of *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) in cancer patients receiving home enteral nutrition—study protocol for a randomized, double-

- blind, and placebo-controlled trial. *Nutr J* 2020;**19**:98.
93. Jayanama K, Theou O. Effects of probiotics and prebiotics on frailty and ageing: a narrative review. *Curr Clin Pharmacol* 2019;**15**:183–192.
  94. Ale EC, Binetti AG. Role of probiotics, prebiotics, and synbiotics in the elderly: insights into their applications. *Front Microbiol* 2021;**12**:631254.
  95. Kim C-S, Cha L, Sim M, Jung S, Chun WY, Baik HW, et al. Probiotic supplementation improves cognitive function and mood with changes in gut microbiota in community-dwelling older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2021;**76**:32–40.
  96. Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010;**59**:53–59.
  97. Spaiser SJ, Culpepper T, Nieves C Jr, Ukhanova M, Mai V, Percival SS, et al. *Lactobacillus gasseri* KS-13, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, and *Bifidobacterium longum* MM-2 ingestion induces a less inflammatory cytokine profile and a potentially beneficial shift in gut microbiota in older adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *J Am Coll Nutr* 2015;**34**:459–469.
  98. Buigues C, Fernández-Garrido J, Pruimboom L, Hoogland A, Navarro-Martínez R, Martínez-Martínez M, et al. Effect of a prebiotic formulation on frailty syndrome: a randomized, double-blind clinical trial. *IJMS* 2016;**17**:932.
  99. Chen Y-M, Wei L, Chiu Y-S, Hsu Y-J, Tsai T-Y, Wang M-F, et al. *Lactobacillus plantarum* TWK10 supplementation improves exercise performance and increases muscle mass in mice. *Nutrients* 2016;**8**:205.
  100. Lee M-C, Hsu Y-J, Chuang H-L, Hsieh P-S, Ho H-H, Chen W-L, et al. In vivo ergogenic properties of the *Bifidobacterium longum* OLP-01 isolated from a weightlifting gold medalist. *Nutrients* 2019;**11**:2003.
  101. Toda K, Yamauchi Y, Tanaka A, Kuhara T, Odamaki T, Yoshimoto S, et al. Heat-killed *Bifidobacterium breve* B-3 enhances muscle functions: possible involvement of increases in muscle mass and mitochondrial biogenesis. *Nutrients* 2020;**12**:219, <https://doi.org/10.3390/nu12010219>
  102. Lee M-C, Hsu Y-J, Ho H-H, Hsieh S-H, Kuo Y-W, Sung H-C, et al. *Lactobacillus salivarius* subspecies *salicinii* SA-03 is a new probiotic capable of enhancing exercise performance and decreasing fatigue. *Microorganisms* 2020;**8**:545.
  103. Soares ADN, Wanner SP, Morais ESS, Hudson ASR, Martins FS, Cardoso VN. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* increases the maximal oxygen consumption and maximal aerobic speed attained by rats subjected to an incremental-speed exercise. *Nutrients* 2019;**11**:2352.
  104. Scheiman J, Luber JM, Chavkin TA, MacDonald T, Tung A, Pham L-D, et al. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat Med* 2019;**25**:1104–1109.
  105. Jensen J, Rustad PI, Kolnes AJ, Lai Y-C. The role of skeletal muscle glycogen breakdown for regulation of insulin sensitivity by exercise. *Front Physiol* 2011;**2**:112.
  106. Pyne DB, West NP, Cox AJ, Cripps AW. Probiotics supplementation for athletes—clinical and physiological effects. *Eur J Sport Sci* 2015;**15**:63–72.
  107. Przewłócka K, Folwarski M, Kaźmierczak-Siedlecka K, Skonieczna-Żydecka K, Kaczor JJ. Gut-muscle axis exists and may affect skeletal muscle adaptation to training. *Nutrients* 2020;**12**:1451.
  108. Shing CM, Peake JM, Lim CL, Briskey D, Walsh NP, Fortes MB, et al. Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. *Eur J Appl Physiol* 2014;**114**:93–103.
  109. Huang W-C, Wei C-C, Huang C-C, Chen W-L, Huang H-Y. The beneficial effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on high-intensity, exercise-induced oxidative stress, inflammation, and performance in triathletes. *Nutrients* 2019;**11**:353.
  110. Hoffman JR, Hoffman MW, Zelicha H, Gepner Y, Willoughby DS, Feinstein U, et al. The effect of 2 weeks of inactivated probiotic *Bacillus coagulans* on endocrine, inflammatory, and performance responses during self-defense training in soldiers. *J strength cond res* 2019;**33**:2330–2337.
  111. Huang W-C, Lee M-C, Lee C-C, Ng K-S, Hsu Y-J, Tsai T-Y, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* TWK10 on exercise physiological adaptation, performance, and body composition in healthy humans. *Nutrients* 2019;**11**:2836.
  112. Cox AJ, Pyne DB, Saunders PU, Fricker PA. Oral administration of the probiotic *Lactobacillus fermentum* VRI-003 and mucosal immunity in endurance athletes. *Br J Sports Med* 2010;**44**:222–226.
  113. West NP, Pyne DB, Cripps AW, Hopkins WG, Eskesen DC, Jairath A, et al. *Lactobacillus fermentum* (PCC®) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: a randomised control trial in athletes. *Nutr J* 2011;**10**:30.
  114. Marshall H, Christmas BCR, Suckling CA, Roberts JD, Foster J, Taylor L. Chronic probiotic supplementation with or without glutamine does not influence the eHsp72 response to a multi-day ultra-endurance exercise event. *Appl Physiol Nutr Metab* 2017;**42**:876–883.
  115. Ibrahim NS, Muhamad AS, Ooi FK, Meor-Osman J, Chen CK. The effects of combined probiotic ingestion and circuit training on muscular strength and power and cytokine responses in young males. *Appl Physiol Nutr Metab* 2018;**43**:180–186.
  116. Townsend J, Bender D, Vantrease W, Sapp P, Toy A, Woods C, et al. Effects of probiotic (*Bacillus subtilis* DE111) supplementation on immune function, hormonal status, and physical performance in Division I baseball players. *Sports* 2018;**6**:70.
  117. Carbuñ AF, Reynolds SM, Campbell CW, Bradford LA, Deckert JA, Kreutzer A, et al. Effects of probiotic (*Bifidobacterium longum* 35624) supplementation on exercise performance, immune modulation, and cognitive outlook in Division I female swimmers. *Sports (Basel)* 2018;**6**:116.
  118. Toohey JC, Townsend JR, Johnson SB, Toy AM, Vantrease WC, Bender D, et al. Effects of probiotic (*Bacillus subtilis*) supplementation during off-season resistance training in female Division I athletes. *J Strength Cond Res* 2020;**34**:3173–3181.
  119. Jäger R, Shields KA, Lowery RP, De Souza EO, Partl JM, Hollmer C, et al. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 reduces exercise-induced muscle damage and increases recovery. *PeerJ* 2016;**4**:e2276.



## Annexe 2 : Grilles couramment utilisées pour diagnostiquer la fragilité chez la personne âgée

---

### Annexe 2A. Frailty Index de Rockwood.

Initialement, 70 items étaient utilisés pour diagnostiquer la fragilité selon l'approche de Rockwood et de ses collaborateurs (Canadian Study on Health and Aging Frailty Index). Plus récemment, cette liste a été réduite à 36 déficits dans la version électronique du Frailty Index (eFI).

Activity limitation	Ischaemic heart disease
Anaemia and haematinic deficiency	Memory and cognitive problems
Arthritis	Mobility and transfer problems
Atrial fibrillation	Osteoporosis
Cerebrovascular disease	Parkinsonism and tremor
Chronic kidney disease	Peptic ulcer
Diabetes	Peripheral vascular disease
Dizziness	Polypharmacy
Dyspnoea	Requirement for care
Falls	Respiratory disease
Foot problems	Skin ulcer
Fragility fracture	Sleep disturbance
Hearing impairment	Social vulnerability
Heart failure	Thyroid disease
Heart valve disease	Urinary incontinence
Housebound	Urinary system disease
Hypertension	Visual impairment
Hypotension/syncope	Weight loss and anorexia

## Annexe 2B. Rockwood Clinical Frailty Scale ou échelle de fragilité clinique.

### ÉCHELLE DE FRAGILITÉ CLINIQUE

	<b>1</b>	<b>TRÈS EN FORME</b>	Personnes robustes, actives, énergiques et motivées. Elles tendent à faire régulièrement de l'exercice et font partie des gens les plus en forme pour leur âge.
	<b>2</b>	<b>EN FORME</b>	Personnes qui ne présentent <b>aucun symptôme de maladie active</b> , mais qui sont moins en forme que les gens de la catégorie 1. Elles font souvent de l'exercice ou sont <b>très actives occasionnellement</b> , p ex., selon la saison.
	<b>3</b>	<b>SE DÉBROUILLE BIEN</b>	Personnes dont les <b>problèmes de santé sont bien maîtrisés</b> , même si elles ont des symptômes occasionnels; elles <b>ne sont pas régulièrement actives</b> , mais peuvent faire des balades à pied.
	<b>4</b>	<b>FRAGILITÉ TRÈS LÉGÈRE</b>	Autrefois nommée « vulnérabilité », cette catégorie marque une première transition par rapport à l'autonomie complète. <b>Sans être dépendantes d'autrui</b> pour une aide quotidienne, les personnes ont souvent des <b>symptômes qui limitent leurs activités</b> . Souvent, elles disent se sentir « au ralenti » ou fatiguées durant la journée.
	<b>5</b>	<b>FRAGILITÉ LÉGÈRE</b>	Personnes qui manifestent souvent un <b>ralentissement plus perceptible</b> et ont besoin d'aide pour les <b>activités instrumentales de la vie quotidienne de haut niveau</b> (finances, transport, tâches ménagères lourdes). En général, la fragilité légère empêche progressivement la personne de faire ses courses, de marcher seule à l'extérieur, de préparer ses repas et de gérer ses médicaments, et elle commence à nuire à l'exécution des tâches ménagères mineures.
	<b>6</b>	<b>FRAGILITÉ MODÉRÉE</b>	Personnes qui ont besoin d'aide pour <b>toutes les activités extérieures</b> et pour <b>tenir maison</b> . À l'intérieur, les escaliers posent souvent problème; elles ont besoin d'aide pour le bain et peuvent avoir besoin d'une assistance minimale pour s'habiller (encouragement, présence).
	<b>7</b>	<b>GRANDE FRAGILITÉ</b>	Personnes qui manifestent une <b>dépendance complète pour leurs soins personnels</b> , quelle que soit la cause (physique ou cognitive). Par contre, elles semblent stables et leur risque de décès n'est pas élevé (dans les 6 mois environ).
	<b>8</b>	<b>TRÈS GRANDE FRAGILITÉ</b>	Personnes qui manifestent une dépendance complète pour leurs soins personnels et dont la mort approche. En général, elles ne se remettraient même pas d'une maladie mineure.
	<b>9</b>	<b>PHASE TERMINALE</b>	Personnes en fin de vie. Les personnes de cette catégorie ont une <b>espérance de vie inférieure à 6 mois</b> , même si elles <b>ne présentent pas une grande fragilité par ailleurs</b> . (Beaucoup de gens en phase terminale peuvent continuer de faire de l'exercice jusqu'à l'approche de la mort.)

#### SCORES DE FRAGILITÉ CHEZ LES PERSONNES ATTEINTES DE DÉMENCE

Le degré de fragilité correspond généralement au degré de démence. Les symptômes courants de la démence légère incluent : oublier les détails d'un événement récent, sans oublier l'événement lui-même, répéter les mêmes questions et histoires, et se replier sur soi.

Dans la **démence modérée**, la mémoire récente est très affectée même si les personnes semblent bien se souvenir d'événements de leur passé. Les personnes peuvent voir à leurs soins personnels avec des encouragements.

Dans la **démence grave**, les personnes ne peuvent pas voir à leurs soins personnels sans aide.

Dans la **démence très grave**, les personnes sont souvent confinées au lit. Plusieurs ne parlent pour ainsi dire plus.



Adaptation libre de Clinical Frailty Scale ©2005–2020 Rockwood, Version 2.0 (EN).  
Tous droits réservés. Pour autorisation : [www.geriatricmedicineresearch.ca](http://www.geriatricmedicineresearch.ca)  
Rockwood, K. et coll. A global clinical measure of fitness and frailty in elderly people.  
CMAJ. 2005; vol. 173 : p. 489–495.

## Annexe 2C. International Association of Nutrition and Ageing FRAIL scale.

- FRAIL scale :

F atigue

R esistance (ability to climb one flight of stairs)

A mbulation (ability to walk one block)

I llnesses (Greater than 5)

L oss of Weight (>5%)

0 critère = robuste/ 1-2 critères = pré-fragile/ ≥ 3 critères= fragile

## Annexe 2D. Edmonton Frailty Scale.

EDMONTON FRAIL SCALE <sup>1</sup>		Entourer l'évaluation faite et additionner les points		
Score : /17		<i>(0-3 : non fragile ; 4-5 : légèrement fragile ; 6-8 : modérément fragile ; 9-17 : sévèrement fragile)</i>		
Domaine	Item	0 point	1 point	2 points
Cognitif	Imaginez que ce cercle est une horloge. Je vous demande de positionner correctement les chiffres et ensuite de placer les aiguilles à 11h10.	Pas d'erreurs	Erreurs mineures de positionnement	Autres erreurs
Santé générale	Au cours de l'année écoulée, combien de fois avez-vous été admis(e) à l'hôpital ?	0	1-2	3 ou plus
	En général comment appréciez-vous votre santé	Excellente, très bonne, bonne	Correcte, passable	Mauvaise
Indépendance fonctionnelle	Pour combien des 8 activités suivantes nécessitez-vous de l'aide : déplacements, courses, préparation des repas, faire le ménage, téléphoner, gérer vos médicaments, gérer vos finances, la lessive	0-1	2-4	5-8
Support social	Si vous avez besoin d'aide, pouvez-vous compter sur quelqu'un qui est d'accord de vous aider et en mesure de vous aider	Toujours	Parfois	Jamais
Médicaments utilisés	Prenez-vous régulièrement 5 médicaments prescrits ou plus ?	Non	Oui	
	Vous arrive-t-il d'oublier de prendre un médicament prescrit ?	Non	Oui	
Nutrition	Avez-vous récemment perdu du poids au point d'avoir des vêtements trop larges	Non	Oui	
Humeur	Vous sentez-vous souvent triste ou déprimé ?	Non	Oui	
Continence	Perdez-vous des urines sans le vouloir ?	Non	Oui	
Performance fonctionnelle	Test « Up and go » chronometer. (Asseyez-vous tranquillement sur cette chaise, levez-vous, marchez trois mètres jusqu'au repère et venez vous rasseoir)	0-10sec	11-20sec	>20 sec, ou Assistance, ou refus

## Annexe 2E. Gérontopôle de Toulouse Frailty Screening Tool.

---

Patients de 65 ans et plus, autonomes (ADL 6 /6),   distance de toute pathologie aiguë

### DÉPISTAGE

	OUI	NON	NE SAIT PAS
Votre patient vit-il seul ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Votre patient a-t-il perdu du poids ces 3 derniers mois ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Votre patient s'est-il senti plus fatigué ces 3 derniers mois ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Votre patient a-t-il plus de difficultés pour se déplacer depuis ces 3 derniers mois ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Votre patient se plaint-il de problèmes de mémoire ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Votre patient présente-t-il une vitesse de marche ralentie (plus de 4 secondes pour parcourir 4 mètres) ?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Si vous avez répondu OUI   l'une de ces questions :

Votre patient vous paraît-il fragile ?  OUI  NON

Si OUI, votre patient accepte-t-il de participer   une évaluation de sa fragilité en hôpital de jour ?

OUI  NON

## Annexe 2F. Groningen Frailty Index.

### **GFI ( Groningen Frailty Index )**

Circle the appropriate answer and add scores

	YES	NO	
<b>Mobility.</b>			
Can the patient perform the following tasks without assistance from another person ( walking aids such as a can or a wheelchair are allowed)			
1. Grocery shopping	0	1	
2. Walk outside house ( around house or to neighbour)	0	1	
3. Getting (un)dressed	0	1	
4. Visiting restroom	0	1	
<b>Vision</b>			
5. Does the patient encounter problems in daily life because of impaired vision?	1	0	
<b>Hearing</b>			
6. Does the patient encounter problems in daily life because of impaired hearing?	1	0	
<b>Nutrition</b>			
7. Has the patient unintentionally lost a lot of weight in the past 6 months (6kg in 6 months or 3kg in 3 months)?	1	0	
<b>Co-morbidity</b>			
8. Does the patient use 4 or more different types of medication?	1	0	
	YES	NO	SOMETIMES
<b>Cognition</b>			
9. Does the patient have any complaints on his/her memory (or diagnosed with dementia)?	1	0	0
<b>Psychosocial</b>			
10. Does the patient ever experience emptiness around him? <i>e.g. You feel so sad that you have no interest in your surroundings. Or if someone you love no longer love you, how do you feel?</i>	1	0	1
11. Does the patient ever miss the presence of other people around him? Or do you miss anyone you love?	1	0	1
12. Does the patient ever feel left alone? <i>e.g. You wish there is someone to go with you for something important.</i>	1	0	1
13. Has the patient been feeling down or depressed lately?	1	0	1
14. Has the patient felt nervous or anxious lately?	1	0	1
<b>Physical Fitness</b>			
15. How would the patient rate his/her own physical fitness? (0-10 ; 0 is very bad, 10 is very good) 0 – 6 = 1 7 – 10 = 0	1	0	
<b>TOTAL SCORE GFI</b>			

#### Appendix 6 – PS (Performance Status)

0	Normal activity without restriction.
1	Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out light work.
2	Ambulatory and capable for all self-care, unable to carry out any work and about >50% of waking hours.
3	Capable only limited self-care, confined to bed or chair and about <50% of waking hours.
4	Completely disabled, cannot carry on any self-care, totally confined to bed or chair.

## Annexe 3 : Principales méthodes d'analyse du microbiote

---

Pour l'analyse du microbiote intestinal, les échantillons fécaux « frais » sont souvent utilisés car ils sont relativement faciles à obtenir. Toutefois, il faut garder à l'esprit que les bactéries du microbiote ne sont pas localisées de manière homogène le long du tube digestif et leur présence dépend notamment de la quantité d'oxygène et de l'acidité de la région dans laquelle elles se trouvent. L'estomac et l'intestin grêle proximal (duodénum), des milieux plutôt acides et globalement aérobies, permettent la colonisation de genres aéro-tolérants (*Lactobacillaceae* et *Enterobacteriaceae* essentiellement) [1]. En revanche, l'iléon et le côlon ne contiennent pas (ou très peu) d'oxygène et sont donc colonisés par des bactéries anaérobies strictes, qui représentent jusqu'à 95 % des bactéries du microbiote intestinal mature [2]. Le gradient en sels biliaires diminué et le ralentissement du transit au niveau de la région distale de l'intestin favorisent également la densité et la diversité bactériennes [1]. D'autre part, les micro-organismes de la lumière intestinale diffèrent des bactéries présentes au niveau de la muqueuse (mucus et cryptes), considérées comme plus importantes mais pour lesquelles une biopsie est nécessaire [1,3].

Les premières méthodes permettant d'analyser la composition du microbiote faisait appel à des techniques traditionnelles de bactériologies telles que la culture sur divers milieux, la coloration de GRAM, l'observation au microscope et la détermination des propriétés biochimiques [4]. Bien que ces techniques aient mis en évidence les phyla majoritaires du microbiote intestinal, elles sont limitées notamment par la difficulté de cultiver les bactéries anaérobies. À ce propos, on estime que plus de 80 % des bactéries du microbiote ne sont pas cultivables [5,6]. L'émergence de nouvelles techniques de biologie moléculaire (séquençage à haut débit notamment) a ainsi permis de contrer les limites de la culture. Aujourd'hui, il existe deux grandes méthodes d'analyse « moléculaire » du microbiote couramment utilisées : la « métagénomique » ciblée (séquençage de l'ARN 16S ou barcoding) et la métagénomique globale Shotgun. Ces méthodes d'identification bactérienne basées sur les séquences nucléotidiques présentent l'avantage de ne pas nécessiter de culture bactérienne préalable, et donc de pouvoir détecter les bactéries qui sont cultivables ainsi que celles qui ne se

développent pas bien en situation de culture « classique » [4]. D'autres méthodologies complémentaires permettent de compléter l'arsenal des méthodes d'analyse du microbiote existantes. En plus de savoir quelles espèces bactériennes présentes (métagénomique ciblée, ou globale), il est important de déterminer la fonction des écosystèmes bactériens en évaluant l'expression des gènes présents ainsi que les métabolites produits (métabolomique et protéomique). Des méthodes plus avancées de culture (culturomics) sont également développées (Figure Annexe 3).

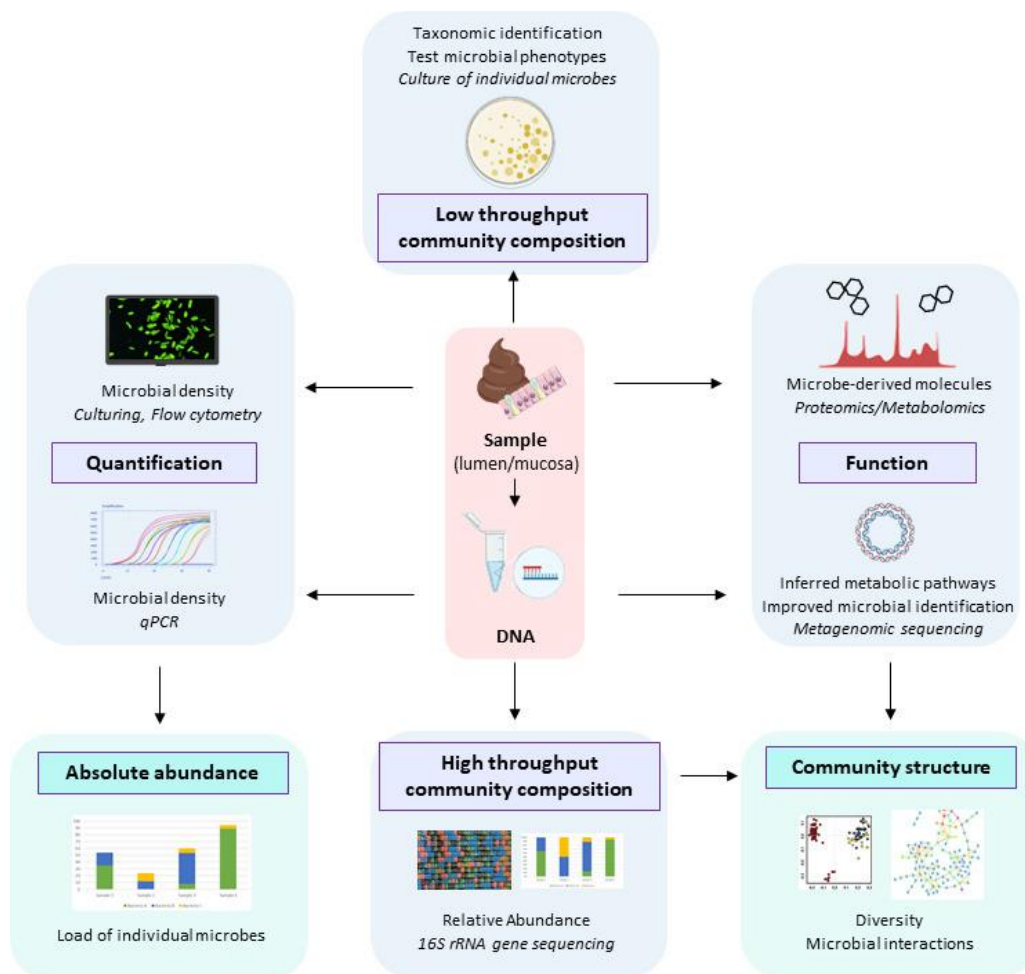


Figure Annexe 3. Ensemble des techniques d'analyse microbienne et leurs applications. L'utilisation du séquençage de l'amplicon du gène de l'acide ribonucléique (ARNr) 16S donne une vue d'ensemble de la communauté microbienne et l'analyse est basée sur l'abondance relative. Le séquençage métagénomique, dans lequel l'ADN génomique total est analysé, permet de comprendre les fonctions potentielles codées par les microbes (par exemple, la dégradation du substrat et la production de métabolites). Ces fonctions microbiennes peuvent être mesurées plus directement à partir d'échantillons biologiques grâce à des techniques telles que la métabolomique et la protéomique. La quantification de l'abondance absolue des microbes peut être réalisée directement en évaluant le nombre de cellules (culture ou cytométrie en flux), ou par une analyse de substitution de l'ADN, par exemple par une réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR). Bien que la culture de microbes individuels ait un faible débit, une renaissance de l'évaluation des microbes gastro-intestinaux basée sur la culture est stimulée par l'identification de nouveaux organismes basée sur la séquence, et est essentielle pour caractériser complètement ces organismes et leurs propriétés métaboliques et fonctionnelles. Shanahan *et al.*, 2021 [7].

## Le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S

Présent chez toutes les bactéries (et les Archées), le gène 16S est composé d'environ 1 500 paires de bases réparties en 10 régions constantes et conservées entre les groupes bactériens (permettant la construction des amorces) et en 9 régions variables (de V1 à V9) qui reflètent la divergence évolutive des bactéries et permettent de définir de manière phylogénétique les genres ou espèces bactériens.

L'analyse des 16S pouvait alors s'effectuer *via* des techniques moléculaires relativement anciennes : électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE), cytométrie de flux par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou puces à ADN. Ces méthodes présentaient néanmoins certains inconvénients dont : une résolution limitée des groupes bactérien du fait que les différences de longueur sont relativement faibles entre les bactéries. Par ailleurs, les groupes bactériens présents en faible abondance n'apparaissent pas. Ces méthodes ont donc été remplacées au fil du temps par des techniques de séquençage de nouvelle génération [4]. Le principe du (méta)barcoding 16S consiste à extraire l'ADN génomique des micro-organismes d'un échantillon, d'amplifier les régions 16S à l'aide d'amorces spécifiques puis de les séquencer. Le séquençage du gène de l'ARN 16S permet alors d'identifier la représentation des différentes espèces de bactéries d'un échantillon donné. Les séquences obtenues sont alignées sur des génomes de référence dans des bases de données (stratégie « close-reference ») afin d'identifier les espèces détectées ou plutôt les unités opérationnelles taxonomiques (OTU) regroupant un groupe de bactéries dont les séquences 16S (lectures ou « reads ») sont similaires à au moins 97 %. Les principaux avantages de cette technique sont qu'elle est plutôt rapide et simple à mettre en place et elle limite le séquençage de contaminants (cellules humaines par exemple). Toutefois, la séquence du gène de l'ARN 16S de certaines espèces d'un même genre bactérien présente tellement peu de différences qu'il est difficile de distinguer une espèce d'une autre. De plus, il est difficile de quantifier l'abondance d'une espèce car plusieurs copies des gènes codants l'ARNr peuvent être présents dans la cellule en fonction de la taille du génome et de la vitesse de croissance. La précision de l'analyse et des taxons couverts dépend du choix des amorces, qui peuvent introduire un biais. De plus, les bactéries mortes et quiescentes sont « captées » par cette méthode. Finalement, la diversité bactérienne que cette technique peut étudier est limitée.



## Le séquençage Shotgun du métagénome entier

Au contraire de l'approche ciblée précédente, la métagénomique Shotgun permet l'étude globale du contenu génétique d'un échantillon dans un environnement complexe et permet d'analyser tous les gènes présents dans cet échantillon. L'approche dite de Shotgun fait référence au séquenceur haut-débit qui est utilisé. Cette technique permet donc de décrire la composition taxonomique d'une communauté d'organismes et sa diversité mais également ses capacités fonctionnelles [8], ce qui n'est pas possible avec l'approche ciblée 16S. La connaissance des gènes bactériens permet une meilleure compréhension de leurs rôles dans la santé animale [9]. Un autre avantage de la métagénomique Shotgun est sa résolution taxonomique ; en effet, elle permet l'identification de bactéries au niveau de l'espèce, voire de la souche, tandis que le 16S ne décrit qu'au niveau du genre et plus rarement l'espèce. Cependant, le traitement et l'analyse des données de séquences de métagénome Shotgun posent plusieurs défis majeurs [4]. Tout d'abord, les données de séquence obtenues concernent non seulement l'ADN bactérien mais aussi l'ADN hôte indésirable (contaminants). Pour faire face à ce problème, des méthodes ont été développées pour enrichir sélectivement les séquences d'ADN microbien dans l'ensemble des données de séquençage en filtrant les séquences d'ADN hôte des données brutes du métagénome, comme première étape du traitement des données. Deuxièmement, pour assurer une représentation adéquate de la plupart des bactéries présentes dans une communauté, la quantité de données générées doit être très importante. Ce grand nombre de lectures doit ensuite être comparé aux génomes entiers d'un grand nombre de bactéries, dont beaucoup sont très proches. Cela représente un énorme défi en termes de puissance informatique. Troisièmement, les bases de données accessibles au public ne contiennent pas de séquences génomiques de référence complètes pour de nombreuses bactéries. Enfin, les données sur le métagénome sont nettement plus coûteuses à générer que les données sur l'ARNr 16S [4]. Du fait de ces limites, cette technique n'est donc pas répandue autant qu'attendu pour l'étude du microbiote intestinal.

## Autres méthodes plus récentes pour analyser le microbiome

Bien que les deux méthodes précédentes aient permis de révéler un grand nombre d'informations sur la composition et la diversité des microbiotes, elles décrivent seulement la présence d'organismes ou de gènes, et ne précisent pas s'ils sont des « membres actifs » du microbiome. Afin de caractériser plus précisément les fonctions et la résilience du microbiome, les scientifiques font de plus en plus appel à des approches dites « omiques ».

La **métatranscriptomique** (ou « RNA sequencing ») permet d'étudier l'expression de l'ensemble des ARN messagers issus de la transcription du métagénome. Comme décrit précédemment, l'analyse de l'ADN permet d'évaluer la capacité fonctionnelle du matériel génomique contenu dans les bactéries présentes dans une communauté microbienne particulière ; cependant, on ne peut pas être certain que ces gènes soient réellement exprimés ou non. L'étude de l'ARN nous permet, au contraire, d'étudier l'expression de divers gènes dans les génomes bactériens, nous rapprochons un peu plus de la caractérisation fonctionnelle réelle du « spécimen » [4].

La **métaprotéomique** permet d'étudier l'ensemble des protéines d'un échantillon, dont les protéines produites par les micro-organismes du microbiote ou celles produites par l'hôte dans une situation physiopathologique spécifique. La **métabolomique** permet d'étudier l'ensemble des métabolites issus de l'organisme (endogènes) ou provenant de l'environnement (exogènes) et d'établir des interactions entre le microbiote intestinal, la nutrition et le métabolome d'un patient par exemple. L'utilisation de ces techniques n'en est actuellement qu'à ses débuts, mais avec le développement continu d'outils pour la mesure de ces substances et l'analyse des données générées, elle est amenée à se développer dans les années à venir [4].

Finalement, la **culturomique** est une approche originale qui combine à la fois la culture d'une communauté microbienne et le séquençage des bactéries (métagénomique). Le principal objectif de cette technique est de multiplier les conditions de culture afin notamment de favoriser la croissance de bactéries minoritaires dans un échantillon qui pourraient présenter des gènes d'intérêt et/ou qui ne peuvent pas être identifiées par séquençage car trop peu représentées. À noter que la culturomique est complémentaire de la métagénomique car seulement 15 % des espèces analysées de façon concomitante par séquençage ont pu être détectées avec les deux techniques [10].

### Références bibliographiques de l'annexe 3

- [1] Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 20–32. doi:10.1038/nrmicro3552
- [2] Orbie J. L'importance d'une flore intestinale mature équilibrée sur la santé de l'homme. Lille; 2015
- [3] Leung C, Rivera L, Furness JB, et al. The role of the gut microbiota in NAFLD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13: 412–425. doi:10.1038/nrgastro.2016.85
- [4] Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R. Methods for Studying Gut Microbiota: A Primer for Physicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 2019; 9: 62–73. doi:10.1016/j.jceh.2018.04.016
- [5] Ferrer M, Martínez-Abarca F, Golyshin PN. Mining genomes and „metagenomes“ for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16: 588–593. doi:10.1016/j.copbio.2005.09.001
- [6] Marrs T, Flohr C. The role of skin and gut microbiota in the development of atopic eczema. *Br J Dermatol* 2016; 175 Suppl 2: 13–18. doi:10.1111/bjd.14907
- [7] Shanahan ER, McMaster JJ, Staudacher HM. Conducting research on diet–microbiome interactions: A review of current challenges, essential methodological principles, and recommendations for best practice in study design. *J Hum Nutr Diet* 2021; 34: 631–644. doi:10.1111/jhn.12868
- [8] Fu BC, Randolph TW, Lim U, et al. Characterization of the gut microbiome in epidemiologic studies: the multiethnic cohort experience. *Ann Epidemiol* 2016; 26: 373–379. doi:10.1016/j.annepidem.2016.02.009
- [9] Singh RK, Chang H-W, Yan D, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Journal of Translational Medicine* 2017; 15: 73. doi:10.1186/s12967-017-1175-y
- [10] Lagier J-C, Armougom F, Million M, et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18: 1185–1193. doi:10.1111/1469-0691.12023

## Annexe 4. Liste des micro-organismes possédant le statut QPS

---

Liste actualisée des agents biologiques recommandés par QPS pour les évaluations des risques de sécurité effectuées par l'EFSA (juillet 2022) : [Updated list of QPS-recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA | Zenodo](#)

L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) a demandé au groupe d'experts sur les risques biologiques (BIOHAZ) de rendre un avis scientifique sur le maintien de la liste des agents biologiques bénéficiant de la présomption de sécurité qualifiée (QPS). L'approche QPS a été développée par le comité scientifique de l'EFSA afin de fournir une pré-évaluation générique harmonisée pour soutenir les évaluations des risques de sécurité des agents biologiques introduits intentionnellement dans la chaîne alimentaire humaine et animale, à l'appui des groupes et unités scientifiques concernés dans le cadre des autorisations de mise sur le marché. L'identité taxonomique, l'ensemble des connaissances, les problèmes de sécurité liés à la pathogénicité et à la virulence, et la sécurité pour l'environnement de ces agents microbiologiques sont évalués. Les problèmes de sécurité identifiés pour une unité taxonomique donnée sont, dans la mesure du possible et si leur nombre est raisonnable, reflétés sous forme de "qualifications" qui sont évaluées au niveau de la souche par les groupes scientifiques de l'EFSA. La "liste des micro-organismes bénéficiant du statut QPS", établie pour la première fois en 2007, a été révisée et mise à jour chaque année jusqu'en 2014 par le biais d'avis QPS ; depuis 2014, les mises à jour sont effectuées et publiées tous les trois ans. Si de nouvelles informations sont obtenues à partir de recherches documentaires étendues qui modifieraient le statut QPS d'une unité taxonomique ou de ses qualifications, elles sont également publiées dans la déclaration du groupe couvrant la période des 6 mois précédents. La déclaration du panel QPS comprend également l'évaluation des agents microbiologiques notifiés à l'EFSA dans le délai de 6 mois pour une évaluation des additifs pour l'alimentation animale, des enzymes alimentaires, des additifs et arômes alimentaires, et des nouveaux aliments ou produits phytopharmaceutiques pour un éventuel statut QPS.



Microbiological Group	Microbiological Subgroup	Genus	Species	Synonyms commonly used in the feed and food industry/ anamorph (for yeasts)/ previous name	Qualification 1	Qualification 2
Bacteria	Gram-negative bacteria	<i>Cupriavidus</i>	<i>Cupriavidus necator</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-negative bacteria	<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-negative bacteria	<i>Komagataeibacter</i>	<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i>	<i>Acetobacter xylinus</i> subsp. <i>sucrofermentans</i> , <i>Gluconacetobacter sucrofermentans</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-negative bacteria	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Carnobacterium</i>	<i>Carnobacterium divergens</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Companilactobacillus</i>	<i>Companilactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Companilactobacillus</i>	<i>Companilactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)

Microbiological Group	Microbiological Subgroup	Genus	Species	Synonyms commonly used in the feed and food industry/ anamorph (for yeasts)/ previous name	Qualification 1	Qualification 2
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Fructilactobacillus</i>	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>Lactocaseibacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactocaseibacillus</i>	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus amylovorus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus crispatus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	

Microbiological Group	Microbiological Subgroup	Genus	Species	Synonyms commonly used in the feed and food industry/ anamorph (for yeasts)/ previous name	Qualification 1	Qualification 2
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Latilactobacillus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Latilactobacillus</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lentilactobacillus</i>	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lentilactobacillus</i>	<i>Lentilactobacillus diolivorans</i>	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lentilactobacillus</i>	<i>Lentilactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lentilactobacillus</i>	<i>Lentilactobacillus kefiri</i>	<i>Lactobacillus kefiri</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lentilactobacillus</i>	<i>Lentilactobacillus parafarraginis</i>	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc citreum</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Levilactobacillus</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Ligilactobacillus</i>	<i>Ligilactobacillus animalis</i>	<i>Lactobacillus animalis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Ligilactobacillus</i>	<i>Ligilactobacillus aviarius</i>	<i>Lactobacillus aviarius</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Ligilactobacillus</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	



Microbiological Group	Microbiological Subgroup	Genus	Species	Synonyms commonly used in the feed and food industry/ anamorph (for yeasts)/ previous name	Qualification 1	Qualification 2
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus panis</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus pontis</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Limosilactobacillus</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Loigolactobacillus</i>	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus coryniformis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Lopidilactobacillus</i>	<i>Lapidilactobacillus dextrinicus</i>	<i>Lactobacillus dextrinicus</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium imperiale</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Oenococcus</i>	<i>Oenococcus oeni</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus parvulus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	<i>Acidipropionibacterium acidipropionici</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Secundilactobacillus</i>	<i>Secundilactobacillus collinoides</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive non-sporulating bacteria	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Alkalihalobacillus</i>	<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	<i>Bacillus clausii</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	

Microbiological Group	Microbiological Subgroup	Genus	Species	Synonyms commonly used in the feed and food industry/ anamorph (for yeasts)/ previous name	Qualification 1	Qualification 2
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus paralicheniformis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	Absence of genetic information to synthesize bacitracin.
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus smithii</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus velezensis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	Absence of aminoglycoside production ability.
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Geobacillus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Lederbergia</i>	<i>Lederbergia lentus</i>	<i>Bacillus lentus</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus fusiformis</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Niallia</i>	<i>Niallia circulans</i>	<i>Bacillus circulans</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Parageobacillus</i>	<i>Parageobacillus thermoglucosidasius</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)

Microbiological Group	Microbiological Subgroup	Genus	Species	Synonyms commonly used in the feed and food industry/ anamorph (for yeasts)/ previous name	Qualification 1	Qualification 2
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Pasteuria</i>	<i>Pasteuria nishizawae</i>		The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Priestia</i>	<i>Priestia flexa</i>	<i>Bacillus flexus</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Priestia</i>	<i>Priestia megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Bacteria	Gram-positive spore-forming bacteria	<i>Weizmannia</i>	<i>Weizmannia coagulans</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	The strains should not harbour any acquired antimicrobial resistance genes to clinically relevant antimicrobials.	
Protists/ Algae	Algae	<i>Tetraselmis</i>	<i>Tetraselmis chuii</i>			QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Protists/ Algae	Algae	<i>Euglena</i>	<i>Euglena gracilis</i>			QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Protists/ Algae	Algae	<i>Haematococcus</i>	<i>Haematococcus lacustris</i>	<i>Haematococcus pluvialis</i>		QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Protists/ Algae	Protists	<i>Aurantiochytrium</i>	<i>Aurantiochytrium limacinum</i>	<i>Schizochytrium limacinum</i>		QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Viruses	Insect viruses					
Viruses	Plant viruses					
Viruses	Plant viruses					
Yeasts	Yeasts	<i>Candida</i>	<i>Limtongozyma cylindracea</i>	<i>Candida cylindracea</i>		QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Yeasts	Yeasts	<i>Cyberlindnera</i>	<i>Cyberlindnera jadinii</i>	<i>Lindnera jadinii</i> , <i>Pichia jadinii</i> , <i>Hansenula jadinii</i> , <i>Torulopsis utilis</i> , <i>Candida utilis</i>		QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)

Microbiological Group	Microbiological Subgroup	Genus	Species	Synonyms commonly used in the feed and food industry/ anamorph (for yeasts)/ previous name	Qualification 1	Qualification 2
Yeasts	Yeasts	<i>Debaryomyces</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	
Yeasts	Yeasts	<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	
Yeasts	Yeasts	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida spherica</i>	Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	
Yeasts	Yeasts	<i>Kluyveromyces</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida kefir</i>	Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	
Yeasts	Yeasts	<i>Komagataella</i>	<i>Komagataella phaffii</i>			QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Yeasts	Yeasts	<i>Komagataella</i>	<i>Komagataella pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>		QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Yeasts	Yeasts	<i>Ogataea</i>	<i>Ogataea angusta</i>	<i>Pichia angusta</i>		QPS applies for 'production purposes only' (the qualification 'for production purpose only' implies the absence of viable cells of the production organism in the final product and can also be applied for food and feed products based on microbial biomass)
Yeasts	Yeasts	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>		Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	
Yeasts	Yeasts	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	
Yeasts	Yeasts	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	
Yeasts	Yeasts	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		Absence of resistance to antimycotics used for medical treatment of yeast infections in cases where viable cells are added to the food or feed chain.	

## Annexe 5. Fiche d'analyse sensorielle utilisée pour les dégustations des fromages

---



# FICHE D'ANALYSE SENSORIELLE – FROMAGE

Date de dégustation et nombre de dégustateurs :

Nom du produit :

Type de produit et temps d'affinage :

## 1/ PERCEPTIONS À L'ŒIL

Apparence (couleur, intensité, uniformité, forme régulière, crayeux/coulant/ferme...) :

## 2/ PERCEPTIONS AU NEZ

Odeur(s) et intensité (délicate/persistante/champignon...) :

Fromage frais/lactique (1= peu intense ; 10= très intense):



Autre...



## 3/ PERCEPTIONS EN BOUCHE

Texture (crémeuse/dense/friable/coulante) :

Fondant/onctueux



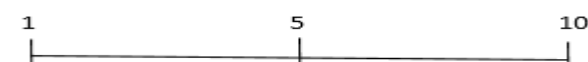
Pâteux/plâtreux



Autre...



Saveur(s) et intensité



Salée (5=équilibré) :



Acide :



Amère :



Flaveur(s) (délicate/persistante...) (1= peu intense ; 10= très intense):

Produit frais lactique



Produit chimique



Autre...



Remarques générales :