



**Lipides intramyocellulaires (IMCL) et exercice.  
Evaluation par la technique histochimique dans les  
champs d'application : effet de l'exercice aigu de très  
longue durée : effet de l'entraînement chez les sujets  
âgés et les sujets en surpoids**

Kim Tu An Ngo

► **To cite this version:**

Kim Tu An Ngo. Lipides intramyocellulaires (IMCL) et exercice. Evaluation par la technique histochimique dans les champs d'application : effet de l'exercice aigu de très longue durée : effet de l'entraînement chez les sujets âgés et les sujets en surpoids. Médecine humaine et pathologie. Université Jean Monnet - Saint-Etienne, 2013. Français. <NNT : 2013STET016T>. <tel-01073542>

**HAL Id: tel-01073542**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01073542>**

Submitted on 10 Oct 2014

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

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



# UNIVERSITE JEAN MONNET SAINT ETIENNE

**Faculté de Médecine Jacques Lisfranc**

## THÈSE

**Pour l'obtention du diplôme de Doctorat**

Discipline : Motricité Humaine et Handicap

Option : Biologie et physiologie de l'exercice

**Présentée par**

**Kim Tu An NGO**

**Titre de la thèse**

**Lipides intramyocellulaires (IMCL) et exercice.**

**Evaluation par la technique histochimique dans les champs d'application:**

- Effet de l'exercice aigu de très longue durée
- Effet de l'entraînement chez les sujets âgés et les sujets en surpoids

*Devant le Jury composé de :*

**Christian DENIS**, Professeur émérite (Université de Lyon-Saint Etienne), *Directeur de Thèse*

**Léonard FEASSON**, MCU-PH (Université de Lyon-Saint Etienne), *Co-Directeur de Thèse*

**Julien VERNEY**, MCF (UFR STAPS Clermont Ferrand), *Co-Directeur de Thèse*

**Robin CANDAU**, Professeur (Université de Montpellier), *Rapporteur*

**Fabrice PRIEUR**, MCF – HDR (Université d'Orléans), *Rapporteur*

**Phanélie BERTHON**, MCF (Université de Savoie), *Examineur*

**Etienne LEFAI**, CR1-INRA (Université de Lyon 1), *Examineur*

**Laurent MESSONNIER**, Professeur (Université de Savoie), *Examineur*

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les deux rapporteurs, M. le Pr. Robin CANDAU et M. le Dr. Fabrice PRIEUR qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir évaluer ce manuscrit. Mes remerciements vont également à Mme le Dr. Phanélie BERTHON, M. le Dr. Etienne LEFAI et M. le Pr. Laurent MESSONNIER qui ont acceptés spontanément de bien vouloir juger ce travail.

Je tiens tout naturellement à remercier le Pr. Christian DENIS qui a accepté de me soutenir dans ce projet de recherche malgré sa retraite et son état de santé. Je le remercie du fond du cœur « d'avoir supporté » un étudiant étranger comme moi, à mon avis encore très gravement handicapé au niveau de la langue et des connaissances scientifiques, depuis les premiers jours de mon Master jusqu'à maintenant. Grâce à vos grands efforts, vos explications, vos cours et vos corrections, j'ai pu « absorber » une petite partie de vos connaissances dans ce domaine et j'ai pu terminer ce projet. Mes co-directeurs, le Dr. Léonard FEASSON et le Dr. Julien VERNEY m'ont aussi beaucoup apporté en me confiant le matériel de l'unité de Myologie, en m'apprenant différentes techniques et en encourageant mon travail.

Je remercie également le Pr. André GEYSSANT et le Dr. Roger OULLION qui ont bien voulu m'accueillir et m'ont intégré dans l'unité de Médecine du Sport et Myologie.

Ce travail de thèse est également un travail d'équipe et de nombreuses personnes sont intervenues pour faire avancer ce projet. En premier lieu, il convient de remercier tous les sujets volontaires qui ont participé à ces protocoles et les responsables qui ont fait vivre ces projets: M. le Pr. Guillaume MILLET, M. Julien VERNEY, M. Mohamed SAAFI. Toute l'équipe technique du laboratoire a bien sûr été indispensable dans ces projets et dans mes manipulations. Je remercie particulièrement Marie-Pierre BLANC, Dominique GOUTTEFANGEAS, Josiane CASTELLS et Régis BONNEFOY. Un grand merci à tout le personnel du service, aux secrétaires, à mes collègues, et à mes colocataires du bureau 104. Ce travail a été enrichi par les mesures effectuées par les collègues de l'équipe "Regulation of Muscle Mass and Metabolic Disorders" (E. Lefai, G. Nemoz et leurs collègues) du laboratoire

de recherche CarMeN, INSERM U 1060 / INRA 1235 / Univ-Lyon1. Merci à eux pour cette aide précieuse. Enfin, je tiens également à remercier toute ma famille qui m'a suivi, surtout aux moments difficiles.

## Sommaire

<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>- 9 -</b>
<b>REVUE DE LA LITTERATURE</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>A. Métabolisme des graisses, données générales.</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>I. Anabolisme lipidique.</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>II. Catabolisme lipidique à partir du tissu adipeux.</b> .....	<b>- 12 -</b>
<b>III. Catabolisme musculaire des lipides.</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>B. Régulation de l'oxydation des acides gras pendant l'exercice.</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>I. Résumé de l'évolution des descriptions physiologiques.</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>II. Etat énergétique et contrôle du métabolisme lors de l'exercice: aperçu synthétique.</b> .....	<b>- 20 -</b>
<b>III. Contrôle de l'oxydation des lipides lors des exercices de faible intensité.</b> .....	<b>- 22 -</b>
<b>1. La disponibilité des substrats.</b> .....	<b>- 24 -</b>
<b>2. La durée de l'exercice.</b> .....	<b>- 28 -</b>
<b>IV. Contrôle de l'oxydation des lipides lors des exercices aérobies à haute intensité.</b> .....	<b>- 28 -</b>
<b>1. Libération des acides gras.</b> .....	<b>- 29 -</b>
<b>2. Transport à travers le sarcolemme.</b> .....	<b>- 30 -</b>
<b>3. TAG intramusculaire.</b> .....	<b>- 31 -</b>
<b>4. Métabolisme mitochondrial.</b> .....	<b>- 33 -</b>
<b>a. Malonyl-Coa et CPT-1.</b> .....	<b>- 33 -</b>
<b>b. Acétyl-CoA, carnitine et CPT-1.</b> .....	<b>- 34 -</b>
<b>C. Oxydation musculaire des lipides, lipides intramyocellulaires et optimisation de la performance à l'exercice d'endurance</b> .....	<b>- 37 -</b>
<b>I. Apport de l'entraînement à l'endurance.</b> .....	<b>- 37 -</b>
<b>II. Apport de la nutrition.</b> .....	<b>- 38 -</b>
<b>D. Les triglycérides intramusculaires</b> .....	<b>- 40 -</b>
<b>I. Histologie et biologie de la gouttelette lipidique dans le muscle.</b> .....	<b>- 40 -</b>
<b>II. IMTG comme source énergétique lors de l'exercice.</b> .....	<b>- 45 -</b>
<b>1. Présentation simplifiée des méthodes de mesure d'ITMG.</b> .....	<b>- 46 -</b>
<b>2. Confrontation des données obtenues par les différentes techniques.</b> .....	<b>- 48 -</b>
<b>3. Effet de l'entraînement sur le contenu et l'utilisation d'ITMG pendant l'exercice chez le sujet en bonne santé de poids normal.</b> .....	<b>- 49 -</b>
<b>III. Les triglycérides musculaires et leur relation avec la résistance à l'insuline.</b> .....	<b>- 49 -</b>
<b>1. Données générales succinctes sur la résistance à l'insuline.</b> .....	<b>- 49 -</b>
<b>2. Triglycérides musculaires et la résistance à l'insuline.</b> .....	<b>- 51 -</b>
<b>IV. Les triglycérides musculaires et leur relation avec le vieillissement.</b> .....	<b>- 54 -</b>
<b>E. Les sphingolipides</b> .....	<b>- 55 -</b>
<b>I. Données générales.</b> .....	<b>- 55 -</b>
<b>II. Implication des céramides et autres sphingolipides dans la résistance à l'insuline dans le muscle.</b> .....	<b>- 57 -</b>
<b>F. Diacylglycérols.</b> .....	<b>- 61 -</b>
<b>I. Données générales.</b> .....	<b>- 61 -</b>
<b>II. Implication des DAG dans la résistance à l'insuline dans le muscle.</b> .....	<b>- 62 -</b>
<b>III. Acyl CoA à longue chaîne.</b> .....	<b>- 65 -</b>
<b>G. La saturation des AGL peut déterminer la nature de la résistance à l'insuline induite par les lipides.</b> .....	<b>- 65 -</b>
<b>H. Dysfonction mitochondriale et accumulation d'IMCL.</b> .....	<b>- 67 -</b>

<b>HYPOTHESES DE TRAVAIL</b> .....	<b>- 73 -</b>
<b>I. Premier champ d'application: l'effet de l'exercice aigu de très longue durée sur IMTG.</b> .....	<b>- 73 -</b>
<b>II. Deuxième champ d'application: l'effet de l'entraînement sur IMTG.</b> .....	<b>- 74 -</b>
1. Entraînement en endurance. ....	- 74 -
2. Entraînement en résistance. ....	- 74 -
3. Entraînement combiné.....	- 75 -
4. Application de ce type d'entraînement aux sujets âgés. ....	- 75 -
5. Application de ce type d'entraînement aux sujets en surpoids. ....	- 76 -
<b>METHODOLOGIE</b> .....	<b>- 78 -</b>
<b>A. Expériences physiologiques utilisées</b> .....	<b>- 78 -</b>
<b>I. Etude 1: Protocole d'exercice d'ultra-endurance: une épreuve de 24h de course à pied en situation de laboratoire (Millet <i>et al.</i>, 2011).</b> .....	<b>- 78 -</b>
<b>II. Etude 2: Protocole d'entraînement combiné en musculation des membres supérieurs et en endurance des membres inférieurs chez des sujets seniors en bonne santé (Verney <i>et al.</i>, 2006)</b> .....	<b>- 81 -</b>
<b>III. Etude 3: Protocole d'entraînement combiné en musculation des membres supérieurs et en endurance des membres inférieurs chez des sujets en surpoids ((Saafi <i>et al.</i>, 2012) et article en préparation).</b> .....	<b>- 85 -</b>
<b>B. Méthodes de colorations histochimiques.</b> .....	<b>- 86 -</b>
<b>I. Technique de coupe.</b> .....	<b>- 86 -</b>
<b>II. Préparations histochimiques.</b> .....	<b>- 87 -</b>
1. Mise en évidence des triglycérides par la coloration à l'huile rouge (HR)..	- 87 -
2. Glycogène avec coloration du Periodic Acid Schiff (PAS). ....	- 89 -
3. Caractérisation des types de fibres musculaires.....	- 90 -
<b>III. Procédure de coloration et photographie par ordre chronologique.</b> .....	<b>- 90 -</b>
1. Coloration par la technique de l'Huile Rouge. ....	- 90 -
2. Coloration par la technique du PAS.....	- 93 -
<b>C. Etablissement de la procédure d'analyse pour 2 colorations.</b> .....	<b>- 94 -</b>
<b>I. Analyse en Densité Optique (DO).</b> .....	<b>- 94 -</b>
<b>II. Certains paramètres ont une influence sur la densité optique.</b> .....	<b>- 95 -</b>
<b>III. Etalonnage.</b> .....	<b>- 96 -</b>
<b>IV. Conversion des photos en couleur grise et suppression du fond blanc avant l'analyse DO.</b> .....	<b>- 97 -</b>
<b>V. Principe de quantification de la densité optique (DO) en unités arbitraires.</b> ..	<b>- 99 -</b>
<b>VI. La fiabilité de cette méthode d'analyse?</b> .....	<b>- 99 -</b>
<b>D) Indices de vascularisation des fibres musculaires.</b> .....	<b>- 100 -</b>
<b>E) Analyse statistique.</b> .....	<b>- 101 -</b>
<b>RESULTATS – DISCUSSION</b> .....	<b>- 102 -</b>
<b>A. Etude 1: Expérience de l'exercice aigu de très longue durée.</b> .....	<b>- 102 -</b>
<b>I. Résultats.</b> .....	<b>- 102 -</b>
<b>II. Discussion.</b> .....	<b>- 105 -</b>
<b>B. Etude 2: Expérience d'entraînement combiné chez les sujets âgés actifs.</b> .....	<b>- 109 -</b>
<b>I. Résultats.</b> .....	<b>- 109 -</b>
<b>II. Discussion.</b> .....	<b>- 113 -</b>
<b>C. Etude 3: Expérience d'entraînement combiné chez les sujets en surpoids âgés de 50-60 ans.</b> .....	<b>- 120 -</b>
<b>I. Résultats.</b> .....	<b>- 120 -</b>
<b>II. Discussion.</b> .....	<b>- 133 -</b>
<b>CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVE</b> .....	<b>- 136 -</b>

<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>- 137 -</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>- 156 -</b>
<b>ANNEXE 1 : Protocoles de coloration immunohistochimiques.....</b>	<b>- 157 -</b>
<b>ANNEXE 2 : Article : K.T.A. Ngo, C. Denis, M.A. Saafi, L. Feasson, et J. Verney.</b>	
<b>Endurance but not resistance training increases intra-myocellular lipid content and <math>\beta</math>-</b>	
<b>hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase activity in active elderly men. Acta Physiol</b>	
<b>2012, 205, 133-144.....</b>	<b>- 158 -</b>



## ABREVIATIONS

[AG]<sub>P</sub> : Concentration plasmatique des acides gras  
ACC2 : Acétyl-CoA carboxylase 2  
ACS : Acyl-CoA synthétase  
ADP : Adénosine di-phosphate  
ADRP : Protéine en relation avec la différenciation adipeuse (Adipose differentiation-related protein)  
AG : Acide gras  
AGL : Acide gras libre  
AGLC : Acide gras longue chaîne  
AGPAT : Acylglycérol phosphate acyltransférase  
AMP : Adénosine monophosphate  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
AMPK : Adénosine monophosphate kinase  
ATP : Adénosine triphosphate  
CACT : Carnitine acylcarnitine translocase  
CAT : Carnitine acétyltransferase  
CD36 : Fatty acid translocase  
CGI-58 : Gène d'identification comparative - 58  
COX : Cytochrome-c oxydase  
CPT : Carnitine palmitoyltransferase  
CS : Citrate synthase  
DAG : Diacylglycérol  
Del : Muscle deltoïde  
DGAT : Diacylglycérol acyltransférase  
DO : Densité Optique  
DT2 : Diabète type 2  
EE - Vlat : Entraînement en endurance - muscle vaste externe  
EE : Entraînement en endurance  
EMCL : Lipide extramyocellulaire  
ER - Del : Entraînement en résistance - muscle deltoïde  
ER : Entraînement en résistance  
ERK : Kinase de régulation extracellulaire

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

FABPpm : Protéine membranaire plasmique de liaison d'acide gras (Plasma membrane fatty acid binding protein)

FAT/CD36 : Translocase acide gras /cluster of differentiation 36

FATP : Protéine de transport des acides gras

G-3-P : Glycérol-3-phosphate

GL : Gouttelettes lipidiques

GLUT4 : Glucose transporteur type 4

GPAT : Glycérol-3-phosphate acyltransférase

HAD : Hydroxyacyl-CoA-deshydrogénase

H-MRS : Spectroscopie de résonance magnétique du proton

HRO ou ORO : Huile Rouge O

HSL ou LHS : Lipase hormone sensible

IMCL : Lipide intramyocellulaire

IMTG : Triacylglycérol intramusculaire

IRS : Substrat récepteur insuline

JNK : Jun N-terminal kinase

LC/PF : Rapport entre la longueur de capillaire en contact avec une fibre et le périmètre de cette fibre

LCFA : Acide gras longue chaîne

LC-FACS : Acyl-CoA synthétase

LEC : Liquide extracellulaire

LPA : Acide lysophosphatidique

LPL : Lipoprotéine lipase

MAG : Monoacylglycérol

MCoa : Malonyl-CoA

MGL : Monoacylglycérol lipase

MLDP : Protéines de gouttelette lipidique du myocarde

NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

OxAG : Oxydation des acides gras

OxAGLC : Oxydation des acides gras longue chaîne

OxCHO : Oxydation des glucides

PA : Acide phosphatidique

PAS : Acide périodique-réaction de Schiff

PAT : Perilipin amino-terminal  
PDC : Complexe du pyruvate déshydrogénase  
PDH : Pyruvate déshydrogénase  
PFK : Phosphofructokinase  
PGC-1 $\alpha$  : Coactivateur de PPAR $\gamma$   
PI3K : Phosphatidylinositol-3 kinase  
PKA : Protéine kinase A  
PKB/AKT : Protéine kinase B / Adénosine kinase transférase  
PKC : Protéine kinase C  
PP: Protéine phosphatase  
PPAR $\alpha$  : Récepteur activé par les proliférateurs de peroxisome  $\alpha$   
QR : quotient respiratoire  
Ra : Vitesse d'apparition  
Rd : Vitesse disparition  
RER : Quotient des échanges respiratoires  
RI : Résistance à l'insuline  
RMN : Résonance magnétique nucléaire  
STE : Système de transfert des électrons  
TAG : Triacylglycérol  
TCA : Cycle de l'acide tricarboxylique  
TG : Triglycéride  
TGLA : Triglycéride lipase du tissu adipeux  
TIP-47 : Tail-interacting protein 47  
UCP3 : Protéine de découplage 3  
Vlat : Muscle vaste externe  
VLDL : Lipoprotéine de très basse densité  
VLDL-TAG : Triacylglycérol associé avec des particules de lipoprotéines de très basse densité  
VO<sub>2</sub>max : Consommation maximale d'oxygène  
VSG : Vésicules sarcolemmales géantes

## INTRODUCTION

Le catabolisme lipidique est mis en jeu à des degrés variables dans l'énergétique musculaire lors de l'exercice. Sa régulation est complémentaire et différente de celle du catabolisme glucidique. Outre l'apport d'acides gras et de glucose par la circulation sanguine, l'utilisation des réserves musculaires de triglycérides et de glycogène contribue de façon importante à l'apport énergétique lors de l'exercice dont l'usage se combine en particulier pendant l'exercice d'endurance.

Ces réserves musculaires de substrats lipidique et glucidique peuvent être estimées de façon semi quantitative par l'analyse de la densité optique des fibres musculaires colorées par des réactions histochimiques spécifiques de chacun des substrats, Huile Rouge O (Oil Red O ou ORO) pour les triglycérides et acide périodique-réaction de Schiff (periodic acid-Schiff ou PAS) pour le glycogène.

Le Laboratoire de Physiologie de l'Exercice (LPE) de l'université Jean Monnet a mis en œuvre depuis les années 1980 un secteur d'histochimie musculaire appliqué à la physiologie de l'exercice chez l'Homme. Des expérimentations permettent de combiner les explorations physiologiques à l'exercice et l'histochimie musculaire sur des échantillons prélevés par biopsie.

Les prélèvements peuvent être pratiqués avant et après soit un exercice unique soit une période d'entraînement.

C'est dans ce cadre expérimental général que ce travail de Thèse a été réalisé. Après la mise au point de la technique ORO et de l'analyse semi automatique de la densité optique (travail de Master), des hypothèses de travail ont été envisagées à partir de protocoles établis et réalisés avec le thème de l'exercice ou de l'entraînement à l'endurance.

Le métabolisme lipidique musculaire est un domaine de recherche important pour l'énergétique du sport. Les études décrivent les phénomènes et les mécanismes de l'adaptation favorable du métabolisme liée aux exigences de l'exercice d'endurance (amélioration de la captation membranaire des acides gras et de leur lipolyse associée à l'augmentation des capacités oxydatives mitochondriales). Les capacités de stockage et de libération des acides gras à partir des réserves des fibres musculaires font partie de ces phénomènes et feront l'objet d'une étude réalisée lors d'une épreuve d'ultra endurance.

Par ailleurs, le vieillissement et l'excès de poids contribuent pour leur part à l'augmentation des réserves lipidiques dans l'organisme en général et dans le muscle en

particulier. L'âge et l'obésité sont souvent associés à la sédentarité qui sous-tend, à l'inverse du sport, les effets délétères de l'accumulation des lipides. La conséquence la plus étudiée est la constitution progressive de la résistance à l'insuline et son évolution vers le diabète de type 2. Deux autres études dans cette Thèse porteront sur l'apport de l'entraînement à l'exercice chez des sujets âgés ou en surpoids dans la modification des réserves de triglycérides musculaires en lien avec l'état énergétique musculaire général et la sensibilité à l'insuline.

Au préalable, une revue de la littérature scientifique sera présentée en tentant de couvrir, à la fois dans le domaine de l'exercice et du sport et celui du vieillissement et de l'obésité, les principales données concernant le métabolisme lipidique et plus particulièrement le contenu lipidique des fibres musculaires.

## REVUE DE LA LITTÉRATURE

### A. Métabolisme des graisses, données générales.

#### I. Anabolisme lipidique.

D'après Horn *et al.* (2005); Shulman & Petersen (2009)

Les graisses alimentaires subissent une émulsion dans l'estomac puis, dans le duodénum, une transformation enzymatique des micelles par adjonction des acides biliaires. Ensuite les lipases du duodénum hydrolysent les TAG en AG et glycérol qui sont absorbés par les entérocytes de l'intestin grêle, ré-estérifiés en TAG et sécrétés sous forme de chylomicrons. Ces derniers passent dans les vaisseaux lymphatiques puis rejoignent la circulation sanguine au niveau du tronc veineux brachio-céphalique gauche.

L'insuline, sécrétée en réponse à une stimulation alimentaire glucidique ou protéique joue un triple rôle sur le métabolisme des lipides. L'insuline stimule la LPL des capillaires du tissu adipeux qui catalyse l'hydrolyse des TAG en AG et glycérol. Les produits de dégradation pénètrent dans les adipocytes pour une nouvelle ré-estérification en TAG. L'insuline favorise également le stockage dans le muscle et dans le tissu adipeux des TAG exogènes issus de l'alimentation et endogènes produit par le foie et transportés dans le sang sous forme de VLDL.

Le second rôle de l'insuline est de stimuler la capture du glucose par les transporteurs GLUT4 des adipocytes. Les adipocytes transforment le glucose en glycérol-3-phosphate qui constitue l'ossature chimique nécessaire à la ré-estérification des AG et TAG. En effet les adipocytes ne possèdent pas l'enzyme glycérol kinase et, à l'inverse du foie et du muscle, ne peuvent phosphoryler directement le glycérol.

Le troisième rôle de l'insuline est d'inhiber LHS des adipocytes. LHS catalyse l'hydrolyse des TAG des adipocytes (alors que LPL agit sur les TAG du sang). En inhibant la lipolyse, l'insuline diminue nettement la concentration d'AG plasmatiques et favorise le stockage des lipides absorbés dans le tissu gras.

Lors d'un repas comprenant un mélange de glucose, d'acides aminés et d'AG, l'augmentation de la concentration plasmatique d'insuline favorise leur stockage sous forme respective de glycogène, protéines et graisse. Ceci s'effectue avec une inhibition parallèle de la glycogénolyse, de la protéolyse et de la lipolyse. Du fait de l'effet dose-réponse, des niveaux bas d'insuline inhibent plutôt la dégradation des réserves énergétiques alors que des hauts

niveaux d'insuline stimulent l'accumulation des réserves. Ainsi, des repas légers (associés à une réponse intestinale faible) conservent les réserves en réduisant leur dégradation alors qu'un repas riche, par sa stimulation insulinique intense, favorise les stockages tissulaires en particulier de graisse.

## II. Catabolisme lipidique à partir du tissu adipeux.

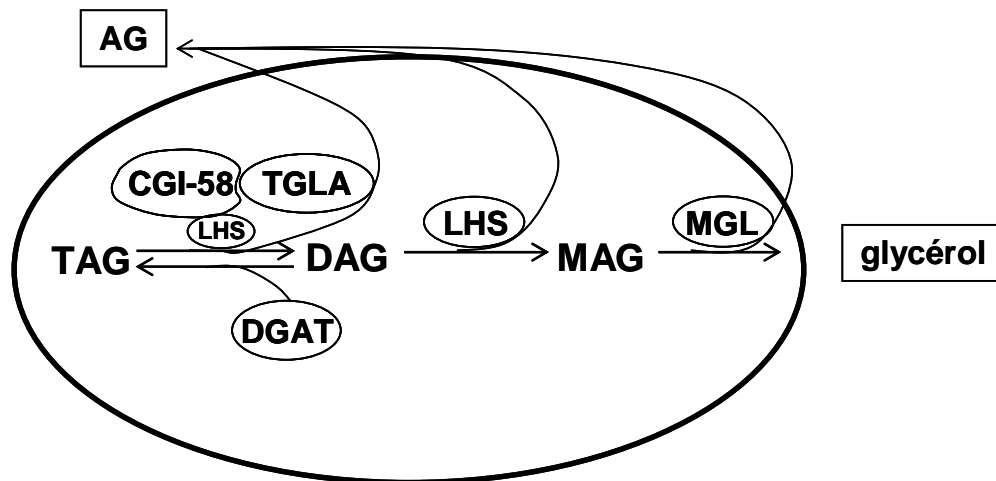
D'après Watt & Steinberg (2008); Zechner *et al.* (2009)

Les réserves de TAG des adipocytes sont libérées pour apporter les AG nécessaires au métabolisme. L'adrénaline sécrétée par la glande médullosurrénale dans les conditions d'hypoglycémie ou de stress (tel que l'exercice) ainsi que la noradrénaline agissent sur la lipolyse. Au niveau du tissu adipeux les catécholamines se fixent sur les récepteurs  $\beta_1$  et  $\beta_2$  et agissent par l'intermédiaire d'une protéine  $G_S$  qui active l'adénylate cyclase, ce qui augmente le taux de l'AMPc. AMPc enclenche l'activité de la protéine kinase A (PKA). PKA permet la phosphorylation des protéines enzymatiques de la lipolyse responsable d'une importante augmentation de la libération des AG par le tissu adipeux (x100). D'autres hormones agissant sur la voie  $G_S$ -PKA dont le glucagon, l'hormone parathyroïde, les hormones thyro- et adrénocorticotropes ainsi que l' $\alpha$ MSH ( *$\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone*) sont également lipolytiques. A l'inverse, des facteurs antilipolytiques peuvent agir sur le tissu adipeux par l'action sur des récepteurs couplés à des protéines  $G_I$ ; parmi eux les catécholamines en présence de récepteurs  $\alpha_2$ , l'adénosine (récepteurs A1), les prostaglandines (récepteurs E2), NPY (récepteurs NPY-1) et l'acide nicotinique (récepteur GPR109A). C'est la distribution relative des récepteurs des catécholamines qui détermine leur action tissulaire ou cellulaire spécifique (Zechner *et al.*, 2009).

Comme indiqué plus haut, l'insuline ainsi qu'IGF représentent d'autres inhibiteurs très efficaces de la lipolyse. Leurs effets sont transmis par le récepteur de l'insuline à une succession d'étapes, la polyphosphorylation des substrats 1-4 du récepteur à l'insuline (IRS1-4), l'activation de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) et l'induction de la protéine kinase B/AKT (PKB/AKT). Dans cette voie relativement linéaire viennent s'intercaler des nœuds d'interaction dont celui au niveau du récepteur de l'insuline et de IRS mettant en jeu l'action des cytokines et de la kinase régulée par les signaux extracellulaires (ERK) et celui au niveau de l'activation par PI3K de protéines kinases C atypiques (PKC $\lambda$  et  $\zeta$ ).

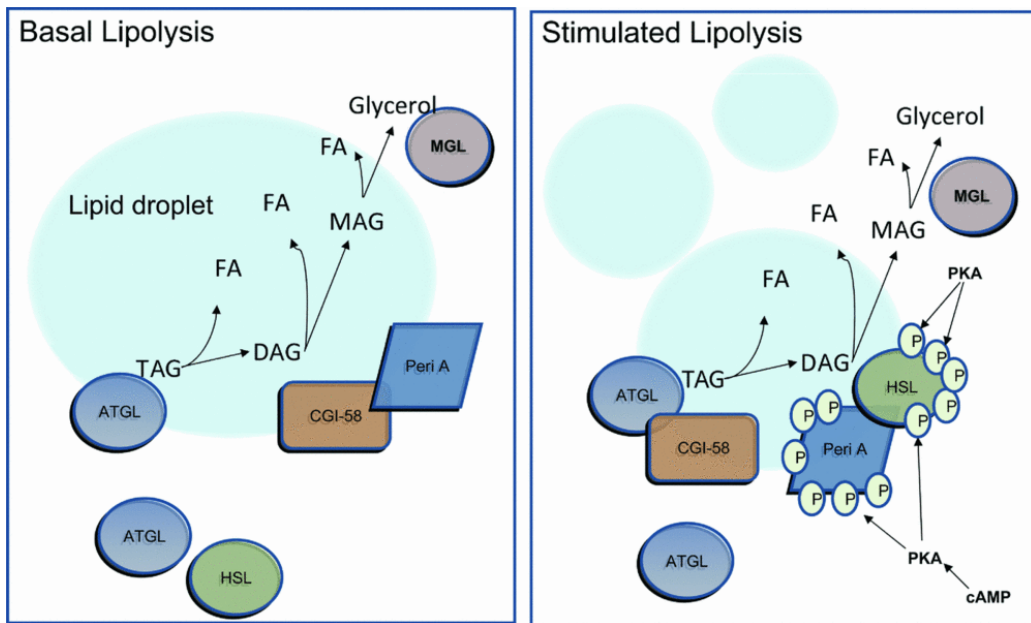
La lipolyse du tissu adipeux s'organise avec trois systèmes enzymatiques principaux (**Figure 1**). La triglycéride lipase du tissu adipeux (TGLA) est le responsable essentiel (et à

un moindre degré HSL) de l'hydrolyse de TAG. Son activation dépend d'un autre facteur, le CGI-58. Lors des conditions basales, celle-ci est liée à la périlipine (protéine de la membrane de la gouttelette lipidique). Sous l'influence de la stimulation hormonale, la périlipine est phosphorylée ce qui libère CGI-58 qui peut interagir avec TGLA. DGA, produit par l'action de TGLA après libération d'un AG est le substrat essentiel d'HSL dont l'activation par la voie  $\beta$ -adrénergique-PKA est également associée à la phosphorylation de la périlipine. La dernière étape concerne MAG dont l'hydrolyse est catalysée par la monoacylglycérol lipase (MGL) (**Figure 2**). Les AG libérés sont déversés dans la circulation et transportés liés à l'albumine jusqu'à leur lieu d'utilisation.



**Figure 1:** Résumé simplifié des étapes de la lipolyse du tissu adipeux. D'après Zechner *et al.* (2009). DGAT, diacylglycérol acyltransférase.



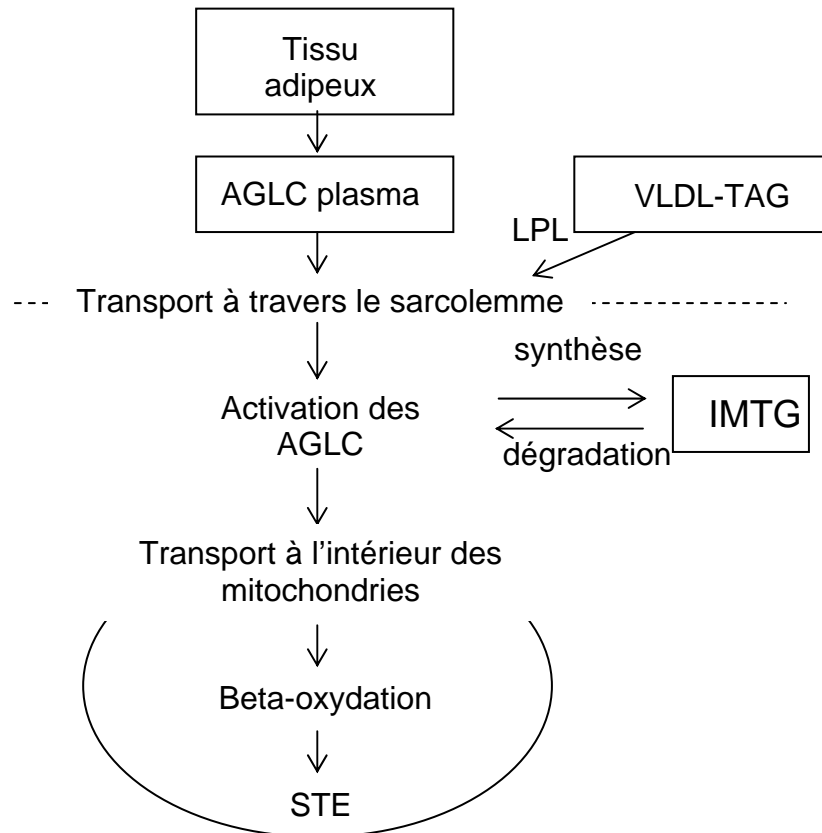


**Figure 2:** Dynamique de la lipolyse dans le tissu adipeux à l'état basal et lors de la stimulation  $\beta$ -adrénergique. D'après Watt & Steinberg (2008).

### III. Catabolisme musculaire des lipides.

D'après Sahlin & Harris (2008); Watt & Hoy (2012)

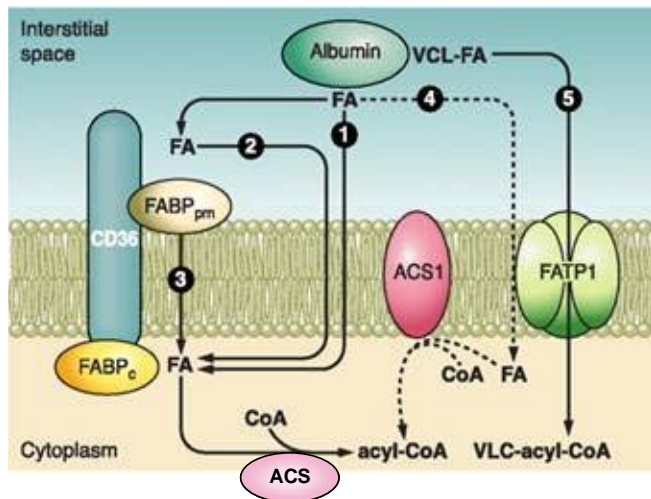
Les étapes de la lipolyse musculaire sont résumées par la (Figure 3).



AGLC, Acide gras longue chaîne; STE, système de transfert des électrons; IMTG, triacylgcérol intramusculaire; LPL, lipoprotéine lipase; TAG, triacylgcérol; VLDL-TAG, TAG associé avec des particules de lipoprotéines de très basse densité.

**Figure 3:** Aperçu de la voie métabolique de l'oxydation des lipides. D'après Sahlin & Harris (2008).

La circulation musculaire apporte au niveau des capillaires les AG fixés à l'albumine et les TAG véhiculés par les VLDL. La paroi des cellules endothéliales capillaires possède des récepteurs de l'albumine qui permettent la dissociation des AG devenus libres (AGL) diffusibles jusqu'au LEC de la fibre musculaire. D'autres AGL sont libérés par l'activité LPL de la paroi des capillaires qui agit sur les VLDL. Le muscle squelettique capte les AGL par diffusion passive et par des transporteurs membranaires; *fatty acid translocase/cluster of differentiation 36* (FAT/CD36), *plasma membrane fatty acid binding protein* (FABPpm), *family of fatty acid transport proteins* (FATP1-4) (Figure 4, (Glatz et al., 2010)).



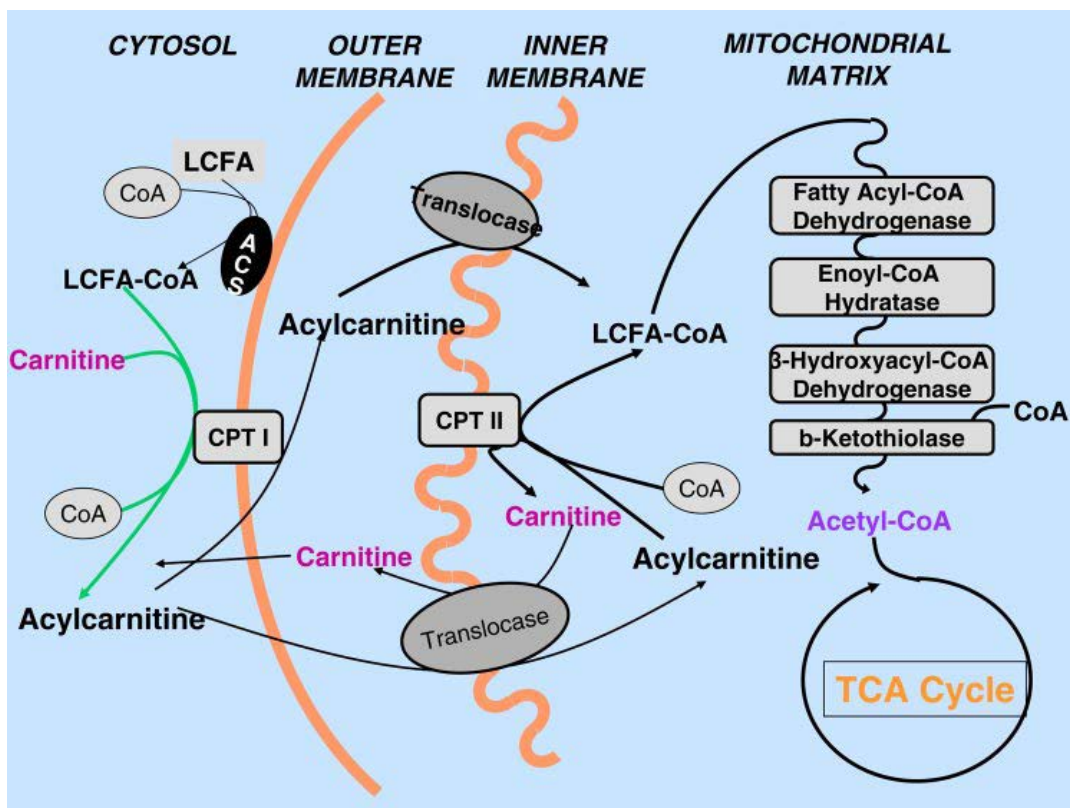
**Figure 4:** Mécanismes moléculaires de l'incorporation myocellulaires des acides gras à longue chaîne ou très longue chaîne (VLC-FA). D'après Glatz *et al.* (2010).

Mécanismes moléculaires de l'incorporation myocellulaire des acides gras à longue chaîne ou très longue chaîne (VLC-FA). (1) Du fait de leur nature hydrophobe, les AG peuvent se dissocier de leur liaison avec l'albumine et traverser la membrane par simple diffusion (passive). (2) Sinon, des protéines associées à la membrane, telles que la protéine membranaire périphérique (FABP<sub>pm</sub>) ou la protéine transmembranaire CD36 peuvent fixer, seules ou ensembles, les AG ce qui augmente la concentration de ces derniers au contact de la surface cellulaire et facilite leur diffusion. (3) CD36 peut lui-même faciliter le transport des AG à travers la double couche phospholipidique (diffusion facilitée). Lorsqu'ils sont du côté interne de la membrane, les AG se fixent sur FABP cytoplasmique (FABP<sub>c</sub>) avant d'entrer dans les voies métaboliques ou de signalisation cellulaire. (4) de plus, une minorité d'AG peuvent être transportés par le transporteur membranaire d'AG (FATP1) et activés rapidement par l'acyl-CoA synthétase membranaire (ACS1) pour former des esters d'acyl-CoA. (5) VLC-FA sont transportés préférentiellement par FATP1 et par l'action de l'activité synthétase de FATP1 convertis directement en esters de VL-acyl-Coa

La plus grande majorité (jusqu'à 90% dans le muscle (Dyck *et al.*, 1997)) des AG captés par le muscle est soit oxydée ou stockée dans les gouttelettes lipidiques sous forme de TAG intramyocellulaires (IMTG), le reste étant incorporé dans les synthèses de phospholipides, glycérolipides, sphingolipides, et esters de cholestérol. Lorsque les AG sont à l'intérieur des myocytes, ils sont fixés de façon réversible à FABP cytoplasmique (FABP<sub>c</sub>). L'enzyme *long chain acyl-CoA synthetase* (LC-FACS)<sup>1</sup> souvent dénommée acyl-CoA synthase (ACS) catalyse leur fixation à l'acétyl-CoA pour former des acyl-CoA avec consommation d'ATP. S'il est destiné à l'oxydation, l'acyl-CoA est alors transporté dans la mitochondrie (**Figure 3**). L'entrée des acides gras à longue chaîne (AGLC) dans les mitochondries est un processus fortement régulé dans la mesure où les acyl-CoA ne peuvent traverser directement la membrane interne. A l'inverse les AG à chaîne courte ou moyenne traversent passivement les membranes mitochondriales. Les AGLC doivent d'abord être transformés en acylcarnitine, réaction catalysée par la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT-1) localisée sur la membrane externe de la mitochondrie (**Figure 5**). CPT-1 mitochondriale existe sous deux isoformes: les types hépatique (L-CPT1) et musculaire (M-CPT1). Dans le muscle, l'isoforme M-CPT1 est

<sup>1</sup> LC-FACS se présente sous 5 isoformes différents dont les localisations cellulaires et les actions respectives sont spécifiques dans un tissu donné et entre les différents tissus. L'activité ACS musculaire globale est l'une des plus faibles par rapport à d'autres tissus tels que le foie et le tissu adipeux (Mashek *et al.* 2006).

prédominant (McGarry & Brown, 1997). Outre la régulation allostérique par le malonyl-CoA, (voir plus loin), il a été décrit que FAT/CD36 est également exprimé sur la membrane mitochondriale et que ce transporteur pourrait influencer le transport et l'oxydation des AG (Holloway *et al.*, 2008). Une autre étude ne confirme pas la présence de FAT/CD36 sur la membrane mitochondriale (Jeppesen *et al.*, 2010). FATP1 est également colocalisé avec CPT1 et favorise l'oxydation des acides gras (OxAG) mitochondriale (Lee *et al.*, 2011; Sebastian *et al.*, 2009). Dans la mitochondrie, l'acyl-CoA entre dans la  $\beta$ -oxydation qui génère de l'acétyl-CoA pour le cycle tricarboxylique et des équivalents réducteurs pour le système de transport des électrons (STE).



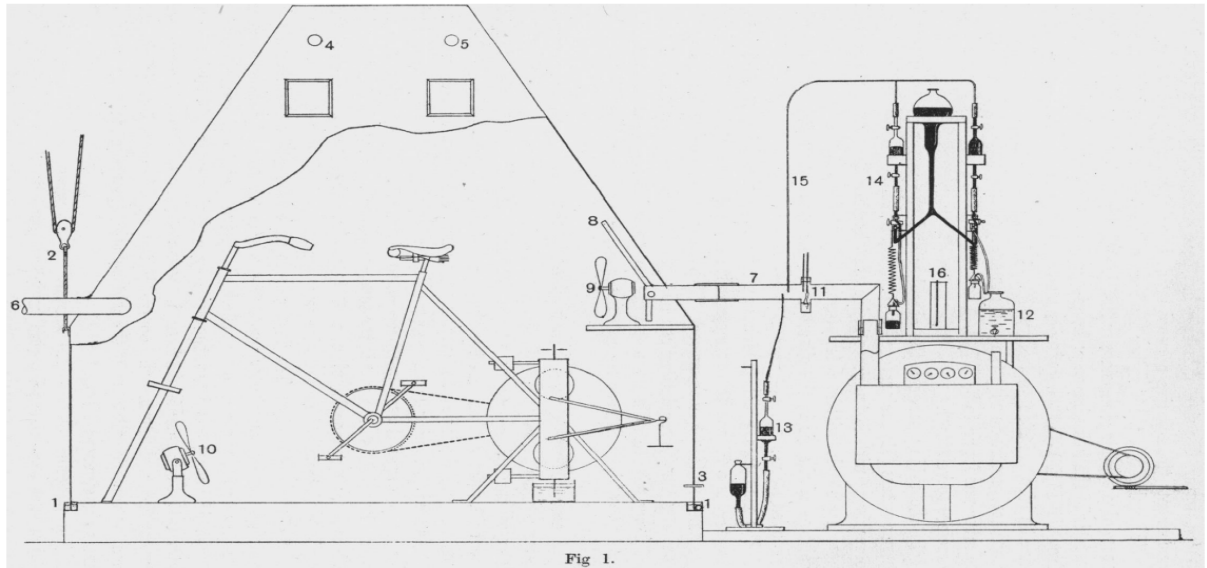
**Figure 5:** Représentation schématique de la voie d'entrée des AG à longue chaîne dans la mitochondrie par le complexe de la carnitine palmitoyl transférase. D'après Kiens (2006).

## B. Régulation de l'oxydation des acides gras pendant l'exercice.

### I. Résumé de l'évolution des descriptions physiologiques.

Les travaux de Krogh & Lindhard (1920) dont le dispositif ergométrique et d'analyse des échanges gazeux est représenté par la (**Figure 6**), à partir de la mesure du quotient des échanges respiratoires (RER, **Tableau 1**), ont initié l'observation des variations de la quantité et de la proportion de l'oxydation des acides gras (OxAG) lors d'exercices par rapport au repos. La vitesse du renouvellement énergétique augmente avec l'intensité de l'exercice et s'accompagne d'une augmentation de l'utilisation des glucides et des lipides pour l'exercice léger. Lorsque l'intensité s'accroît encore, RER augmente (Christensen & Hansen, 1939), ce qui témoigne d'un glissement de l'utilisation des lipides vers celui des glucides. Des études plus récentes ont permis de mettre en évidence l'OxAG lors d'exercices à intensité modérée, en particulier celle de Jones et al 1980 pour laquelle la mesure de RER a été accompagnée de celle de la vitesse de renouvellement du palmitate marqué au  $^{14}\text{C}$ : l'augmentation de RER au cours de l'exercice (70%  $\text{VO}_2\text{max}$ ) est associée à une diminution du renouvellement du palmitate par rapport à l'exercice léger (36%  $\text{VO}_2\text{max}$ ). Ces mesures ont été confirmées par celle du quotient respiratoire local (QR) sur les muscles à l'exercice et par des traceurs radioactifs ((Romijn *et al.*, 1993a; van Loon *et al.*, 2001), voir plus loin). La vitesse maximale d'oxydation des lipides ( $\text{OxAG}_{\text{max}}$ ) est atteinte pour une intensité d'exercice de 50-60%  $\text{VO}_2\text{max}$  (**Figure 7**), (Achten & Jeukendrup, 2004; Nordby *et al.*, 2006). Pour des intensités supérieures, OxAG diminue non seulement en terme relatif mais également absolu.  $\text{OxAG}_{\text{max}}$  et l'intensité qui lui correspond sont augmentés par l'entraînement à l'endurance (Nordby *et al.*, 2006). Cette baisse de la contribution d'OxAG dans l'énergétique de l'exercice musculaire modéré à intense a depuis fait l'objet de nombreuses études pour explorer les mécanismes de la régulation et de limitation d'OxAG.

Un élément déterminant qui intervient dans la régulation globale du métabolisme musculaire est la variation de l'état énergétique induite par l'exercice.

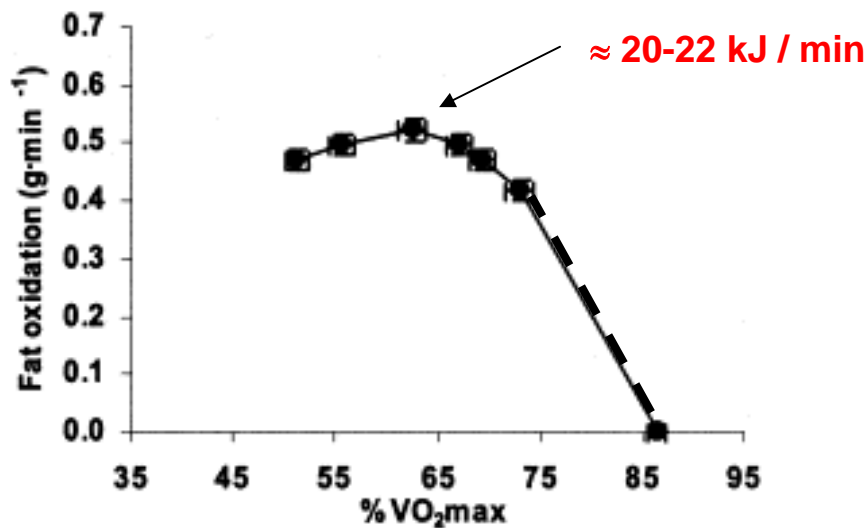


- 1, gouttière en U remplie d'eau pour assurer le joint de la cloche  
 2, dispositif de levage de la cloche  
 3, passage pour les câbles électriques  
 4, orifice pour le passage du tube des gaz expirés  
 5, orifice pour le passage d'air inspiré  
 6, voie d'entrée de l'air atmosphérique  
 7, voie de connexion avec les analyseurs externes  
 8, tubes de prélèvement de l'air de la chambre  
 9 et 10, ventilateurs pour mélanger l'air de la chambre  
 11, thermomètre et hygromètre  
 12, réservoir humidificateur de l'analyseur de gaz  
 13, dispositif de prélèvement d'échantillon de gaz  
 14, analyseur de Krogh  
 15, tube d'échantillonnage automatique pour l'analyseur de Krogh  
 16, thermomètre du gazomètre

**Figure 6:** Schéma du dispositif de travail ergométrique en chambre ventilée et de mesure des échanges gazeux utilisé par Krogh & Lindhard (1920).

R.Q.	Energy value of 1 l. O <sub>2</sub> Cal.	Cal. from carbohydrate	Cal. from fat	Per cent. energy from fat	$\frac{100(1 - R.Q.)}{1.00 - 0.71}$
0.71	4.795	0	4.795	100	100
0.75	4.829	0.647	4.182	86.6	86.3
0.80	4.875	1.530	3.345	68.6	69.0
0.85	4.921	2.411	2.510	51.0	51.8
0.90	4.967	3.295	1.672	33.65	34.5
0.95	5.012	4.175	0.837	16.7	17.2
1.00	5.058	5.058	0	0	0

**Tableau 1:** Tableau permettant l'évaluation du pourcentage d'énergie catabolique des lipides en fonction du quotient mesuré des échanges respiratoires. D'après Krogh & Lindhard (1920).



**Figure 7:** Utilisation des lipides par l'organisme entier au cours d'un exercice sur cycloergomètre réalisé à différents % de VO<sub>2</sub>max chez des sujets entraînés. D'après Achten & Jeukendrup (2004).

## II. Etat énergétique et contrôle du métabolisme lors de l'exercice: aperçu synthétique.

La concentration des nucléotides de l'adénine (ATP, ADP, AMP) est d'une importance centrale pour la fonction cellulaire et le contrôle du métabolisme. La concentration relative des nucléotides de l'adénine permet la définition de la charge énergétique  $(ATP + 0,5 ADP)/(ATP + ADP + AMP)$  introduite par (Atkinson, 1968), ou d'une autre façon des rapports ATP/ADP ou ATP/AMP. Plus de 90% d'ADP et d'AMP sont considérés comme fixés à des protéines et les concentrations libres cytosoliques métaboliquement actives (ADP<sub>libre</sub> et AMP<sub>libre</sub>) peuvent être calculées à partir des constantes d'équilibre des réactions liées à la créatine kinase et à l'adénylate kinase (Veech *et al.*, 1979). L'état énergétique diminue lorsque l'ATP est utilisé pendant l'exercice et les rapports ADP<sub>libre</sub> /ATP et AMP<sub>libre</sub> /ATP peuvent augmenter jusqu'à 6 et 30 fois respectivement (**Tableau 2**).

	Rest	40% VO <sub>2max</sub> at 10 min	75% VO <sub>2max</sub> at 10 min	100% VO <sub>2max</sub> during fatigue
PCr	26.4 ± 0.8	23.6 ± 0.7	11.2 ± 1.0	5.5 ± 1.6
Cr	11.6 ± 0.8	14.4 ± 0.6	26.7 ± 1.5	32.4 ± 1.1
ATP	8.4 ± 0.2	8.1 ± 0.2	8.1 ± 0.1	6.6 ± 0.2
ADP	1.15 ± 0.04	1.11 ± 0.03	1.21 ± 0.05	1.30 ± 0.03
AMP	0.043 ± 0.003	0.047 ± 0.003	0.047 ± 0.003	0.050 ± 0.003
ADP <sub>free</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	23	33	97	103
AMP <sub>free</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )	0.07	0.13	1.1	1.6
ADP <sub>free</sub> /ATP (related to rest)	1	1.5	4.4	5.9
AMP <sub>free</sub> /ATP (related to rest)	1	2.1	17.7	31.0

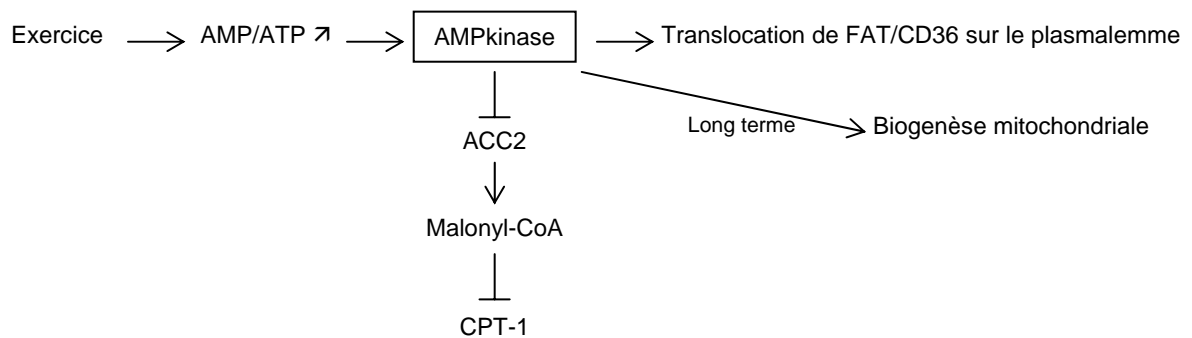
**Tableau 2:** Phosphates à haute énergie dans le muscle humain au repos et pendant des exercices à différentes puissances. Les valeurs ont été recalculées à partir des valeurs obtenues par Sahlin *et al.* (1987). Hormis pour ADP libre et AMP libre (μmol/L eau cellulaire), les concentrations des métabolites sont exprimées en mmol/L eau cellulaire. D'après Sahlin & Harris (2008).

L'augmentation des fractions libres d'ADP et d'AMP sont des signaux importants du contrôle métabolique et permettent la resynthèse de l'ATP par les processus aérobie et anaérobies. Tout d'abord, l'augmentation d'ADP<sub>libre</sub> oriente la réaction à l'équilibre de la créatine kinase vers la formation de l'ATP au dépend de la créatine phosphate (ADP + créatine phosphate → ATP + créatine). Egalement, la réduction de la charge énergétique favorise la production glycolytique de l'ATP puisque des enzymes régulateurs du métabolisme des sucres (glycogène phosphorylase et phosphofructo kinase) sont activés de façon allostérique par l'AMP (Connet & Sahlin, 1996). Enfin, la formation aérobie de l'ATP est stimulée par l'augmentation d'ADP<sub>libre</sub> /ATP qui active le complexe du pyruvate déshydrogénase (PDC), les enzymes du cycle TCA (isocitrate déshydrogénase et α-cétoglutarate déshydrogénase) et le contrôle des phosphorylations oxydatives (Meyer & Foely, 1996; Newsholme & Leech, 1983).

Un autre mécanisme par lequel l'état énergétique peut intervenir sur le métabolisme est constitué par l'AMP-kinase (AMPK). Cette protéine est activée par une augmentation de l'AMP et représente un régulateur majeur du métabolisme cellulaire (Hardie, 2004). AMPK activée stimule la translocation sur la membrane plasmique des protéines transporteuses des AG telle FAT/CD36 et FABPpm (Bonen *et al.*, 2007), ce qui facilite la capture des AG et OxAG. AMPK activée faciliterait également le transport d'AG dans la mitochondrie par l'inhibition de l'acétyl-CoA carboxylase 2 (ACC2) catalysant la formation du malonyl-CoA (MCoa) qui est un intermédiaire de la synthèse des AG et un inhibiteur de CPT1 (Hardie,



2011). Enfin, AMPK activée stimule la biogenèse mitochondriale, ce qui à terme favorise OxAG (**Figure 8**).



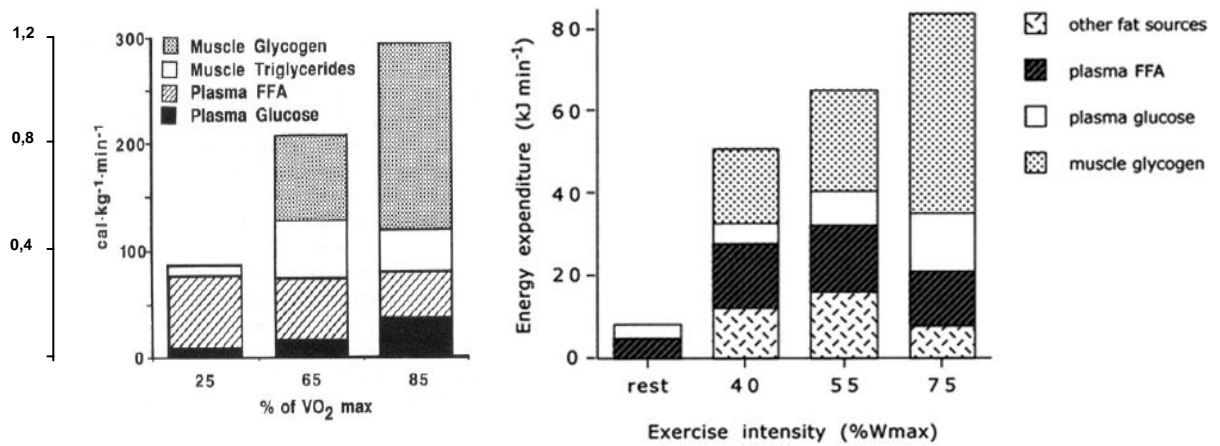
**Figure 8:** Rôle possible de l'état énergétique cellulaire dans le contrôle de l'oxydation des lipides.

Le contrôle de l'état énergétique est donc important dans l'homéostasie cellulaire et toute diminution d'ATP se traduit par des mécanismes d'ajustement de sa production. Ce rôle est particulièrement important pendant l'exercice.

### III. Contrôle de l'oxydation des lipides lors des exercices de faible intensité.

La part des lipides dans les substrats utilisés par le muscle est d'autant plus élevée que l'exercice est moins intense et poursuivi plus longtemps (Lacour, 2001).

Lors de l'exercice léger, inférieur à 50-60%  $VO_2$ max, l'activation du métabolisme oxydatif (cycle TCA, phosphorylation oxydative) liée aux signaux extra et intra musculaires (système nerveux et humoral, état énergétique musculaire) augmente à la fois OxAG et l'oxydation des sucres (OxCHO) (**Figure 9**).

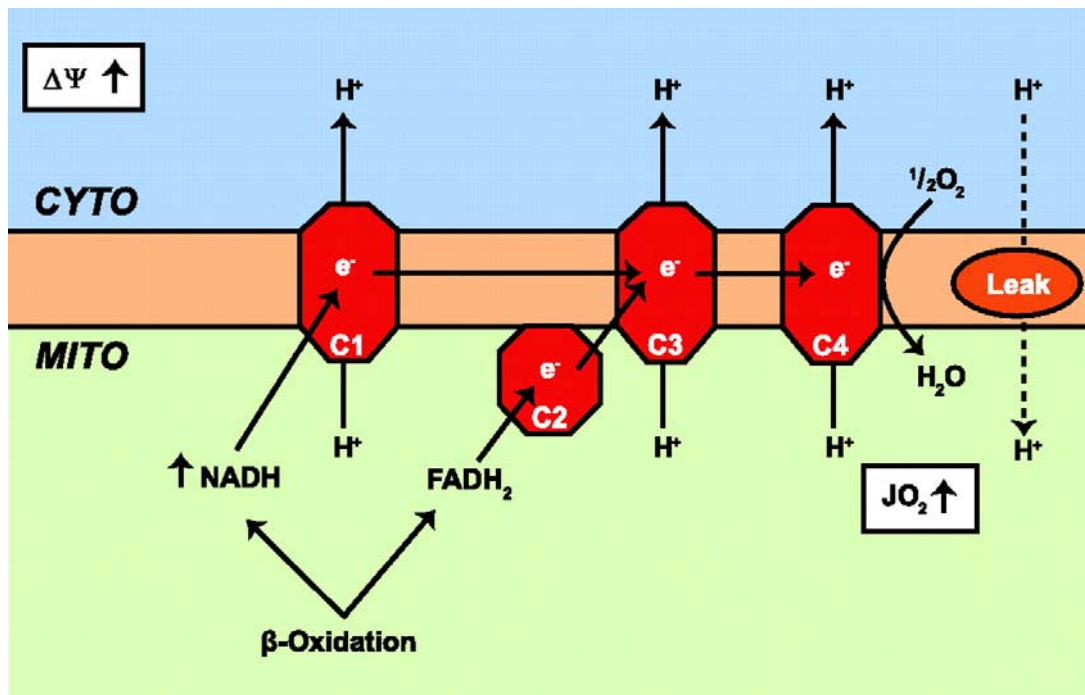


(Romijn *et al.*, 1993a)

(van Loon *et al.*, 2001)

**Figure 9:** Oxydation des substrats par l'organisme entier au cours d'un exercice sur cycloergomètre de 30 minutes de durée (à différents % VO<sub>2</sub>max) sans apport de glucides pendant l'exercice chez des sujets entraînés (VO<sub>2</sub>max voisine de 70 mL/min/kg pour les deux études). D'après Romijn *et al.* (1993a); van Loon *et al.* (2001).

En plus de ce contrôle métabolique général, d'autres mécanismes contribuent à activer plus spécifiquement OxAG, dont ceux liés à l'AMPK et ceux dépendants de la meilleure sensibilité des phosphorylations oxydatives induites par l'ADP en présence d'AG que de pyruvate (Sahlin *et al.*, 2007) attestée par la production de NADH. En effet, une augmentation de la concentration de NADH dans le tissu musculaire sous l'influence d'une charge en lipides, témoin d'une facilitation d'OxAG (**Figure 10**) a été observée au début de l'exercice de faible intensité (Odland *et al.*, 2000). La conséquence physiologique serait qu'une augmentation modérée d'ADP stimule préférentiellement OxAG au cours de l'exercice à faible intensité.



**Figure 10:** Stimulation de la respiration mitochondriale par les AGL. La β-oxydation des AG stimule la consommation d'oxygène mitochondriale (JO<sub>2</sub>) et augmente le rapport NADH/NAD et le potentiel de membrane mitochondrial (ΔΨ). D'après Hue & Taegtmeier (2009).

Cependant, devant la difficulté de déterminer la concentration réelle de NADH intra mitochondrial, il n'est pas possible de prouver définitivement cette hypothèse (Spriet & Watt, 2003; White & Schenk, 2012).

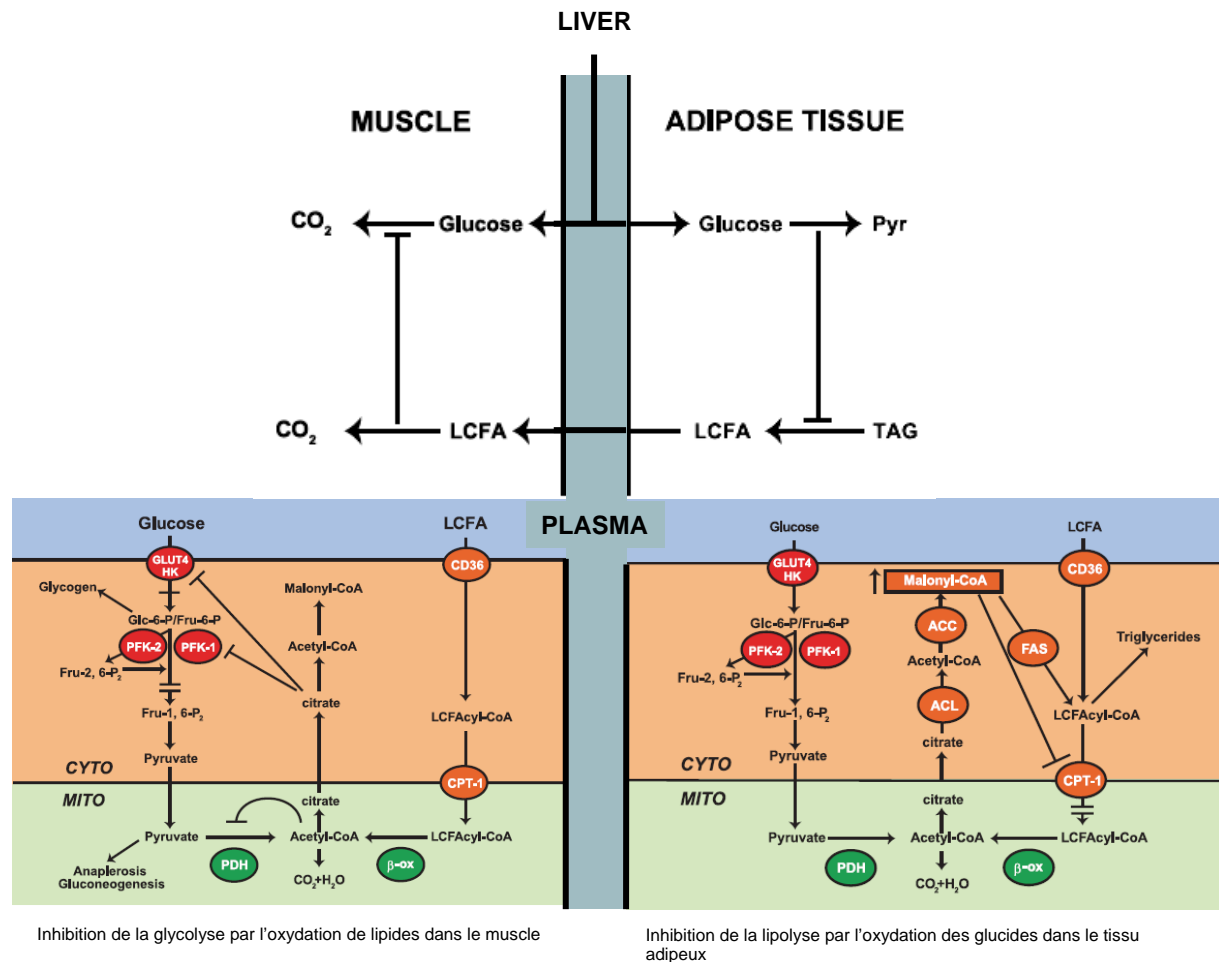
D'autres paramètres interviennent dans l'adaptation respective de la glycolyse et de la lipolyse au cours de l'exercice :

### 1. La disponibilité des substrats.

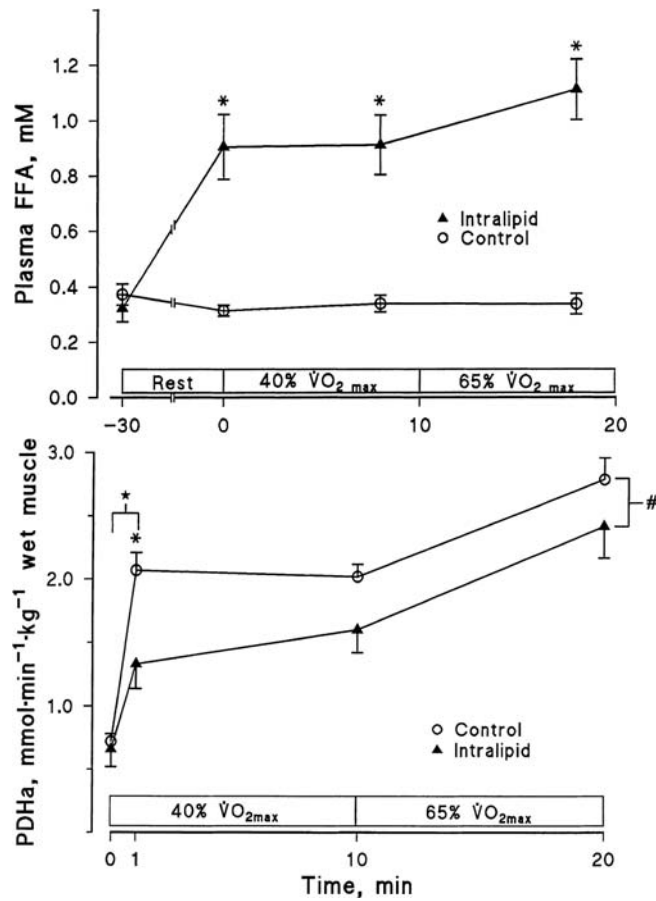
Toute variation de la disponibilité d'un substrat (glucide ou lipide) entraîne la variation inverse de l'utilisation de l'autre.

- Lors de l'augmentation de l'apport d'AG, un mécanisme a été proposé par Randle et al., dans les années 1960 sur le cœur de rat, étendu au muscle squelettique et rediscuté plus tard par Randle lui-même (Randle, 1998). La **Figure 11** résume les étapes de la glycolyse musculaire qui pourraient être inhibées par l'excès d'AG, selon la théorie de Randle, en particulier au niveau de PDH par le biais d'une augmentation du pyruvate déshydrogénase

kinase (Odland *et al.*, 2000) (**Figure 12**) mais également celui de PFK et du transport du glucose.



**Figure 11:** Résume les étapes de la glycolyse musculaire qui pourraient être inhibées par l'excès d'AG. D'après Hue & Taegtmeier (2009).

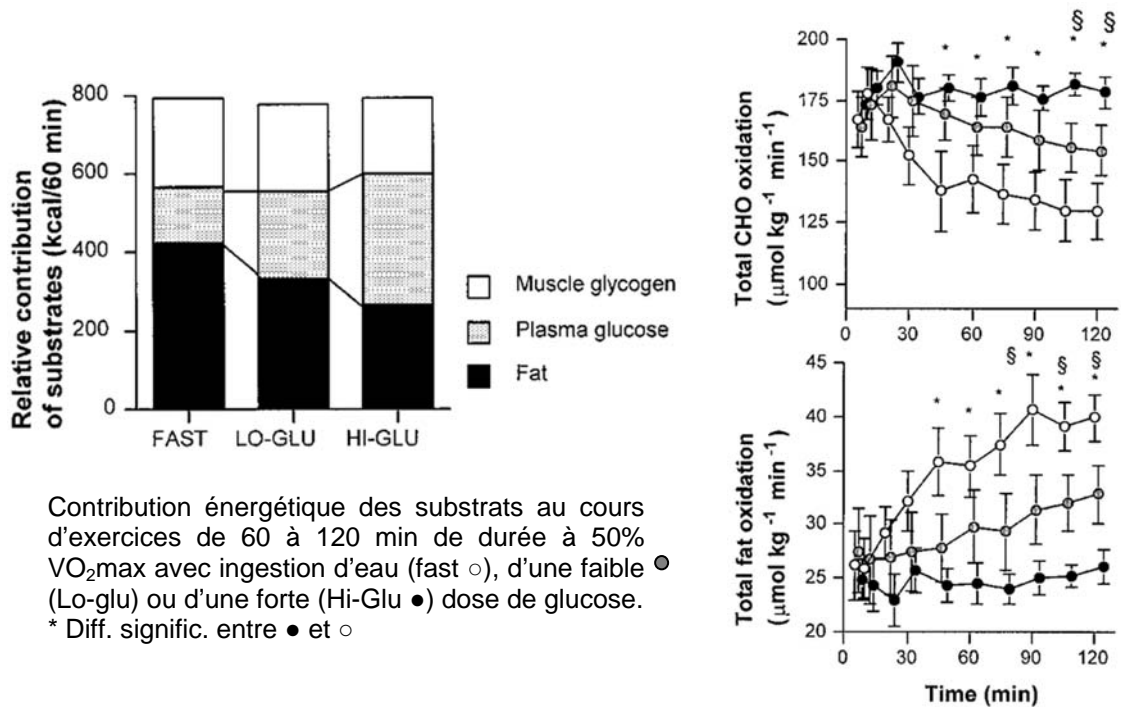


En haut, concentration d'AGL pendant 20 min de bicyclette ergométrique à 40 et 65 %  $\dot{V}O_{2max}$  sous perfusion d'Intralipid (émulsion pharmacologique de divers acides gras utilisée en perfusion pour certains cas de dénutrition) ou de sérum physiologique.

En bas, activité correspondante de la forme active de PDH (PDHa) dans le muscle vaste externe.

**Figure 12:** Glycolyse musculaire qui pourrait être inhibées par l'excès d'AG, en particulier au niveau de PDH par le biais d'une augmentation de pyruvate déshydrogénase kinase. D'après Odland *et al.* (2000).

• L'augmentation de l'apport de glucose pendant l'exercice à 50%  $VO_2$ max diminue OxAG par rapport à l'exercice contrôle (Jeukendrup *et al.*, 1999) (**Figure 13**).



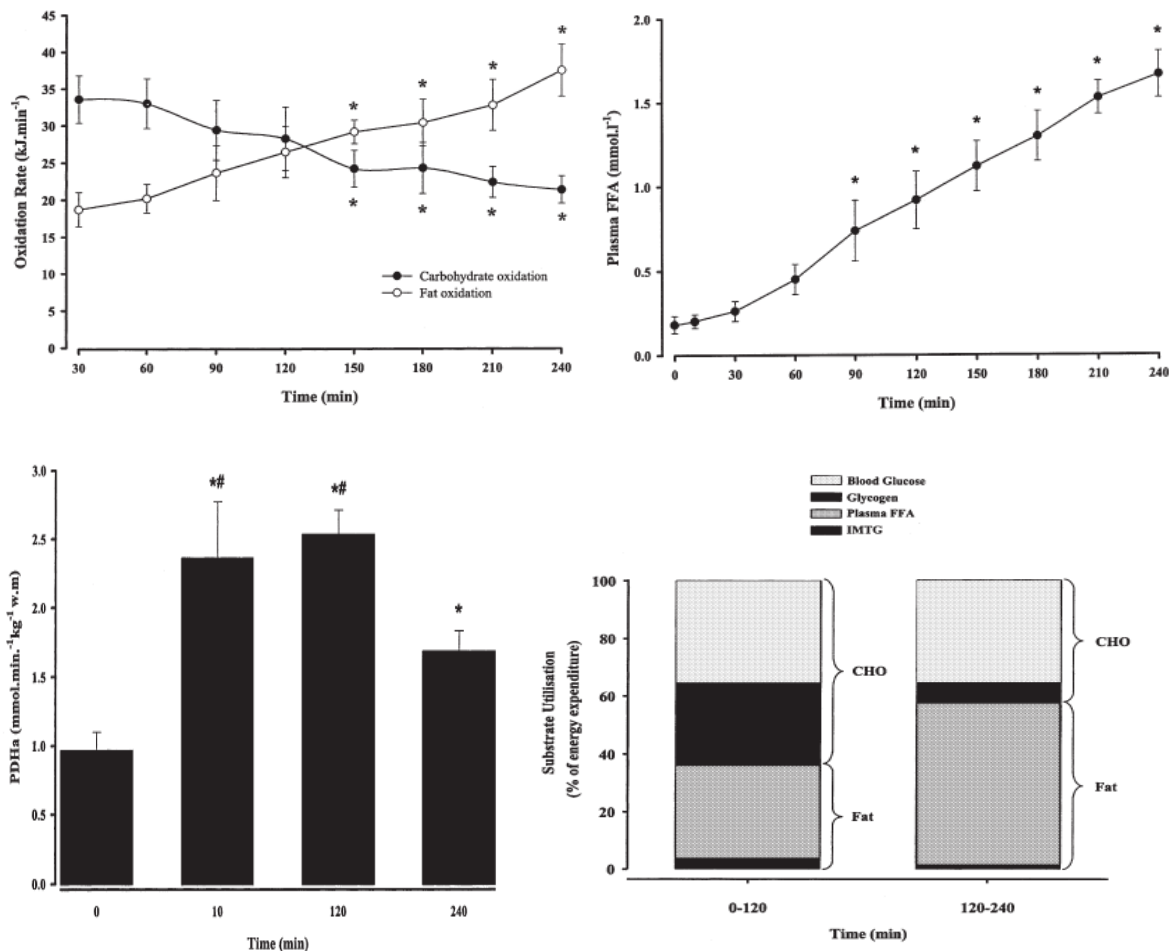
**Figure 13:** L'augmentation de l'apport de glucose pendant l'exercice à 50%  $VO_2$ max diminue OxAG par rapport à l'exercice contrôle. D'après Jeukendrup *et al.* (1999).

L'exercice d'endurance en hyperglycémie freine l'accumulation d'AMP mais ce phénomène ne s'accompagne pas d'une modification de l'activation d'AMPK (Lee-Young *et al.*, 2006). L'hyperglycémie induite s'accompagne d'une augmentation de l'insulinémie, elle-même responsable d'une diminution de la lipolyse du tissu adipeux et de l'apport d'AG au muscle (Coyle *et al.*, 1997). Dans cette même étude, l'oxydation du palmitate (AGLC, dépendante de CPT1) est diminuée par l'hyperglycémie et non celle de l'octanoate (AG à chaîne moyenne, indépendante de CPT1). Cette observation pourrait être compatible avec l'inhibition spécifique de CPT1 par le malonyl-CoA initialement appliquée au tissu adipeux (**Figure 11**) mais également au muscle via l'activation d'ACC2 induite elle-même par l'augmentation d'acétyl CoA (Hue & Taegtmeyer, 2009). Cependant, les concentrations de malonyl-CoA n'augmentent pas pendant l'exercice à 60%  $VO_2$ max (Dean *et al.*, 2000) et ne sont pas modifiées par l'hyperglycémie à 65%  $VO_2$ max (Roepstorff *et al.*, 2005).

Au total, les mécanismes de la diminution d'OxAG lorsque OxCHO augmente ne sont pas encore suffisamment expliqués.

## 2. La durée de l'exercice.

Lors de l'exercice prolongé, la contribution relative d'OxAG augmente progressivement au détriment d'OxCHO. La baisse régulière de la concentration musculaire de glycogène semble être la cause principale de celle d'OxCHO en association avec la baisse de l'activation de PDH en fin d'exercice (Watt *et al.*, 2002) (**Figure 14**).



**Figure 14:** Evolution d'OxAG et d'OxCHO au cours d'un exercice à 55% VO<sub>2</sub>max prolongé pendant 240 min. Modification de l'activité de PDH dans le même temps. D'après Watt *et al.* (2002).

## IV. Contrôle de l'oxydation des lipides lors des exercices aérobies à haute intensité.

D'après Jeppesen & Kiens (2012)

Lorsque l'exercice corps entier a été étudié avec l'utilisation d'AGLC marqués aux isotopes chez des sujets endurants entraînés, l'OxAG à 65% de VO<sub>2</sub>max est supérieure à celle

mesurée à 25% ou à 85 %  $VO_2\text{max}$  (Romijn *et al.*, 1993a). Malgré le haut niveau de dépense énergétique pendant l'exercice à intensité élevée, la vitesse de disparition (Rd) des AG plasmatiques et l'OxAG (**Figure 9**) sont diminuées en deçà des valeurs mesurées lors de l'exercice à intensité modérée.

L'inaptitude de l'OxAG à soutenir la demande énergétique pendant l'exercice intense pourrait être due soit à une déficience de la lipolyse du tissu adipeux et donc d'une insuffisance de la libération des AG aux muscles en activité, soit à une limitation de la capacité musculaire à oxyder les AG.

### **1. Libération des acides gras.**

Les AG contenus dans le plasma à destination des muscles en activité sont principalement fournis par la lipolyse de TAG en réserve dans le tissu adipeux (voir chapitre précédent). Pendant l'exercice léger à modéré la lipolyse des TAG plasmatiques par la lipoprotéine lipase (LPL) délivre également une quantité mineure d'AG au contenu plasmatique total (Kiens *et al.*, 1993; Morio *et al.*, 2004).

Pendant l'exercice intense, l'insuffisance lipolytique du tissu adipeux peut être due soit à un manque de stimulation de la lipolyse elle-même soit à une perfusion inadéquate du tissu adipeux. La concentration plasmatique des catécholamines, l'un des facteurs majeurs de régulation de la lipolyse du tissu adipeux, augmente de façon exponentielle avec l'intensité de l'exercice (Galbo *et al.*, 1975; Romijn *et al.*, 1993a). Dans l'étude de Romijn *et al.*, la vitesse d'apparition du glycérol (Ra), qui est utilisée comme témoin de la lipolyse du tissu adipeux<sup>2</sup>, n'est pas diminuée lors de l'exercice à 85%  $VO_2\text{max}$  par rapport à celle mesurée à 65%  $VO_2\text{max}$ . La concentration interstitielle du glycérol dans le tissu adipeux sous-cutané, qui est environ 10 fois supérieure à celle du muscle, augmente avec l'intensité de l'exercice jusqu'à 85% de la capacité maximale de travail de la jambe (Stallknecht *et al.*, 2004), ce qui indique que la lipolyse du tissu adipeux n'est pas diminuée lors de l'exercice intense. Cependant, aux intensités élevées, la forte concentration plasmatique en catécholamines peut amener à l'inhibition de la lipolyse du tissu adipeux par un mécanisme  $\alpha$ -adrénergique (Frayn, 2010). De plus, la forte réponse sympatho-adrénergique pendant l'exercice corps entier peut induire une diminution du débit sanguin du tissu adipeux (Bulow & Madsen, 1981). Ceci pourrait expliquer pourquoi une diminution de Ra des AGLC à partir du tissu adipeux est observée

---

<sup>2</sup> Le catabolisme du glycérol nécessite une phosphorylation par l'enzyme glycérol kinase, qui aurait une activité faible dans le muscle. C'est essentiellement le foie qui joue ce rôle, notablement diminué pendant l'exercice. Le glycérol est donc utilisé comme témoin de la lipolyse. Cependant cette estimation sous-entend que la lipolyse soit complète et que le glycérol ne soit pas réutilisé par le muscle. De ce fait, la lipolyse déterminée à partir du glycérol souffre d'une probable sous-estimation.



pendant l'exercice intense par rapport aux exercices légers ou modérés (Romijn *et al.*, 1993a; van Loon *et al.*, 2001) ce qui coïncide avec la diminution de la concentration plasmatique des AG ([AG]<sub>P</sub>) et de leur oxydation. Par ailleurs, lorsque les [AG]<sub>P</sub> sont augmentés jusqu'à 2 mmol/L par perfusion d'une émulsion lipidique et d'héparine (cette dernière augmente l'activité de LPL dans le plasma et donc l'hydrolyse des VLDL-TAG) pendant l'exercice intense, OxAG augmente de seulement 27% par rapport au même exercice réalisé sans perfusion (Romijn *et al.*, 1995). Il faut noter que OxAG est seulement restaurée partiellement en comparaison des niveaux observés à 65% VO<sub>2</sub>max, alors que [AG]<sub>P</sub> est supérieur à 2 mmol/L (Romijn *et al.*, 1995). Ces résultats ont été confirmés et étendus par van Loon *et al.* (2001) qui ont observé une diminution d'OxAG lors de l'exercice intense (72% VO<sub>2</sub>max) par rapport à des intensités plus légères (44% et 55% VO<sub>2</sub>max) malgré le maintien de la disponibilité des AG. De plus, lorsque l'exercice corps entier est réalisé chez des hommes volontaires en bonne santé, [AG]<sub>P</sub> diminue de 23% pendant l'exercice intense (90% VO<sub>2</sub>max) en comparaison à un exercice à 65%VO<sub>2</sub>max (Kiens *et al.*, 1999). Simultanément à la diminution de [AG]<sub>P</sub> à intensité élevée, il est observée une augmentation des AG intramyocellulaires (Kiens *et al.*, 1999). Vus dans leur ensemble, ces résultats sont de forts indicateurs que les limitations d'OxAG ne sont pas dues à la défaillance de leur libération par le tissu adipeux et qu'il faut en rechercher la cause dans la fibre musculaire. La diminution de [AG]<sub>P</sub> lors de l'exercice intense peut cependant être un phénomène qui s'ajoute à la défaillance de l'utilisation des AG par le muscle.

## **2. Transport à travers le sarcolemme.**

Des études se sont intéressées au rôle de FAT/CD36 dans l'augmentation aiguë de la captation des AG par le muscle lors de la transition du repos à l'exercice (Bonen *et al.*, 2000; Jeppesen *et al.*, 2011). La suggestion de FAT/CD36 comme régulateur dynamique de la captation des AG a été faite par Bonen *et al.* (2000) qui montrèrent que le transport de [<sup>3</sup>H] palmitate dans les vésicules sarcolemmales géantes (VSG) était supérieur dans des VSG issues de muscle de rat en contraction que celles obtenues de muscle au repos. De plus, cette modification de transport était corrélée à l'augmentation du contenu en CD36 membranaire induite par la contraction (Bonen *et al.*, 2000). Des résultats concordants ont montré que l'augmentation d'OxAG liée à la contraction est plus importante dans le muscle isolé de souris transgéniques surexprimant FAT/CD36 que dans celui de souris sauvages (Ibrahimi *et al.*, 1999), même si OxAG au repos est similaire dans les deux souches. Cela peut indiquer qu'un transfert plus important de FAT/CD36 à partir d'un compartiment intracellulaire jusqu'à la

membrane plasmique pendant la contraction musculaire est intervenu chez les souris transgéniques. Autrement dit, la surexpression de FAT/CD36 a pu faciliter un flux métabolique plus important d'AG que dans la souche sauvage.

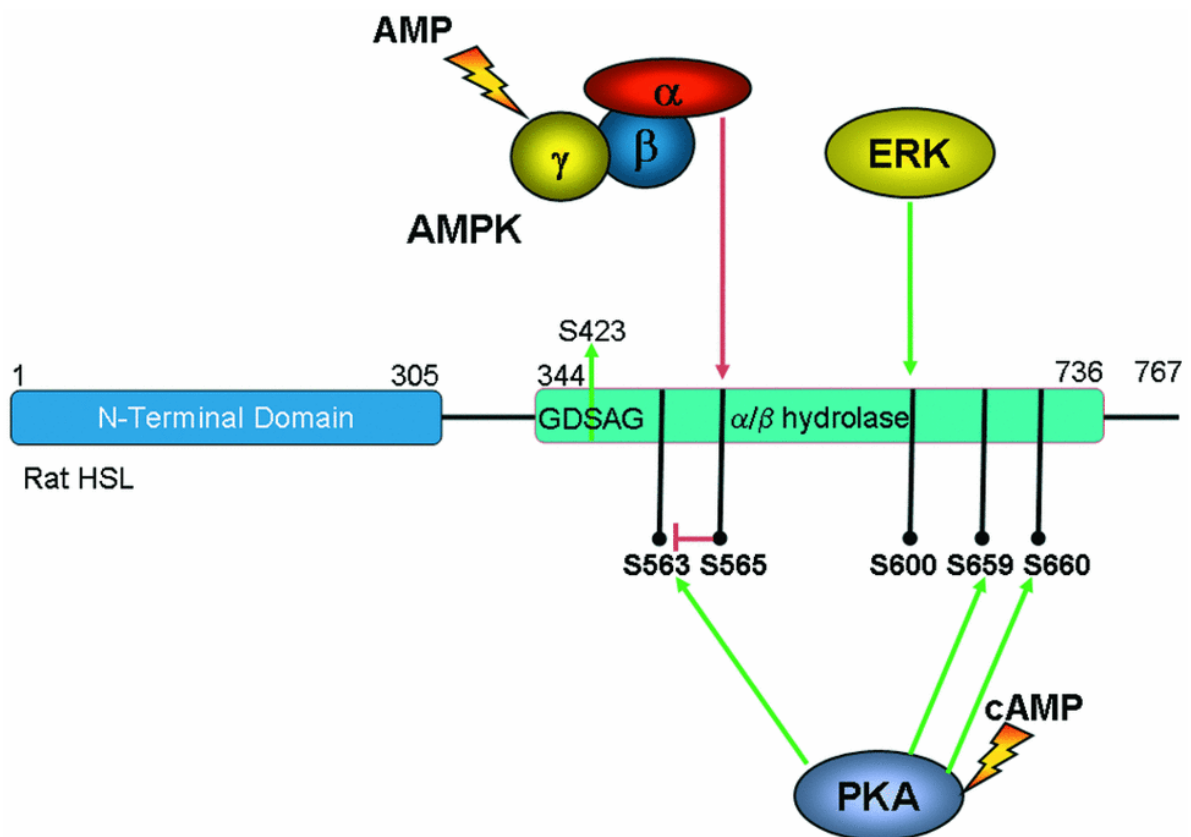
Le transport trans-sarcolemmal est-il limitant pour l'oxydation des AG lors de l'exercice intense? Comme indiqué plus haut, une accumulation d'AG intramyocellulaire a été observée dans le muscle vastus lateralis humain lors de l'augmentation de l'intensité de l'exercice de 65% à 90%  $VO_2$ max malgré une diminution de  $[AG]_p$  (Kiens *et al.*, 1999), ce qui suggère que le transport à travers le sarcolemme ne limiterait pas l'oxydation des AG à haute intensité d'exercice. Des résultats obtenus sur le modèle du muscle isolé perfusé de rat (Raney & Turcotte, 2006) ont révélé une relation entre la captation des AG et leur oxydation, mais seulement à des intensités de contraction faibles ou modérées. Lorsque l'intensité s'accroît encore, la captation des AG reste supérieure à celle des niveaux de base alors que l'OxAG diminue jusqu'au niveau du repos (Raney & Turcotte, 2006), ce qui confirme que le transport des AG à travers la membrane n'est pas un facteur limitant pour l'OxAG lors du passage à l'exercice intense.

### **3. TAG intramusculaire.**

Les réserves intramyocellulaires de TAG (IMTG) dans les muscles striés représentent une importante source d'énergie pour l'OxAG. Le niveau d'utilisation d'IMTG pendant l'exercice dépend de l'intensité, de la durée et du mode d'exercice, du statut alimentaire, du niveau d'IMTG avant l'exercice, du niveau d'entraînement et du sexe des sujets (voir revue (Kiens, 2006)). L'utilisation de la technique du  $^1H$ -MRS à des hommes volontaires courant à 60-70% de  $VO_2$ max montre une diminution du contenu d'IMTG dans le soleus et le tibialis anterior alors que la course à 80-90%  $VO_2$ max ne s'accompagne d'aucune variation d'IMTG dans chacun des muscles (Brechtel *et al.*, 2001). De même, l'utilisation d'IMTG n'est pas retrouvée à haute intensité dans le modèle de l'extenseur isolé (Helge *et al.*, 2007b; Stallknecht *et al.*, 2004) alors que différentes méthodes de mesure d'IMTG ont été utilisées.

Comme dans le tissu adipeux, la lipolyse d'IMTG est régulée par TGLA, HSL et MGL (Watt *et al.*, 2006). Seules quelques études se sont intéressées à l'effet de l'intensité de l'exercice sur l'activité des lipases. L'activité d'HSL est augmentée lors de l'exercice en parallèle avec les contractions musculaires et la stimulation adrénergique. Watt *et al.* (2003) ont montré que l'activité d'HSL mesurée chez des hommes à trois niveaux d'intensité (30%, 60% et 90% de  $VO_2$ max) était augmentée de façon similaire par rapport au repos pour tous les niveaux, ce qui confirme les résultats initiaux de Kjaer *et al.* (2000). Watt *et al.* (2004a) ont

montré que la baisse de la disponibilité des AG plasmatiques pendant l'exercice, provoquée par l'ingestion d'acide nicotinique, induit l'augmentation de l'hydrolyse d'IMTG malgré l'absence d'activation d'HSL. Il se pourrait que les régulateurs allostériques d'HSL (dont l'influence n'est pas mesurée dans les essais in vitro de l'activité HSL) surpassent la régulation covalente d'HSL liée à la phosphorylation de différents résidus sérine (Watt & Steinberg, 2008), (**Figure 15**).



**Figure 15:** Séquence d'HSL de rat. Action des kinases activatrices (en vert) ou inhibitrices (en rouge) sur les sites de phosphorylation des sérines. D'après Watt & Steinberg (2008).

En effet, AMPK apparaît un régulateur négatif d'HSL pendant la contraction. Lors d'une stimulation physiologique d'AMPK au cours de l'exercice chez l'homme, par une déplétion initiale en glycogène musculaire, l'activation d'HSL est diminuée (Watt *et al.*, 2004b). Cette observation, confirmée par des expériences pharmacologiques in vitro et sur des cultures est compatible avec le concept de compétition entre des kinases activatrices et inhibitrices, ce qui pourrait participer à l'explication de la diminution de la lipolyse lors de l'exercice intense (Watt & Steinberg, 2008). Cet effet n'est cependant pas retrouvé dans l'étude de Roepstorff *et al.* (2004). Par ailleurs, les acyl-CoA, inhibiteurs allostériques d'HSL, peuvent réduire

l'activité *in vivo* d'HSL en particulier pendant l'exercice intense qui s'accompagne de l'accumulation d'AG intramusculaire (Kiens *et al.*, 1999). Dans l'étude de Watt *et al.* (2004a), la baisse d'[AG]<sub>p</sub> induite par l'acide nicotinique a pu diminuer la concentration intramusculaire d'acyl-CoA et ainsi limiter l'inhibition allostérique d'HSL.

Au total, il manque encore des preuves expérimentales plus nettes pour affirmer que la diminution de la lipolyse d'ITMG soit l'origine principale de la limitation de l'OxAG pendant l'exercice intense.

#### **4. Métabolisme mitochondrial.**

Les AGLC captés par la cellule sont activés en acyl-CoA par l'action de l'acyl-CoA synthétase (LC-ACS). Outre la localisation cytosolique et mitochondriale de certains isoformes d'ACS d'autres, dont ACS1, sont intégrés à la membrane plasmique (Glatz *et al.*, 2010), ce qui suggère que les AGLC nouvellement incorporés sont immédiatement estérifiés au contact de la membrane plasmique. La rapidité de l'estérification permet de maintenir une faible concentration intracellulaire d'AGLC et contribue au maintien de leur capture.

##### **a. Malonyl-Coa et CPT-1.**

L'importance du transporteur membranaire mitochondrial CPT-1 dans l'OxAGLC est montrée par la baisse marquée de l'oxydation de AG lors du blocage de CPT-1 par l'étomoxir (Dzanko *et al.*, 2008). De plus, l'électroporation de M-CPT1 dans le muscle de rat s'accompagne d'une augmentation simultanée de 30% de l'activité maximale de CPT-1 et de 24% de l'oxydation du palmitoyl-CoA dans les mitochondries isolées (Bruce *et al.*, 2007). Des résultats antérieurs avaient montré que CPT-1 est fortement régulée par la concentration du malonyl-CoA dans le muscle (Bird & Saggerson, 1984) et qu'il existe une relation étroite entre la concentration du malonyl-CoA et la diminution de l'OxAG dans le muscle au repos à la fois chez le rat et chez l'homme (Bavenholm *et al.*, 2000; Chien *et al.*, 2000). La formation du malonyl-CoA à partir de l'acétyl-CoA dans le muscle est catalysée par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). Un des moyens de régulation d'ACC nécessite une phosphorylation et son inactivation par AMPK. Pendant l'exercice, AMPK et la phosphorylation d'ACC sont augmentées ce qui aboutit à l'inactivation d'ACC (Richter & Ruderman, 2009). Ceci devrait induire pendant l'exercice la diminution du contenu en malonyl-CoA musculaire, l'augmentation de l'activité de CPT-1 et en conséquence l'augmentation OxAGLC.

La relation entre malonyl-CoA et OxAG observée au repos n'est pas nette pendant l'exercice chez l'homme. Dans une série d'expériences, il existe une divergence entre les

concentrations de malonyl-CoA, la captation des AG et OxAG chez l'homme à l'exercice (Dean *et al.*, 2000; Odland *et al.*, 1996; Odland *et al.*, 1998; Roepstorff *et al.*, 2005). Lorsque l'intensité de l'exercice est augmentée de 65% à 90% VO<sub>2</sub>max chez des hommes, le malonyl-CoA musculaire ne varie pas bien qu'OxAG estimée par RER diminue nettement (Odland *et al.*, 1998). Ceci a été confirmé par Dean *et al.* (2000) qui ont montré que l'augmentation de l'intensité de contraction du quadriceps de 60% à 85% de la capacité de travail puis ensuite jusqu'à épuisement s'accompagne d'une diminution de la concentration de malonyl-CoA, malgré l'augmentation de RER de 0,84 à 0,99. Des résultats plus récents, où la teneur initiale de glycogène était modifiée pour induire des OxAG faibles ou élevées pendant un exercice à 65% VO<sub>2</sub>max (Roepstorff *et al.*, 2005), ont montré d'importantes différences d'OxAG sans changement du contenu en malonyl-CoA. Dans leur ensemble ces résultats suggèrent que le contenu en malonyl-CoA n'est pas un régulateur majeur d'OxAG dans le muscle à l'exercice. Il faut cependant noter que l'effet d'éventuelles variations locales de malonyl-CoA telles qu'au voisinage de la mitochondrie n'est pas connu.

#### **b. Acétyl-CoA, carnitine et CPT-1.**

Hormis les effets régulateurs de la carnitine pour l'entrée des AG dans la mitochondrie, des études ont révélé un autre rôle important de la carnitine. A titre d'exemple, les muscles du vol chez la mouche contiennent beaucoup de carnitine mais n'utilisent pas d'AG lors de leur action motrice (Childress *et al.*, 1967). Au lancement du vol, la concentration d'acétylcarnitine est multipliée par 4, de même que celle du pyruvate (Childress *et al.*, 1967). A partir de ces observations, il fut proposé que la carnitine pouvait agir comme accepteur de groupement d'acétyl à partir de l'acétyl-CoA en formant de l'acétylcarnitine, une réaction catalysée par l'enzyme mitochondriale carnitine acétyltransférase (CAT), lorsque l'acétyl-CoA est produit plus vite que sa vitesse d'utilisation par le cycle de Krebs. De ce fait, CoASH peut être régénéré ce qui permet à la glycolyse de se poursuivre jusqu'à l'acétyl-CoA. Ces données initiales ont été confirmées par des résultats obtenus chez l'animal et chez l'homme. En effet, il a été montré dans plusieurs études chez l'homme que le contenu d'acétylcarnitine musculaire augmente avec l'intensité de l'exercice (Constantin-Teodosiu *et al.*, 1991; Odland *et al.*, 1998; Sahlin, 1990; van Loon *et al.*, 2001) simultanément à une baisse de la carnitine libre (Constantin-Teodosiu *et al.*, 1991; Sahlin, 1990; van Loon *et al.*, 2001). Dans la revue de Stephens *et al.* (2007), les résultats compilés de quatre études différentes illustrent qu'une courte période de 4 minutes d'exercice à différentes intensités est suivie d'une diminution progressive du contenu musculaire en carnitine libre de 75% de la carnitine totale au repos à

20% à 75%  $VO_2\text{max}$ . De plus, l'augmentation de l'acétylcarnitine compense la diminution de la carnitine. Par ailleurs, à intensité faible d'exercice, ni la carnitine libre ni l'acétylcarnitine ne changent par rapport aux valeurs de repos (Stephens *et al.*, 2007). Ces résultats confirment la notion que la carnitine agit comme l'accepteur de groupement acétyl en formant de l'acétylcarnitine, lorsque la vitesse de production d'acétyl-CoA par la glycolyse à haute intensité d'exercice dépasse sa vitesse d'utilisation par le cycle de Krebs. D'autre part, puisque l'activité de CPT-1 dépend de la présence de carnitine (McGarry *et al.*, 1983), un contenu faible en carnitine peut induire une baisse de l'activité de CPT-1. En conséquence, cela amène à une baisse de l'apport d'AGLC-CoA pour la  $\beta$ -oxydation et limite donc OxAGL pendant l'exercice intense. Ainsi, une disponibilité élevée de pyruvate, la formation d'acétyl CoA et l'"enrôlement" de la carnitine libre pendant l'exercice intense permettent d'envisager le mécanisme par lequel OxAG est dérégulée (**Figure 16**).

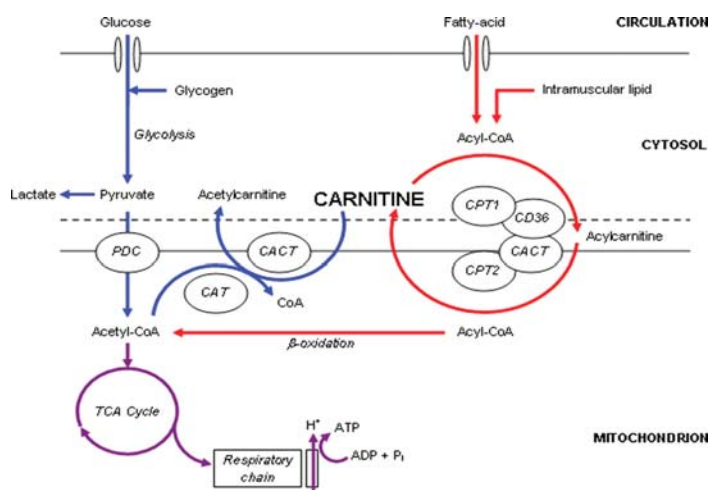


Diagramme schématisant des rôles de la carnitine dans le muscle.

- L'action de la carnitine dans la translocation des acides gras à longue chaîne dans la matrice mitochondriale pour entrer ensuite dans la  $\beta$ -oxydation est soulignée en rouge.

- L'intervention de la carnitine comme tampon de l'excès d'acétyl-CoA, en particulier lors de l'exercice d'endurance intense, est soulignée en bleu.

- PDC, complexe pyruvate déshydrogénase ; TCA, cycle de l'acide tricarboxylique ; CACT, carnitine acétyltransférase ; CACT, carnitine acétylcarnitine translocase ; CPT1, carnitine palmitoyltransférase ; CD36, fatty acid translocase.

**Figure 16:** Des rôles de la carnitine dans le muscle. D'après Stephens *et al.* (2007).

Il a été montré récemment que lorsque les réserves préexercice de glycogène sont élevées, l'OxAG est diminuée de 2,5 fois lors d'un exercice de 60 min à 65%  $VO_2\text{max}$  par rapport au même exercice réalisé avec un niveau bas de glycogène préexercice (Roepstorff *et al.*, 2005). Ceci est accompagné par un niveau bas de carnitine libre pour le glycogène élevé, l'inverse étant vrai pour le glycogène bas. Ce résultat soutient la notion qu'une réduction de carnitine libre limite la capacité de CPT-1 de transporter AGLC dans la mitochondrie et ainsi limite aussi la vitesse d'OxAG à des intensités modérées.

Dans une étude récente par Wall *et al.* (2011), 14 volontaires masculins en bonne santé ont ingéré un supplément de carnitine (associé à des sucres) pendant 24 semaines, ce qui a

induit une augmentation de 21% de la carnitine totale musculaire. Cette augmentation de carnitine a été associée à une réduction de 55% de l'utilisation du glycogène au cours d'un exercice à 50%  $VO_2$ max en comparaison à des sujets contrôles non soumis au supplément en carnitine. Lorsque l'intensité de l'exercice est augmentée à 80%  $VO_2$ max, il n'y a pas de différence entre les groupes pour l'utilisation du glycogène mais la concentration de lactate est 44% plus basse dans l'essai carnitine que chez les témoins (Wall *et al.*, 2011). Ces résultats indiquent qu'à haute intensité d'exercice, la formation de l'acétyl-CoA, probablement essentiellement dépendante du flux glycolytique élevé, est prise en charge par la carnitine et prévient ainsi une inhibition de l'activation de PDC liée à l'augmentation du rapport acétyl-CoA/CoASH (Cooper *et al.*, 1975). L'étude de Wall *et al.* (2011) apporte des arguments à cette hypothèse en montrant une activité plus importante de 38% de PDC et un contenu plus élevé d'acétylcarnitine (+16%) dans le muscle au cours de l'exercice à 80%  $VO_2$ max dans le groupe avec supplément de carnitine par rapport aux témoins. Du fait que RER et d'autres mesures de l'OxAG n'ont pas été effectuées, il n'est pas possible d'après ces résultats d'évaluer l'action du supplément de carnitine sur OxAG lors de l'exercice modéré ou intense. Il ne peut donc être ni confirmé ni exclu que l'augmentation de la disponibilité de la carnitine peut augmenter OxAG pendant l'exercice intense.

- Conclusion.

OxAG pendant l'exercice est soumise à plusieurs niveaux possibles de régulation métabolique, s'étalant de la lipolyse du tissu adipeux jusqu'au métabolisme mitochondrial musculaire. Cependant, si l'accent est mis sur l'étude des limitations d'OxAG lors de la transition entre l'exercice d'intensité modérée à celui plus intense, il semble que le facteur métabolique le plus convaincant soit la carnitine musculaire, élément essentiel de la régulation de CPT-1 et donc d'OxAG. Pendant l'exercice intense, l'important flux glycolytique apporte aux mitochondries une quantité importante d'acétyl-CoA qui est incorporée à la carnitine libre par sa transformation en acétylcarnitine. En conséquence, une baisse du contenu de carnitine libre peut réduire l'activité de CPT-1 et donc la capacité de transport des AG dans la mitochondrie et la vitesse d'OxAG. De ce fait, la dégradation rapide du glycogène et le flux glycolytique élevé pourrait avoir un impact déterminant sur l'inhibition d'OxAG. L'absence d'autre mécanisme clairement identifié permet de croire que la carnitine soit le régulateur direct majeur d'OxAG dans la transition de l'exercice modéré à intense.

## **C. Oxydation musculaire des lipides, lipides intramyocellulaires et optimisation de la performance à l'exercice d'endurance.**

Des concentrations basses de glycogène liées à la fois à l'alimentation et à l'exercice sont associées avec la fatigue pendant l'exercice submaximal d'endurance ( $< 85\% \text{ VO}_{2\text{max}}$ ) au-delà d'une durée de 2 heures (Bergstrom *et al.*, 1967). La déplétion en glycogène est fonction de sa concentration initiale (pré-exercice) et sa vitesse d'utilisation pendant un exercice donné. De ce fait, des stratégies nutritionnelles pour améliorer la performance d'endurance permettent d'augmenter la disponibilité des glucides en maximisant leurs stocks musculaire et hépatique dans les jours et les heures précédant une compétition et en apportant des glucides au cours de la compétition (Burke, 2003). Cependant, la vitesse d'utilisation du glycogène au cours de l'exercice est fonction de sa concentration initiale (Hargreaves *et al.*, 1995; Helge, 2000). De plus, consommer des glucides immédiatement avant ou pendant l'exercice augmente la vitesse de l'oxydation des glucides par l'organisme (Arkininstall *et al.*, 2001; Coyle *et al.*, 1986). En conséquence, une stratégie alternative pour retarder la fatigue ou améliorer la performance serait d'augmenter la disponibilité et/ou la capacité d'OxAG en diminuant de façon concomitante la vitesse d'utilisation du glycogène (Hawley *et al.*, 1998).

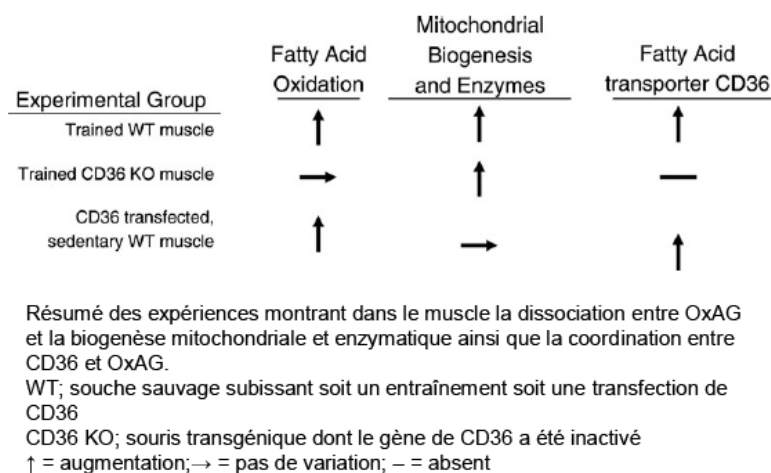
### **I. Apport de l'entraînement à l'endurance.**

L'entraînement en endurance (EE) s'accompagne d'adaptations métaboliques qui augmentent OxAG et diminuent l'utilisation du glycogène pendant l'exercice submaximal à  $60\text{-}85\% \text{ VO}_{2\text{max}}$  (Holloszy & Coyle, 1984; Romijn *et al.*, 1993b; Smekal *et al.*, 2003; Turcotte *et al.*, 1992). L'augmentation du recours à OxAG est en général attribué à une augmentation de la densité mitochondriale simultanée à des adaptations enzymatiques liée à OxAG ainsi qu'à une diminution des concentrations d'ADP et d'AMP responsables de l'activation des enzymes de la glycolyse; glycogène phosphorylase (PHOS), phosphofructokinase (PFK) et pyruvate déshydrogénase (PDH). La résistance à la fatigue lors de l'exercice prolongé est augmentée par EE (Hawley, 2002; Holloszy & Coyle, 1984). Ceci s'accomplit via l'augmentation de la densité capillaire (Hermansen & Wachtlova, 1971) et des protéines de transport membranaire du glucose et des acides gras (Andersen *et al.*, 1993; Talanian *et al.*, 2010) ainsi que du volume mitochondrial et de l'activité des enzymes représentatifs des principales voies métaboliques; citrate synthétase,  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA-deshydrogénase, cytochrome *c* oxydase IV, aspartate aminotransférase et PDH (Chi *et al.*, 1983; Gollnick *et*



*al.*, 1972; Hoppeler *et al.*, 1973; Perry *et al.*, 2008; Talanian *et al.*, 2010). Ces adaptations permettent d'améliorer le maintien du contrôle métabolique (équilibre de la production d'ATP par les processus oxydatifs par rapport à son hydrolyse) et de l'état énergétique des fibres musculaires (moins d'accumulation d'ADP et d'AMP) au cours d'exercice submaximaux de haute intensité (Hawley, 2002). De plus, EE augmente la capacité de stockage du glycogène et d'IMTG (Gollnick *et al.*, 1972; Hoppeler *et al.*, 1973). Ces adaptations aboutissent à l'augmentation d'OxAG et à la diminution d'OxCHO au cours de l'exercice submaximal de longue durée à intensités relative ou absolue identiques entre avant et après EE (Hawley, 2002; Hawley & Stepto, 2001; Holloszy *et al.*, 1998).

L'adaptation à EE des étapes d'OxAG telles que les augmentations franches des protéines de transport et du potentiel mitochondrial pourraient apparaître coordonnées. Il est cependant possible d'observer *in vivo* une augmentation d'OxAG induite par l'accroissement de CD36 sans variation du potentiel mitochondrial. A l'inverse, l'augmentation des capacités oxydatives ne s'accompagne pas de celle d'OxAG si CD36 ne peut s'adapter (**Figure 17**). Le niveau d'OxAG n'est donc pas exclusivement dépendant de l'augmentation du potentiel mitochondrial (Yoshida *et al.*, 2012).



**Figure 17:** Dissociation entre OxAG, biogenèse mitochondriale et enzymatique. D'après Yoshida et al. (2012).

## II. Apport de la nutrition.

Un régime gras (~70% lipides, 15% glucides) de courte durée augmente également OxAG et préserve le glycogène musculaire pendant l'exercice submaximal lorsqu'il est pratiqué chez des sujets déjà bien entraînés. Cette "adaptation aux graisses" est un protocole

qui se compose du régime gras et pauvre en glucides poursuivi jusqu'à 14 jours tout en poursuivant l'entraînement normal. Ce régime peut être entrepris de façon isolée (Lambert *et al.*, 1994; Phinney *et al.*, 1983) ou être suivi d'une période de restauration des glucides se terminant par une alimentation hyperglucidique (~70% glucides, 15% lipides) et une baisse de l'intensité de l'entraînement pendant 1-3 jours (Burke *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2001). Ces deux régimes, lorsqu'ils sont comparés à un régime glucidique isoénergétique, s'accompagnent d'une augmentation d'OxAG par l'organisme et diminuent l'utilisation de glycogène pendant l'exercice qui les suivent (Burke *et al.*, 2000; Carey *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 1994; Phinney *et al.*, 1983). Il faut noter que l'augmentation d'OxAG après régime gras s'effectue sans modification du volume mitochondrial, ce qui implique que les mécanismes d'adaptations sont différents de ceux observés lors de l'entraînement traditionnel. Le bénéfice en performance n'est pas observé de façon univoque: certaines études décrivent des améliorations (Lambert *et al.*, 1994; Muoio *et al.*, 1994; Venkatraman *et al.*, 2001) d'autres aucune (Phinney *et al.*, 1983). De plus ce régime n'est pas bien toléré par tous les athlètes ce qui peut conduire à une diminution des capacités d'entraînement (Yeo *et al.*, 2008). Il apparaît cependant que le régime gras hypoglucidique de 14 jours suivi de 1-3 jours d'alimentation hyperglucidique permette de retrouver un stock de glycogène élevé avant la compétition. Cette surcompensation de glycogène n'inhibe pas l'augmentation d'OxAG au cours de l'exercice comme c'est le cas lorsque le régime hyperglucidique est utilisé seul (Burke *et al.*, 2000; Stellingwerff *et al.*, 2006; Yeo *et al.*, 2008).

Des réactions d'adaptation au régime gras ont été identifiées à plusieurs niveaux de l'utilisation des lipides et des glucides par la fibre musculaire.

- augmentation de FAT/CD36 (Cameron-Smith *et al.*, 2003)
- augmentation de l'activité de CPT1 (Goedecke *et al.*, 1999)
- augmentation de l'activation d'AMPK et de la phosphorylation d'ACC (Yeo *et al.*, 2008)
- augmentation d'IMTG (Yeo *et al.*, 2008)
- augmentation de l'utilisation d'IMTG au cours de l'exercice (Van Proeyen *et al.*, 2011b)
- augmentation des capacités oxydatives (Turner *et al.*, 2007)
- augmentation de l'activité d'HSL (Stellingwerff *et al.*, 2006)
- diminution de l'activité de PDH au repos (Peters *et al.*, 2001; Peters *et al.*, 1998) et au cours de l'exercice (Stellingwerff *et al.*, 2006).

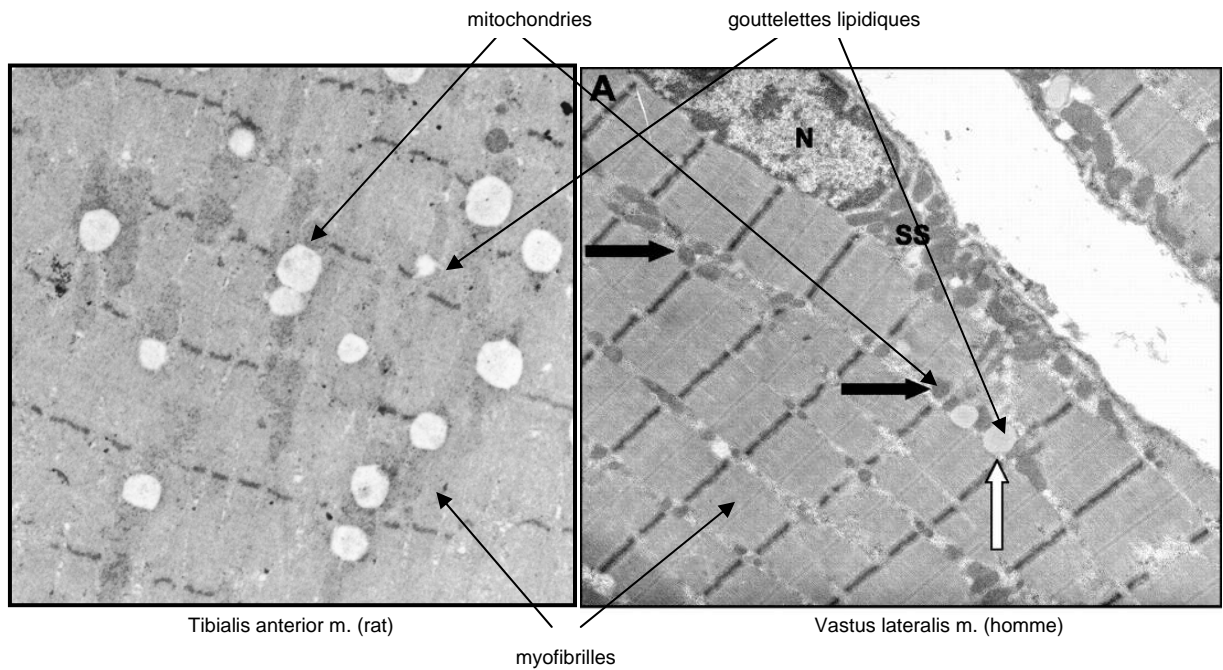
Cette alimentation hyperlipidique ne s'applique que sur une période limitée pour des athlètes chez lesquels les capacités métaboliques et les dépenses énergétiques quotidiennes sont élevées (Yeo *et al.*, 2011). Chez les sujets sédentaires ou peu actifs, pour lesquels ce type d'alimentation est peu étudié, le régime gras induit une diminution du rendement énergétique à l'exercice qui pourrait être lié au découplage mitochondrial et s'accompagne d'une diminution de certaines capacités cognitives (Edwards *et al.*, 2011). Cependant, chez des sujets non sportifs, les augmentations de l'expression génique témoignant d'une flexibilité métabolique vers l'oxydation des lipides (PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , protéine découplante UCP3) sont retrouvées chez les sujets de poids normal mais pas chez les obèses (Boyle *et al.*, 2011).

#### **D. Les triglycérides intramusculaires.**

La présence de triglycérides dans le muscle (IMTG) a été décrite par Denton & Randle (1967). Dès lors, des travaux montrèrent que les IMTG pouvaient être utilisés comme source énergétique pendant l'exercice (Carlson *et al.*, 1971). Au cours des années 1990, l'association de l'accumulation des IMTG et de la résistance à l'insuline a été observée (Pan *et al.*, 1995). Les techniques analytiques pour la quantification des lipides intramyocellulaires (composés principalement d'IMTG) sous forme de gouttelettes lipidiques (GL) se sont développées. Les colorations histologiques avec l'huile rouge et la spectroscopie de résonance magnétique au proton ( $^1\text{H}$  SRM) (Dube & Goodpaster, 2006) ont facilité l'étude des IMCL et incité un renouveau d'intérêt à la fois dans leur rôle énergétique et dans leur relation avec RI.

##### **I. Histologie et biologie de la gouttelette lipidique dans le muscle.**

Les GL sont le lieu de stockage des lipides soit dans le tissu adipeux, où une gouttelette occupe tout le cytoplasme de l'adipocyte (Suzuki *et al.*, 2011) soit dans les autres cellules de l'organisme en particulier dans le muscle où elles se présentent sous la forme de micro gouttelettes de taille variable selon leur degré de fusion à partir des gouttelettes primitives de 0,1-à 0,4  $\mu\text{m}$  (Olofsson *et al.*, 2009). Le processus de fusion est contrôlé par les protéines SNARE (Boström *et al.*, 2007). Les GL sont formées à partir des membranes microsomiales du réticulum endoplasmique (Meex *et al.*, 2009). Dans le muscle elles sont localisées à proximité des mitochondries et du réticulum sarcoplasmique (**Figures 18**).

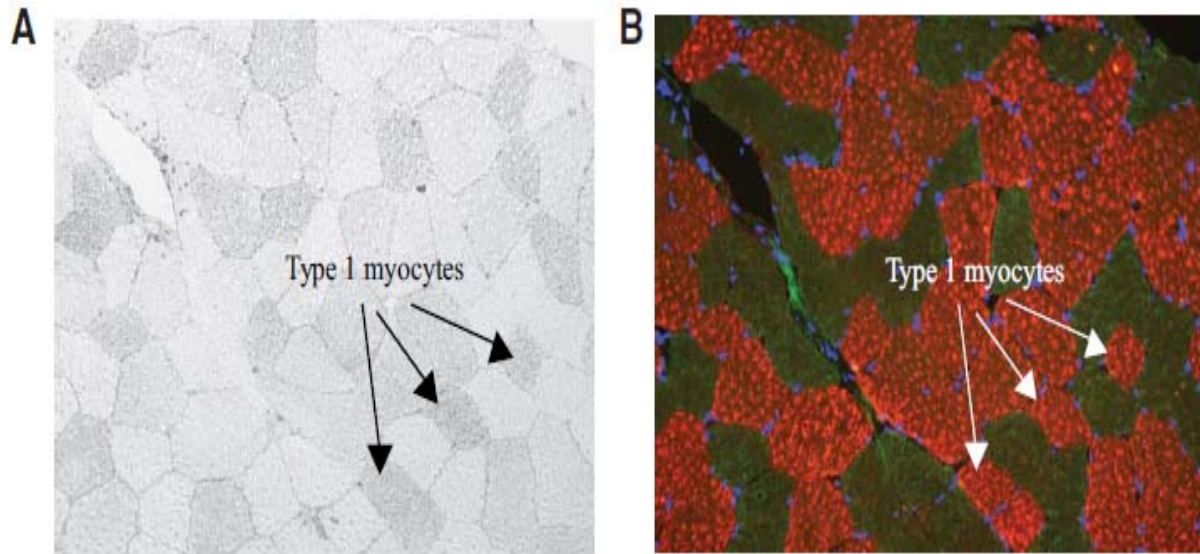


Schrauwen-Hinderling *et al.* (2006)

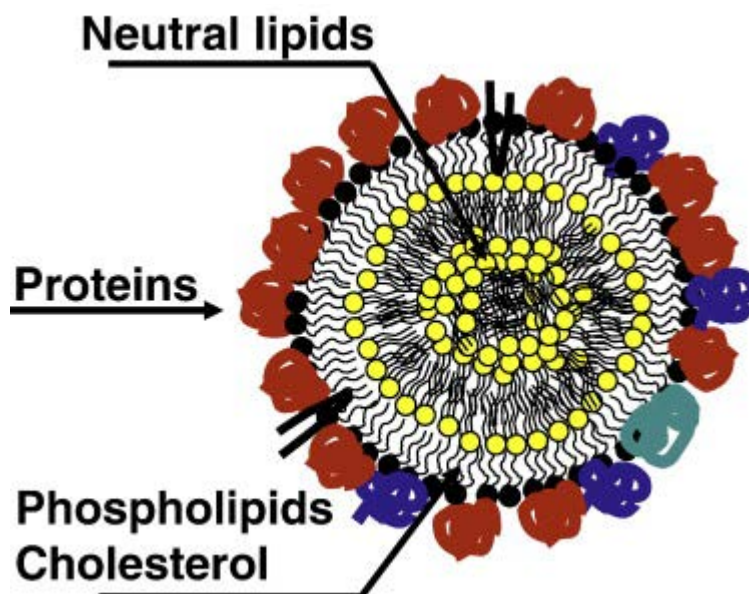
Tarnopolsky *et al.* (2007)

**Figure 18:** Mise en évidence des lipides intramyocellulaires en microscopie électronique. D'après Schrauwen-Hinderling *et al.* (2006); Tarnopolsky *et al.* (2007)

Elles sont plus abondantes dans les fibres de type I que dans celles de type II, de façon concomitante avec la plus grande capacité oxydative des fibres de type I (**Figure 19**) (Coen *et al.*, 2010). Les GL contiennent principalement des TAG mais également des DAG, des esters de cholestérol et du cholestérol libre et sont entourées d'une mono membrane phospholipidique (Murphy, 2001; Olofsson *et al.*, 2009) (**Figure 20**).



**Figure 19:** Mise en évidence des gouttelettes lipidiques par la réaction à l'huile rouge (A) en parallèle à la typologie des fibres musculaires par immunohistochimie (anticorps MYH-7 pour les fibres 1 et MYH-2 pour les fibres 2, (B)). D'après Coen *et al.* (2010).



**Figure 20:** La gouttelette lipidique est constituée d'un cœur de lipides neutres (triglycérides et esters de cholestérols) entouré d'une mono couche de molécules amphipathiques telles que des phospholipides, du cholestérol et des protéines. D'après Olofsson *et al.* (2009).

Les GL remplissent de nombreux rôles biologiques dynamiques dans la cellule. La fonction des GL est dépendante de plus de 100 protéines qui recouvrent la membrane (Bartz *et al.*, 2007) et coordonnent la synthèse et la dégradation des TAG, le trafic des vésicules, la signalétique cellulaire et la fusion et la fission des GL. Les protéines les plus étudiées sont la périlipine et celles de la famille des PAT (PLIN2-5) qui possèdent également une homologie avec la périlipine au niveau du N-terminal (d'où le terme périlipin amino-terminal ou PAT), *l'adipose differentiation-related protein* (ADRP), *tail-interacting protein 47* (TIP-47), *S3-12 and OXPAT/myocardial lipid droplet protein* (MLDP) (Bickel *et al.*, 2009).

- La périlipine est essentiellement exprimée dans les adipocytes et les cellules stéroïdogéniques; elle a également été retrouvée dans le muscle squelettique (Dalen *et al.*, 2004). Sa phosphorylation et son action coordonnée avec TGLA et CGI-58 permettent la lipolyse des TAG (Olofsson *et al.*, 2009).

- PLIN2 (ADRP) est exprimé dans un plus grand nombre de tissus que la périlipine, dont le muscle squelettique humain (Meex *et al.*, 2009). Un rôle fonctionnel d'ADPR dans le muscle squelettique est encore à décrire: cependant des études dans d'autres types cellulaires tels que le foie suggèrent que PLIN2 pourrait agir comme une protéine d'assemblage pour la formation des GL (Varela *et al.*, 2008). Chez des animaux soumis à une alimentation grasse, l'inhibition de l'expression de ADRP dans les hépatocytes induit une diminution du contenu de TAG et de RI (Varela *et al.*, 2008). Dans le muscle squelettique de cyclistes d'endurance, PLIN2 est deux fois plus élevé dans les fibres de type I que dans celles de type II et seulement 60% des GL contiennent PLIN2 (Shaw *et al.*, 2009), ce qui suggère une hétérogénéité dans la population de GL.

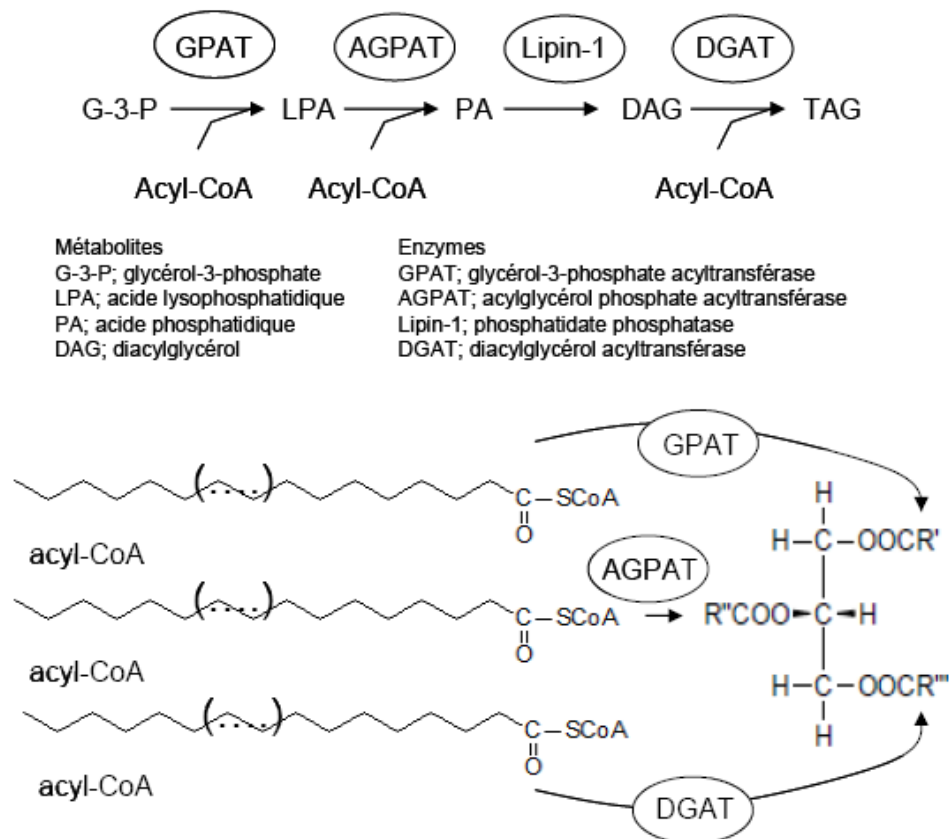
- PLIN3 (TIP47) est exprimé dans le muscle squelettique et bien que son rôle ne soit pas confirmé, il pourrait intervenir dans la synthèse de GL (Bulankina *et al.*, 2009).

- PLIN4 (S3-12), également exprimé dans le muscle (Dalen *et al.*, 2004) n'a pas de fonction définie.

- PLIN5 (OXPAT), la mieux caractérisée des protéines PAT, est considérée comme une protéine d'assemblage pour la lipolyse et il a été montré qu'elle interagit avec LHS, le gène d'identification comparative (CGI-58) et TGLA (Granneman *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011). PLIN5 est fortement exprimée dans le muscle, est localisée avec la mitochondrie et avec les GL et est étroitement associée au contenu en IMTG (Minnaard *et al.*, 2009). PLIN5 et PLIN2 sont colocalisés avec GL d'une manière hétérogène et la contraction musculaire n'affecte pas

leur recrutement par les GL (MacPherson *et al.*, 2012). Dans l'ensemble, ces études suggèrent un rôle important de PLIN5 dans la régulation de l'oxydation des AG.

Quelques 50-60% des AG captés par le muscle sont estérifiés en TAG pour constituer des réserves pour le métabolisme oxydatif (Sacchetti *et al.*, 2004). Les étapes de la biosynthèse sont schématisées dans la (Figure 21).



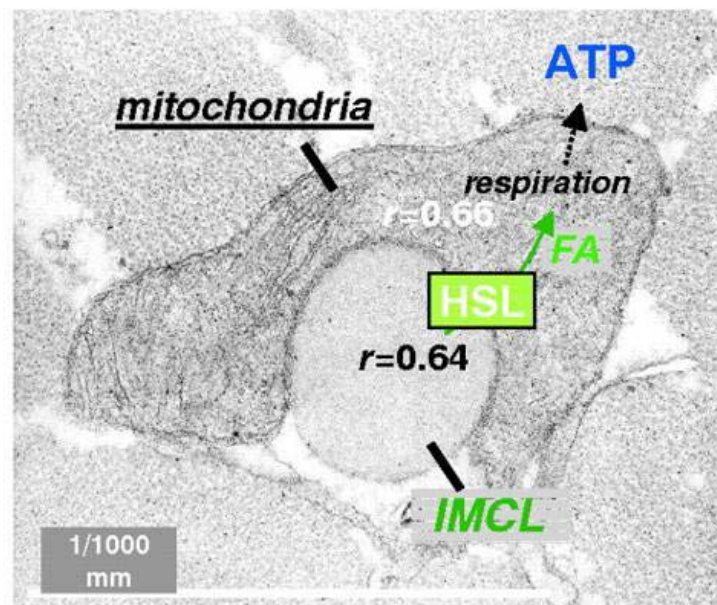
**Figure 21:** Résumé simplifié de la synthèse de TAG applicable aux fibres musculaires. D'après Shaw *et al.* (2010).

Quatre isomères de GPAT sont présents dans le muscle: GPAT1 et 2 au niveau de la membrane mitochondriale et sont aussi nommés mGAPT alors que GPAT3 et 4 se trouvent sur le réticulum endoplasmique. Toutes les autres étapes de la synthèse de TAG se déroulent dans le réticulum endoplasmique.

Dans le muscle squelettique, la mobilisation séquentielle des AG à partir des IMTG dans les GL est contrôlée par LHS, TGLA et la monoacylglycérol lipase. L'hydrolyse de TAG par TGLA libère des AG et du DAG (Yang *et al.*, 2010; Zimmermann *et al.*, 2004). LHS agit essentiellement sur DAG mais peut également hydrolyser TAG, MAG et les esters du

cholestérol. L'activité de LHS pendant l'exercice est régulé par la protéine kinase PKA, la kinase extracellulaire régulée par le signal (ERK) et AMPK (Watt *et al.*, 2006). La contraction musculaire induit également la translocation de LHS vers les GL pour faciliter la lipolyse. L'expression génique de LHS dont l'activité s'effectue préférentiellement au contact des GL a été trouvée corrélée avec le volume mitochondrial et le volume des GL, ce qui peut illustrer les liens fonctionnels étroits entre GL et mitochondries (Fluck, 2006) (**Figure 22**). LHS et TGLA interviennent de façon coordonnée pour réguler la lipolyse musculaire; leur activité discordante est responsable de la lipolyse perturbée dans le muscle squelettique de sujets obèses (Blaak *et al.*, 2004).

$$Vv(li,f) \approx [HSL \text{ mRNA}] \approx Vv(mt,f)$$



**Figure 22:** L'expression génique de LHS dont l'activité s'effectue préférentiellement au contact des GL a été trouvée corrélée avec le volume mitochondrial et le volume des GL, ce qui peut illustrer les liens fonctionnels étroits entre GL et mitochondries. D'après Fluck (2006).

## II. IMTG comme source énergétique lors de l'exercice.

L'oxydation des AGL du plasma contribue à environ 50-70% de l'oxydation totale des lipides pendant l'exercice d'intensité modérée (Romijn *et al.*, 1993a; van Loon *et al.*, 2001). Il existe donc une autre source lipidique qui participe à OxAG (van Loon, 2004; Watt *et al.*,

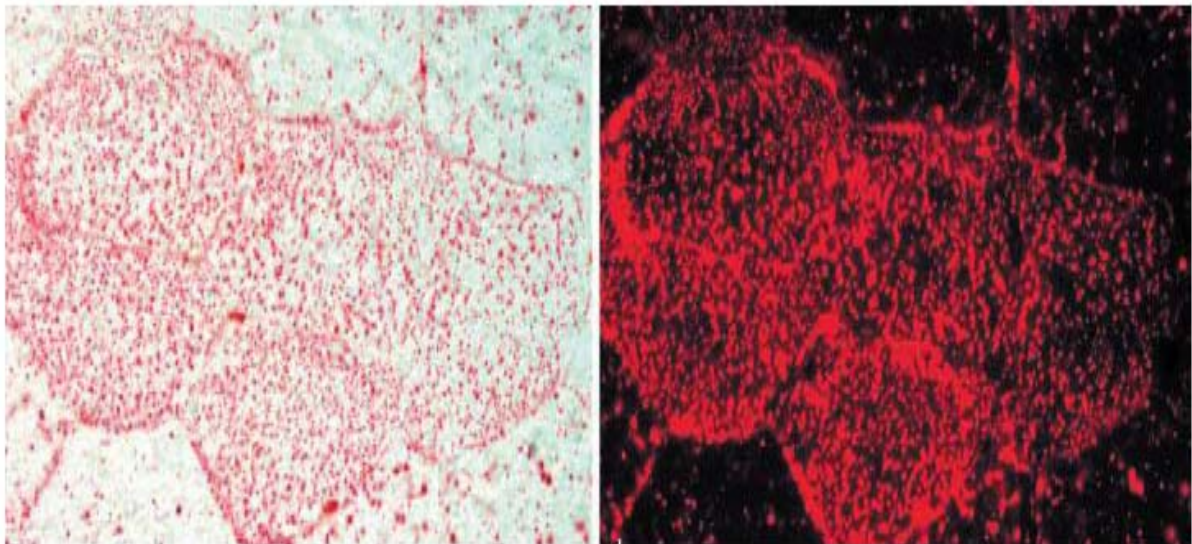


2002). Parmi celles-ci, comme vu dans un chapitre précédent, la part la plus importante semble prise par IMTG. Le consensus n'est cependant pas complet lorsqu'on reprend le cheminement des études et leurs contradictions jusqu'à une période récente, souvent liées à la méthode de détermination d'IMTG.

### 1. Présentation simplifiée des méthodes de mesure d'IMTG.

- *dosage chimique* (Chernick, 1969; Folch *et al.*, 1957). L'extraction des lipides s'effectue avec du chloroforme sur de la poudre musculaire (5-10mg) obtenue à partir de tissu lyophilisé après dissection des adipocytes, du sang et de l'excès de tissu conjonctif. La fraction de chloroforme est ensuite évaporée, le culot traité à l'acide silicique pour enlever les phospholipides. Le résidu est saponifié et le glycérol libéré est dosé par fluorimétrie (Bergmeyer, 1974).

- *coloration histochimique ou immunohistochimique* (Goodpaster *et al.*, 2000; Koopman *et al.*, 2001). Le colorant huile rouge O (HRO) se fixe sur les lipides neutres, essentiellement TAG. La mise en contact d'une solution alcoolisée d'HRO avec des coupes transversales (6-10 $\mu$ m d'épaisseur) de micro faisceaux musculaires permet la coloration des gouttelettes lipidiques dans le cytosol des fibres musculaires. L'observation en microscopie optique s'effectue soit en lumière naturelle soit en épifluorescence (**Figure 23**).



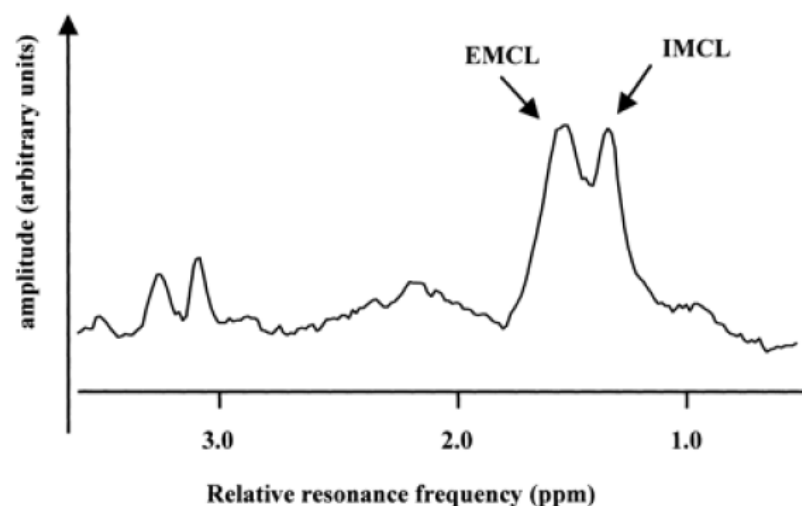
**Figure 23:** Mise en évidence des gouttelettes lipidiques par la technique de l'huile rouge O en microscopie optique soit en lumière naturelle (gauche) soit en épifluorescence (droite). D'après Koopman *et al.* (2001).

Le niveau de densité optique mesurée dans le cytosol de chaque fibre permet d'en quantifier la densité de gouttelettes lipidiques. La densité n'est pas homogène dans le cytosol et la plus forte population de GL est retrouvée dans les régions sous sarcolemmales, surtout dans les fibres oxydatives chez les sujets entraînés en endurance (Stellingwerff *et al.*, 2007b).

- *coloration histochimique par BODIPY 493/503* (Alsted *et al.*, 2013; Prats *et al.*, 2006; Spangenburg *et al.*, 2011). Initialement utilisé pour le tissu adipeux, le 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentaméthyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene (BODIPY 493/503) est également utilisé pour la quantification d'IMTG et la morphologie des GL dans le muscle, en association avec la microscopie confocale.

- *microscopie électronique* (Howald *et al.*, 2002). Des coupes ultrafines (50-70 nm) de faisceaux de fibres préalablement fixés avec une solution de glutaraldéhyde sont observables en microscopie électronique (**Figure 18**). Par l'analyse de clichés multiples, la mesure de la densité des GL peut être effectuée. Une méthode stéréologique a été récemment décrite (Broskey *et al.*, 2013).

- *spectrométrie de résonance magnétique du proton,  $^1H$  SRM* (Boesch & Kreis, 2000). L'usage d'un appareil d'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM) couplé à une sonde de spectrométrie permet d'identifier des ondes du spectre spécifiques des lipides intra- et extramyocellulaires (**Figure 24**). La taille du pic correspondant est proportionnelle au contenu moyen du tissu musculaire contenu dans un volume voisin de 2 mL localisé sur l'IRM (Howald *et al.*, 2002).



**Figure 24:** Mise en évidence des lipides intramyocellulaires (IMCL) par spectroscopie RMN du proton dans le muscle vastus lateralis (homme). EMCL représente les lipides extra cellulaires entre les faisceaux de fibres. D'après Schrauwen-Hinderling *et al.* (2006).

- au niveau de l'organisme entier, il est possible grâce à des techniques par marqueurs isotopiques stables (palmitate marqué au  $^{13}\text{C}$ ) d'estimer le niveau d'utilisation d'IMTG (Guo *et al.*, 2000; Romijn *et al.*, 1993a; Stellingwerff *et al.*, 2007a; van Loon *et al.*, 2001). L'utilisation combinée des données relatives au débit de perfusion de l'AG marqué ainsi que celles des échanges respiratoires au cours de l'exercice permettent de calculer OxAG de l'organisme entier auquel est soustrait OxAG plasmatique, la différence correspondant à l'utilisation d'IMTG (van Loon *et al.*, 2003a).

## **2. Confrontation des données obtenues par les différentes techniques.**

De nombreuses équipes utilisant la microscopie en immunofluorescence sur des sections transversales de tissu musculaire colorées à HRO ont montré une diminution nette du contenu en lipides des fibres de type 1 à la suite d'un exercice chez des sujets en bonne santé (De Bock *et al.*, 2005; Koopman *et al.*, 2001; van Loon *et al.*, 2003a; van Loon *et al.*, 2003b). Ces données sont en accord avec les études utilisant  $^1\text{H}$  SRM (Rouffet *et al.*, 2013; White *et al.*, 2003). Cependant une controverse existe encore en ce qui concerne le rôle de substrat énergétique d'IMTG lors de l'exercice. Ceci provient d'études utilisant la méthode de mesure biochimique de TAG après extraction sur le tissu musculaire où certaines ont décrit une diminution significative des lipides intramusculaires à la suite d'un exercice (Bergstrom *et al.*, 1973; Carlson *et al.*, 1971; Costill *et al.*, 1973; Essen *et al.*, 1977; Phillips *et al.*, 1996; Watt *et al.*, 2002) et d'autres non (Bergman *et al.*, 1999; Kiens & Richter, 1998; Roepstorff *et al.*, 2002; Starling *et al.*, 1997; Wendling *et al.*, 1996). De plus des diminutions significatives d'IMTG après exercice ont été observées chez les femmes et pas chez les hommes (Roepstorff *et al.*, 2006; Roepstorff *et al.*, 2002; Steffensen *et al.*, 2002). Bien que les analyses biochimiques d'extrait de TAG apportent des résultats quantitatifs sur le contenu en lipides du tissu musculaire, ceux-ci permettent de différencier ni les contenus des différents types de fibres ni la répartition entre l'intérieur et l'extérieur des fibres musculaires. Ces limitations sont probablement en partie responsables de la grande variabilité des résultats obtenus par la technique biochimique (Watt *et al.*, 2002). L'utilisation en parallèle de différentes méthodes de mesure ou d'estimation (De Bock *et al.*, 2007; Howald *et al.*, 2002; Stellingwerff *et al.*, 2007b) montre la faible reproductivité de la méthode biochimique alors que les méthodes microscopiques photoniques ou électroniques ainsi que la spectrométrie RMN du proton apparaissent plus fiables et confirment l'utilisation d'IMTG au cours de l'exercice.

### **3. Effet de l'entraînement sur le contenu et l'utilisation d'ITMG pendant l'exercice chez le sujet en bonne santé de poids normal.**

L'entraînement en endurance induit une augmentation simultanée des réserves d'ITMG et des capacités oxydatives musculaires (Pruchnic *et al.*, 2004; Schrauwen-Hinderling *et al.*, 2003; Shepherd *et al.*, 2012; Tarnopolsky *et al.*, 2007). Chez le sujet sédentaire, la part des AG plasmatiques dans OxAG au cours de l'exercice est majoritaire (Sacchetti *et al.*, 2002; van Hall *et al.*, 2002; van Loon *et al.*, 2003a). Après EE la contribution d'ITMG s'accroît essentiellement par l'augmentation de l'utilisation d'ITMG des fibres de type 1 (Shepherd *et al.*, 2012; Van Proeyen *et al.*, 2011b; Van Proeyen *et al.*, 2011a). Ceci est associé à l'augmentation de l'expression musculaire d'ATGL par l'entraînement (Alsted *et al.*, 2009). Chez le sujet entraîné, il existe une corrélation entre le contenu d'ITMG de repos et la dégradation d'ITMG pendant l'exercice (Shepherd *et al.*, 2012; Stellingwerff *et al.*, 2007b). Une relation de cause à effet pourrait être évoquée par le fait que la répétition d'exercices liés à l'entraînement avec utilisation métabolique d'ITMG s'accompagne lors de la récupération d'un accroissement des enzymes responsables de la synthèse d'ITMG telles que mGPAT et DGAT (Schenk & Horowitz, 2007; Shaw *et al.*, 2010) et de sa lyse (Alsted *et al.*, 2009).

L'augmentation du contenu en ITMG est en rapport avec celle du nombre de gouttelettes lipidiques et non de leur volume (Shepherd *et al.*, 2012; Tarnopolsky *et al.*, 2007), ce qui permet de maintenir un rapport surface/volume élevé, élément morphologique favorable aux échanges (Shepherd *et al.*, 2012). Cette adaptation des GL est associée à l'augmentation des protéines PLIN2 et/ou PLIN 5 sous l'effet de EE (Amati *et al.*, 2011; Peters *et al.*, 2012; Shepherd *et al.*, 2012).

### **III. Les triglycérides musculaires et leur relation avec la résistance à l'insuline.**

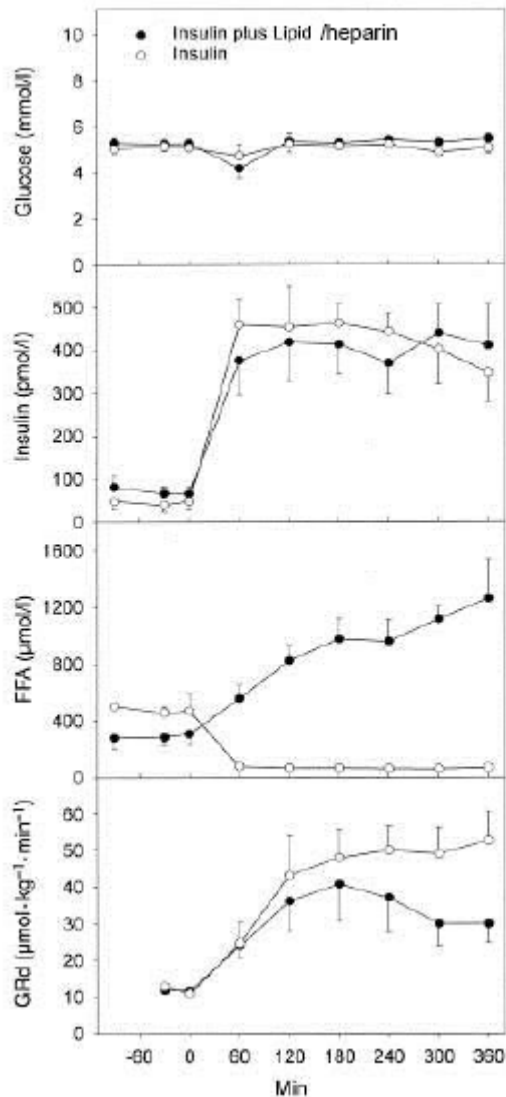
#### **1. Données générales succinctes sur la résistance à l'insuline.**

L'insuline est une hormone anabolisante majeure dont l'action primordiale est de contribuer à la différenciation et la croissance des tissus et au maintien de l'homéostasie du glucose. L'insuline est sécrétée par les cellules  $\beta$  du pancréas en réponse à une augmentation de la concentration circulante de glucose et des acides aminés après un repas. L'insuline régule l'équilibre du glucose sur de nombreux sites en réduisant la production hépatique de glucose (via une diminution de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse) et en augmentant la vitesse de capture du glucose par le muscle et le tissu adipeux. L'insuline touche également le métabolisme lipidique en augmentant la synthèse des lipides dans le foie et dans le tissu

adipeux. La résistance à l'insuline est définie comme un état de diminution de la réponse des tissus cibles à des concentrations physiologiques de l'insulinémie; RI joue un rôle majeur dans la constitution du diabète de type 2. RI est également caractéristique dans de nombreuses autres états pathologiques dont l'obésité, l'intolérance au glucose, les dyslipidémies et l'hypertension artérielle (Sesti, 2006).

La résistance à l'insuline répond à une définition biologique fonctionnelle. La méthode de référence pour tester la sensibilité des tissus à l'insuline consiste à injecter puis à perfuser de l'insuline de telle sorte à maintenir sa concentration sanguine à une valeur voisine de 100 $\mu$ U/mL. Pendant ce temps, par une perfusion ajustable en débit, l'explorateur maintient la glycémie constante. C'est l'évolution du débit de perfusion de glucose (GRd), témoin de la capture du glucose par les tissus, qui permet de quantifier et de normaliser le test. Celui-ci est défini comme le clamp hyperinsulinique euglycémique (DeFronzo *et al.*, 1979).

A titre d'exemple, l'augmentation aiguë expérimentale de l'apport sanguin des lipides chez des sujets en bonne santé s'accompagne de l'apparition de RI attesté par le clamp défini ci-dessus (**Figure 25**) (Itani *et al.*, 2002). En effet, en présence de l'augmentation des lipides plasmatiques, GRd diminue nettement.



L'héparine stimule l'hydrolyse des triglycérides contenus dans la perfusion de lipides, ce qui facilite la libération dans le plasma des acides gras libres

Utilisation de l'épreuve du « clamp hyperinsulinémique – euglycémique »

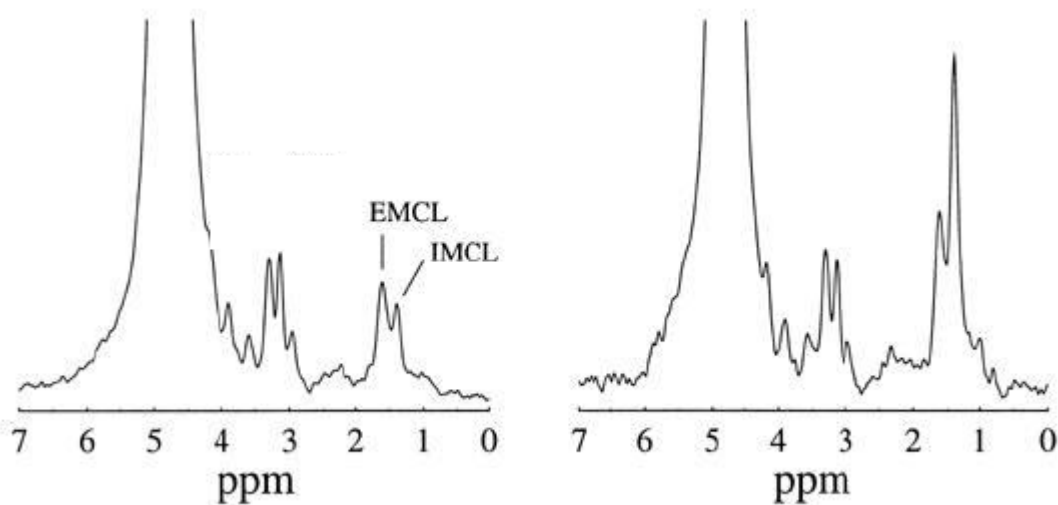
Apparition d'une résistance à l'insuline sous l'effet d'une augmentation de l'apport de acides gras libres.

**Figure 25:** L'augmentation aiguë expérimentale de l'apport sanguin des lipides chez des sujets en bonne santé s'accompagne de l'apparition de RI. D'après Itani *et al.* (2002).

## 2. Triglycérides musculaires et la résistance à l'insuline.

L'étude de l'utilisation des lipides pendant l'exercice a amené à des indices sur le fait que l'utilisation d'IMTG et la resynthèse de TG pourraient jouer un rôle dans la constitution de la résistance à l'insuline. Par exemple, Schenk et al, (2007) ont montré qu'un exercice préalable dirigeait les AG vers de la synthèse d'IMTG, réduisait l'accumulation des métabolites des AG et prévenait RI induite par les lipides (Schenk & Horowitz, 2007).

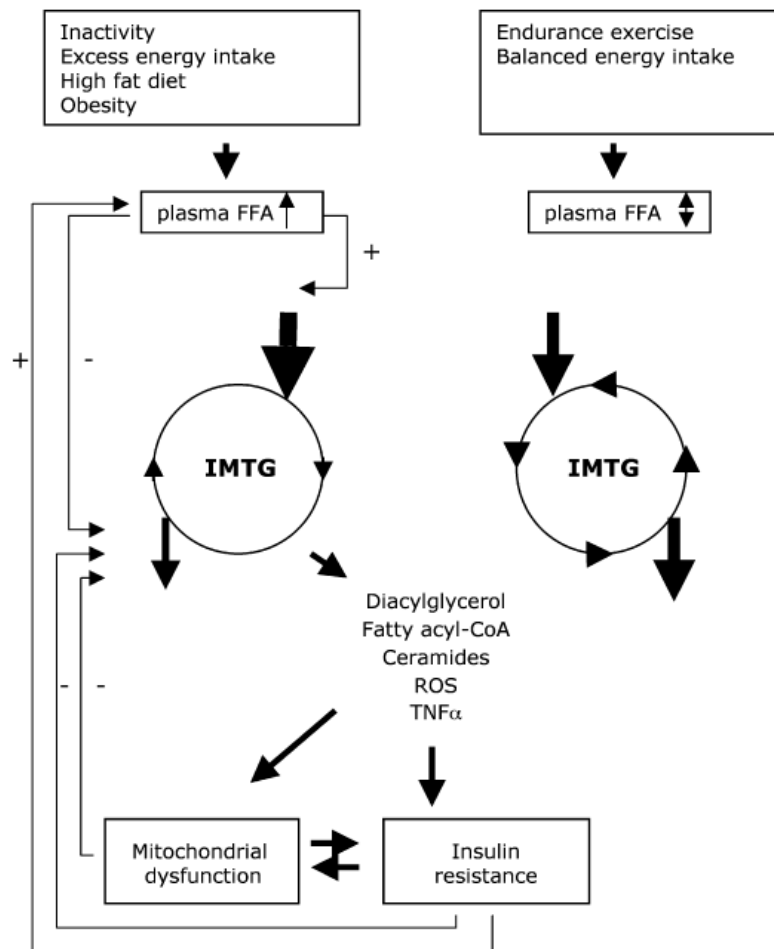
Les premières études sur l'homme ont démontré que l'accumulation d'IMCL, dont on présume qu'il s'agit essentiellement d'IMTG, est associée à RI (Pan *et al.*, 1995). L'utilisation de  $^1\text{H}$  SRM a également contribué la relation entre IMCL et RI en réduisant ou éliminant l'influence confondante des lipides extramyocellulaires. Par exemple, il a été observé qu'IMCL était élevée chez les descendants directs de sujets DT2 et que cet état s'associait à une captation anormale du glucose induite par l'insuline (**Figure 26**) (Jacob *et al.*, 1999). Des études ultérieures utilisant la coloration à l'huile rouge sur des biopsies humaines confirmèrent l'association entre IMCL et RI dans l'obésité et DT2 (Goodpaster *et al.*, 2000).



**Figure 26:** Spectres du proton du muscle tibialis anterior représentant IMCL et EMCL de sujets avec une sensibilité à l'insuline normale (gauche) ou basse (droite). D'après Jacob *et al.* (1999).

Les études sur les expériences d'amaigrissement précoce semblent également en faveur de la relation entre IMCL et RI du muscle. Les amaigrissements induits par un régime diminuent IMCL simultanément à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline (Toledo *et al.*, 2008). De plus, la perfusion de lipides et une alimentation riche en graisse augmente IMCL et diminuent la sensibilité à l'insuline (Bachmann *et al.*, 2001). Cependant, la corrélation positive entre IMCL et RI n'est pas retrouvée dans tous les cas ; comme indiqué plus haut, le contenu en IMTG est élevé chez les athlètes très sensibles à l'insuline, une observation définie sous le terme du paradoxe de l'athlète (Goodpaster *et al.*, 2001). Il est maintenant reconnu que IMTG n'est pas la cause de RI dans le muscle, mais augmente plutôt comme le résultat d'une

meilleure régulation de l'apport de substrat (TAG) et de la capacité énergétique du muscle avec l'entraînement (Dube *et al.*, 2008; Goodpaster *et al.*, 2001). Le paradoxe de l'athlète illustre la convergence de deux voies de recherche, l'une reliant IMTG au métabolisme des substrats et l'autre reliant IMTG à RI. Cela va dans le sens du concept qu'IMTG agit plus probablement –sous des conditions spécifiques- comme précurseur d'intermédiaires lipotoxiques tels que les acyl CoA à longue chaîne, DAG et céramide eux-mêmes à l'origine de RI (voir plus loin). Le paradigme actuel est que l'exercice régulier augmente le renouvellement et le contenu en IMTG, ce qui prévient de l'accumulation des intermédiaires lipotoxiques (van Loon & Goodpaster, 2006) (**Figure 27**).



**Figure 27:** Des différents facteurs qui accompagnent l'accumulation d'IMTG dans les conditions de déséquilibre ou d'équilibre énergétique. Dans le premier cas, les conditions sont favorables à la constitution de RI. D'après van Loon & Goodpaster (2006).

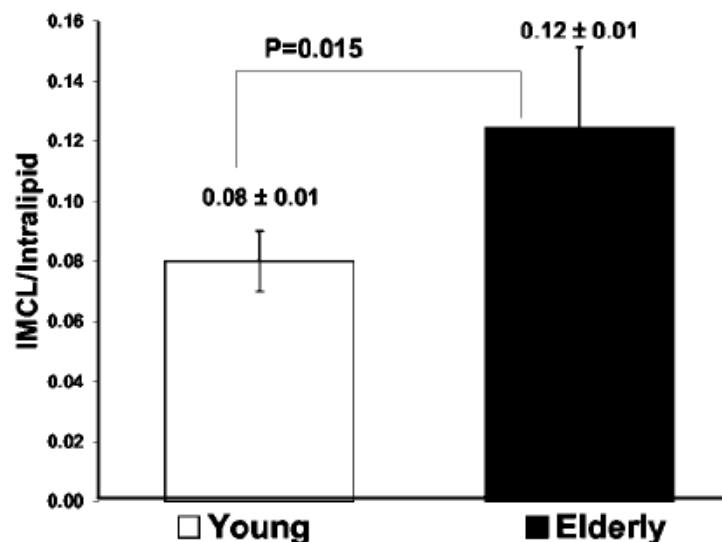
Cependant, le fondement du paradoxe de l'athlète n'agit pas exclusivement sur les lipides. Des études récentes ont mis en évidence que la production par les mitochondries d'espèces



réactives de l'oxygène (ERO) et de stress oxydant contribue également à RI (Anderson *et al.*, 2009). Il a été montré que l'exercice régulier chez le rat augmente la fonction mitochondriale et les capacités antioxydantes (Leeuwenburgh *et al.*, 1997) et réduit RI du muscle. La diminution du stress oxydant avec l'exercice régulier va également dans le sens du paradoxe de l'athlète. Ceci est validé par le fait que toutes les études ne concluent pas à un rôle de DAG (Coen *et al.*, 2010) et des céramides (Skovbro *et al.*, 2008) dans RI du muscle.

#### IV. Les triglycérides musculaires et leur relation avec le vieillissement.

L'augmentation d'IMTG avec le vieillissement est une observation bien montrée dans des études transversales (Crane *et al.*, 2010; Cree *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2007; Petersen *et al.*, 2003) (**Figure 28**). Cependant le vieillissement physiologique s'accompagne d'une importante variabilité dans l'évolution de la composition corporelle, de l'alimentation ou de l'activité physique quotidienne. Cette variabilité peut amener à ce que des facteurs confondants tels que surpoids, résistance à l'insuline, diminution de la capacité oxydative musculaire, sarcopénie, eux-mêmes liés à la physiopathologie du vieillissement, contribuent par eux-mêmes à l'augmentation d'IMTG (Cree *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2003; St-Onge, 2005). En effet, les descendants de familles prédisposées à la longévité ont un taux d'IMTG moindre par rapport à des sujets témoins (Wijsman *et al.*, 2012).



**Figure 28:** Comparaison des contenus en IMTG (IMCL) par la méthode spectrométrique en résonance magnétique entre deux groupes de sujets hommes et femmes d'âges différents (27 et 69 ans). D'après Cree *et al.* (2004).

Chez le sujet âgé, la reprise de l'activité physique sous forme d'entraînement à l'endurance permet de modifier le métabolisme musculaire et induit un accroissement des capacités oxydatives (Coggan et al 1992, Charifi et al 2004). Cette démarche a montré qu'elle s'accompagnait d'une augmentation d'IMTG (Pruchnic et al 2004). Il apparaît donc que, comme chez le sujet jeune, l'augmentation d'IMTG sous l'effet de l'entraînement chez le sujet âgé en bonne santé peut être considérée comme un signe positif d'amélioration des capacités de stockage et probablement de renouvellement de réserves lipidiques pour répondre à l'accroissement de la dépense énergétique. L'entraînement proposé par Dubé et al (2008) à des sujets âgés obèses a induit également une augmentation d'IMTG simultanément à une amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'à une diminution des sphingolipides et des diacylglycérols musculaires dont le rôle dans RI est maintenant bien établi (voir chapitres suivants).

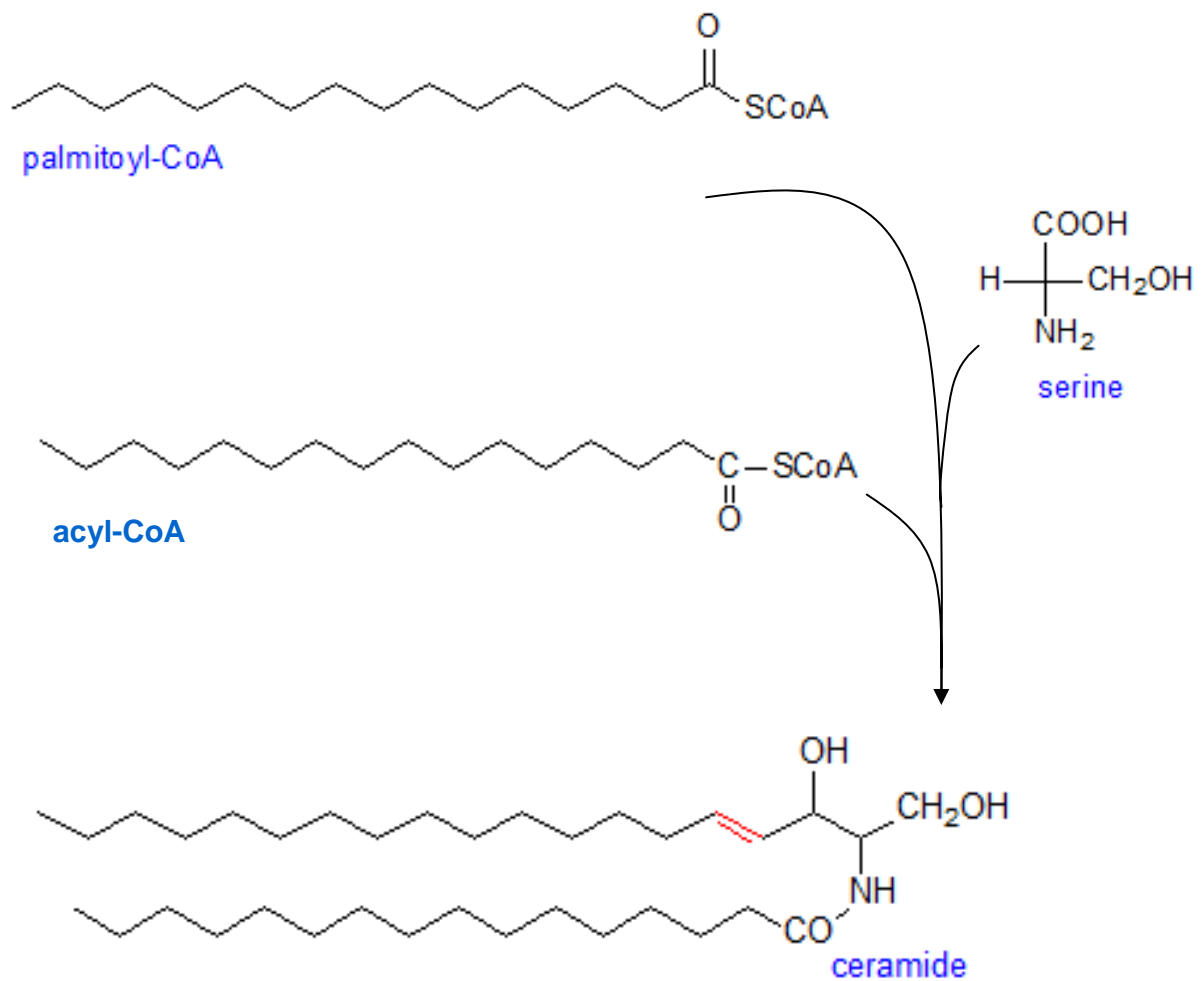
## **E. Les sphingolipides.**

### **I. Données générales.**

Les sphingolipides sont des molécules bioactives parmi lesquelles on compte:

- La sphingosine
- Les céramides
- La sphingosine-1-phosphate
- La céramide-1-phosphate

Ces molécules sont à la base le résultat de l'association de trois molécules (sérine, acide palmitique et un autre acide gras à longue chaîne). La **(Figure 29)** schématise de façon simplifiée la constitution d'une molécule de céramide.

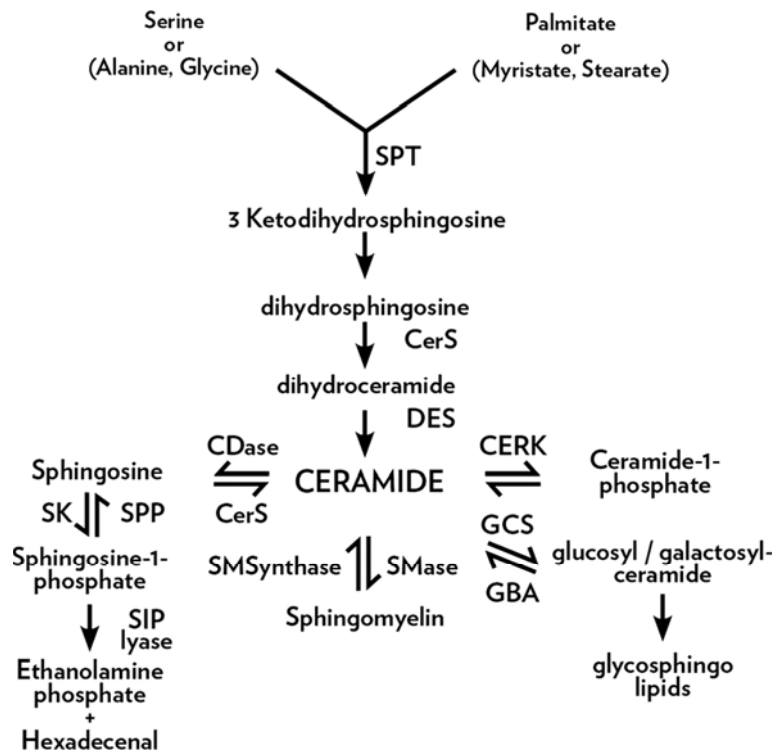


**Figure 29:** La constitution simplifiée d'une molécule de céramide.

Les sphingolipides fonctionnent comme messagers intra ou intercellulaires et comme molécules régulatrices et jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal, l'inflammation, l'angiogenèse, le diabète/syndrome métabolique, la neurodégénérescence, l'apoptose, l'atrophie cellulaire, l'autophagie, et le cancer et son traitement (De Larichaudy *et al.*, 2012; Hannun & Obeid, 2011; Tirodkar & Voelkel-Johnson, 2012). Elles aboutissent également à la formation de la sphingomyéline, élément déterminant de la gaine de myéline.

La **Figure 30** schématise les connexions entre les sphingolipides dans le cadre de leur métabolisme (biosynthèse et catabolisme) où les céramides y constituent une plaque tournante. La réalité est bien plus complexe. Des estimations suggèrent qu'il existe plus de 28 enzymes différents agissant sur les substrats ou les produits des céramides (Hannun & Obeid, 2008). Par ailleurs, du fait du caractère hydrophobe des céramides, leur métabolisme se situe

soit dans la membrane du réticulum endoplasmique où ils sont formés soit à distance après mise en jeu de système de transport vésiculaire ou moléculaire (protéine transporteuse CERT, (Hanada *et al.*, 2009)).



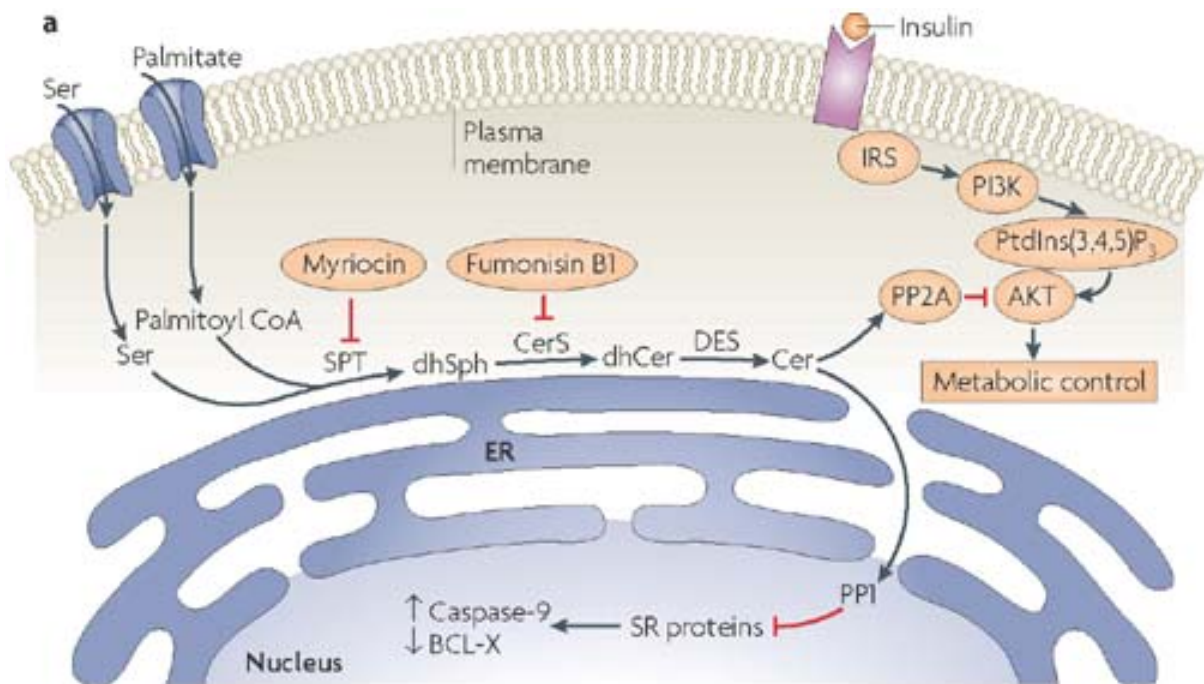
**Métabolisme des sphingolipides.** Voie *de novo* de la formation des céramides, la production des sphingolipides complexes à partir des céramides, de la dégradation des céramides en sphingosine, de la formation de S1P à partir de sphingosine, et de la clairance de S1P par la réaction de la lyase. *CERK*, céramide kinase; *CerS*, céramide synthétase; *DES*, désaturase; *GCS*, glucosylcéramide synthétase; *GBA*, acide glucocérébrosidase; *SK*, sphingosine kinase; *SMS*, sphingomyéline synthétase; *SPP*, S1P phosphatase; *SPT*, sérine palmytoyltransférase;

**Figure 30:** Métabolisme des sphingolipides. D'après Hannun & Obeid (2011).

## II. Implication des céramides et autres sphingolipides dans la résistance à l'insuline dans le muscle.

Dans le muscle, les céramides ont été identifiés comme des médiateurs clés de RI via l'inhibition de la protéine kinase B (PKB) Akt-sérine/thréonine, un intermédiaire important reliant la signalétique de l'insuline à la translocation de GLUT4 sur la membrane, via la voie dépendant de la protéine phosphatase 2 (PP2) (Chavez *et al.*, 2003; Stratford *et al.*, 2004).

Une importante augmentation des réserves tissulaires de sphingolipides se produit en cas de surcharge lipidique alimentaire à base de palmitate (Deevska & Nikolova-Karakashian, 2011). Il est donc possible que la surcharge lipidique induise la résistance à l'insuline via la synthèse *de novo* de céramides comme illustré par la **Figure 31**.



La régulation de la synthèse de novo de céramides par le palmitate pourrait avoir un rôle clé dans le diabète et le syndrome métabolique. Des données convergentes suggèrent que la surcharge en palmitate s'accompagne de l'accumulation de céramides, qui activent la protéine phosphatase-2A (PP2A) résultant en la déphosphorylation et l'inactivation d'AKT, un intermédiaire de la signalisation de l'insuline et du contrôle métabolique. L'excès de céramides actives également PP1 et l'activation combinée de PP1 et PP2A peut augmenter les réponses cytotoxiques et apoptotiques.

**Figure 31:** La surcharge lipidique induit la résistance à l'insuline via la synthèse de novo de céramides. D'après Hannun & Obeid (2008).

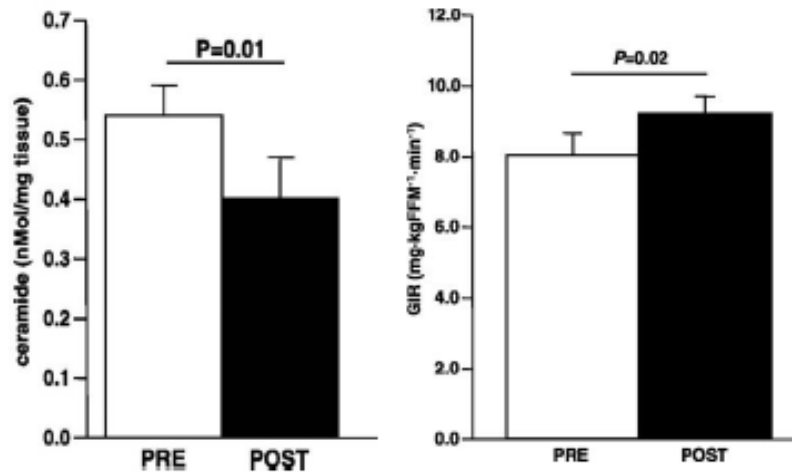
D'autres espèces de sphingolipides et d'autres mécanismes peuvent être mis en jeu dans RI. Une étude récente a montré dans l'adipocyte l'interaction directe du ganglioside GM3 avec le récepteur de l'insuline ayant pour conséquence la dissociation de la protéine de soutien cavéoline (Cav-1). Ceci aboutit à l'éloignement du récepteur de l'insuline de la cavéole, lieu de translocation de GLUT4, et à RI (Kabayama *et al.*, 2007).

Les céramides sont également en relation avec la dysfonction mitochondriale, qui est elle-même impliquée dans l'accumulation d'IMCL et RI (voir plus loin). Une variété de sphingolipides a été trouvée dans des mitochondries (hautement purifiées de membranes contaminantes) du tissu cérébral, comportant des céramides à longues chaînes saturés et insaturés (Yu *et al.*, 2007). Ceci doit être noté car les céramides inhibent la chaîne de transfert

des électrons et induit la production d'ERO. Les mitochondries contiennent des enzymes intervenant dans la production (céramide synthétase et sphingomyélinase) et la dégradation (céramidase) des céramides (Novgorodov *et al.*, 2011) ainsi que le transporteur principal de céramides associé à la protéine de fixation goodpasture (GPBP/CERT) (Mencarelli *et al.*, 2010). Cela va dans le sens d'hypothèses actuelles selon lesquelles les fonctions spécifiques des espèces de céramides sont régulées par des voies localisées dans des compartiments subcellulaires (mitochondries, lysosomes) (Hannun & Obeid, 2011). Dans les mitochondries, les céramides interfèrent avec la bioénergétique mitochondriale en inhibant le transport d'électrons au niveau des complexes I et III (Di Paola *et al.*, 2000) et en augmentant la production d'ERO (Garcia-Ruiz *et al.*, 1997).

La myriocine inhibe la sérine palmitoyl transférase-1 étape initiale de la synthèse des céramides (**Figure 30 et 31**). Cette substance prévient RI induite par l'apport excessif de lipides ou par les glucocorticoïdes chez le rat (Holland *et al.*, 2007) et s'oppose également à RI induite par l'apport excessif de lipides chez la souris (Ussher *et al.*, 2010). A l'opposé, des études n'observent pas d'augmentation des céramides musculaires à la suite d'apport d'émulsions lipidiques contenant essentiellement des AG insaturés (Itani *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). Ceci suggère que la surcharge en lipides avec des AG saturés est la cause préférentielle de RI induite par les céramides, alors que la surcharge avec les AG insaturés pourrait induire une RI liée au DAG (voir plus loin, **Figure 36**).

Les études chez l'homme confirment la relation entre le contenu en céramides du muscle et RI. Les céramides musculaires sont plus élevées chez les obèses que chez les sujets à poids normal (Adams *et al.*, 2004). Les céramides musculaires ont été également retrouvés associés à RI chez les obèses (Coen *et al.*, 2010). De plus, l'entraînement à l'exercice peut diminuer le taux de céramides de façon concomitante avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Dube *et al.*, 2008) (**Figure 32**).



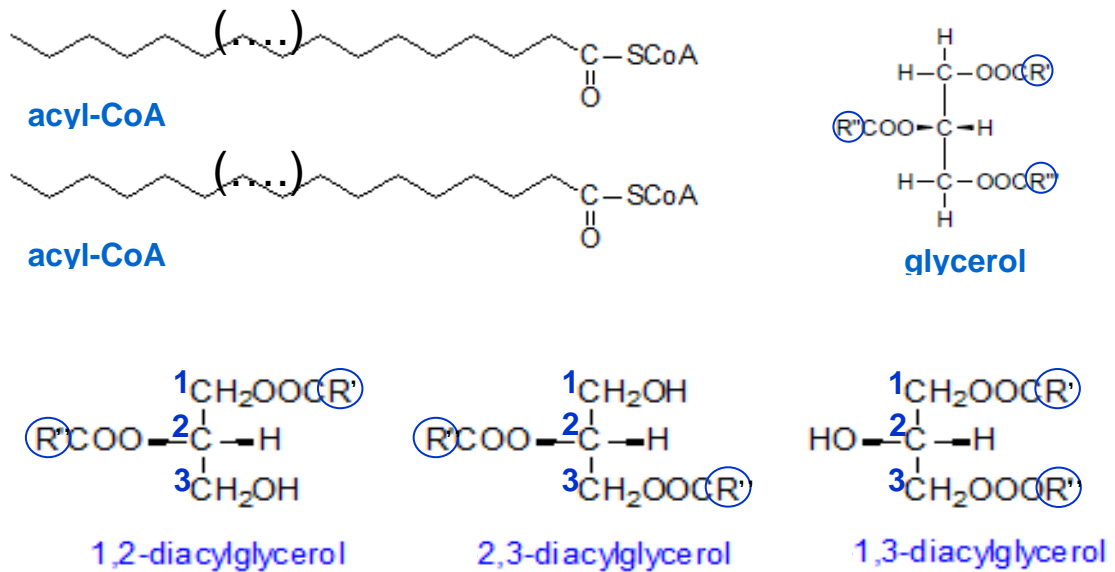
**Figure 32:** Effets de 16 semaines d'entraînement en endurance chez 25 sujets en surpoids (9 hommes et 16 femmes) de  $66 \pm 1$  ans sur la sensibilité à l'insuline (GIR d'après un clamp euglycémique hyperinsulinique) et sur la concentration des céramides musculaires. D'après Dube *et al.* (2008).

A l'opposé, les taux de céramides peuvent être similaires entre des groupes de sujets à sensibilité à l'insuline très variable (Skovbro *et al.*, 2008). De même, Itani et al ont montré que RI aiguë après surcharge lipidique ne s'accompagne pas de modification des céramides (Itani *et al.*, 2002). Cependant, la perfusion de lipides dans cette dernière étude ne contenait que des lipides insaturés, ce qui peut expliquer le non variation des céramides. D'autres composés sphingolipidiques, tels que la sphingosine et la sphingosine 1-phosphate sont liés à l'obésité et RI chez l'homme (Amati *et al.*, 2011; Coen *et al.*, 2010). Cependant, le mécanisme de leur rôle dans RI n'est pas encore expliqué.

## F. Diacylglycérols.

### I. Données générales.

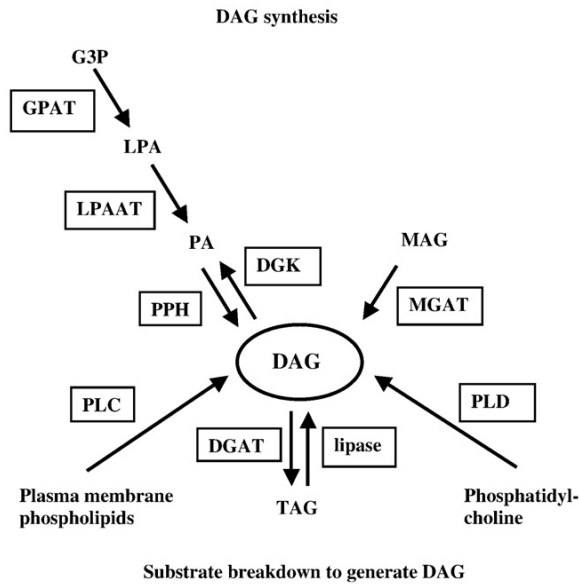
Les diacylglycérols (DAG) sont des esters du glycérol, alcool trihydroxylique sur lequel deux des fonctions hydroxyles sont estérifiées avec des acyl CoA à longue chaîne. On les trouve sous trois formes stéréochimiques différentes (1,2-DAG, 2,3-DAG, 1,3-DAG) selon l'ordre des liaisons esters (**Figure 33**).



**Figure 33:** Trois formes stéréochimiques différentes de DAG.



La biosynthèse tissulaire des DAG peut dériver de plusieurs sources (**Figure 34**)

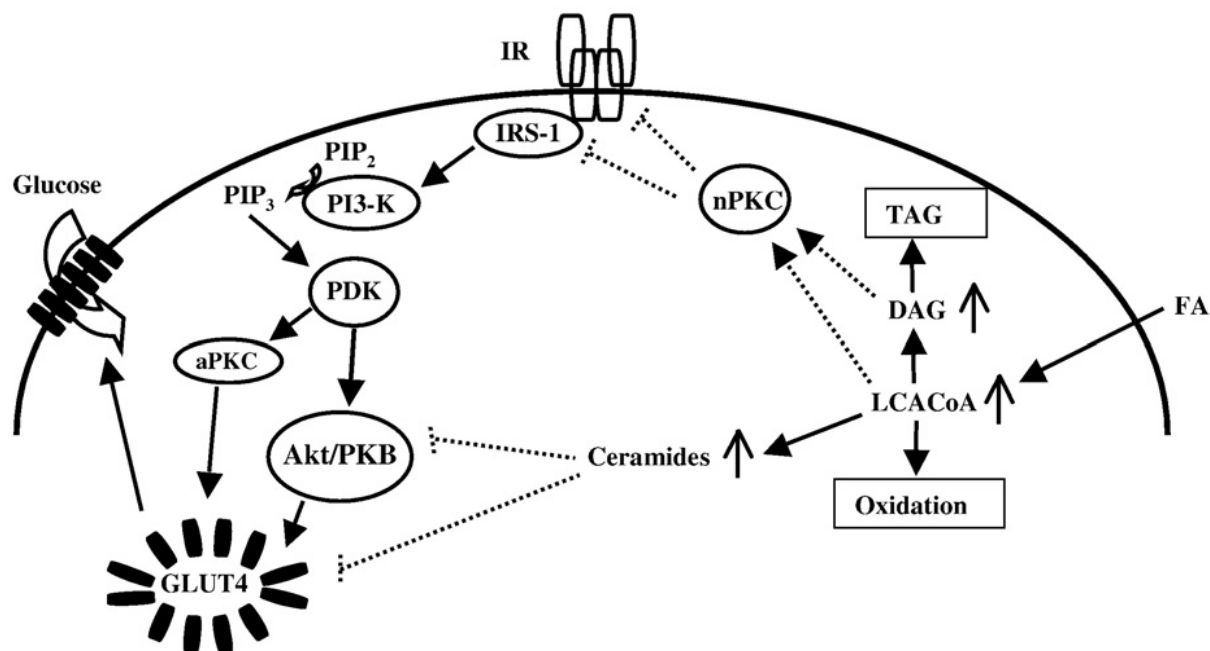


Représentation schématisée de la synthèse de DAG. Le haut de la figure montre la synthèse de DAG à partir de G3P ou de MAG. Le bas de la figure montre la génération de DAG par la dégradation enzymatique de TAG, des phospholipides, ou de phosphatidyl-choline.

G3P, glycerol-3-phosphate;  
 LPA, acide lysophosphatidique;  
 PA, acide phosphatidique;  
 DAG, diacylglycérol;  
 TAG, triacylglycérol;  
 MAG, mono acylglycérol;  
 GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase;  
 LPAAT, lysophosphatidate acyltransférase;  
 PPH, acide phosphatidique phosphohydrolase;  
 DGK, diacyl glycérolkinase;  
 MGAT, acyl-coA: monoacylglycérol acyltransférase;  
 PLC, phospholipase C;  
 PLD, phospholipase D;  
 DGAT, diacylglycérol acyltransférase.

**Figure 34:** Biosynthèse tissulaire des DAG. D'après Timmers et al. (2008).

Bien que leur concentration intracellulaire soit faible, les DAG sont des seconds messagers intracellulaires au niveau du sarcolemme et un intermédiaire de la synthèse de TAG et de la dégradation des GL. Les DAG ont aussi été identifiés comme les médiateurs lipotoxiques de RI. Un taux élevé de DAG peut augmenter l'activité de la protéine kinase C (PKC)  $\epsilon$  et  $\theta$  (Timmers *et al.*, 2008). PKC activé phosphoryle la sérine de l'insulin receptor substrate (IRS-1), ce qui inhibe l'activité kinase et l'activation résultante de PI3-kinase et de PKB/Akt (Timmers *et al.*, 2008). En conséquence, la translocation de GLUT4 est perturbée, d'où RI (**Figure 35**).



**Figure 35:** L'augmentation de l'apport d'AG à la fibre musculaire peut provoquer l'accumulation d'acyl-CoA à longue chaîne et de DAG, ce qui interfère, via les protéines kinases, avec la signalisation de l'insuline. D'après Timmers *et al.* (2008).

De nombreuses études sur l'animal ont démontré le lien entre DAG et RI dans l'obésité (Turinsky *et al.*, 1990). Cependant, d'autres ont observé la dissociation entre DAG et RI. Par exemple, la surexpression de l'enzyme diacylglycérol acyltransférase (DGAT-1) dans le muscle s'accompagne de l'accumulation d'IMCL mais également de DAG et de l'amélioration de RI induite par une alimentation grasse (Timmers *et al.*, 2011).

Dans les études chez l'homme, il n'est pas clair que le contenu musculaire de DAG soit corrélé à RI. DAG est élevé dans l'obésité et dans DT2 (Bergman *et al.*, 2012) et augmente suite à RI aigu induit par une perfusion de lipides (Itani *et al.*, 2002). La perte de poids et l'exercice sont tous deux à l'origine de la baisse de DAG et de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Dube *et al.*, 2011). A l'opposé, d'autres études ont décrit que le contenu de DAG musculaire n'est pas élevé dans l'obésité (Anastasiou *et al.*, 2009), dans RI (van Hees *et al.*, 2011) ou chez des obèses RI en comparaison à des sujets sensibles à l'insuline (Coen *et al.*, 2010).

Il est difficile de concilier les résultats divergents décrivant les relations entre DAG et RI dans le muscle humain.

Un facteur important pourrait être le degré de saturation des AG dans DAG. Bergman *et al.* (2012) ont montré que les athlètes ont un degré de saturation moindre que les sujets sédentaires. En accord avec ce résultat, van Hees *et al.* ont observé qu'un haut degré de saturation de DAG est associé avec RI chez des hommes avec un syndrome métabolique (van Hees *et al.*, 2011). D'autres ont trouvé l'absence d'une telle association (Coen *et al.*, 2010) ou même une relation inverse (Amati *et al.*, 2011).

La localisation subcellulaire de DAG est un autre facteur qui peut être mis en jeu. La majeure partie des études chez l'homme mesure la concentration de DAG sur l'homogénat musculaire. DAG se retrouve dans le sarcolemme, le réticulum sarcoplasmique, les GL et les membranes mitochondriales; ceci peut certainement affaiblir les relations recherchées entre DAG mesuré sur homogénat et RI du muscle. Cependant, Bergman *et al.* (2012) ont récemment montré que le DAG de membrane est associé avec l'activation de PKC et la sensibilité à l'insuline chez des sujets obèses, DT2 et chez des athlètes.

En dernier lieu et peut-être le point le plus important, les trois stéréo isomères distincts de DAG (1,3-DAG, 2,3-DAG, et 1,2-DAG) pourraient agir sur RI du muscle à des degrés divers. Jusqu'à ce jour, seul 1,2-DAG a été associé avec le signal de l'insuline (Turinsky *et al.*, 1990). 1,2-DAG peut activer PKC alors que 1,3-DAG et 2,3-DAG n'en ont pas le pouvoir (Boni & Rando, 1985). Le mécanisme classique de formation de 1,2-DAG est l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-phosphate par la phospholipase C (PLC) dans la membrane plasmique. C'est à cet endroit que 1,2-DAG active les isoformes de PKC. Il a également été proposé que 1,2-DAG pourrait être formé dans le réticulum endoplasmique. Ce dernier n'est cependant pas une localisation cellulaire compatible avec l'activation de PKC membranaire. Une troisième source potentielle de DAG est la lipolyse d'IMTG des GL par TGLa et LHSm. Cependant, ces deux enzymes ne semblent pas capables de catalyser la synthèse du stéréo isomère 1,2-DAG (Zechner *et al.*, 2012). Il apparaît également peu probable que 1,2-DAG provenant des GL puisse s'associer avec PKC membranaire et l'activer. La mesure de 1,2-DAG membranaire pourrait apporter plus de précision sur les relations entre DAG et RI musculaire. A ce jour, aucune étude chez l'homme ne s'est intéressée aux différents stéréo isomères de DAG et leur relation avec RI.

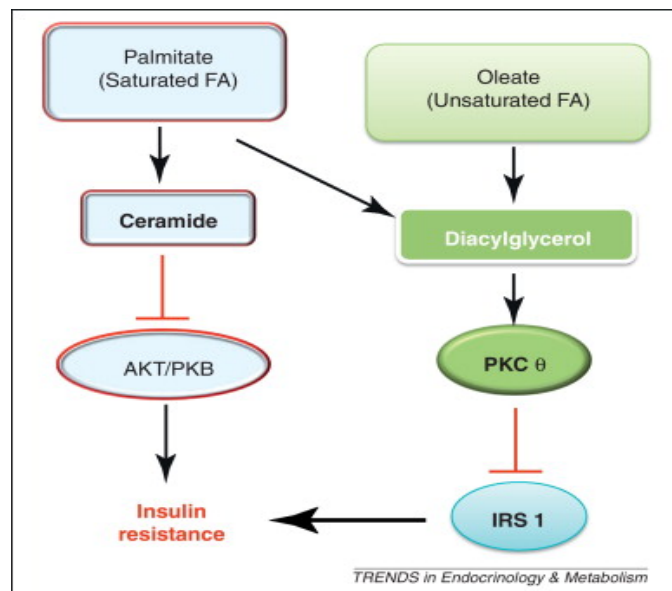
### **III. Acyl CoA à longue chaîne.**

Les acyl CoA à longue chaîne sont formés à partir des AG incorporés par les myocytes et conjugués en groupe CoA. Ceci engage les AG soit vers la synthèse lipidique soit vers la  $\beta$ -oxydation. Les acyl CoA à longue chaîne sont des IMCL qui ont été associés à RI, mais ils ont reçu moins d'attention que d'autres espèces d'IMCL. Dans le contexte de surcharge lipidique et de sédentarité, les acyl CoA s'accumulent dans le myocyte. L'obésité est associée à cette élévation des acyl CoA et à la diminution de la capacité oxydative (Hulver *et al.*, 2003). Houmard *et al.* (2002) ont montré que la perte de poids induit une diminution du contenu en acyl CoA à longue chaîne dans l'obésité, de façon concomitante à une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Les études de perfusion de lipides ont également montré une augmentation aiguë du contenu en acyl CoA simultanément à l'activation de PKC (**Figure 35**) et à l'apparition de RI (Yu *et al.*, 2002). Bien que l'association avec RI ait été décrite, le mécanisme par lequel acyl CoA causerait RI n'a pas été identifié. Il est possible que l'acyl CoA agisse comme un précurseur de la synthèse de DAG ou de céramides, eux-mêmes responsables de RI.

### **G. La saturation des AGL peut déterminer la nature de la résistance à l'insuline induite par les lipides.**

Comme cela a été noté plus haut, soit pour les céramides soit pour les DAG, le degré de saturation des AG plasmatiques peut jouer un rôle dans la contribution relative des DAG et des céramides à RI musculaire. Des études provoquant la surcharge en AGL dans des cultures de myocytes, dans le muscle isolé de rongeur ou chez des rongeurs perfusé en lipides suggèrent que les DAG n'interviennent pas de façon prépondérante dans la RI induite par les lipides saturés. La surcharge en alimentation grasse induit une augmentation à la fois des céramides et des DAG simultanément à l'apparition de RI (Montell *et al.*, 2001). Cependant, l'utilisation de myriocine, un inhibiteur de la synthèse des céramides, minore l'apparition de RI lors de la surcharge en lipides saturés, malgré l'augmentation des DAG (Chavez *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 2007). A l'opposé, la RI induite par les lipides insaturés peut se constituer indépendamment des céramides. Les études qui utilisent la perfusion de mélanges lipidiques enrichis en linoléate [C18: 2] (Denton & Randle, 1967; Krogh & Lindhard, 1920) montrent l'augmentation de RI et des DAG musculaires, sans variation du taux de céramides (Holland *et al.*, 2007; Itani *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2002). De façon intéressante, des rats avec

une alimentation grasse (huile de carthame<sup>3</sup>, acide linoléique) développent une augmentation de la sensibilité à l'insuline et des DAG sans changement des céramides, en comparaison à des animaux nourris de façon standard (Lee *et al.*, 2006). Vues dans leur ensemble, ces études suggèrent que le degré de saturation des AGL plasmatiques dans l'obésité et DT2 pourrait être un facteur important de distinction entre RI induite par les DAG ou par les céramides (**Figure 36**). Cependant, des études chez l'homme ont jusqu'à maintenant apporté des résultats équivoques. Kien et al ont nourri des sujets en bonne santé avec des rations à haute ou basse teneur en palmitate et haute teneur en oléate pendant 7 jours et n'ont pas observé de variations en DAG musculaire (Kien *et al.*, 2011). D'autres interventions nutritionnelles sont nécessaires pour explorer l'impact de la saturation des AG alimentaires sur RI du muscle induite par DAG ou les céramides.



Rôle présumé des acides gras saturés et non saturés (FAs) comme intervenant dans la résistance à l'insuline (IR). Dans l'obésité, les AG saturés seraient la source préférentielle de l'accumulation des céramides, qui induisent IR en inhibant la phosphorylation et l'activation de la protéine kinase B (PKB). A l'inverse, les AG insaturés pourraient préférentiellement induire l'accumulation de diacylglycérol et en conséquence l'activation de la protéine kinase C theta (PKCθ), ce qui amène à la phosphorylation de la serine of du récepteur de l'insuline substrat-1 (IRS-1) and IR.

**Figure 36:** Le degré de saturation des AGL plasmatiques dans l'obésité et DT2 pourrait être un facteur important de distinction entre RI induite par les DAG ou par les céramides. D'après Coen & Goodpaster (2012).

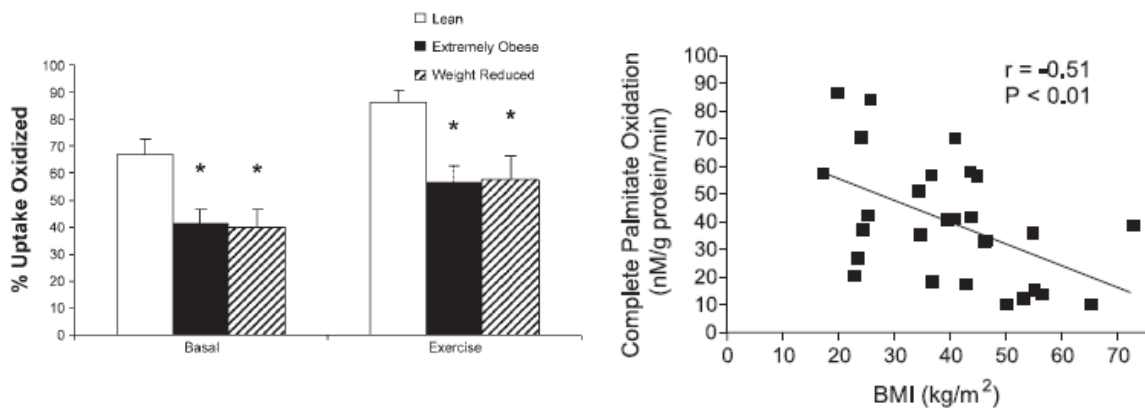
<sup>3</sup> Huile végétale issue d'une plante méditerranéenne voisine du chardon. L'huile contient 74% d'acide linoléique et 20% d'acide oléique.

En résumé

Le rôle des céramides et des DAG semble fortement établi dans la constitution de la résistance à l'insuline dans le muscle. L'état de saturation des AG constituant les céramides et les DAG ainsi que les cibles de ces lipides intermédiaires dans la signalisation de l'insuline sont schématisés dans la (Figure 36).

## H. Dysfonction mitochondriale et accumulation d'IMCL.

La diminution de l'oxydation des lipides qui résulte d'une dysfonction mitochondriale est une autre cause de RI qui prédispose les obèses à une augmentation d'IMCL. Cette déficience d'oxydation des AG a été observée chez les obèses au niveau de l'organisme entier (Thyfault *et al.*, 2004) et dans des extraits musculaires (Berggren *et al.*, 2008) (Figure 37).



Pourcentage des acides gras captés qui ont été oxydés au repos ou lors d'un exercice à 50% de VO<sub>2</sub>max. Les niveaux d'oxydation sont plus bas ( $p < 0.05$ ) chez les obèses avec ou sans perte de poids.

Relation entre l'oxydation du palmitate dans le muscle et BMI.

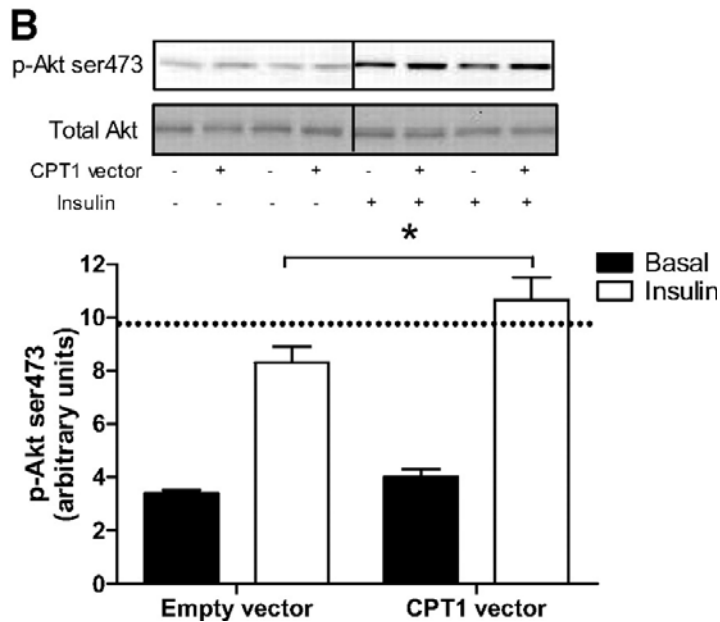
(Thyfault *et al.*, 2004)

(Berggren *et al.*, 2008)

**Figure 37:** La déficience d'OxAG a été observée chez les obèses au niveau de l'organisme entier d'après Thyfault *et al.* (2004) et dans des extraits musculaires d'après Berggren *et al.* (2008).

Il semble également que l'altération de l'oxydation soit liée principalement à une diminution du contenu ou de la fonction oxydative des mitochondries (Kelley *et al.*, 2002). En effet, des modèles d'augmentation de la captation mitochondriale des AG et de la  $\beta$ -oxydation dans les muscles ont démontré leur potentiel à les protéger de RI induite par la surcharge

lipidique (Bruce *et al.*, 2009) (**Figure 38**). Des effets protecteurs semblables sont provoqués par l'exercice aigu et par l'augmentation des flux mitochondriaux d'AG induite par la contraction musculaire (Thrush *et al.*, 2011).

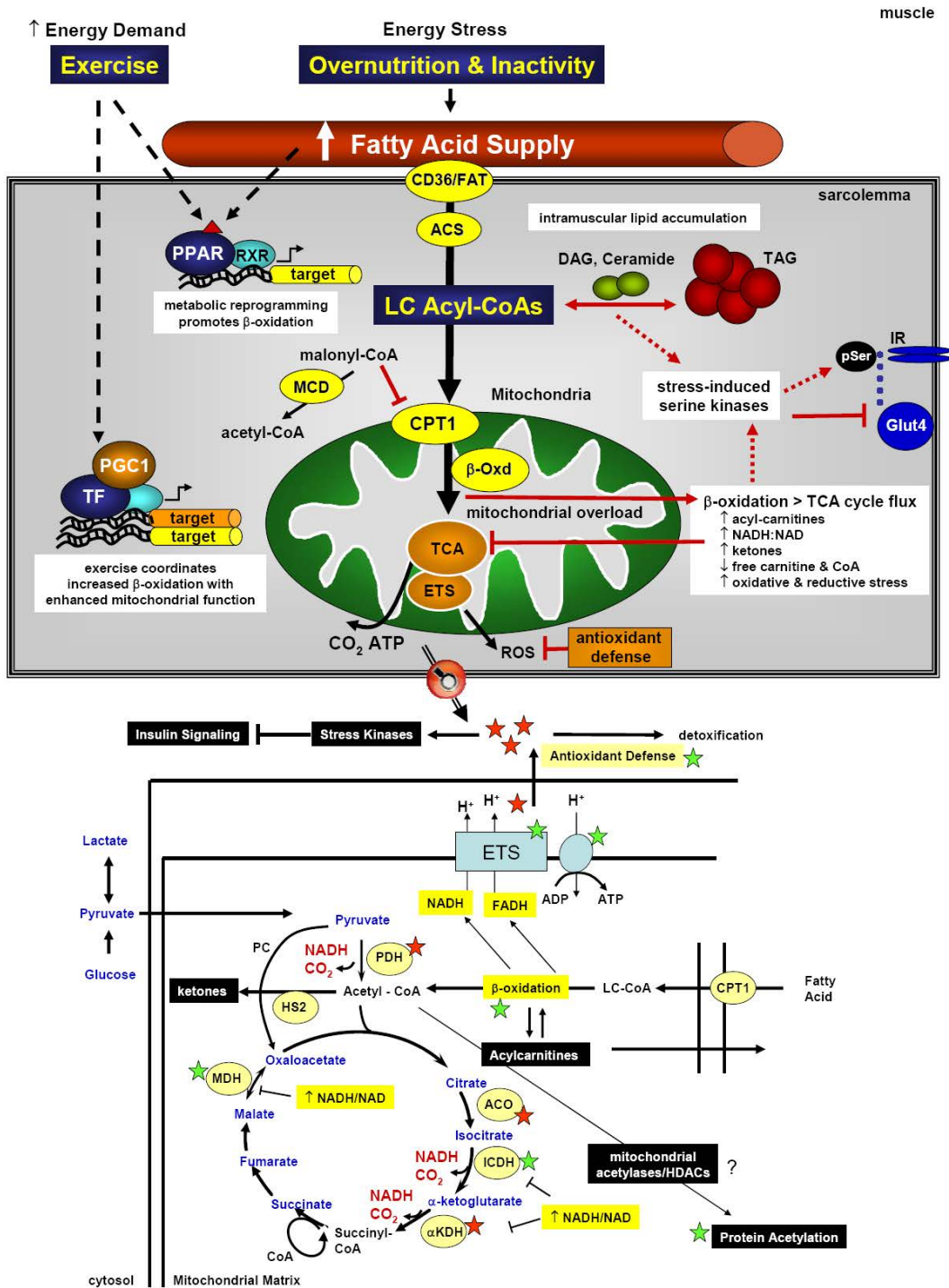


La surexpression de CPT1 protège de la diminution de l'action de l'insuline induite par une alimentation grasse dans le muscle in vivo.

Immunoblots représentatifs et quantification de la phosphorylation (Ser473)/total Akt (B) dans le muscle tibialis anterior. Le muscle est obtenu après électroporation avec un vecteur vide ou induisant CPT1 chez des animaux recevant une alimentation grasse pendant 4 semaines et ensuite soumis à un clamp hyperinsulinémique euglycémique de 120 min.

**Figure 38:** L'augmentation de la captation mitochondriale des AG et de la  $\beta$ -oxydation dans les muscles ont démontré leur potentiel à les protéger de RI induite par la surcharge lipidique. D'après Bruce *et al.* (2009).

Des données récentes contestent ce consensus et indiquent que les mitochondries peuvent prendre part dans la surconsommation de lipides et l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation pendant la phase d'installation de l'obésité induite par l'alimentation. Cela aboutit à des lipides imparfaitement oxydés, comme l'indique l'augmentation des taux musculaires et plasmatiques d'acylcarnitine (Koves *et al.*, 2008). Cette dernière étude a donné lieu à un mécanisme synthétique dont le modèle est schématisé par la (**Figure 39**). La nature exacte de ces métabolites partiellement oxydés n'est pas encore connue, mais une étude récente de Seifert et al. utilisant la métabolomique sur des mitochondries isolées permet d'envisager une approche expérimentale future prometteuse (Seifert *et al.*, 2010). En effet, l'étude comparative entre le milieu extramitochondrial et la matrice mitochondriale met en évidence que des métabolites sont issus du cycle TCA sous l'influence de charges croissantes en palmitate (**Figure 40 et 41**).



**Figure 39:** Les mitochondries peuvent prendre part dans la surconsommation de lipides et l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation pendant la phase d'installation de l'obésité induite par l'alimentation. Cela aboutit à des lipides imparfaitement oxydés, comme l'indique l'augmentation des taux musculaires et plasmatiques d'acylcarnitine (cf. légende page suivante). D'après Koves *et al.* (2008).

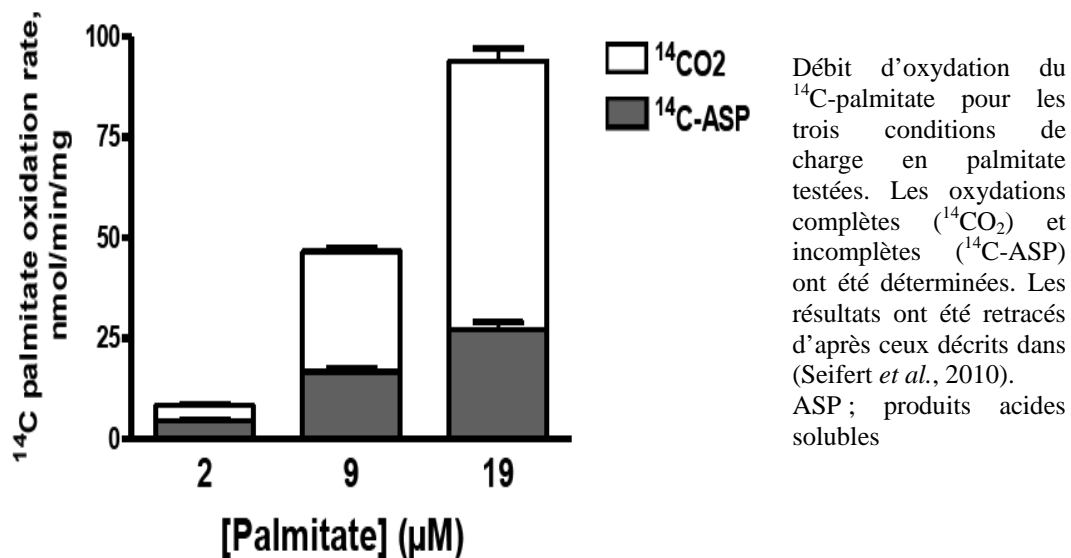


Légende de la (Figure 39):

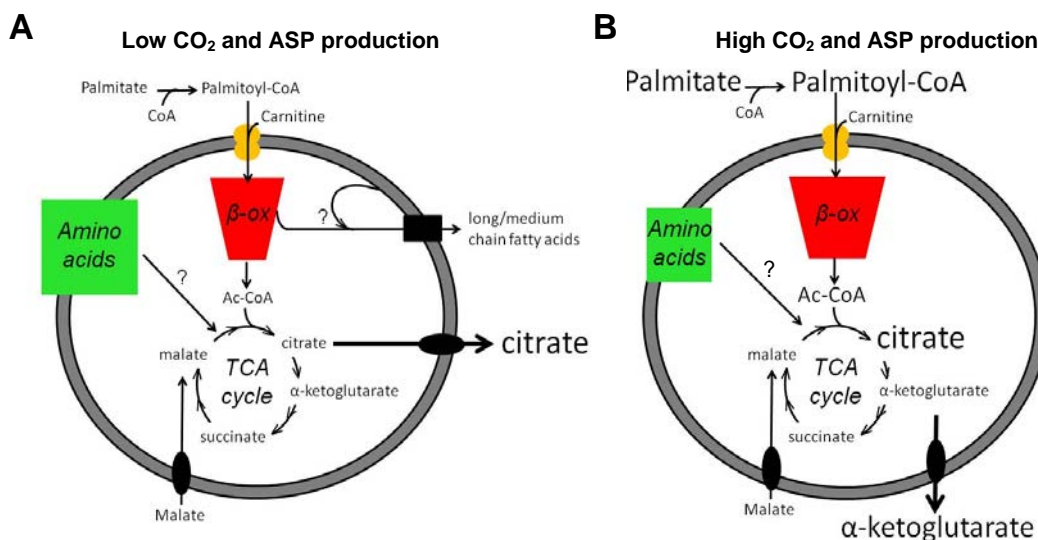
### Proposition d'un modèle de stress mitochondrial et de résistance à l'insuline dans le muscle squelettique.

Lors de conditions de surnutrition lipidique et d'inactivité, l'influx d'AG et l'activation des gènes cibles induite par PPAR (en jaune, schéma du haut) favorise la  $\beta$ -oxydation sans augmentation coordonnée du flux dans le cycle TCA. L'augmentation chronique de voie de la  $\beta$ -oxydation amène à une augmentation du potentiel redox et à une diminution de CoA libre et de carnitine, qui exercent de concert un effet négatif sur TCA et sur ETS, tout en inhibant également l'utilisation du glucose au travers de l'activité de PDH. (les sites spécifiques de régulation sont indiqués sur le zoom du schéma du bas). Cet environnement déséquilibré est propice au stress oxydatif et réducteur (étoiles rouges), avec d'autres défaillances mitochondriales, et peut altérer l'état d'acétylation des protéines mitochondriales (étoiles vertes). Avec l'accumulation des dérivés de l'oxydation incomplète des graisses (acylcarnitines, cétones, NADH, ERO, ERA), les LC-CoA sont redirigés vers la synthèse de TAG et des intermédiaires tels que DAG et céramides. Ces stress combinés d'origine mitochondriale et lipidique activent les sérine kinases, ce qui entrave la signalisation de l'insuline, la translocation de Glut4 et le métabolisme du glucose (schéma du haut en bleu). L'exercice habituel s'oppose au stress lipidique en augmentant le flux du cycle TCA et en couplant l'induction de l'activité PPAR avec les voies métaboliques d'aval dépendantes de PGC1 $\alpha$  (en orange, schéma du haut). L'amélioration de la fonction mitochondriale restaure alors la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie du glucose.

Abréviations: ACO; aconitase, ACS; acyl-CoA synthétase,  $\beta$ -Oxd; enzymes  $\beta$ -oxydatives, CD36/FAT; transporteur d'AG, CPT1; carnitine palmitoyltransférase 1, DAG; diacylglycérol, ETS; système de transport des électrons; Glut4; transporteur de glucose 4,  $\alpha$ KDH;  $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase, HDACs; histone déacetylases, HS2; HMG-CoA synthétase mitochondriale, ICDH; isocitrate déhydrogénase, IMTG; triacylglycérol intramusculaire, IR; récepteur de l'insuline, LC-CoAs; acyl-CoAs à longue chaîne; MCD; malonyl-CoA décarboxylase, MDH; malate déshydrogénase, PDH; pyruvate déshydrogénase, RNS (ERA), espèces réactives de l'azote, ROS (ERO); espèces réactives de l'oxygène, TF; facteur de transcription.



**Figure 40:** Métabolites sont issus du cycle TCA sous l'influence de charges croissantes en palmitate. D'après Seifert *et al.* (2010).



L'oxydation du palmitate est associée à des transferts d'intermédiaires du cycle TCA, d'acides gras et d'acides aminés. Le schéma est simplifié et ne montre pas les voies et destinés de chaque métabolite. Seuls les intermédiaires détectés du TCA sont représentés. L'oxydation lente du palmitate s'accompagne d'un efflux de citrate (A). Puisque la concentration de citrate dans la matrice ne diminue pas, celui-ci bénéficie d'une reconstitution anaplerotique. Le malate d'origine exogène est probablement le substrat de l'anaplerose. Les acides aminés peuvent également en être une autre source. Les acides gras C12 et C14 sortent également de la mitochondrie ; ils peuvent provenir des réactions de la  $\beta$ -oxydation, après clivage d'unités d'acyl-CoA par une thioestérase, ou de groupes liés aux membranes. A l'opposé (B), l'oxydation élevée du palmitate s'accompagne de l'augmentation du citrate dans la matrice sans transfert à l'extérieur, alors que l'efflux d' $\alpha$ -cétooglutarate est prédominant. Les acides aminés de la fraction de la matrice diminuent également, ce qui témoigne de la probable reconstitution anaplerotique des intermédiaires du cycle TCA.

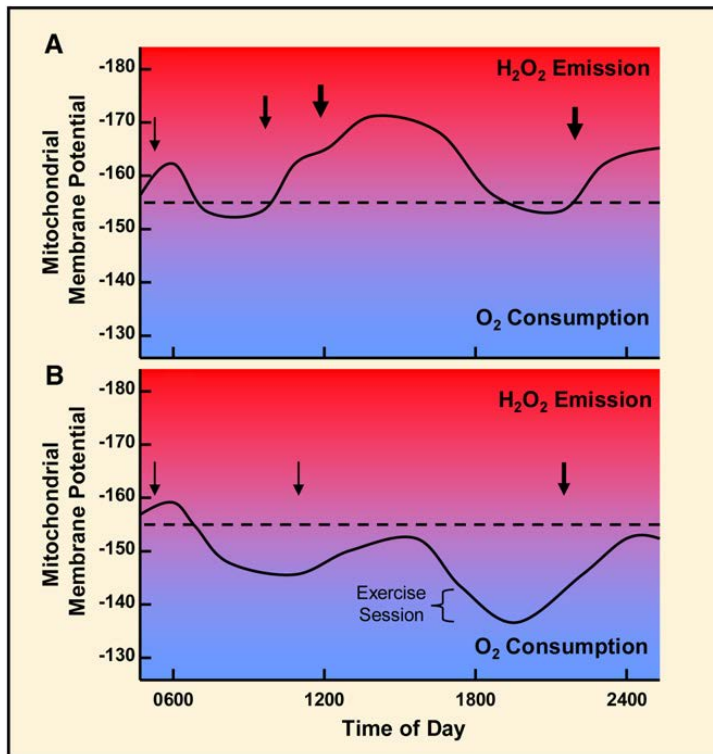
ASP: produits acide soluble marqués au <sup>14</sup>C, témoins d'une oxydation incomplète.

Seifert et al, *PLoS ONE*, 2010

**Figure 41:** L'oxydation du palmitate est associée à des transferts d'intermédiaires du cycle TCA. D'après Seifert et al. (2010).

Un autre aspect du stress lipidique mitochondrial est l'augmentation de la production d'ERO de façon concomitante avec l'abaissement de la capacité oxydative (Anderson et al., 2009). L'augmentation de la  $\beta$ -oxydation est la conséquence d'une alimentation grasse, ce qui produit une quantité abondante de FADH<sub>2</sub>, source d'électrons pour le cycle Q du STE. Le potentiel de membrane interne élevé qui en résulte, en parallèle avec la faible consommation et production d'ATP induit la création de superoxyde au niveau des complexes I et III de STE. L'augmentation d'ERO active à son tour les voies de la serine kinase dont JNK, ce qui dérégule de façon négative la signalétique de l'insuline (Bloch-Damti & Bashan, 2005). Une vue synthétique de ce sujet a été récemment proposée par Muoio & Neuffer (2012) qui mettent l'accent sur la variabilité de l'équilibre redox mitochondrial entre la production d'ERO induite

par la surcharge lipidique alimentaire et la consommation d'oxygène liée à la dépense énergétique quotidienne (**Figure 42**).



**Fluctuations prédites du potentiel de membrane mitochondrial en relation avec l'équilibre métabolique.**

(A et B). Illustration montrant les fluctuations pendant 24h du potentiel de membrane mitochondrial pour un sujet avec une balance énergétique déséquilibrée en lien avec une alimentation excessive et un état sédentaire (A) et un sujet au métabolisme équilibré lié à une alimentation appropriée et une vie active (B). La ligne pointillée indique le niveau approximatif du potentiel de membrane à partir duquel les électrons commencent à s'échapper des superoxydes.

Les flèches indiquent une prise alimentaire. Le fond rouge représente l'augmentation de  $H_2O_2$  alors que le fond bleu représente l'augmentation progressive de  $VO_2$

Muoio & Neuffer, *Cell Metab*, 2012

**Figure 42:** Fluctuations prédites de potentiel de membrane mitochondrial en relation avec l'équilibre métabolique. D'après Muoio & Neuffer (2012).

En résumé, la compréhension actuelle de la dysfonction mitochondriale ne doit pas se réduire à la diminution de la capacité oxydative, mais doit maintenant être envisagée comme un déséquilibre entre la  $\beta$ -oxydation et l'activité de la phosphorylation oxydative ou du cycle tricarboxylique et l'augmentation du stress oxydant. Prises dans leur ensemble, ces études suggèrent une chronologie de la dysfonction mitochondriale depuis l'induction de l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation par l'alimentation grasse jusqu'au phénotype bien établi de l'obèse (diminution de la capacité oxydative et du contenu mitochondrial). Le bilan de la dysfonction mitochondriale sont la partition des lipides et le stockage ectopique d'IMCL ce qui est à l'origine d'espèces lipidiques qui induisent RI.

## HYPOTHESES DE TRAVAIL

L'introduction bibliographique donne un aperçu partiel et non exhaustif de l'importance qualitative et quantitative des recherches sur le métabolisme lipidique musculaire lié à l'activité physique.

Lors de certains protocoles mettant en jeu des situations d'exercice aigu ou des situations d'entraînement à l'exercice, les techniques histochimiques ORO et PAS musculaires ont été utilisées. Même si ces protocoles n'avaient pas pour objectif prioritaire le métabolisme lipidique, il s'est révélé que ce domaine constituait un élément intéressant pour soulever certaines hypothèses de travail en utilisant le matériel musculaire encore disponible après les investigations principales.

### **I. Premier champ d'application: l'effet de l'exercice aigu de très longue durée sur IMTG.**

Les études centrées sur la consommation énergétique des triglycérides et du glycogène musculaires au cours de l'exercice d'endurance sont multiples et riches en conclusions. Il existe cependant peu d'informations sur l'exercice de très longue durée (au-delà de 3-4 heures). En effet, à notre connaissance, l'analyse de l'utilisation des réserves énergétiques musculaires en lipides et glucides n'a fait l'objet que d'une étude à propos d'une épreuve de 100 heures d'endurance (Helge *et al.*, 2007a). Cette dernière n'a pas observé de diminution des stocks d'IMTG mesurés par méthode biochimique malgré une forte contribution de la lipolyse à partir des AG plasmatiques et un faible recours au glucose plasmatique et au glycogène musculaire (Helge *et al.*, 2007a). Il semble donc surprenant que l'utilisation d'IMTG, assez communément observée au cours d'exercices de 2 à 3 heures de durée (De Bock *et al.*, 2008; De Bock *et al.*, 2005; Stellingwerff *et al.*, 2007a; Stellingwerff *et al.*, 2007b; van Loon *et al.*, 2003a) ne le soit pas pour un exercice de plus longue durée et à une puissance relative plus faible.

**Objectifs de la première étude:** Une expérience pionnière visant à étudier les phénomènes de fatigue et les répercussions musculaires et biomécaniques d'un exercice de 24h de durée a été menée sur tapis roulant au sein de LPE (Millet *et al.*, 2011). Cette opportunité nous a permis de tester l'hypothèse alternative à l'absence de consommation d'IMTG décrite par Helge *et al.* (2007a). Par l'utilisation de la méthode histochimique, il est possible de vérifier si les fibres à contraction lente ou rapide donnent lieu à une diminution du

contenu en IMTG entre le départ et l'arrivée de la performance réalisée par 10 sujets coureurs de très longue distance. La diminution du contenu en glycogène est également quantifiée.

## **II. Deuxième champ d'application: l'effet de l'entraînement sur IMTG.**

### **1. Entraînement en endurance.**

Malgré l'importance fonctionnelle d'un niveau élevé des réserves d'IMTG pour la pratique de l'exercice d'endurance chez le sujet entraîné, leur augmentation sous l'influence du vieillissement, de l'obésité et de la sédentarité a été rapportée à l'incidence de la résistance à l'insuline dans le muscle (Shaw *et al.*, 2010; van Loon & Goodpaster, 2006). Ces deux types d'observations d'effets bénéfique ou délétère d'IMTG ont donné lieu à des travaux pour expliquer ce paradoxe (Amati *et al.*, 2011; Dube *et al.*, 2008; Goodpaster *et al.*, 2001; Tarnopolsky *et al.*, 2007; van Loon, 2004).

L'augmentation des réserves d'IMTG sous l'influence de l'entraînement à l'endurance a été montrée par plusieurs études (Dube *et al.*, 2008; Haus *et al.*, 2011; Pruchnic *et al.*, 2004; Schrauwen-Hinderling *et al.*, 2003; Tarnopolsky *et al.*, 2007). Cependant, des données contradictoires ont également été rapportées (Alsted *et al.*, 2009; Bruce *et al.*, 2004; Solomon *et al.*, 2008; Van Proeyen *et al.*, 2011a). Outre les méthodes de détermination d'IMTG, ces divergences peuvent résulter de différents facteurs dont l'âge, l'état métabolique (obésité ou diabète) des sujets (Bruce *et al.*, 2004; Bruce *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2008) ainsi que l'alimentation. Pour ce dernier point des études par Dube *et al.* (2008) et par Van Proeyen *et al.* (2011b); Van Proeyen *et al.* (2011a) ont montré l'impact de l'alimentation hyper lipidique ainsi que des conditions de réalisation des séances d'entraînement (à jeun ou sous alimentation sucrée) sur l'évolution des réserves d'IMTG après entraînement en endurance. D'autres études sont donc nécessaires pour tenter d'apporter des arguments permettant d'éclaircir ces données disparates concernant l'impact de l'entraînement en endurance sur IMTG.

### **2. Entraînement en résistance.**

L'entraînement en résistance ou en force est également intégré à la préparation physique dans un but de performance mais également de santé (réadaptation à l'exercice, prévention de la sarcopénie, hygiène de vie associée aux maladies métaboliques, cardiaques, respiratoires ou neurologiques).

Les variations du contenu en IMTG sous l'effet de l'entraînement en résistance n'ont pas fait l'objet d'études particulières chez le sujet en bonne santé. Cependant, chez le diabétique

ou le sujet résistant à l'insuline, si l'effet positif de l'entraînement en résistance sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline est connu (Dunstan *et al.*, 2002; Holten *et al.*, 2004; Ibanez *et al.*, 2005; Ishii *et al.*, 1998; Praet *et al.*, 2008), une seule de ces études s'intéresse à IMTG et montre son absence d'évolution sous l'effet de l'entraînement (Praet *et al.*, 2008). On sait cependant qu'un exercice aigu en résistance sollicite les réserves d'IMTG (Essen-Gustavsson & Tesch, 1990; Harber *et al.*, 2008; Koopman *et al.*, 2006).

Là encore, des informations apportées par d'autres expériences d'entraînement en résistance seraient utiles pour juger de leur impact sur IMTG.

### **3. Entraînement combiné.**

Afin d'apporter un éclairage particulier sur les adaptations induites par l'entraînement sur les paramètres physiologiques de la condition physique générale et de la santé, des protocoles ont été conçus pour être appliqués aux sujets âgés et aux sujets en surpoids. Le but de physiologie clinique était de stimuler à la fois, chez le même sujet, les adaptations à l'exercice d'endurance et de résistance afin de développer conjointement les capacités cardiovasculaires et la masse musculaire. Du fait du risque d'interférence entre les mécanismes cellulaires mis en jeu dans l'augmentation de la capacité mitochondriale par l'entraînement en endurance et dans l'accroissement de la masse musculaire par l'entraînement en résistance dans un groupe musculaire soumis à une stimulation mixte, en particulier par l'effet inhibiteur possible d'AMPK sur la voie Akt-mTOR (Hawley, 2009), nous avons choisi de séparer les muscles entraînés en sollicitant les masses musculaires des membres inférieurs pour l'entraînement en endurance (pédalage sur cycloergomètre) et celles des membres supérieurs et du tronc pour l'entraînement en résistance (mouvements de musculation ciblés). Les muscles cibles respectifs ont été le vastus latéralis et le deltoïdus.

### **4. Application de ce type d'entraînement aux sujets âgés.**

Un groupe de 10 hommes volontaires encore très actifs, âgés de 70 à 80 ans, a participé à cette expérimentation. Les résultats ont mis l'accent sur les adaptations physiologiques à l'exercice (Verney *et al.*, 2006), sur celles des cellules satellites (Verney *et al.*, 2008) et des capillaires (Charles *et al.*, 2006) musculaires.

**Objectifs de la deuxième étude:** En rapport avec le métabolisme lipidique, une étude antérieure a montré le bénéfice de l'entraînement en endurance chez le sujet âgé, accompagné en particulier d'une augmentation d'IMTG (Pruchnic *et al.*, 2004). Cependant devant les données contradictoires d'autres études à propos de l'évolution d'IMTG chez des sujets plus

jeunes (De Bock *et al.*, 2008; Van Proeyen *et al.*, 2011a) ou en excès de poids (Solomon *et al.*, 2008) il nous a semblé opportun de s'intéresser à nouveau à cette question. De plus, la confrontation des données des deux muscles soumis à des entraînements différents peut permettre de situer l'efficacité relative de l'entraînement en résistance (encore non explorée) par rapport à celle bien établie de l'entraînement en endurance sur l'augmentation d'IMTG.

### **5. Application de ce type d'entraînement aux sujets en surpoids.**

Le bénéfice de l'exercice physique pour la prévention ou la prise en charge du surpoids est bien établi depuis de nombreuses années (Cohen, 1985). La question de l'apport de l'entraînement en résistance pour conforter ou compléter l'action cardiovasculaire et énergétique de l'entraînement en endurance avait été posée par Walberg (1989). En revanche, il existe des données contradictoires sur les effets de l'entraînement en endurance et la diminution (Solomon *et al.*, 2008), l'absence de modification (Bruce *et al.*, 2006; Gan *et al.*, 2003), l'augmentation (Dube *et al.*, 2008) d'IMTG chez les sujets obèses.

L'action de l'entraînement en endurance chez l'obèse s'accompagne de l'augmentation des capacités oxydatives et de la sensibilité à l'insuline (Houmard *et al.*, 2004; Menshikova *et al.*, 2005). Il nous a donc paru intéressant sur le plan clinique de proposer une prise en charge par l'exercice de sujets en surpoids. Plusieurs centaines de volontaires ont répondu à l'appel à participation. Les résultats de l'exploration de leurs capacités physiques et de leurs caractéristiques générales de composition corporelle et de métabolisme ont été publiés (Saafi *et al.*, 2012). Parmi ces sujets, une vingtaine a été retenue pour participer à un programme d'entraînement combiné identique à celui décrit ci-dessus pour les sujets âgés.

**Objectifs de la troisième étude:** Outre la nouvelle question posée sur le devenir d'IMTG avec l'entraînement en endurance, cela nous a permis d'évaluer également l'apport de l'entraînement en résistance. En effet, le bénéfice de l'entraînement en résistance a été argumenté par LeBrasseur *et al.* (2011); Zanuso *et al.* (2010) pour l'obésité et pour le diabète de type 2. Par ailleurs, du fait de l'action du récepteur à l'insuline sur la stimulation de la voie PI3K/Akt/mTOR, inductrice de la synthèse des protéines, l'incidence de l'obésité et de la résistance à l'insuline sur l'hypotrophie musculaire est actuellement discutée (McLoughlin, 2010). A notre connaissance, une seule étude sur l'incidence de l'entraînement en résistance sur IMTG a été publiée à propos d'un groupe de sujets diabétiques de type 2 souffrant de polyneuropathie (Praet *et al.*, 2008). Dans cette dernière, IMTG est resté inchangé. Il reste cependant à contrôler que chez des sujets ne présentant pas de morbidité particulière associée au surpoids, cette absence d'effet sur IMTG demeure.

Enfin, dans la mesure où la résistance à l'insuline semble finalement être non directement liée à IMTG mais à l'accumulation d'intermédiaires lipidiques tels que les céramides et le diacylglycérol (voir chapitres correspondant dans l'introduction), une collaboration avec le laboratoire de recherche CarMeN (Inserm/INRA) de Lyon a permis d'effectuer le dosage des céramides sous l'effet de l'entraînement dans les muscles vastus lateralis et deltoïdes. Cette approche permet de comparer la baisse attendue des céramides musculaires sous l'influence de l'entraînement à l'endurance (Dube *et al.*, 2008) et d'observer l'éventuelle variation de ceux-ci avec l'entraînement en résistance.



# METHODOLOGIE

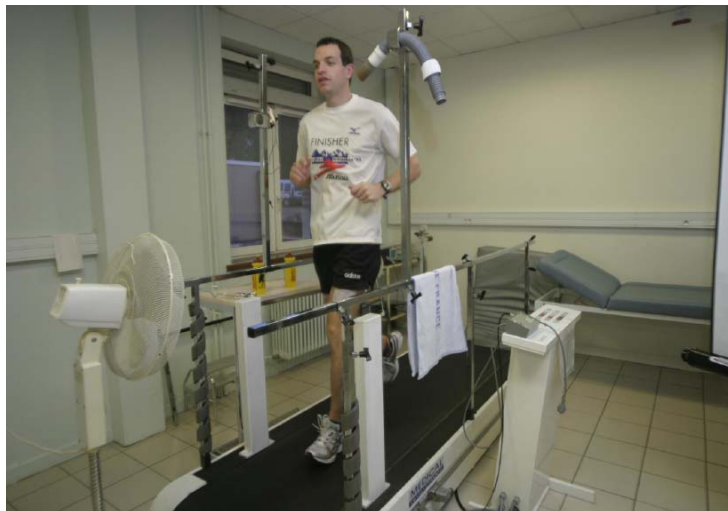
## A. Expériences physiologiques utilisées.

Les études qui vont suivre sont intégrées à trois programmes de recherche réalisés avec des objectifs variés pour lesquels d'autres études ont été menées. Chaque programme a reçu un avis favorable de la part du Comité Consultatif pour la Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) de la Région Rhône-Alpes-Loire.

Les échantillons musculaires utilisés pour ce mémoire proviennent:

- d'un protocole d'exercice d'ultra-endurance (Millet *et al.*, 2011).
- de deux protocoles d'entraînement sur 2 populations différentes: chez des sujets séniors âgés de 70-80 ans) (Verney *et al.*, 2006) et chez des sujets en surpoids âgés de 50-60 ans (Saafi *et al.*, 2012).

## I. Etude 1: Protocole d'exercice d'ultra-endurance: une épreuve de 24h de course à pied en situation de laboratoire (Millet *et al.*, 2011).

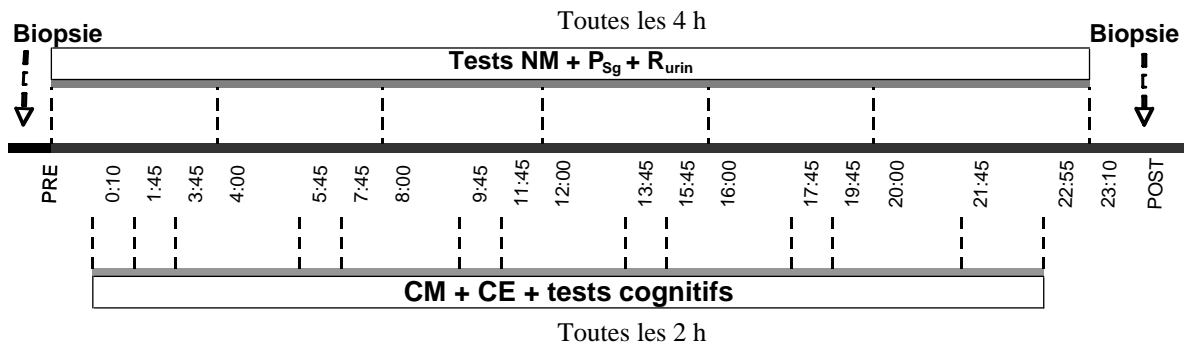


**Figure 43:** Présentation du tapis roulant utilisé dans ce protocole

**Objectif général de l'expérience:** étude des facteurs biomécaniques et énergétiques associés à la fatigue musculaire induite par un exercice d'ultra-endurance

**Sujets:** 10 sportifs (spécialistes d’ultra-endurance ayant réalisés au moins une épreuve d’une durée supérieure de 12 heures de course à pied en compétition) de sexe masculin ( $40 \pm 6$  ans,  $74 \pm 8$  kg,  $178 \pm 6$  cm,  $VO_2\text{max} : 53 \pm 5$  ml/min/kg) ont été volontaires pour participer à cette étude suite à un appel à candidature diffusé par la presse spécialisée (magazine Ultrafondus)

### Schéma expérimental:



NM: neuromusculaires (force volontaire évoquée électriquement et électromyographie), P<sub>Sg</sub>: prélèvements sanguins, R<sub>urin</sub>: Recueil urinaire, CM: mesure du coût mécanique sur tapis Adal, CE: mesure du coût énergétique par échanges gazeux.

**Figure 44:** Présentation de l'organisation des mesures lors du protocole de 24h.

### Procédure:

- Avant le test:

Chaque sportif a participé à une visite médicale d’inclusion préliminaire dans les semaines précédant le test. Cette visite médicale était associée à une épreuve de course sur tapis roulant (HEF Techmachine, Andrézieux-Bouthéon, France) pour la détermination de  $VO_2\text{max}$  et de la vitesse associée à celle-ci (épreuve triangulaire par paliers de 3 min, séparés de 1 min de repos, avec incréments de 1,5 km/h). Dans la même journée étaient pratiqués divers tests neuromusculaires non décrits ici.

- Le jour du test de performance:

Ce protocole était centré sur une épreuve de 24h de course à pied sur un tapis roulant en laboratoire (unité de Médecine du sport et Myologie, Service de Physiologie Clinique et de l’Exercice du CHU de Saint-Étienne, Hôpital Bellevue). La course était régulièrement interrompue pour la réalisation de différents mesures : des tests neuromusculaires et des prélèvements sanguins toutes les 4 heures, des tests cognitifs et de la biomécanique de la course toutes les 2 heures. Compte tenu du temps imparti aux expérimentations (réalisation

d'enregistrements électromyographiques, de mesures de forces musculaires, prises de sang, et de tests cognitifs....), les distances et les durées courues étaient précisément mesurées. La vitesse de progression était librement choisie et modifiable par les sujets, sans excéder 10 km.h<sup>-1</sup>.

**Alimentation au cours de l'exercice de 24h:** les sujets s'alimentaient selon leurs habitudes nutritionnelles sur ce genre d'épreuve. Les apports alimentaires s'effectuaient sous forme de boissons énergétiques (maltodextrine + fructose), de barres et de gels énergétiques (même composition) ainsi que des féculents salés (potages, pâtes alimentaires).

**Biopsies musculaires:**

Deux biopsies musculaires ont été réalisées dans le muscle vaste externe: 1 biopsie a été effectuée 2 heures avant l'exercice sous anesthésie locale selon la technique par pince de Weil Blakesley décrite par Henriksson (1979) et l'autre biopsie (controlatérale du site initial) selon le même procédé, immédiatement à la fin de l'exercice (Henriksson, 1979). L'incision est refermée par des bandes adhésives.

Localisation des biopsies pour le vastus lateralis: face antéro-externe de la cuisse, jonction 1/3 inférieur – 1/3 moyen du segment joignant l'interligne fémoro-tibial et l'épine iliaque antéro-supérieure. La quantité moyenne du tissu prélevé de chaque biopsie était de 80 à 100 mg. L'échantillon avait une double destinée.

La première partie était préparée pour la coupe à congélation (50 mg), deux faisceaux (15-25 mg) étaient orientés dans le composé OCT puis congelés dans l'isopentane refroidi dans l'azote liquide (-160°C) pour l'obtention des coupes à congélation destinées aux réactions histochimiques et immunohistochimiques.

La deuxième partie (40 mg) était rapidement congelée et conservée dans l'azote liquide pour servir aux analyses enzymatiques.



**Figure 45:** Présentation d'un prélèvement musculaire du côté droit après exercice

**II. Etude 2: Protocole d'entraînement combiné en musculation des membres supérieurs et en endurance des membres inférieurs chez des sujets seniors en bonne santé** (Verney *et al.*, 2006).

**Objectif général de l'expérience:** Etude des effets respectifs de l'entraînement à l'endurance et à la force sur les capacités musculaires des sujets âgés.

**Sujets :** 10 hommes en bonne santé ( $73 \pm 4$  ans,  $77,7 \pm 9$  kg,  $168 \pm 6$  cm,  $VO_2\text{max} : 35,8 \pm 7,3$  ml/min/kg) ont été volontaires pour participer à cette étude par l'intermédiaire d'un appel à candidature effectué par voie de presse locale.

### **Mesures effectuées avant et après l'entraînement**

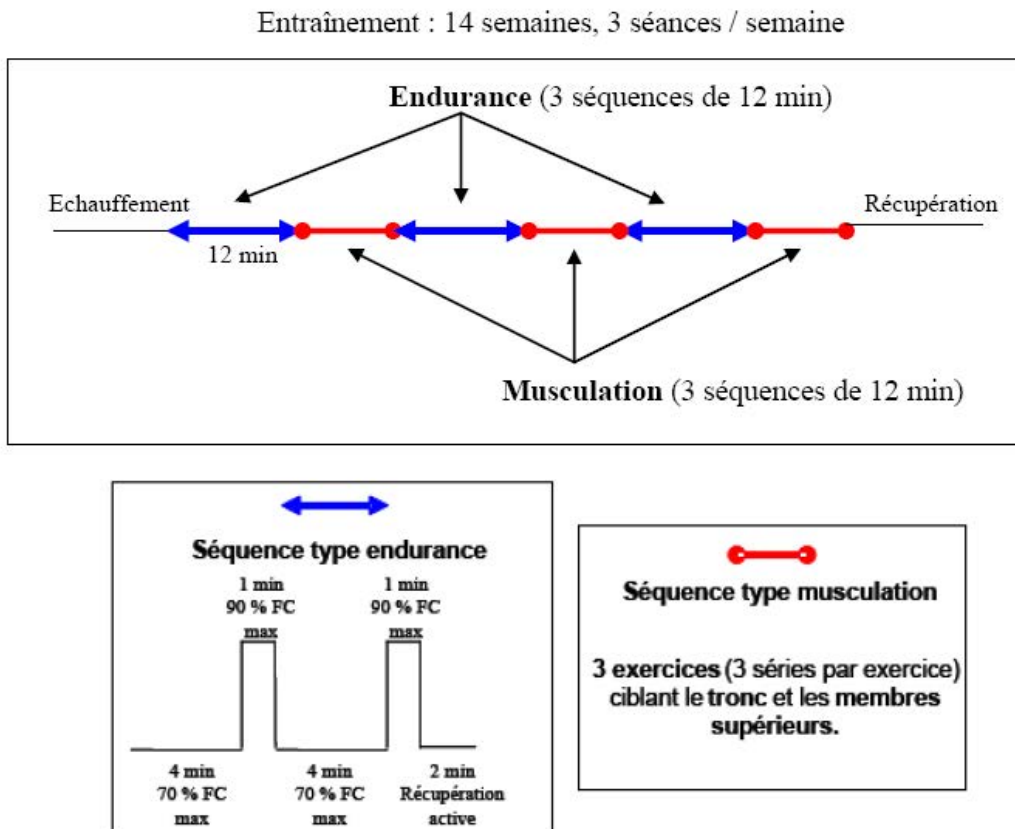
Après un examen médical d'inclusion, les sujets ont pris part à des épreuves physiologiques, des mesures anthropométriques et des explorations d'imagerie médicale. Ces différentes mesures étaient destinées à quantifier:

- les capacités d'endurance ( $VO_2\text{max}$ ) et de force (force isométrique) des membres supérieurs et inférieurs
- la composition corporelle : épaisseur des plis cutanés, mesure de la densité corporelle dans l'eau, absorption biphotonique aux rayons X (DXA), imagerie en résonance

magnétique (IRM) en coupe des membres supérieurs (muscle deltoïde), de l'abdomen et des membres inférieurs (muscle vaste externe)

Des biopsies musculaires (muscles deltoïde et vaste externe) ont été pratiquées avant et après la période d'entraînement.

### Procédure de l'entraînement combiné dissocié:



**Figure 46:** Organisation d'une séance d'entraînement.

L'entraînement se déroulait en présence d'un médecin et de deux éducateurs physiques.

Le programme d'entraînement a duré 14 semaines avec une cadence de 3 séances par semaine et chaque séance étant séparée de la suivante par au moins un jour de repos. Pour chaque séance, après une dizaine de minutes d'échauffement, les sujets effectuaient en alternance 3 séquences de 12 minutes d'entraînement en endurance et 12 minutes d'entraînement en musculation. Au total, chaque séance comprenait 36 minutes d'entraînement en endurance et 36 minutes d'entraînement en musculation. Au cours de chaque séance, la fréquence cardiaque des sujets était saisie en continu par des montres cardio-fréquence-mètres (polar S810, Polar, Kempele, Finland)

*Séquence d'exercice de pédalage (entraînement en endurance):*

Dans cette expérience, la méthode en créneau a été utilisée. Les sujets pédalaient sur des appareils ergométriques (Monark 868, Monark, Suède) équipés d'un boîtier électronique permettant de connaître la puissance développée en temps réel. Une séquence de pédalage se déroulait de la manière suivante : tout d'abord 4 minutes de pédalage à la puissance soutenue (75-85% de FC max), 1 minute de pédalage à la puissance élevée (80-95% FC max), ensuite 4 minutes de pédalage à la puissance soutenue (75-85% de FC max), suivie d'une minute de pédalage à la puissance élevée (80-95% FC max) et enfin 2 minutes de récupération active. Au fil des séances, en fonction de la diminution de la fréquence cardiaque le niveau de puissance était augmenté afin de maintenir un niveau de sollicitation constant.



**Figure 47:** Photo de présentation l'entraînement en endurance sur appareil ergométrique

*Séquence de travail en résistance (entraînement en force):*

Les sujets travaillaient en résistance par groupes musculaires ciblant les membres supérieurs et le tronc: deltoïde et pectoraux avec appareils guidés (développé couché, développé incliné, développé assis), biceps et triceps avec barres libres et haltères, dos et abdomen avec banc à lombaire et "crunch trainer". Au début de l'entraînement, les charges étaient modérées de telle sorte à réaliser des séries de 10 à 20 répétitions maximums (RM). Au fur et à mesure de la

progression pendant l'entraînement, les charges ont été augmentées parallèlement à une diminution du nombre de RM.



**Figure 48:** Photo de présentation d'entraînement en résistance

**L'alimentation pendant la période d'entraînement:** les sujets se sont alimentés selon leurs habitudes nutritionnelles. Le programme ne comprenait pas d'objectif de perte de poids. Les seules consignes alimentaires ont concerné la veille (pas d'excès de gras) et le jour de la biopsie musculaire (petit déjeuner standard pris dans le service). .

**Biopsie musculaire:** Quatre biopsies musculaires ont été effectuées pour chaque sujet. Deux biopsies musculaires simultanées ont été réalisées avant l'entraînement dans le vaste externe (même localisation que dans le protocole de l'exercice d'ultra-endurance) et dans le deltoïde (localisation: face latérale de l'épaule, à la moitié du segment joignant l'acromion et le bec de l'intersection humérale du chef médian du deltoïde). Après l'entraînement, deux autres biopsies musculaires similaires ont été réalisées sur les mêmes muscles. La biopsie post entraînement était décalée de 2 cm latéralement et verticalement pour le vaste externe et de 1 cm latéralement pour le deltoïde afin d'éviter toute zone cicatricielle.

Les destinées du tissu musculaire étaient similaires à celles du protocole d'exercice d'ultra-endurance.

Cependant, parmi 10 sujets dans ce protocole déjà publié par Verney *et al.*, (2006), le tissu musculaire résiduel a manqué chez 2 d'entre eux. En conséquence, seuls 8 sujets ont pu être étudiés pour ce mémoire.

### **III. Etude 3: Protocole d'entraînement combiné en musculation des membres supérieurs et en endurance des membres inférieurs chez des sujets en surpoids ((Saafi *et al.*, 2012) et article en préparation).**

**Justification et objectif général de l'étude:** L'expérimentation sur les sujets âgés décrite ci-dessus a montré une diminution des témoins sanguins du métabolisme glucido-lipidique (glucose, cholestérol, triglycérides par exemple) chez des sujets initialement normaux pour ces paramètres. L'association de ces données aux modifications de la composition corporelle (augmentation de la masse maigre et diminution de la masse grasse sans variation de la masse corporelle) a incité les expérimentateurs à appliquer le même programme à des sujets en surpoids avec des troubles métaboliques glucido-lipidiques. L'étude de l'évolution des caractéristiques énergétiques générales et métaboliques musculaires constituait là encore l'objectif de l'expérimentation

**Sujets:** 16 sujets du sexe masculin ( $58 \pm 5$  ans,  $94 \pm 10$  kg,  $173 \pm 7$  cm,  $VO_2\text{max} : 27,6 \pm 3,3$  ml/min/kg) ont été volontaires pour participer à cette étude par l'intermédiaire d'un appel à candidature effectué par voie de presse locale. Deux groupes appariés ont été constitués par tirage au sort (témoin et entraîné).

#### **Critères d'inclusion:**

• L'existence d'un syndrome métabolique bien que discutée dans sa signification physiopathologique et également dans sa définition clinique (NCEP<sup>4</sup>, EGIR<sup>5</sup>, WHO<sup>6</sup>), a permis de recruter les sujets volontaires. Chaque sujet devait présenter trois critères parmi les cinq suivants:

- Obésité abdominale : tour de taille  $> 102$  cm chez l'homme et  $> 88$  cm chez la femme
- Triglycérides  $\geq 1,5$  g/L
- HDL-cholestérol  $< 0,4$  g/L chez l'homme et  $< 0,5$  g/L chez la femme
- Glycémie à jeun  $\geq 1,1$  g/L
- Pression artérielle  $\geq 130/85$  mm Hg

---

<sup>4</sup> National Cholesterol Education Program

<sup>5</sup> European Group for the study of Insulin Resistance

<sup>6</sup> World Health Organisation



- Activité physique : être capable d'exercer des activités de la vie quotidienne (jardinage, bricolage, loisir actif) et de marche (30 minutes à vitesse de confort).

### **Critères d'exclusion:**

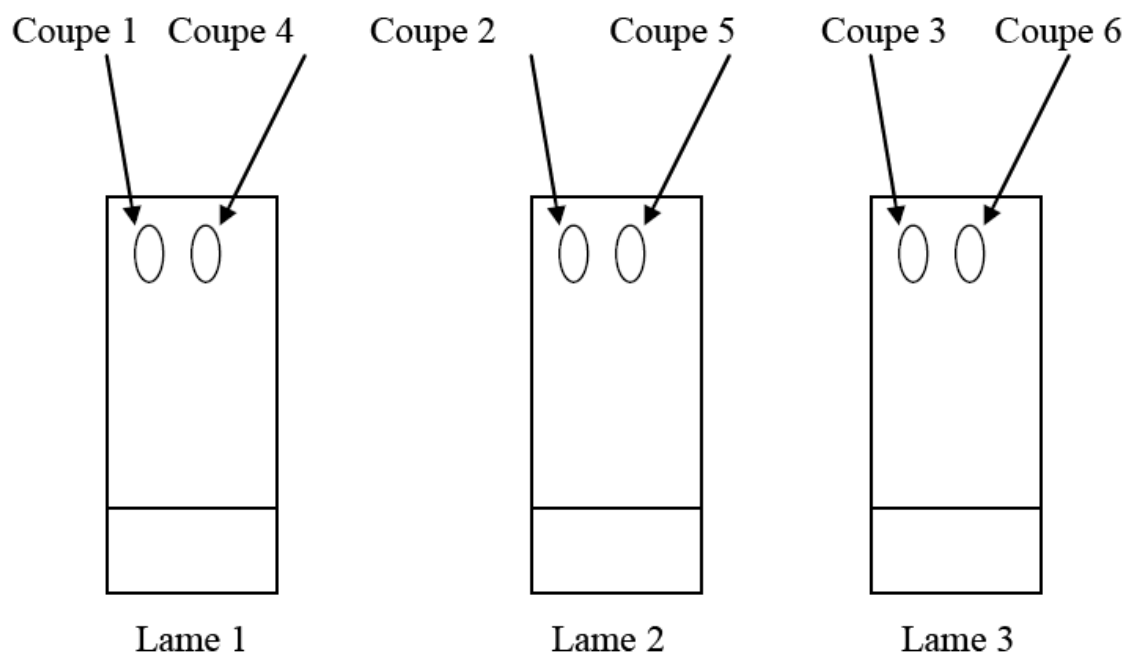
- Gêne douloureuse invalidante pour les mouvements du tronc et des membres supérieurs ou inférieurs.
- Obésité excessive : Indice de masse corporelle supérieur à  $35 \text{ kg} / (\text{m})^2$
- Toute maladie chronique évolutive ou en rémission, pouvant nécessiter le recours intempestif à une période d'invalidité, à un traitement, à une hospitalisation, à une incapacité à l'exercice...
  - La pratique déjà régulière et soutenue d'une activité physique.
  - Traitement médicamenteux en cours incompatible avec l'étude :
    - Traitement à visée cardio-vasculaire, respiratoire, neurologique, rénale, endocrinienne ou digestive pour maladie chronique avérée.
    - Traitement corticoïde de longue durée quelle que soit l'indication.
    - Traitement antidiabétique (diabète de type 1 ou 2).
    - Traitement hypocholestérolémiant (fibrates ou statines).
    - Traitement par inhibiteur de l'enzyme de conversion ou du récepteur de l'angiotensine II ou par  $\beta$ -bloquants pour hypertension modérée ( $130 < \text{PAS} < 150 \text{ mm Hg}$  ;  $85 < \text{PAD} < 95 \text{ mm Hg}$ ).

**Les mesures effectuées, la procédure d'entraînement, l'alimentation pendant la période de l'entraînement et les biopsies musculaires ont été organisées de façon similaire à l'étude ci-dessus.**

## **B. Méthodes de colorations histochimiques.**

### **I. Technique de coupe.**

Les échantillons musculaires se présentent sous forme de blocs inclus dans du Cryomount (Histolab) puis congelés et conservés dans de l'azote liquide. Toutes les coupes sont effectuées avec un microtome à congélation (Microm, HM560) à  $-20^\circ\text{C}$ . Des coupes en série d'une épaisseur de  $10 \mu\text{m}$  sont disposées sur des lames de microscopie.



**Figure 49:** Disposition des coupes en série sur les lames.

## II. Préparations histochimiques.

Le glycogène a été mis en évidence par la réaction du Périodic Acid Schiff (PAS) et les triglycérides par la méthode de l'Huile Rouge (HR). Ces méthodes réalisables dans notre laboratoire ont pu être apprises et effectuées par moi-même pendant le stage en Master. De plus, nous avons pu appliquer la méthode de quantification de l'intensité des colorations par l'analyse de la densité optique (analyse d'image avec le logiciel Sigma ScanPro 5.0, SPSS Inc.)

### 1. Mise en évidence des triglycérides par la coloration à l'huile rouge (HR).

Il y a 2 méthodes de coloration : une méthode classique par Dubowitz (1985) référence et une méthode optimisée par Koopman *et al.* (2001).

Principales étapes des préparations histochimiques

**La procédure de coloration HR selon Dubowitz** (Dubowitz, 1985):

Préparation de la solution :

Solution mère : 0,5g d'HR et 100ml d'isopropylique à 60%.

Solution d'emploi : 12ml de solution mère et 8ml d'eau distillé, et filtrer Whatman papier numéro 42.

Technique :

+Incubation dans la solution d'emploi pendant 30 minutes.

+Rinçage rapide à l'alcool isoproylique à 60%.

+Rinçage à l'eau distillé.

+Montage avec aquatex.

**La procédure de coloration HR d'après Koopman** (Koopman *et al.*, 2001):

Préparation de la solution :

Solution mère : 0,5g d'HR et 100ml de triéthyl phosphate à 60%.

Solution d'emploi : 12ml de solution mère et 8ml d'eau distillé, et filtrer Whatman papier numéro 42.

Technique :

+Fixation chimique : formaldéhyde 3,7 % pendant 1 heure.

+L'excès de formaldéhyde est éliminé par 3 rinçages à l'eau distillée pendant 30 secondes.

+Incubation dans la solution d'emploi pendants 30 minutes.

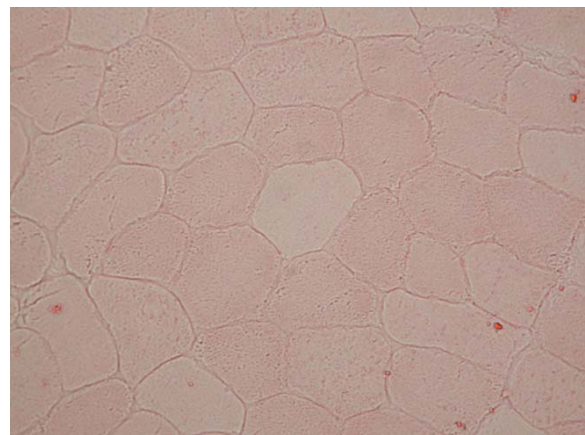
+Rinçage 3 fois dans l'eau distillée (30 secondes à chaque fois).

+Rinçage à l'eau courante pendant 10 minutes.

+Montage avec aquatex.



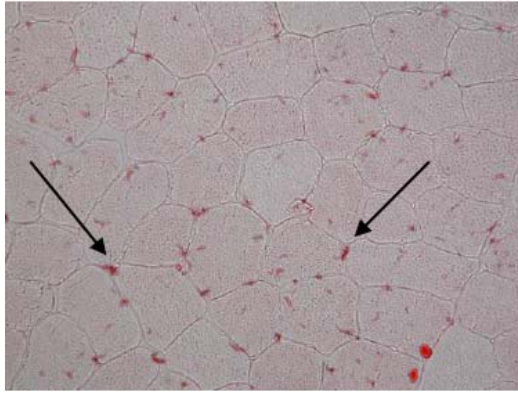
Méthode de Koopman



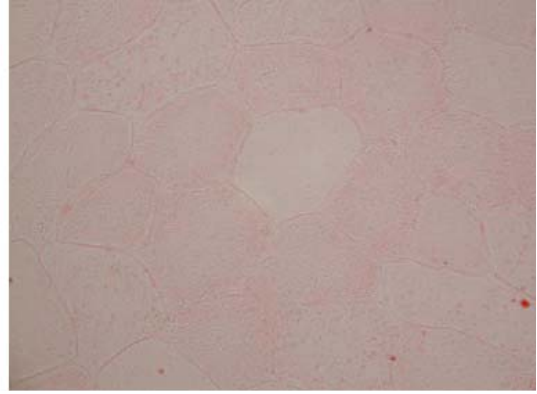
Méthode de Dubowitz

**Figure 50:** Comparaison de la coloration HR entre 2 méthodes

La technique de coloration de Koopman *et al.*, (2001) donne des images plus nettes avec un meilleur contraste entre les cellules. C'est cette méthode qui sera utilisée dans le cadre de ce mémoire. Cependant, cette méthode entraîne des modifications très importantes des cellules au fil du temps (**Figure 51**). Nous avons donc analysé les images obtenues le jour de la coloration à l'HR.



Méthode de Koopman



Méthode de Dubowitz

**Figure 51:** Evolution de la coloration HR en fonction du temps : après 6 jours

## 2. Glycogène avec coloration du Periodic Acid Schiff (PAS).

Préparation : Fixateur de Carnoy : 60ml d'éthanol, 30ml de chloroforme, 10ml d'acide acétique glacial.

Technique :

+Fixation des lames dans le fixateur de Carnoy pendant 10 minutes.

+Lavage à l'eau.

+Incubation dans l'acide périodique pendant 5 minutes.

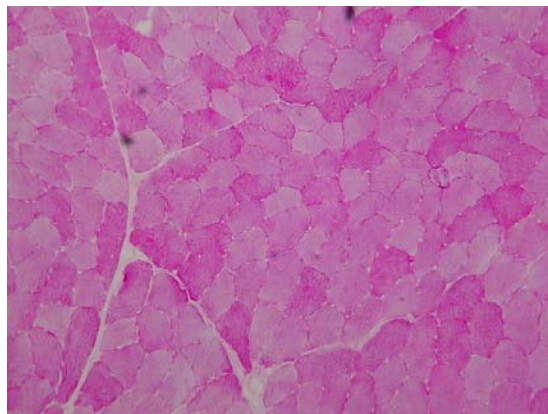
+Lavage à l'eau.

+Réactif de Schiff pendant 15 minutes.

+Passage dans l'eau 10 minutes.

+Déshydratation : 30 secondes dans de l'alcool à 95°, puis 2 fois de 30 secondes dans de l'alcool à 100°.

+Incubation dans Xylène pendant 1 minute puis montage à l'Eukit.



**Figure 52:** Coloration PAS

### 3. Caractérisation des types de fibres musculaires.

La typologie des fibres musculaires est réalisée en combinant les colorations immunohistochimiques utilisant les anticorps A4.951 et N2.261 dirigés respectivement contre les chaînes lourdes de myosine de type I et IIA. Avec l'anticorps A4.951, les fibres de type I sont fortement colorées et les fibres de type IIA et IIX ne sont pas colorées du tout. Avec l'anticorps N2.261, les fibres de type IIA sont fortement colorées, les fibres de type I sont plus légèrement colorées et les fibres de type IIX ne sont pas colorées du tout (**Tableau 3** et **Figure 54**). Les lames ont été colorées par les techniciennes du laboratoire. Le protocole complet de coloration est présenté dans la partie « annexes ».

	I	IIA	IIX
A4	■	□	□
N2	■	■	□

**Tableau 3:** Détermination de la typologie des fibres musculaires.

### III. Procédure de coloration et photographie par ordre chronologique.

- Quatre lames sériées sont préparées pour chaque sujet avec 3 coupes par lames (voir **Figure simplifiée 49**) :

Une lame est utilisée pour la coloration PAS et une autre pour la coloration à l'Huile rouge. Deux lames sont utilisées pour le typage immunohistochimique des fibres.

#### 1. Coloration par la technique de l'Huile Rouge.

\*Coloration à l'huile rouge (à faire le même jour):

+ Chaque jour, le matin : les 4 lames d'un même sujet sont colorées (vaste externe et deltoïde avant et après entraînement) dans les protocoles d'entraînement ou les 2 lames d'un même sujet (vaste externe avant et après exercice) dans le protocole d'ultra endurance de course à pieds de 24 heures afin d'avoir des conditions de coloration identiques.

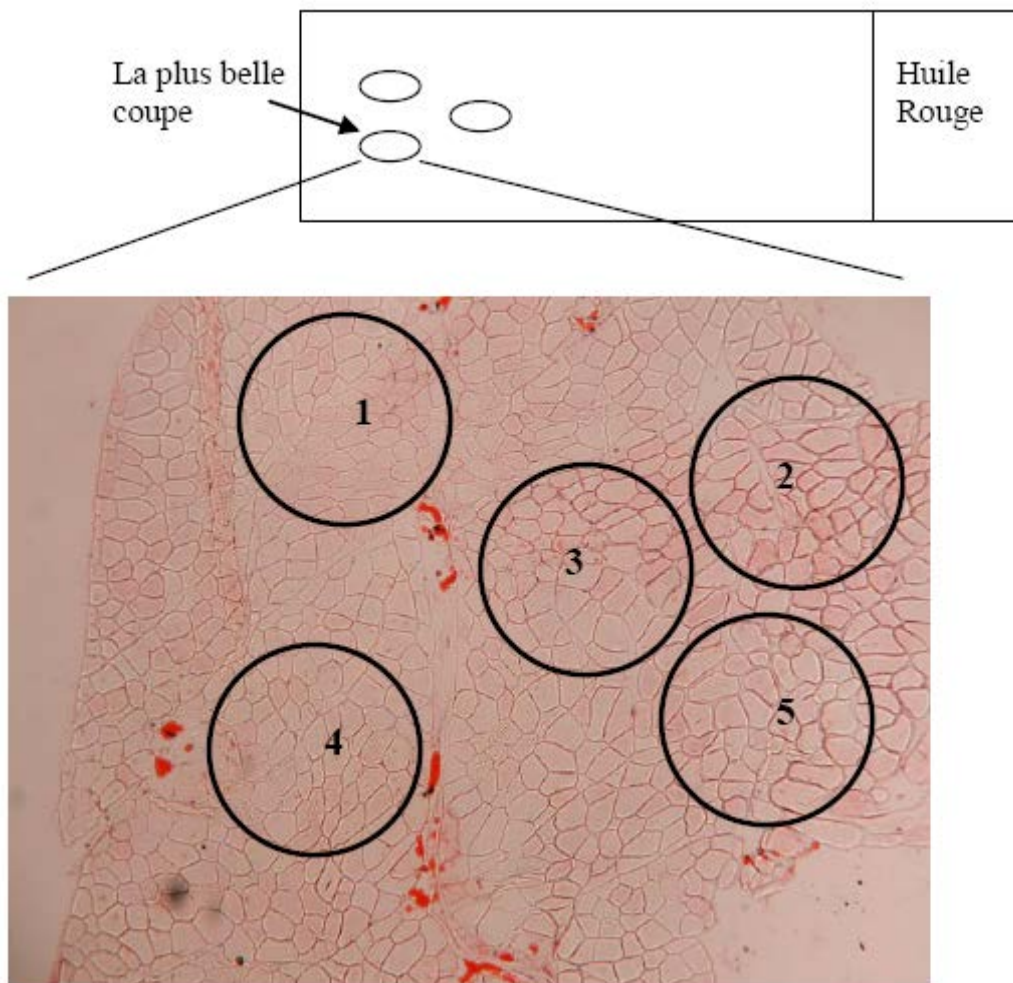
+ L'après-midi : les coupes sont photographiées (le dispositif d'analyse d'image est constitué d'un microscope modèle Nikon Eclipse E400 et d'un appareil photo numérique modèle Nikon Coolpix 990).

\*Procédure de la photographie à suivre :

Réglage de l'appareil photo numérique en mode manuel pour stabiliser les paramètres d'une photo à l'autre.

Diminuer l'intensité lumineuse du microscope

Choisir un champ sans artefact d'où il est possible de connaître la typologie des fibres

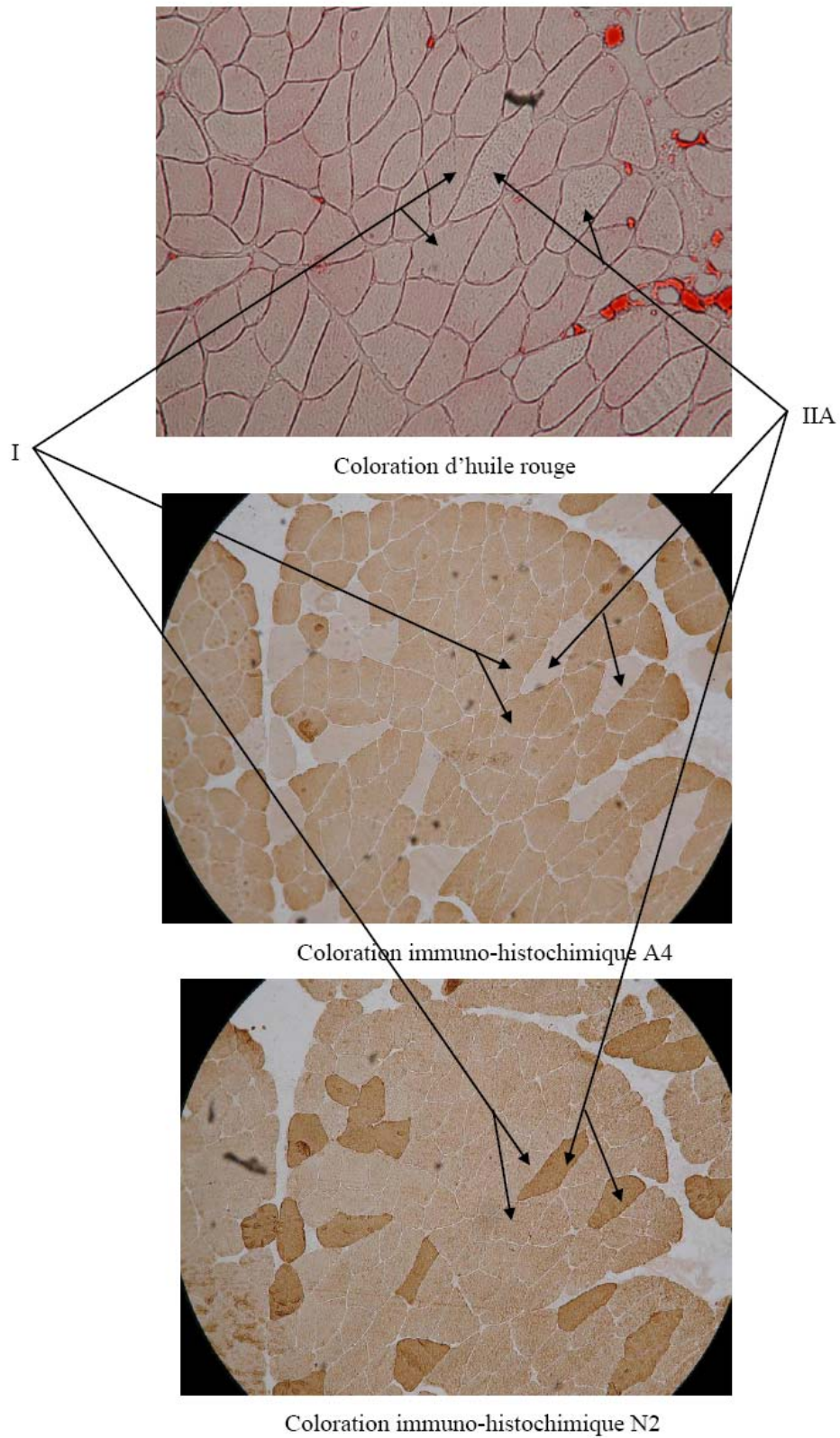


**Figure 53:** Les champs sans artefact où il est possible de connaître la typologie des fibres utilisées pour la coloration de l'huile rouge.

Sur la plus belle coupe de la coloration à l'huile rouge, 15 à 20 champs différents (15 à 20 photos) sont photographiés avec l'objectif x20 et 2 photos de fond blanc (zone vierge de la lame histologique en dehors de la coupe et pas de déchet de coloration) et de fond rouge par interposition d'un filtre rouge sur l'éclairage du microscope.

- Détermination de la typologie des fibres musculaires

+ Chaque champ photographié comprend en moyenne 20 à 25 cellules



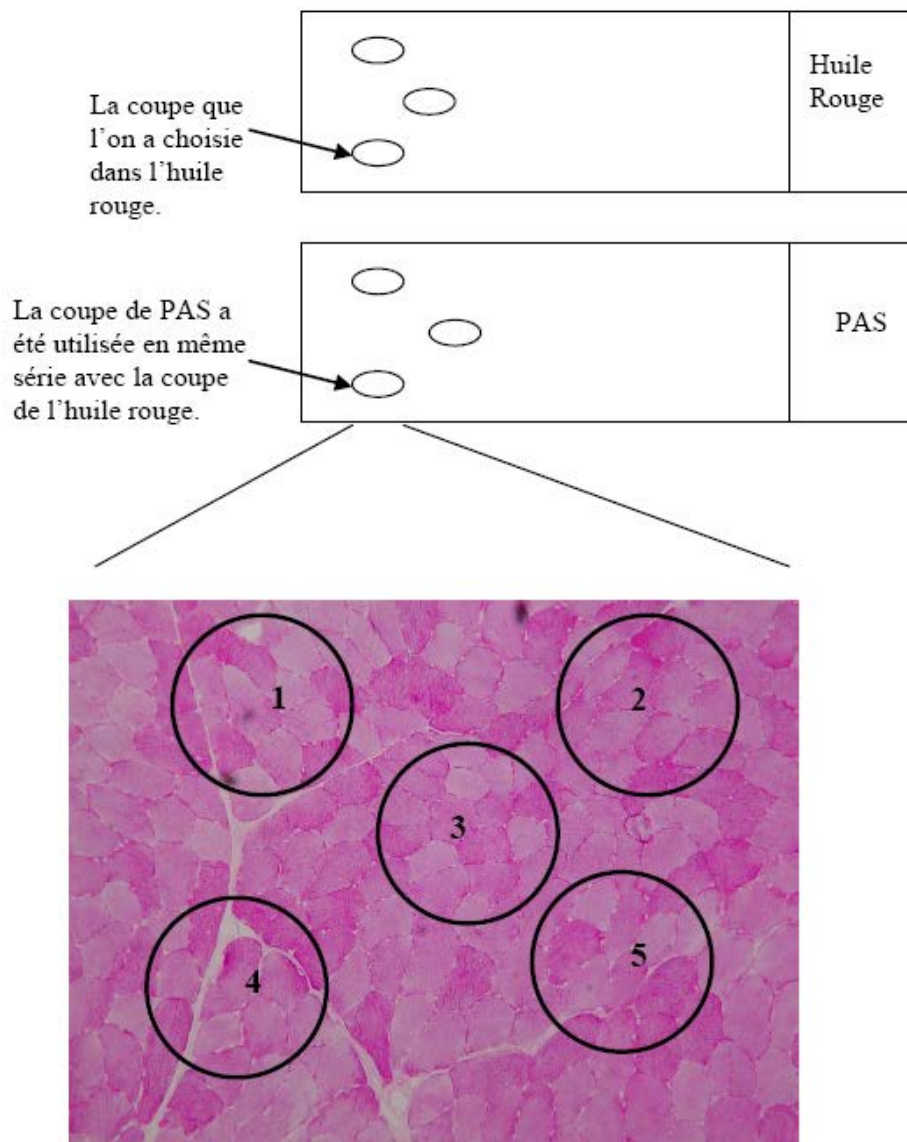
**Figure 54:** La typologie des fibres musculaires est réalisée en combinant les colorations immunohistochimiques utilisant les anticorps A4.951 et N2.261.

## 2. Coloration par la technique du PAS.

\*Les colorations de toutes les lames (tous les sujets dans un même protocole) ont été effectuées le même jour afin d'avoir des conditions de coloration comparables

\* Procédure pour faire les photographies :

- + Réglage de l'appareil photo numérique sur la fonction manuelle pour stabiliser les paramètres d'une photo à l'autre.
- + Parmi les coupes sur la lame de coloration de PAS, on a choisi la coupe en même série avec la coupe de la coloration de l'huile rouge.



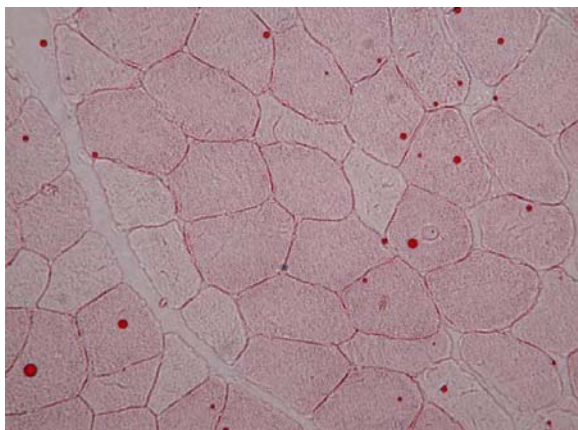
**Figure 55:** Les champs sans artefact où il est possible de connaître la typologie des fibres utilisées pour la coloration du PAS.



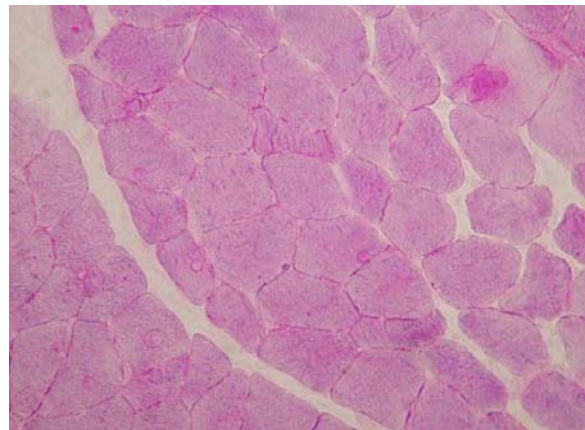
+ Les photographies en série (sans éteindre l'appareil photo numérique) sont effectuées dans un même lieu que ceux choisis pour d'huile rouge (15 à 20 photos) avec l'objectif de x20 et 2 photos de fond blanc (zone vierge de la lame histologique en dehors de la coupe) et de fond rouge par interposition d'une filtre rouge (le niveau de coloration de ce filtre doit être plus sombre que la coloration des cellules) sur l'éclairage du microscope.

- Typage des types de fibres sur chaque photo :

Les cellules sélectionnées pour la coloration de PAS sont les mêmes que celles de la coloration de l'huile rouge.



Huile rouge



PAS

**Figure 56:** Les champs sans artefact et où il est possible de connaître la typologie des fibres utilisées pour la coloration du PAS.

Le contenu en glycogène a également été mesuré par la méthode biochimique qui consiste à extraire les unités glucoses constitutives du glycogène de la poudre musculaire lyophilisée par traitement à l'acide chlorhydrique à 100°C pendant 2 heures et de les doser par méthode fluorimétrique. Cette technique a été réalisée pour l'étude 2.

### **C. Etablissement de la procédure d'analyse pour 2 colorations.**

#### **I. Analyse en Densité Optique (DO).**

Le dispositif d'analyse d'image est constitué d'un microscope modèle Nikon Eclipse E400 et d'un appareil photo numérique modèle Nikon Coolpix 990. Puis, l'analyse en densité optique (DO) est effectuée par le logiciel SigmaScan Pro 5.0 dans la gamme comprise entre 0 (noir) et 255 (blanc).

## II. Certains paramètres ont une influence sur la densité optique.

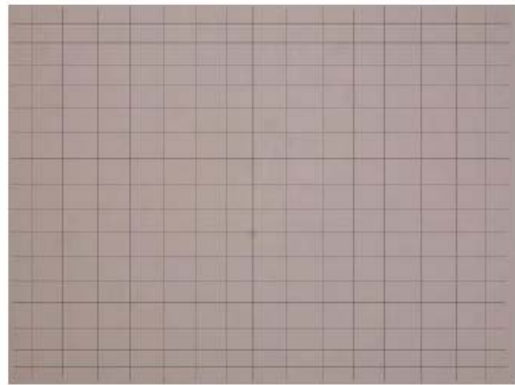
+ L'ouverture et la vitesse de la prise de vue pour l'appareil numérique en mode standard sont automatiques ce qui induit une variabilité des constantes d'une photo à l'autre.

Il est donc nécessaire de faire les prises de vue en mode manuel, ce qui permet pour une même série de coupes, d'effectuer les procédures d'étalonnage et les saisies d'image avec les paramètres photographiques constants.

+Le phénomène de halo sur les photos : Bien que cela ne soit pas détectable à l'observation visuelle, il a été mis en évidence une densité optique non homogène du champ microscopique photographié à partir d'un fond transparent (fond blanc). Ainsi, les contours d'un halo ont été discernés et quantifiés. Ce phénomène provient des caractéristiques des objectifs du microscope et sont reproductible pour une intensité d'éclairage avec un objectif donné.

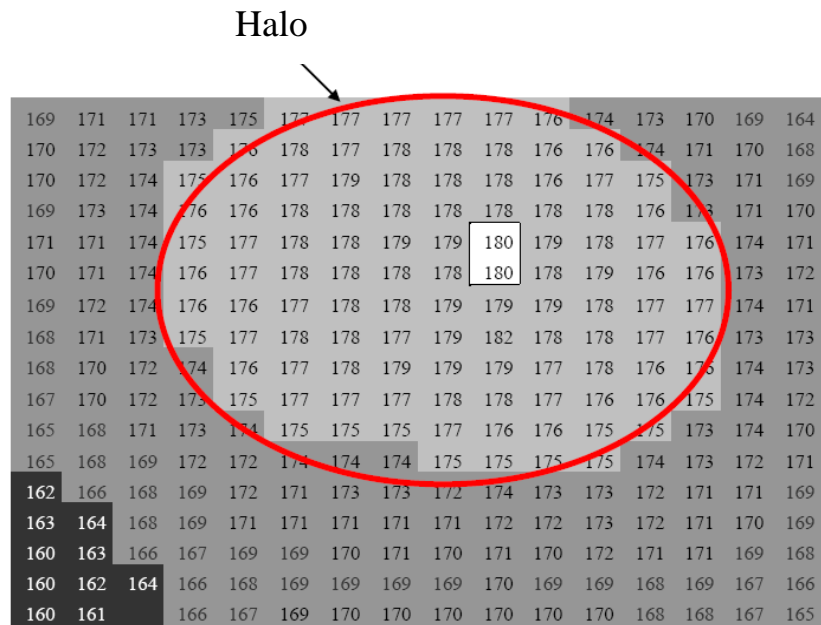


Photographie d'un fond blanc

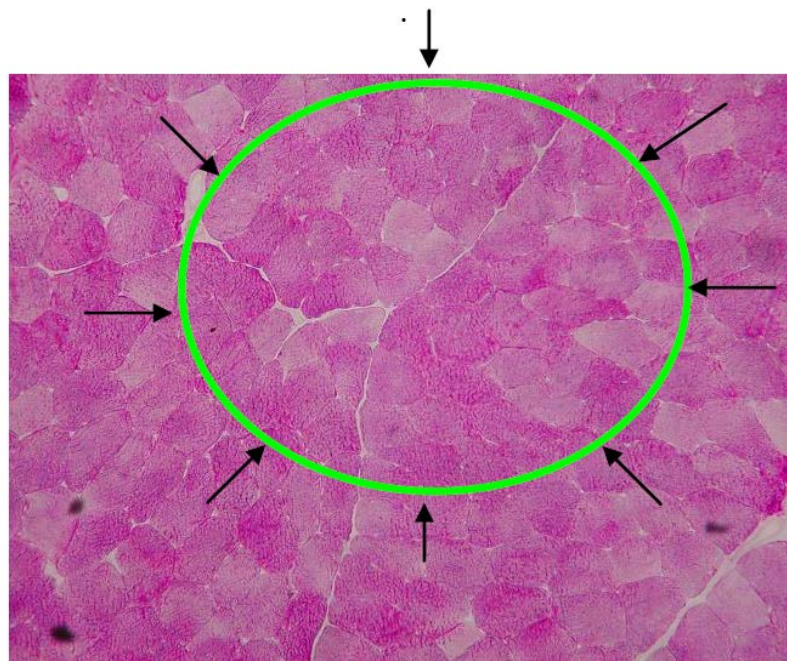


Analyse de la DO par zone

**Figure 57:** L'analyse DO par zone.



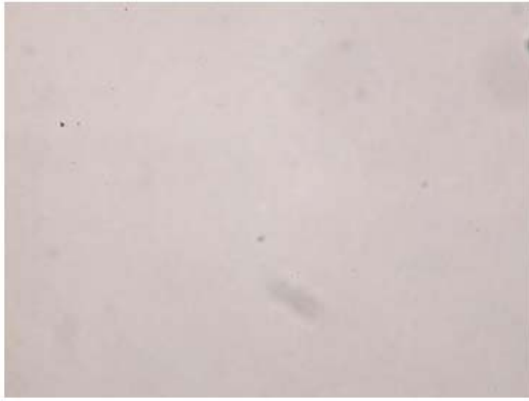
**Figure 58:** Le résultat DO par zone.



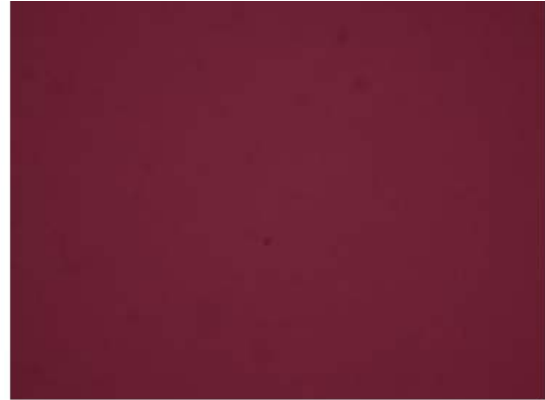
**Figure 59:** Détermination de la zone de prise en compte des cellules.

### III. Etalonnage.

+ Photographie d'un fond blanc (zone de la lame histologique en dehors de la coupe, pas de déchet produit de la coloration) et d'un fond rouge par interposition d'un filtre rouge sur l'éclairage du microscope.



Fond blanc



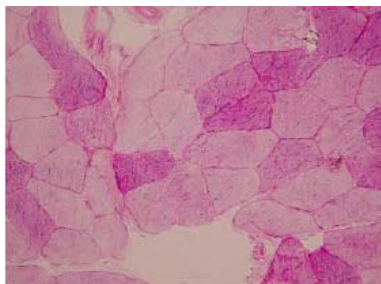
Fond rouge

**Figure 60:** Deux fonds l'utilisés dans le système d'étalonnage.

+ Pour chaque fond, l'intensité lumineuse du microscope est réglée à la moitié de l'intensité maximum.

+ Cette même intensité est conservée pour les photographies des coupes en série. Les prises de vue sont effectuées en mode manuel, ce qui permet pour une même série de coupes, d'effectuer les procédures d'étalonnage et les saisies d'image avec les paramètres photographiques constants.

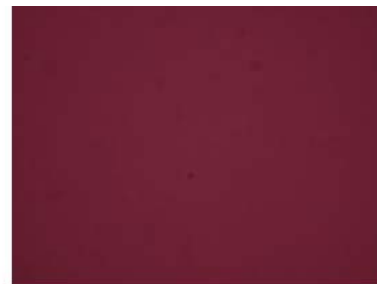
#### **IV. Conversion des photos en couleur grise et suppression du fond blanc avant l'analyse DO.**



Cellules

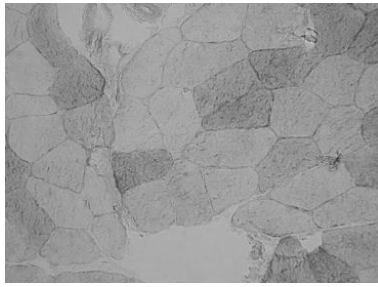


Fond blanc

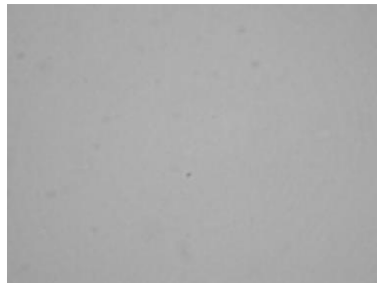


Fond rouge

**Figure 61:** Les photos originales.



Cellules en gris

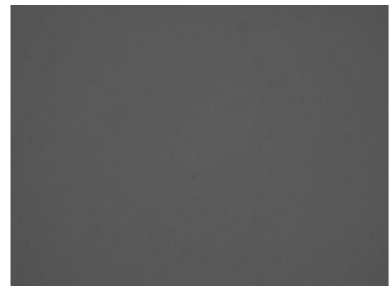
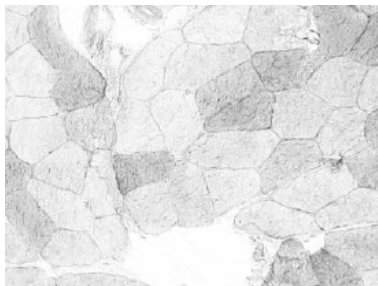


Fond blanc en gris



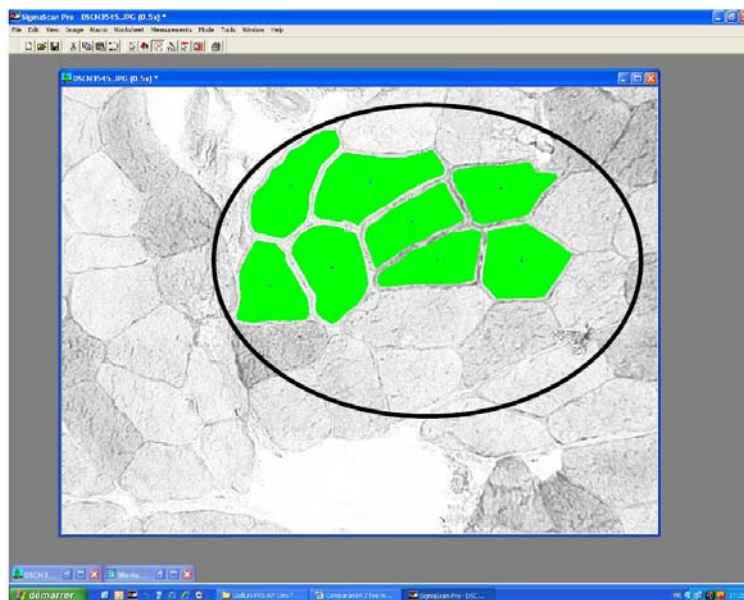
Fond rouge en gris

**Figure 62:** Conversion en couleur grise.



**Figure 63:** Suppression de l'intensité de l'éclairage du fond blanc.

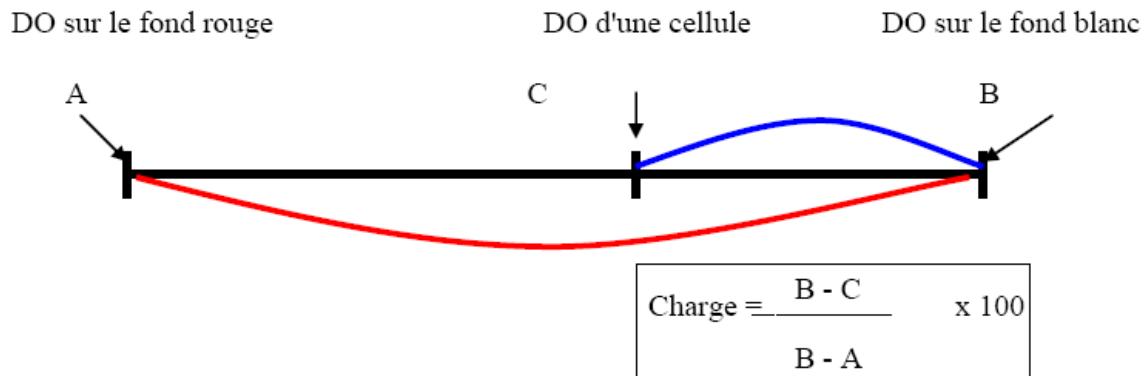
+ La mesure de la densité optique de la cellule est effectuée sur l'ensemble du cytoplasme si aucun artefact (bulle d'air ou huile rouge) n'est présent (dans la zone de prise en compte des cellules présenté au-dessus)



**Figure 64:** La mesure de la densité optique de la cellule est effectuée sur l'ensemble du cytoplasme.

## V. Principe de quantification de la densité optique (DO) en unités arbitraires.

A partir des valeurs absolues d'étalonnage et de DO sur une cellule, la quantification en unité arbitraire de la « charge » en substrat de cette cellule est calculée comme indiqué ci-dessous.



**La charge totale:**

$$\text{La charge totale} = (\text{DO type I} * X) / 100 + (\text{DO type IIA} * Y) / 100$$

X: pourcentage surface occupée par les fibres de types I

Y: pourcentage surface occupée par les fibres de types IIA

**Figure 65:** Mode de calcul de la « charge » en unité arbitraire à partir de DO.

## VI. La fiabilité de cette méthode d'analyse?

**Reproductibilité pour une lame:** A partir d'une lame de coloration du PAS (en théorie, cette coloration ne se modifie pas avec le temps) d'un sujet. Nous avons choisi une somme de 8 cellules pour effectuer une mesure de la charge moyenne (en unité arbitraire) (**Tableau 4**) en deux reprises différentes de la technique utilisée ci-dessus.

**Reproductibilité d'une étude à l'autre:** Il existe des risques de variabilité difficilement évitables lorsque des mesures histochimiques sont effectuées pour des programmes expérimentaux réalisés à des périodes différentes:

- température du cryostat et les conditions de la coupe à congélation qui peuvent modifier l'épaisseur des coupes
- durée de conservation de la coupe congelée sur lame sans préparation (la coloration peut être

extemporanée ou effectuée plusieurs mois après, suivant les programmes)

- réglage optique du microscope

- densité optique (DO) des filtres utilisés: dans ce cas particulier, le filtre utilisé pour les coupes huile rouge du programme ultra endurance a une DO deux fois plus élevée que celle utilisée pour les autres programmes, ce qui devrait aboutir à une charge estimée d'IMTG plus faible pour les muscle d'ultra endurance. Cette modification de méthodologie a été choisie pour rendre plus réelle l'unité arbitraire de l'estimation du stockage des lipides par rapport à l'intensité de coloration des préparations au PAS.

Il en demeure que ces méthodes d'estimation aboutissent à des unités arbitraires pour lesquelles seules des variations relatives au sein d'une même expérience peuvent aboutir à une démarche de comparaison.

	1ere reprise				2ere reprise			
	DO	F Rouge	F Blanc	Charge	DO	F Rouge	F Blanc	Charge
Cellule 1	241,93	90,92	255,00	7,96	241,41	92,11	255,00	8,34
Cellule 2	232,99	90,92	255,00	13,42	232,82	92,11	255,00	13,61
Cellule 3	239,57	90,92	255,00	9,40	241,00	92,11	255,00	8,59
Cellule 4	239,80	90,92	255,00	9,26	240,46	92,11	255,00	8,92
Cellule 5	210,42	90,92	255,00	27,17	210,15	92,11	255,00	27,53
Cellule 6	195,95	90,92	255,00	35,99	198,71	92,11	255,00	34,56
Cellule 7	197,52	90,92	255,00	35,03	196,84	92,11	255,00	35,70
Cellule 8	224,91	90,92	255,00	18,34	225,09	92,11	255,00	18,36
<b>Moyenne</b>				<b>19,57</b>				<b>19,45</b>

**Tableau 4:** Résultats deux reprises différentes du même champ.

#### **D) Indices de vascularisation des fibres musculaires.**

Grâce aux colorations effectuées par d'autres collègues du laboratoire, nous avons pu quantifier certains paramètres en relation avec les capillaires musculaires (ou micro vaisseaux).

La coloration des micros vaisseaux a été réalisée à l'aide de l'anticorps CD31 (Dako, Glostrup, Danmark), spécifique des molécules PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule) exprimées notamment par les cellules endothéliales. Le protocole complet de coloration est présenté dans la partie « annexes ».

A partir de captures d'images réalisées sur cette coloration, les différents indices de

microvascularisation ont été déterminés:

**1. Indice global** (calculé pour l'ensemble d'une zone de la biopsie).

La densité capillaire (DC):  $DC = \text{nombre de capillaire dans une zone} / \text{surface de la zone}$   
(cap.mm<sup>-2</sup>)

**2. Indices spécifiques** (calculés pour chaque fibre musculaire).

CAF: nombre de capillaires au contact d'une fibre.

CAFA: CAF/ surface d'une fibre.

LC/PF: rapport entre la longueur du capillaire en contact avec la fibre et le périmètre de la fibre. Cela correspond au pourcentage du périmètre de la fibre en contact avec un capillaire.

### **E) Analyse statistique.**

Les comparaisons de moyennes seront réalisées par test-t de Student pour des valeurs appariées (avant-après exercice et avant-après entraînement). Dans le cas des comparaisons effectuées simultanément pour le muscle vaste externe et deltoïde une analyse de variance à deux facteurs sera utilisée (effet entraînement et effet muscle). Dans le cas de deux facteurs significatifs ou d'un facteur significatif associé à une interaction, des tests t appariés seront réalisés pour tester les effets individuels. Des régressions linéaires et leurs coefficients de corrélation (Pearson) correspondants (rho) ont été utilisés pour déterminer la relation entre 2 variables. Tous les calculs statistiques et les analyses seront effectués avec le logiciel Stat View (SAS Institute Inc.). Le seuil de significativité fixé à  $p < 0,05$  a été choisi. Les degrés de significativité exacts sont donnés pour les valeurs de p comprises entre 0,001- 0,05 et  $< 0,001$  apparaît pour les valeurs inférieures.



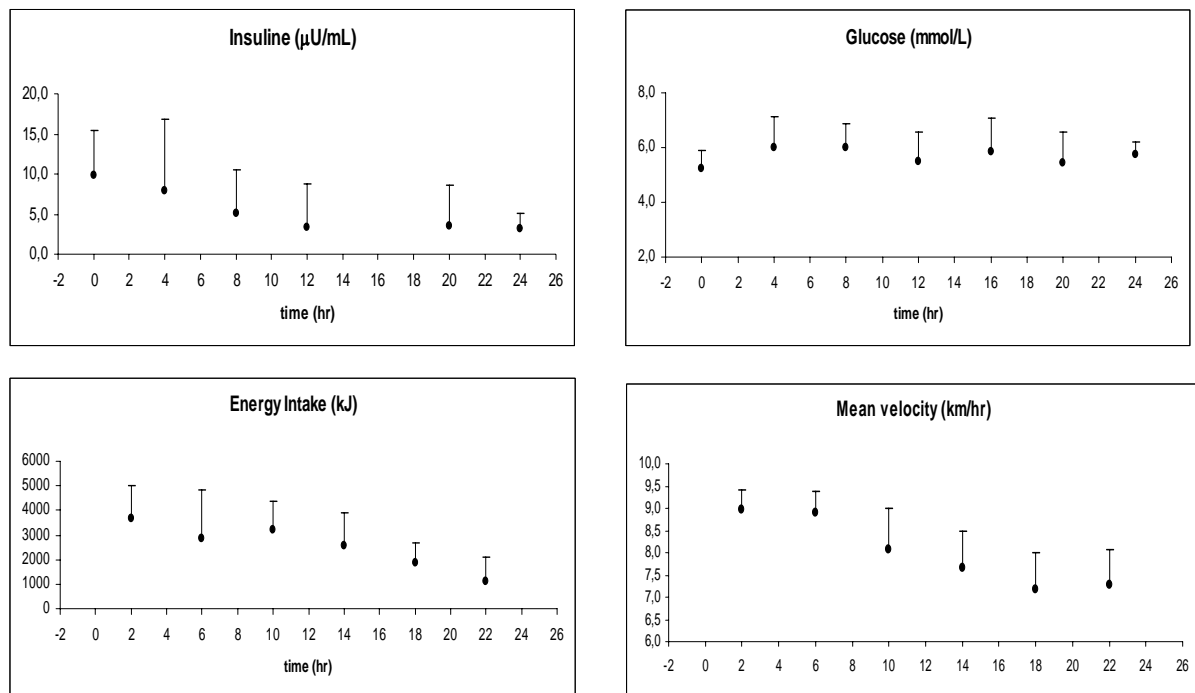
## RESULTATS – DISCUSSION

### A. Etude 1: Expérience de l'exercice aigu de très longue durée.

#### I. Résultats.

##### Performance et paramètres fonctionnels associés

Ces données ont été largement publiées dans les articles portant sur les facteurs physiologiques ((Millet *et al.*, 2011), Gimenez *et al.*, à paraître), sur la fatigue neuromusculaire (Martin *et al.*, 2010) et sur la régulation de l'autophagie musculaire (Jamart *et al.*, 2012). En résumé, la distance parcourue a été de  $150 \pm 15$  Km à la vitesse moyenne de  $8.0 \pm 0.7$  Km/h ce qui correspond à  $44 \pm 3$  % de la vitesse maximale aérobie. La **Figure 66** ci-dessous illustre l'évolution en fonction du temps de la glycémie (stable), et de l'insulinémie (stable à partir de la 8<sup>e</sup> heure) alors que l'apport énergétique alimentaire et la vitesse moyenne ont diminué au cours des 24 heures.



Time (hr): temps d'exercice (heure) ; Energy intake: apport énergétique ; Mean velocity: Vitesse moyenne (km/h).

**Figure 66:** Paramètres métaboliques et énergétiques mesurés au cours des 24 heures de course.

## Stockages d'IMCL

IMCL vaste externe (UA)	Avant exercice	Après exercice	Effet exercice
Type I	9.20 ± 3.9	4.12 ± 2.1	**
Type IIA	7.5 ± 3.6 <sup>†</sup>	4.2 ± 2.1 <sup>ns</sup>	*

IMCL: lipides intramyocellulaires ; UA: unité arbitraire

Différence significative entre avant exercice et après exercice: \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

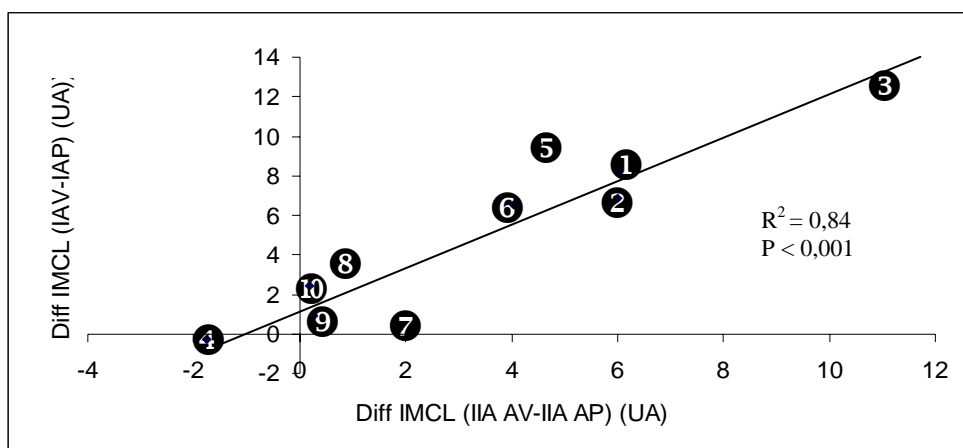
Différence significative entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>: p<0.05

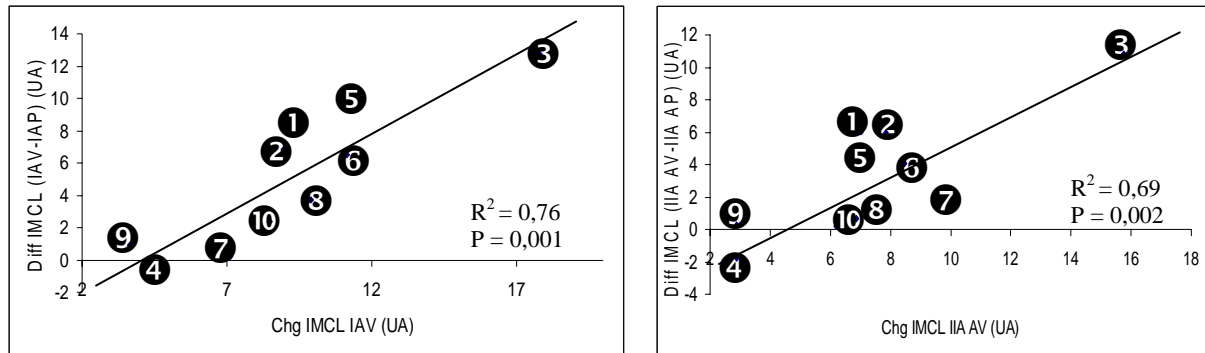
**Tableau 5:** Effet de la course de 24 heures sur les réserves en IMCL.

Avant l'exercice, les réserves en IMCL étaient significativement plus élevées ( $p < 0,05$ ) dans la fibre de type I que dans le type IIA. Après l'exercice, les réserves en IMCL étaient similaires dans les deux types de fibres (**Tableau 5**).

Nous avons observé une diminution d'IMCL à la fois dans les fibres de type I ( $p < 0,01$ ) et de type IIA ( $p < 0,05$ ) (**Tableau 5**).

Lorsque les données individuelles ont été examinées, une corrélation significative a été observée entre les déplétions induites par l'exercice dans les deux types de fibres ( $r = 0,84$ ,  $p < 0,001$ ). En outre, plus le taux des réserves en IMCL était élevé avant l'exercice, plus l'amplitude de la diminution des réserves en IMCL était importante à la fois dans les fibres de type I et type IIA (**Figure 67**).





IMCL: triglycérade intra-myocellulaire, UA: unité arbitraire  
 Chg IMCL IAV: charge en IMCL dans fibre de type I avant l'exercice  
 Chg IMCL IIA AV: charge en IMCL dans fibre de type IIA avant l'exercice  
 Diff IMCL (IAV-IAP): déplétion d'IMCL par fibre de type I  
 Diff IMCL (IIA AV-IIA AP): déplétion d'IMCL par fibre de type IIA

**Figure 67:** Relation entre les réserves initiales en IMCL avant l'exercice et la déplétion d'IMCL. Les numéros à l'intérieur des symboles correspondent aux sujets.

### Stockages du glycogène musculaire

Glycogène vaste externe (UA)		Avant exercice	Après exercice	Effet exercice
	Type I	22.8 ± 4.8	10.4 ± 4.0	***
	Type IIA	24.5 ± 3.8 <sup>ns</sup>	22.7 ± 4.7 <sup>†††</sup>	ns

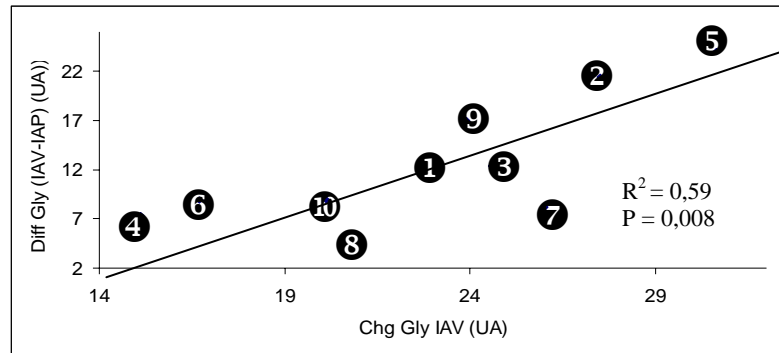
UA: unité arbitraire

Différence significative entre avant exercice et après exercice: ns: pas de différence significative, \*\*\*: p<0.001

Différence significative entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†††</sup>: p<0.001.

**Tableau 6:** Effet de la course de 24 heures sur les stockages du glycogène musculaire.

Avant l'exercice, les réserves en glycogène n'étaient pas significativement plus élevées dans les fibres de type IIA que dans le type 1. Après l'exercice, les réserves en glycogène étaient significativement plus élevées dans les fibres de type IIA que dans le type I (p<0.001). La déplétion en glycogène n'était significative que dans les fibres de type I (p<0.001). (Tableau 6).



Gly: glycogène, UA: unité arbitraire  
 Chg Gly IAV: charge en glycogène dans fibre de type I avant l'exercice  
 Diff Gly (IAV-IAP): déplétion du glycogène par fibre de type I

**Figure 68:** Relation entre réserves initiales en Glycogène avant l'exercice et la déplétion du glycogène. Les numéros à l'intérieur des symboles correspondent aux sujets.

Dans les fibres de type I, plus le taux des réserves en glycogène était élevé avant l'exercice, plus l'amplitude de la diminution des réserves en glycogène était importante. (Figure 68).

## II. Discussion.

Dans la présente étude, dans un groupe de 10 coureurs de longue distance, une baisse significative de la réserve en IMCL a été observée au cours d'une course sur tapis roulant de 24 heures à la fois dans les fibres de type I et de type IIA avec une baisse moyenne relative de 56% et 45% respectivement. Une importante diminution en glycogène a été trouvée dans les fibres de type I uniquement (55%), les fibres de type IIA n'ont montré qu'une diminution modeste et non significative au cours de l'exercice (8%). Ces résultats sont en accord avec l'utilisation de la réserve en IMCL et en glycogène décrite pendant un exercice en endurance de 3 heures (Stellingwerff *et al.*, 2007a) ou 4 heures (Watt *et al.*, 2002). En ce qui concerne la performance strictement en ultra-endurance, c'est à dire d'une durée supérieure à 6 heures, une autre étude a constaté une baisse significative du glycogène, mais pas d'IMCL (malgré 31 % de baisse moyenne) après environ 100 heures d'exercice entrecoupées par environ 5 heures de sommeil dans une course de raid (Helge *et al.*, 2007a). Les données de cette dernière étude

ont été obtenues sur des extraits musculaires mixtes analysés par des techniques biochimiques. La technique biochimique pour le glycogène musculaire est reconnue depuis longtemps comme une méthode reproductible et précise (Tsintzas *et al.*, 1996) avec une bonne concordance avec les résultats obtenus par la méthode histochimique au PAS (Gollnick *et al.*, 1974; Ngo *et al.*, 2012). En conséquence, les mêmes résultats entre notre étude actuelle et les études antérieures étaient attendus. D'autre part, comme brièvement présenté dans l'introduction, il peut exister des différences entre les méthodes de dosage d'IMCL (De Bock *et al.*, 2007; Stellingwerff *et al.*, 2007a; Watt *et al.*, 2002b), avec des doutes sur la reproductibilité et la précision de la méthode biochimique (Wendling *et al.*, 1996). C'est probablement ce manque de précision qui a conduit à ce qu'une baisse de 31% d'IMCL pendant le raid ne se soit pas révélée significative dans l'étude de Helge *et al.* (2007a). Aucune autre tentative d'explication, en particulier physiologique, n'a été évoquée par Helge *et al.* (2007a). Par conséquent, en s'appuyant sur les études précédentes qui concernent des exercices de 3 h (Stellingwerff *et al.*, 2007a) ou 2 heures (De Bock *et al.*, 2008; De Bock *et al.*, 2005; van Loon *et al.*, 2003a) et qui utilisent les colorations histochimiques par l'huile rouge, nos résultats étendent la description de la baisse de la réserve en IMCL dans les fibres de type I pendant une course de 24 heures sur tapis roulant.

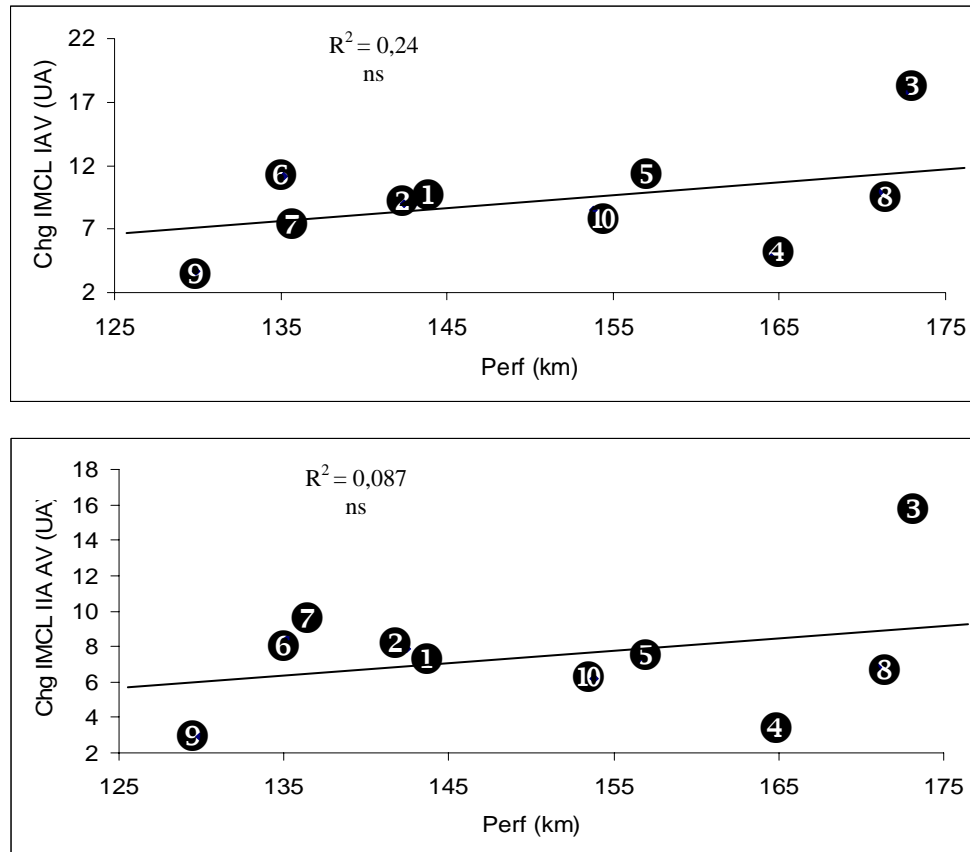
D'autre part, la diminution significative de la réserve en IMCL dans les fibres de type IIA est rarement décrite. En effet, au cours d'un exercice prolongé sous-maximal, l'importante utilisation des IMCL se produit essentiellement dans les fibres de type I (De Bock *et al.*, 2008; De Bock *et al.*, 2005; Stellingwerff *et al.*, 2007a; Stellingwerff *et al.*, 2007b; van Loon *et al.*, 2003a). Néanmoins, la baisse significative d'IMCL dans les fibres de type IIA pendant l'exercice en endurance de 2 heures a été montrée chez des sujets soumis soit à un entraînement en endurance donc les séances sont effectuées à jeun (Van Proeyen *et al.*, 2011a) soit lors d'une alimentation riche en graisse lors de l'entraînement (Van Proeyen *et al.*, 2011b). Ces deux conditions expérimentales dans les expériences de Van Proeyen *et al.*, ne correspondent pas au programme d'entraînement ou au régime alimentaire des sujets de notre étude.

Les différences méthodologiques entre la présente étude et celles qui n'ont pas trouvé une baisse d'IMCL dans les fibres de type IIA résident dans la durée et les intensités relatives des exercices. Deux heures d'exercices à 75 %  $VO_2max$  (De Bock *et al.*, 2008; De Bock *et al.*, 2005) ou à 60 %  $VO_2max$  (van Loon *et al.*, 2003a) ou 3 heures d'exercice à 62 %  $VO_2max$  (Stellingwerff *et al.*, 2007a; Stellingwerff *et al.*, 2007b) sont des conditions très différentes de celles imposées lors de l'exercice pendant 24 heures à 40-45 %  $VO_2max$ . Il peut être envisagé

que la longue durée à faible intensité de l'exercice pourrait recourir au recrutement des fibres de type IIA pour compenser la déficience métabolique progressive des fibres de type I. Ce phénomène de recrutement des fibres rapides secondairement à celui des fibres lentes au cours de l'exercice en endurance est bien décrit pour l'épuisement des réserves de glycogène (Vollestad & Blom, 1985). Toutefois, dans notre étude, simultanément à l'utilisation des réserves d'IMCL, celles de glycogène n'ont pas été entamées dans les fibres IIA. Compte tenu du fait que le modèle de déplétion en glycogène peut consister en un outil valable pour identifier le recrutement de fibre au cours de l'exercice (Saltin, 1981), pourquoi les fibres de type IIA apparemment non soumises à la glycolyse pendant l'exercice de 24 heures le seraient dans l'utilisation d'IMCL? Pendant les dernières heures de la course de 24h à une vitesse de course de 7-7,5 km/h, ce qui correspond approximativement à 40% VO<sub>2</sub>max, la déplétion en glycogène probablement déjà installée dans les fibres de type I ainsi que l'augmentation de la stimulation du système nerveux sympathique (Steensberg *et al.*, 2002; Watt *et al.*, 2002; Wojtaszewski *et al.*, 2003) pourraient être associées à une augmentation marquée de l'oxydation des graisses et une diminution de la glycolyse dans les fibres IIA. Puisque les catécholamines sont les  $\beta$ -activateurs de la lipase hormonosensible (HSL) dans les fibres musculaires (Watt *et al.*, 2006), l'utilisation d'IMCL pourrait s'associer à celle des acides gras libres plasmatiques pour assurer l'oxydation des lipides par le muscle. Cependant, en opposition à ces phénomènes suggérés, une inhibition potentielle (Watt *et al.*, 2006; Watt *et al.*, 2004b), mais non confirmée (Roepstorff *et al.*, 2006) d'HSL par AMPK peut également être évoquée. En effet, la phosphorylation (et donc l'activation) d'AMPK a augmenté significativement après 24h lors de cette étude (Jamart *et al.*, 2012). Au total, il manque beaucoup d'éléments pour apporter une explication à la dissociation entre déplétion en glycogène et IMCL dans les fibres IIA lors de l'exercice de 24h. Une analyse musculaire intermédiaire aurait pu apporter des éléments supplémentaires puisque la lipolyse musculaire a été amplifiée dans la deuxième partie de l'épreuve. En effet, pour des mesures réalisées à vitesse fixe (8km/h), le coefficient des échanges gazeux respiratoires a diminué dans les 8 premières heures puis est resté stable (0,80 – 0,85) jusqu'à la fin des 24 h. (Gimenez *et al.*, à paraître). Le phénomène a été probablement amplifié puisque la vitesse moyenne réelle de course a diminué au cours de l'épreuve.

Des corrélations positives significatives ont été décrites entre le contenu initial d'IMCL et sa déplétion pendant l'exercice en endurance de 3 heures (Stellingwerff *et al.*, 2007b) ou de 2 heures (Van Proeyen *et al.*, 2011b) chez des sujets entraînés en endurance. La présente étude étend ces résultats à une durée de 24 heures ce qui pourrait indiquer l'intérêt d'augmenter la

réserve en IMTG avant un exercice d'ultra-endurance. Cependant, les 5 sujets présentant le taux le plus élevé d'IMTG n'ont pas réalisé de meilleures performances que les 5 autres sujets (**Figure 69**).



IMCL: triglycérade intra-myocéllulaire, UA: unité arbitraire, Perf: performance en kilomètre  
 Chg IMCL IAV: charge en IMCL dans fibre de type I avant l'exercice  
 Chg IMCL IIA AV: charge en IMCL dans fibre de type IIA avant l'exercice

**Figure 69:** Relation entre les réserves initiales en IMCL avant l'exercice et la performance (km). Les numéros à l'intérieur des symboles correspondent aux sujets.

En conclusion, cette étude a montré que lors d'une épreuve d'ultra-endurance, les réserves d'IMTG participaient de façon significative à l'apport énergétique musculaires tant pour les fibres IIA que pour les fibres I. La description d'une participation plus importante de la lipolyse que de la glycogénolyse dans les fibres de type IIA est une donnée originale dont la confirmation et les mécanismes y contribuant pourraient faire l'objet d'études complémentaires.

## B. Etude 2: Expérience d'entraînement combiné chez les sujets âgés actifs.

Les résultats ci-dessous correspondent aux mesures réalisées sur les muscles des 8 sujets prélevés avant et après l'entraînement (Verney *et al.*, 2006):

- entraînement en résistance de la partie supérieure du corps et prélèvement sur le deltoïde (ER - Del)

- entraînement en endurance de la partie inférieure du corps et prélèvement sur le vaste externe (EE - Vlat)

La principale hypothèse de ce travail était de montrer que si les deux types d'entraînement se confirment dans leur aptitude à induire une augmentation des capacités oxydatives musculaires, il devrait en être de même pour celle des réserves musculaires en triglycérides et en glycogène.

Les paragraphes suivants sont la traduction parfois condensée de l'article publié en 2012 (cf annexe 2)

### I. Résultats.

#### Stockages d'IMCL

	Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
IMCL moyen (UA)			
EE - Vlat	21.2 ± 5.2	27.6 ± 4.2	*
ER - Del	18.4 ± 5.4 <sup>ns</sup>	17.9 ± 5.5 <sup>†††</sup>	ns
IMCL EE - Vlat par type (UA)			
Type I	22.6 ± 5.5	29.2 ± 4.6	**
Type IIA	19.1 ± 4.2 <sup>†</sup>	24.9 ± 5.0 <sup>†</sup>	*
IMCL ER - Del par type (UA)			
Type I	20.7 ± 6.3	19.1 ± 5.8	ns
Type IIA	15.7 ± 3.4 <sup>†</sup>	15.1 ± 6.3 <sup>†</sup>	ns

IMCL: lipides intramyocellulaires ; UA: unité arbitraire; ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe.

Effet entraînement: ns: pas de différence significative, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

Comparaisons entre vaste externe et deltoïde ou entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>: p<0.05, <sup>†††</sup>: p<0.001.

**Tableau 7:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les réserves d'IMCL.



Au départ, les réserves d'IMCL étaient significativement plus élevées dans les fibres de type I par rapport aux fibres de type IIA à la fois dans Vlat ( $P < 0.05$ ) et dans Del ( $P < 0.05$ ). Parmi les fibres de type IIA, IMCL au départ était également significativement plus élevé ( $P < 0.05$ ) dans Vlat que dans Del. Après l'entraînement, nous avons observé une augmentation significative d'IMCL moyen dans EE - Vlat ( $P < 0.05$ ). C'était le résultat d'une augmentation d'IMCL à la fois des fibres de type I ( $P < 0.01$ ) et de type IIA ( $P < 0.05$ ). Cette augmentation n'a pas été observée dans ER - Del (**Tableau 7**).

### Stockages du glycogène musculaire

	Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
Glycogène moyen (UA)			
EE - Vlat	43.8 ± 11.2	47.9 ± 9.8	ns
ER - Del	34.3 ± 6.8 <sup>†</sup>	37.5 ± 14.1 <sup>ns</sup>	ns
Glycogène EE - Vlat par type (UA)			
Type I	39.7 ± 11.9	43.7 ± 9.7	ns
Type IIA	49.8 ± 9.3 <sup>††</sup>	56.1 ± 10.6 <sup>†††</sup>	ns
Glycogène ER - Del par type (UA)			
Type I	31.1 ± 5.9	32.0 ± 11.8	ns
Type IIA	40.3 ± 7.9 <sup>†††</sup>	52.2 ± 22.6 <sup>††</sup>	ns
Glycogène (mmol kg <sup>-1</sup> sec)			
EE - Vlat	559 ± 151	618 ± 150	ns
ER - Del	468 ± 106 <sup>ns</sup>	438 ± 88 <sup>†</sup>	ns

UA: unité arbitraire; ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe.

Effet entraînement: ns: pas de différence significative.

Comparaisons entre vaste externe et deltoïde ou entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>:  $p < 0.05$ , <sup>††</sup>:  $p < 0.01$ , <sup>†††</sup>:  $p < 0.001$ .

**Tableau 8:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur le stockage du glycogène musculaire.

En fonction du type de fibre, nous avons observé significativement plus de glycogène ( $P < 0.01$ ) dans les fibres de type IIA que celles de type I dans les deux muscles Vlat et Del. Après 14 semaines de l'entraînement, nous n'avons pas observé de changement significatif du stockage du glycogène de EE - Vlat ni dans ER - Del. Cette stabilité était présente à la fois en coloration PAS et en test biochimique (**Tableau 8**).

## Activités enzymatiques et capillaires (Charles *et al.*, 2006; Verney *et al.*, 2006)

	Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
Activité CS (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )			
EE - Vlat	47 ± 10	67 ± 20	**
ER - Del	29 ± 11 <sup>†††</sup>	39 ± 17 <sup>†</sup>	*
Activité β-HAD (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )			
EE - Vlat	9.8 ± 2.5	12.1 ± 3.3	**
ER - Del	8.1 ± 2.2 <sup>†</sup>	9.0 ± 4.2 <sup>††</sup>	ns
Activité PFK (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )			
EE - Vlat	100 ± 7	110 ± 17	ns
ER - Del	62 ± 15 <sup>††</sup>	76 ± 15 <sup>†</sup>	*
LC/PF (%)			
EE - Vlat	23.9 ± 6.4	29.7 ± 6.5	**
ER - Del	17.8 ± 3.7 <sup>†</sup>	20.4 ± 2.8 <sup>††</sup>	*

ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe.  
 CS: citrate synthèse; β-HAD: 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; PFK: phosphofructokinase; LC/PF: rapport entre la longueur du capillaire en contact avec la fibre et le périmètre de la fibre, cela correspond au pourcentage du périmètre de la fibre en contact avec des capillaires.

Effet entraînement: ns: pas de différence significative, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

Comparaison entre vaste externe et le deltoïde: †: p<0.05, ††: p<0.01, †††: p<0.001.

**Tableau 9:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les activités enzymatiques et l'index des capillaires.

Au départ, les activités des CS et β-HAD étaient significativement plus importantes dans le muscle vaste latéral que dans le deltoïde. Après 14 semaines d'entraînement, l'activité CS a augmenté dans EE - Vlat (P <0.01) et ER - Del (P <0.05). Cependant, une augmentation de β-HAD en réponse à l'entraînement a été observée dans EE - Vlat, mais pas dans ER - Del. L'activité de la PFK a augmenté de façon significative en ER - Del, mais pas dans EE - Vlat (**Tableau 9**).

L'indice LC/PF, au départ, était significativement plus élevé dans muscle vaste latéral que dans le Del. Après 14 semaines d'entraînement, une augmentation significative de l'indice LC/PF a été observée dans EE - Vlat (P <0.01) et dans ER - Del (P <0.05) (**Tableau 9**).

### Les capacités physiques

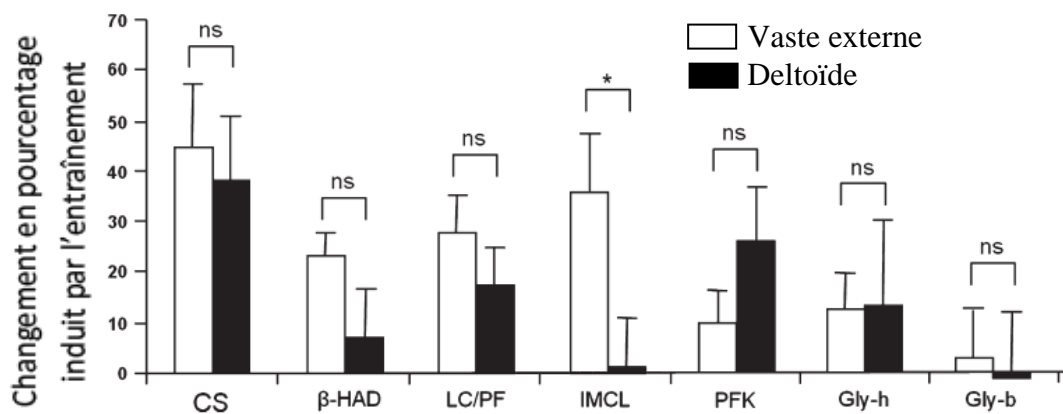
Comme précédemment décrit chez 10 sujets (Verney *et al.*, 2006), le poids des sujets dans cet échantillon n'a pas été modifié à la suite de l'entraînement physique, mais le pourcentage de la masse grasse a diminué de manière significative tandis que la surface du deltoïde et le couple maximal d'abduction isométrique de l'épaule ont augmenté de façon significative. La

puissance maximale anaérobie a augmenté de façon significative pendant d'exercice de pédalage avec les jambes ( $P < 0.001$ ) et avec les bras ( $P < 0.01$ ). La consommation maximale d'oxygène a été augmenté respectivement de  $16 \pm 9\%$  ( $P < 0.001$ ) et de  $10 \pm 7\%$  ( $P < 0.01$ ) (données non présentées ici).

### Phénotype contractile et la surface des fibres musculaires (Verney *et al.*, 2006)

Chez les 8 sujets, la proportion de fibres de type I était significativement plus élevée dans Del que dans Vlat, ( $P < 0.001$ ) ainsi que le pourcentage de surface occupé par fibres de type I ( $P < 0.01$ ). Ce pourcentage prend en compte à la fois la proportion du type de fibre et la surface moyenne de chaque type de fibre. Ce pourcentage de surface occupée par les fibres de type I n'était significativement modifiée ni par l'entraînement en endurance ni par l'entraînement en résistance. Un effet d'entraînement était observé uniquement dans l'augmentation de la surface des fibres de type I (données non représentées).

### Changement relatifs



CS: citrate synthèse; β-HAD: 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; LC/PF: rapport entre la longueur du capillaire en contact avec la fibre et le périmètre de la fibre, cela correspond au pourcentage du périmètre de la fibre en contact avec des capillaires; IMCL: lipides intramyocellulaires; PFK: phosphofruktokinase; Gly-h: glycogène mesuré par coloration histochimique PAS (periodic acid Schiff); Gly-b; glycogène mesuré par méthode biochimique.

**Figure 70:** Changement relatif des divers indicateurs induits par l'effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance.

En vue de compléter des données absolues décrites précédemment et de localiser les plus fortes modifications induites par l'entraînement dans les principaux paramètres étudiés, les pourcentages moyens des modifications individuelles ont été également comparés. Sur la **Figure 70**, il n'y a pas de différences significatives pour CS, β-HAD, LC/PF, PFK ou pour le

glycogène musculaire entre EE - VLat et ER - Del. En revanche, IMCL a démontré une différence significative ( $P < 0.05$ ) entre une augmentation d'environ 36% dans EE - VLat et des valeurs presque stables dans ER - Del.

## **II. Discussion.**

En réponse au programme d'entraînement de 14 semaines, l'augmentation de la puissance maximale aérobie en EE (données publiées antérieurement, (Verney *et al.*, 2006)), était concomitante avec une augmentation des activités des CS et  $\beta$ -HAD, l'indice LC/PF et IMCL dans EE - VLat. Ces résultats sont en accord avec les précédentes études (Dube *et al.*, 2008; Pruchnic *et al.*, 2004). Cependant, dans ER - Del, malgré une augmentation significative de la consommation maximale d'oxygène (exercice en pédalage avec les bras), de l'activité CS et de l'index LC/PF, aucune augmentation statistique des  $\beta$ -HAD et IMCL n'a été observée. Par conséquent, contrairement à notre hypothèse, une augmentation de la capacité oxydative induite par ER - Del n'est pas nécessairement liée à une augmentation d'IMCL ou du glycogène.

### **Capacité oxydative**

Au départ, malgré un plus faible pourcentage de surface occupée par les fibres lentes dans le vaste latéral que dans le deltoïde, le potentiel du cycle de l'acide citrique évalué par l'activité de la CS ou le potentiel de la  $\beta$ -oxydation évalué par l'activité de la  $\beta$ -HAD étaient significativement plus élevés dans le vaste latéral. Il en était de même pour l'indice PC/PF. Concernant les données de CS, ces différences entre le deltoïde et le vaste latéral se trouvent parmi les valeurs reportées par une étude récente chez les sujets jeunes (Helge, 2010). Cette différence est probablement en partie liée à l'activité physique quotidienne qui stimule les membres inférieurs en régime d'endurance, et que la plupart des sujets pratiquaient encore une activité physique régulière (cyclisme essentiellement).

Des augmentations concomitantes de la capacité oxydative des muscles et de la vascularisation capillaire chez les sujets âgés après l'entraînement d'endurance ont été démontrées par des études antérieures (Coggan *et al.*, 1992; Proctor *et al.*, 1995) et ont été revisitées dans une récente étude transversale (Iversen *et al.*, 2011). La relation proportionnelle entre l'activité de CS et les indices de vascularisation a également été observée avant et après l'entraînement (Charifi *et al.*, 2004). Une augmentation des capacités

oxydatives induite par l'entraînement en endurance chez les sujets âgés a été liée à une augmentation des capacités oxydatives des lipides mesurées sur les mitochondries isolées (Rimbert *et al.*, 2004). Une augmentation concomitante de CS et de  $\beta$ -HAD a été également décrite (Coggan *et al.*, 1992). Cependant, dans les études longitudinales sur l'entraînement en endurance chez les sujets plus âgés, l'augmentation de la CS n'est pas toujours associée à une augmentation significative de la  $\beta$ -HAD (Berthon *et al.*, 1995; Gosker *et al.*, 2006).

L'augmentation de CS induite par l'entraînement en résistance chez les sujets plus âgés démontrée par Grimby *et al.* (1992) ne s'accompagnait d'aucun changement de l'activité de la  $\beta$ -HAD, ce qui supporte les résultats de notre étude (Grimby *et al.*, 1992). Par conséquent, selon les données des capillaires et l'activité de la CS, il peut être réaffirmé que l'ER chez les sujets âgés est capable de stimuler et d'améliorer certains aspects de la capacité mitochondriale musculaire (par exemple l'apport en oxygène et le cycle de l'acide citrique) au cours d'entraînement en circuit à une intensité approximative de 70-75% d'une répétition maximale (RM). Toutefois, ce type d'entraînement ne serait pas un moyen efficace pour améliorer  $\beta$ -HAD, le marqueur de la voie de la  $\beta$ -oxydation de la capacité mitochondriale musculaire.

### **Stockage d'IMCL**

L'entraînement en endurance augmente la capacité d'oxydation musculaire globale et IMCL dans Vlat. En cohérence avec l'hypothèse que le renouvellement des IMCL est facilité par l'augmentation de la  $\beta$ -oxydation des lipides (Moro *et al.*, 2008; van Loon & Goodpaster, 2006), ce résultat renforce la théorie selon laquelle l'entraînement en endurance chez les sujets âgés actifs peut encore augmenter l'oxydation musculaire des lipides pendant les séances d'exercices (Sial *et al.*, 1998). En plus du potentiel oxydatif, les récentes études chez les sujets jeunes ont analysé la synthèse musculaire des IMCL et la lipolyse (Alsted *et al.*, 2009; Bergman *et al.*, 2010). Le statut sportif est lié à la fois à un stockage plus important en IMCL et à une augmentation de la synthèse des IMCL en comparaison avec les sujets contrôles moins actifs (Bergman *et al.*, 2010). En parallèle à l'augmentation de CS, de  $\beta$ -HAD et de CPT1, la coordination entre l'entrée dans les fibres musculaires des acides gras et l'oxydation des acides gras dans les mitochondries a été suggérée en se basant sur une augmentation parallèle du transport des acides gras par le sarcolemme (FABPpm) et de celui des membranes mitochondriales (FAT/CD36) à la suite d'un entraînement en endurance chez des femmes (Talanian *et al.*, 2010). Néanmoins, une augmentation parallèle de la capacité oxydative et d'IMCL n'est pas reportée par toutes les études. Chez les sujets jeunes et actifs,

deux études récentes ont rapporté des stockages stables en IMCL à la suite d'un entraînement en endurance à la fois à jeûne et après un régime hyperglucidique (De Bock *et al.*, 2008; Van Proeyen *et al.*, 2011a). Parallèlement, les activités de CS et de  $\beta$ -HAD ont augmenté seulement après l'entraînement en état de jeûne (Van Proeyen *et al.*, 2011a), tandis que l'activité de la succinate déshydrogénase (SDH) a augmenté après l'entraînement à la fois à jeûne et non (De Bock *et al.*, 2008). Dans un troisième rapport chez les sujets jeunes sans entraînement, les augmentations significatives de CS et de  $\beta$ -HAD étaient montrées, mais les réserves d'IMCL mesuré par méthode biochimique a été trouvé significativement moins important après l'entraînement en endurance (Alsted *et al.*, 2009).

Dans notre étude, l'entraînement en résistance n'a pas induit de changement en termes d'IMCL dans le deltoïde, ce qui ne confirme pas notre hypothèse de l'augmentation simultanée des capacités oxydatives et d'IMCL après l'entraînement en résistance. De plus, la différence significative des modifications relatives d'IMCL (36% dans le muscle vaste latéral en entraînement en endurance vs 1% dans le deltoïde en entraînement en résistance) souligne le fait qu'un programme d'entraînement en résistance en circuit pourrait être capable d'augmenter la capacité oxydative musculaire jusqu'à un certain point, mais pas suffisamment pour augmenter les réserves d'IMCL, contrairement à l'entraînement en endurance. Ce résultat renforce l'importance de la promotion d'un entraînement combiné chez les personnes âgées afin qu'ils puissent bénéficier des effets spécifiques et complémentaires de chaque type d'entraînement.

### **Stockages de glycogène musculaire**

Après 14 semaines d'entraînement en endurance, aucune modification significative de glycogène, évaluée à la fois par la coloration du PAS et par technique de biochimique, n'a été observée dans Vlat. Ces résultats sont en concordance avec un précédent rapport, où aucune différence significative dans l'intensité de la coloration PAS a été observée dans les deux type de fibres I ou II entre des hommes âgés sédentaires ou entraînés en endurance (Boon *et al.*, 2007). Ces résultats diffèrent toutefois des autres études où le glycogène a significativement augmenté chez les sujets âgés en réponse à l'entraînement en endurance (Dube *et al.*, 2008; Meredith *et al.*, 1989). Dans ces deux dernières études, les sujets avaient une faible consommation maximale d'oxygène (26,6 et 18,5 ml min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> respectivement) et présentaient un pourcentage élevé de masse grasse (38 et 42% respectivement), ce qui pourrait contribuer aux faibles réserves de glycogène musculaire avant l'entraînement et augmenter les stockages après l'entraînement (Christ-Roberts & Mandarino, 2004). Dans

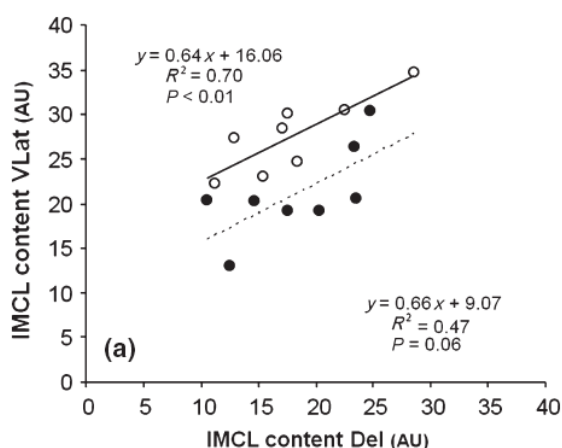
l'étude de Boon *et al.* (2007), les sujets témoins avaient une consommation d'oxygène maximale plus importante ( $37 \text{ ml min}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ ) et un pourcentage de masse grasse moins important (29 %), ce qui est plus semblable à la population de notre étude. Chez des hommes jeunes en bonne santé, dans le contexte de la baisse de la déplétion en glycogène induite pendant l'entraînement en endurance, l'augmentation significative du glycogène musculaire après l'entraînement en endurance n'était pas constamment reportée dans les études antérieures (Denis *et al.*, 1991; Hurley *et al.*, 1986; Saltin *et al.*, 1976). Plus récemment, les effets de l'alimentation associés à l'entraînement ont également été étudiés, et certaines études ont comparé les conséquences d'un entraînement à jeun à celles après d'un entraînement en régime hyperglucidique (De Bock *et al.*, 2008; Van Proeyen *et al.*, 2011a). Les résultats contradictoires ont été observés; De Bock *et al.*, (2008) ont rapporté une augmentation significative du stockage en glycogène musculaire seulement après l'entraînement en régime hyperglucidique, tandis que Van Proeyen *et al.*, (2011a) ont observé cette augmentation seulement après l'entraînement à jeûne.

Quatorze semaines d'ER n'ont entraîné aucun changement en termes du stockage en glycogène musculaire dans le deltoïde. Cependant, il y avait une augmentation significative de l'activité de la PFK dans ce même muscle. Ce résultat, à notre connaissance, n'a jamais été rapporté chez les sujets en bonne santé plus âgés. Cependant, chez les hommes jeunes en bonne santé, l'activité de PFK dans le muscle vaste latéral est restée stable après un programme d'entraînement en résistance de 12 semaines (Tang *et al.*, 2006).

### **Limites de notre étude**

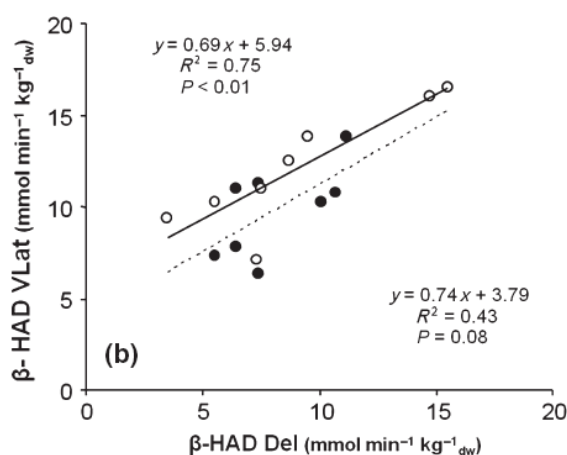
Les procédures d'entraînement en endurance et en résistance ont impliqué les deux parties différentes du corps sur le même sujet, ce qui rend difficile de conclure que les modifications d'un muscle (muscle vaste latéral et deltoïde) sont seulement induites par l'un et pas par l'autre entraînement (ER ou EE, respectivement). Cependant, de nombreuses études ont utilisé l'entraînement isolé d'une jambe, l'autre étant utilisée comme contrôle, pour étudier les effets d'entraînements divers (Wojtaszewski *et al.*, 2005) et qui montrent l'importance des mécanismes locaux des muscles dans les modifications physiologiques induites par l'entraînement. Toutefois, pour des raisons cliniques et éthiques et à causes des contraintes d'inclusion, le processus de l'entraînement concomitant a été choisi au lieu de celui qui aurait impliqué deux groupes différents de sujets effectuant sur le même muscle un entraînement soit de type EE soit de type ER. Malgré son caractère inhabituel, ce choix de combiner l'entraînement en endurance pour la partie basse du corps et l'entraînement en résistance pour

la partie haute du corps chez le même sujet âgé nous a permis d'observer en même temps l'état histochimique de base et les évolutions induites par les entraînements dans les deux muscles fonctionnellement différents chez un même individu. Il est en particulier intéressant de noter que la variabilité de certaines caractéristiques métaboliques entre les différents sujets n'est pas statistiquement indépendante de ceux des autres muscles. Cela a été illustré par une corrélation significative entre les mesures avant et après l'entraînement d'IMCL (**Figure 71a**) et de la  $\beta$ -HAD (**Figure 71b**).



AU: Unité arbitraire; ligne continue: après l'entraînement; ligne discontinue: avant l'entraînement.

**Figure 71a:** Relation entre IMCL dans le vaste externe (Vlat) et le deltoïde (Del) avant (●) et après (○) l'entraînement.



$\beta$ -HAD:  $\beta$ -hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; ligne continue: après l'entraînement; ligne discontinue: avant l'entraînement.

**Figure 71b:** Relation entre  $\beta$ -HAD dans le vaste externe (Vlat) et le deltoïde (Del) avant (●) et après (○) l'entraînement.



Ce même type de résultat a été observé dans le même groupe de sujets avec une corrélation significative entre la valeur de la population des cellules satellites entre le vaste latéral et le deltoïde (Verney *et al.*, 2008). En conséquence, notre étude démontre que la plasticité de  $\beta$ -HAD musculaires et des phénotypes d'IMCL peuvent être spécifiquement modifiés par l'entraînement en endurance, sans gommer les caractéristiques innées ou acquises partagées par différents muscles chez le même sujet.

La durée effective de travail musculaire a été plus importante lors de l'entraînement en endurance du muscle vaste latéral (travail continu) que pour l'entraînement en résistance du deltoïde (travail en circuit). En effet des exercices du tronc ou des bras (biceps) ne sollicitaient pas directement le deltoïde. Cette différence du type de stimulation de chaque entraînement a pu induire un biais en faveur du muscle vaste latéral pour le degré d'augmentation de la capacité oxydative. Cependant, les moyennes des modifications relatives de la CS et de l'index LC/PF n'étaient pas significativement différentes entre les deux schémas d'entraînement, alors que les modifications d'IMCL étaient clairement différentes. Cette observation nous conduit à suggérer qu'une augmentation de la capacité oxydative induite par entraînement n'est pas nécessairement liée à une augmentation en IMCL.

Une dernière limite de notre étude peut être le manque de quantification de l'apport alimentaire pendant le programme d'entraînement. La gestion nutritionnelle a été limitée aux conseils généraux donnés individuellement à chaque sujet et avait pour seul but de maintenir un poids stable.

## Conclusion

Les résultats de notre étude indiquent que 14 semaines de combinaison de l'entraînement en résistance pour la partie haute du corps et de l'entraînement en endurance pour la partie basse du corps chez des sujets âgés actifs ont induit une augmentation de la capacité oxydative musculaire à la fois en entraînement en endurance (Vlat) et en entraînement en résistance (Del). Lors d'EE - Vlat, IMCL a augmenté dans les fibres de type I et type IIA en parallèle avec l'activité de  $\beta$ -HAD. Cependant, ni IMCL ni  $\beta$ -HAD n'ont varié lors de ER - Del, malgré une augmentation significative de la vascularisation capillaire et de l'activité de CS.

Les données précédemment publiées sur cette expérience qui ont rapporté des modifications de la force physique, de la composition corporelle (augmentation des masses musculaires) et du potentiel régénératif des muscles (augmentation des populations de cellules satellites à la fois dans le vaste muscle latéral et dans le deltoïde) devraient être prise en

compte (Charles *et al.*, 2006; Verney *et al.*, 2008; Verney *et al.*, 2006). Avec l'apport des résultats de notre étude, cette expérience met en valeur de nombreux bénéfices fonctionnels pour promouvoir la combinaison de l'entraînement en endurance et de l'entraînement en résistance sur des muscles différents chez les sujets âgés.

### C. Etude 3: Expérience d'entraînement combiné chez les sujets en surpoids âgés de 50-60 ans.

Le même programme d'entraînement que celui décrit chez les sujets âgés a été appliqué à des sujets en surpoids avec des troubles métaboliques glucido-lipidiques

Les résultats ci-dessous correspondent aux mesures réalisées sur les muscles de 16 sujets prélevés avant et après l'entraînement. Deux groupes (8 sujets par groupe) appariés ont été constitués par tirage au sort (témoin et entraîné).

L'objectif de cette expérimentation est l'étude de l'évolution des caractéristiques énergétiques générales et métaboliques musculaires sous l'influence de l'entraînement.

#### I. Résultats.

Afin de permettre une vision globale de l'expérience, les deux tableaux suivants apportent des données non encore publiées.

#### Capacités physiques et données anthropométriques (article Saafi et al en préparation)

Groupe d'entraînement	Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
VO2max (L/min)	2.60 ± 0.42	2.98 ± 0.36	*
Puissance aérobie max (Watts)	178 ± 33	224 ± 30	*
Développé couché max (kg)	56 ± 17	74 ± 20	*
Développé assis max (kg)	39 ± 18	54 ± 19	*
Masse corporelle (kg)	93 ± 10.7	92.2 ± 11.2	ns
Masse grasse (kg)	26 ± 3.1	24.1 ± 4	*
Masse maigre (kg)	67 ± 9.1	68.1 ± 8.7	*
Graisse abdominale (cm <sup>3</sup> )	5234 ± 815	4695 ± 811	*
Graisse abdominale/sous cutané (cm <sup>3</sup> )	3221 ± 942	3036 ± 849	*
Graisse abdominale viscérale (cm <sup>3</sup> )	2013 ± 475	1659 ± 693	*
Surface section deltoïde (cm <sup>2</sup> )	40.8 ± 5.4	43.9 ± 6.2	*

Groupe témoin	Semaine 0	Semaine 14	Effet période
VO2max (L/min)	2.61 ± 0.04	2.58 ± 0.4	ns
Puissance aérobie max (Watts)	178 ± 31	177 ± 31	ns
Masse corporelle (kg)	95.5 ± 10.1	95.9 ± 10.2	ns
Masse grasse (kg)	25.9 ± 3.8	26.7 ± 4.3	ns
Masse maigre (kg)	69.6 ± 9.7	69.3 ± 8.3	ns
Graisse abdominale (cm <sup>3</sup> )	5192 ± 745	5360 ± 678	*
Graisse abdominale/sous cutané (cm <sup>3</sup> )	2892 ± 465	2859 ± 433	ns
Graisse abdominale viscérale (cm <sup>3</sup> )	2242 ± 725	2501 ± 766	*
Surface section deltoïde (cm <sup>2</sup> )	41.2 ± 7.1	40 ± 6.6	ns

ns: pas de différence significative, \*: p<0.05

La surface de section du muscle deltoïde a été effectuée sur les coupes d'IRM des épaules

**Tableau 10:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les capacités physiques et les données anthropométriques dans le groupe d'entraînement (en haut) et dans le groupe témoin (en bas).

### Glucose –insuline et biologie sanguine générale (article Saafi et al en préparation)

Groupe d'entraînement	Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
Glucose à jeun (mmol/L)	5.7 ± 0.8	5.2 ± 0.5	*
Insuline à jeun (mU/L)	10.7 ± 6.2	7.5 ± 5.5	*
Surface glycémie HGPO (UA)	1430 ± 414	1260 ± 371	*
Surface insulinémie HGPO (UA)	10247 ± 8178	8897 ± 7131	ns
ISI 180 min	5.0 ± 2.8	7.3 ± 4.6	*
Cholestérol total	2.2 ± 0.8	1.9 ± 1.0	*
HB1ac	5.9 ± 0.5	5.5 ± 0.2	*

Groupe témoin	Semaine 0	Semaine 14	Effet période
Glucose à jeun (mmol/L)	5.8 ± 0.8	5.7 ± 0.7	ns
Insuline à jeun (mU/L)	10.3 ± 3.0	11.9 ± 6.7	ns
Surface glycémie HGPO (UA)	1408 ± 409	1449 ± 388	ns
Surface insulinémie HGPO (UA)	7769 ± 2529	9432 ± 484	*
ISI 180 min	4.5 ± 1.9	4.2 ± 2.5	ns
Cholestérol total	2.3 ± 1.0	2.1 ± 1.5	ns
HB1ac	6.2 ± 0.3	6.0 ± 0.4	ns

HGPO : hyper glycémie par la voie orale ; HB1ac : hémoglobine glycosylée ; ISI : indice sensibilité insuline

ns: pas de différence significative, \*: p<0.05.

Surface glycémie et surfaces insulinémie: surfaces sous la courbes des deux variables biologiques en fonction du temps.

**Tableau 11:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les paramètres glucose–insuline et biologie sanguine générale dans le groupe d'entraînement (en haut) et dans le groupe témoin (en bas).

### Stockages d'IMCL

Avant entraînement, aucune différence significative n'existait entre les deux groupes sur les différentes quantifications d'IMCL

Groupe d'entraînement	Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
IMCL moyen (UA)			
EE - Vlat	13.93 ± 4.0	19.82 ± 5.07	*
ER - Del	12.92 ± 3.63 <sup>ns</sup>	11.97 ± 3.57 <sup>††</sup>	ns
IMCL EE - Vlat par type (UA)			
Type I	15.56 ± 4.18	22.28 ± 4.78	*
Type IIA	12.16 ± 3.71 <sup>†††</sup>	18.33 ± 5.35 <sup>††</sup>	*
IMCL ER - Del par type (UA)			
Type I	14.51 ± 3.97	12.38 ± 3.83	ns
Type IIA	10.25 ± 2.79 <sup>†††</sup>	10.96 ± 2.94 <sup>ns</sup>	ns

Groupe témoin	Semaine 0	Semaine 14	Effet période
IMCL moyen (UA)			
Vlat	11.08 ± 3.48	9.92 ± 2.92	ns
Del	11.75 ± 2.34 <sup>ns</sup>	11.59 ± 2.33 <sup>ns</sup>	ns
IMCL Vlat par type (UA)			
Type I	12.71 ± 4.44	11.16 ± 4.07	ns
Type IIA	9.73 ± 2.54 <sup>††</sup>	9.07 ± 2.66 <sup>†</sup>	ns
IMCL Del par type (UA)			
Type I	12.80 ± 2.12	12.50 ± 2.72	ns
Type IIA	9.62 ± 2.39 <sup>†††</sup>	10.11 ± 2.13 <sup>†††</sup>	ns

IMCL: lipides intramyocellulaires ; UA: unité arbitraire ; ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe ; Del : le deltoïde ; Vlat : le vaste externe.

Effet entraînement ou effet période: ns: pas de différence significative, \*: p<0.05.

Comparaisons entre vaste externe et deltoïde ou entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>: p<0.05, <sup>††</sup>: p<0.01, <sup>†††</sup>: p<0.001.

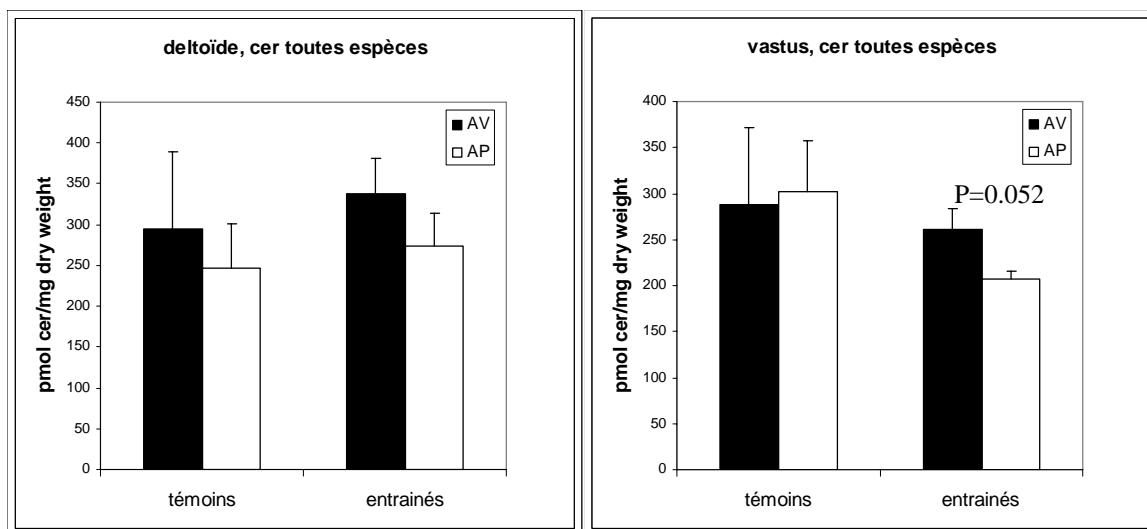
**Tableau 12:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les réserves d'IMCL dans le groupe d'entraînement (en haut) et dans le groupe témoin (en bas).

Avant l'entraînement, les réserves en IMCL étaient significativement plus élevées dans les fibres de type I par rapport aux fibres de type IIA à la fois dans EE - Vlat (P <0.001) et dans ER - Del (P <0.001). Après 14 semaines de l'entraînement, nous avons observé une augmentation significative d'IMCL moyen dans EE - Vlat (P <0.05). C'était le résultat d'une augmentation d'IMCL à la fois des fibres de type I (P <0.05) et de type IIA (P <0.05). Cette augmentation n'a pas été observée dans ER - Del (**Tableau 12**-en haut).

**Céramides:** extrait des résultats obtenus par l'équipe "Regulation of Muscle Mass and Metabolic Disorders" (E. Lefai, G. Nemoz et leurs collègues) du laboratoire de recherche CarMeN, INSERM U 1060 / INRA 1235 / Univ-Lyon1.

Avant l'entraînement, les céramides n'étaient pas significativement plus élevées dans ER - Del que dans EE - Vlat. Après 14 semaines de l'entraînement, nous avons observé une diminution des céramides dans EE - Vlat, cette diminution (21 % en valeur relative) était à la limite de significativité  $P = 0.052$  (**Figure 72**).

Aucune variation significative n'a été observée dans le groupe témoin.



**Figure 72:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les céramides dans le deltoïde (gauche) et dans le vaste externe (droit) sur les 2 groupes d'entraînement et du groupe témoin.

## Stockages du glycogène musculaire

Avant entraînement, aucune différence significative n'existait entre les deux groupes sur les différentes quantifications du glycogène.

Groupe d'entraînement		Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
Glycogène moyen (UA)				
	EE - Vlat	52.60 ± 15.11	87.12 ± 14.33	*
	ER - Del	28.97 ± 9.0 <sup>††</sup>	45.25 ± 17.49 <sup>†††</sup>	ns
Glycogène EE - Vlat par type (UA)				
	Type I	49.55 ± 13.63	81.25 ± 17.38	**
	Type IIA	56.21 ± 17.54 <sup>†</sup>	90.76 ± 15.92 <sup>ns</sup>	**
Glycogène ER - Del par type (UA)				
	Type I	30.16 ± 7.68	41.87 ± 16.46	ns
	Type IIA	27.78 ± 13.67 <sup>ns</sup>	49.75 ± 20.14 <sup>ns</sup>	ns

Groupe témoin		Semaine 0	Semaine 14	Effet période
Glycogène moyen (UA)				
	Vlat	52.04 ± 14.44	45.99 ± 17.29	ns
	Del	42.95 ± 12.04 <sup>ns</sup>	48.64 ± 20.17 <sup>ns</sup>	ns
Glycogène Vlat par type (UA)				
	Type I	51.82 ± 13.91	45.08 ± 17.95	ns
	Type IIA	52.30 ± 15.35 <sup>ns</sup>	47.39 ± 17.39 <sup>ns</sup>	ns
Glycogène Del par type (UA)				
	Type I	42.40 ± 12.46	45.39 ± 19.18	ns
	Type IIA	40.76 ± 14.03 <sup>ns</sup>	53.77 ± 23.35 <sup>†</sup>	ns

UA: unité arbitraire ; ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe ; Del : le deltoïde ; Vlat : le vaste externe.

Effet entraînement ou effet période: ns: pas de différence significative, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

Comparaisons entre vaste externe et deltoïde ou entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>: p<0.05, <sup>††</sup>: p<0.01, <sup>†††</sup>: p<0.001.

**Tableau 13:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les réserves du glycogène dans le groupe d'entraînement (en haut) et dans la groupe témoin (en bas).

Au départ, nous avons observé significativement plus de stockage du glycogène (P <0.05) dans les fibres de type IIA que celles de type I dans EE - Vlat mais pas dans ER - Del. En effet du muscle, les réserves du glycogène de fibres de type I étaient significativement plus élevée dans EE - Vlat que dans ER - Del (P<0.01) ainsi que les réserves du glycogène de fibres de type IIA (P<0,01). Le stockage du glycogène moyen était significative plus

important dans EE - VLat que ER - Del ( $p < 0.01$ ). Après l'entraînement, nous avons observé une augmentation significative du stockage du glycogène moyen dans EE - VLat ( $P < 0.05$ ). C'était le résultat d'une augmentation des réserves du glycogène à la fois des fibres de type I ( $P < 0.01$ ) et de type IIA ( $P < 0.01$ ). Cette augmentation n'a pas été observée dans ER - Del (**Tableau 13**-en haut).



## Activité enzymatique

Avant entraînement, aucune différence significative n'existait entre les deux groupes sur les différentes quantifications des activités enzymatiques.

Groupe d'entraînement		Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
Activité COX moyenne (UA)				
	EE - Vlat	27.26 ± 4.37	25.12 ± 5.76	ns
	ER - Del	27.43 ± 6.24 <sup>ns</sup>	25.16 ± 3.54 <sup>ns</sup>	ns
Activité COX EE - Vlat par type (UA)				
	Type I	35.08 ± 6.54	34.28 ± 8.33	ns
	Type IIA	19.70 ± 3.01 <sup>†††</sup>	19.62 ± 4.01 <sup>†††</sup>	ns
Activité COX ER - Del par type (UA)				
	Type I	33.72 ± 7.33	29.0 ± 4.19	ns
	Type IIA	16.95 ± 3.09 <sup>†††</sup>	18.96 ± 2.73 <sup>†††</sup>	ns
Activité β-HAD (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )				
	EE - Vlat	18.18 ± 2.84	21.12 ± 3.68	*
	ER - Del	16.87 ± 3.90 <sup>ns</sup>	19.08 ± 4.14 <sup>ns</sup>	ns
Activité PFK (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )				
	EE - Vlat	141.19 ± 24.98	157.26 ± 19.47	ns
	ER - Del	111.57 ± 18.99 <sup>††</sup>	118.01 ± 26.01 <sup>†</sup>	ns

Groupe témoin		Semaine 0	Semaine 14	Effet période
Activité COX moyenne (UA)				
	Vlat	27.58 ± 7.57	23.58 ± 9.35	ns
	Del	28.43 ± 8.0 <sup>ns</sup>	23.17 ± 8.96 <sup>ns</sup>	ns
Activité COX Vlat par type (UA)				
	Type I	36.45 ± 8.0	30.02 ± 11.52	ns
	Type IIA	20.70 ± 6.07 <sup>†††</sup>	18.28 ± 6.87 <sup>†††</sup>	ns
Activité COX Del par type (UA)				
	Type I	33.34 ± 9.03	28.98 ± 12.06	ns
	Type IIA	18.66 ± 6.56 <sup>†††</sup>	13.54 ± 4.17 <sup>††</sup>	ns
Activité β-HAD (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )				
	Vlat	16.09 ± 2.92	15.51 ± 1.67	ns
	Del	20.13 ± 5.23 <sup>ns</sup>	19.12 ± 6.01 <sup>ns</sup>	ns
Activité PFK (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )				
	Vlat	162.32 ± 25.45	163.92 ± 24.57	ns
	Del	128.61 ± 19.50 <sup>†</sup>	130.38 ± 20.46 <sup>†</sup>	ns

UA: unité arbitraire; ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe ; Del : le deltoïde ; Vlat : le vaste externe; COX: cytochrome c oxydase; β-HAD: 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; PFK: phosphofructokinase.

Effet entraînement ou effet période: ns: pas de différence significative, \*: p<0.05.

Comparaisons entre vaste externe et deltoïde ou entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>: p<0.05, <sup>††</sup>: p<0.01, <sup>†††</sup>: p<0.001.

**Tableau 14:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les activités enzymatiques dans le groupe d'entraînement (en haut) et dans le groupe témoin (en bas).

Avant l'entraînement, l'activité FPK était significativement plus importantes dans EE - Vlat que dans ER - Del ( $P < 0.01$ ). Cette observation n'était pas trouvée sur les activités  $\beta$ -HAD et COX moyenne. En fonction l'activé COX par type, l'activité COX des fibres de type I étaient significativement plus importante que celles de type IIA à la fois dans EE - Vlat ( $P < 0.001$ ) et ER - Del ( $P < 0.001$ ). Après 14 semaines d'entraînement, une augmentation de  $\beta$ -HAD en réponse à l'entraînement a été observée dans EE - Vlat ( $P < 0.05$ ). Cette augmentation n'était pas retrouvée dans les autres activités enzymatiques (**Tableau 14**-en haut).

## Capillaires

Groupe d'entraînement		Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
LC/PF moyen (%)				
	EE - Vlat	11.74 ± 2.08	15.85 ± 2.38	***
	ER - Del	11.64 ± 1.71 <sup>ns</sup>	13.52 ± 1.58 <sup>ns</sup>	ns
LC/PF EE - Vlat par type (%)				
	Type I	12.37 ± 2.13	16.90 ± 1.87	***
	Type IIA	11.16 ± 2.01 <sup>†</sup>	15.44 ± 3.25 <sup>ns</sup>	**
LC/PF ER - Del par type (%)				
	Type I	12.70 ± 1.45	14.10 ± 1.81	ns
	Type IIA	10.13 ± 2.08 <sup>††</sup>	12.65 ± 1.50 <sup>††</sup>	*
LC moyen EE - Vlat par type (µm)				
	Type I	7.13 ± 0.79	8.08 ± 0.95	ns
	Type IIA	7.58 ± 1.49 <sup>ns</sup>	8.22 ± 1.17 <sup>ns</sup>	ns
LC moyen ER - Del par type (µm)				
	Type I	6.80 ± 0.63	7.35 ± 1.12	ns
	Type IIA	6.74 ± 1.01 <sup>ns</sup>	7.36 ± 0.91 <sup>ns</sup>	ns
CAF EE - Vlat par type				
	Type I	4.94 ± 0.61	6.32 ± 0.78	**
	Type IIA	4.63 ± 0.56 <sup>ns</sup>	6.15 ± 0.87 <sup>ns</sup>	**
CAF ER - Del par type				
	Type I	5.51 ± 0.50	5.87 ± 1.13	ns
	Type IIA	5.11 ± 0.64 <sup>ns</sup>	6.08 ± 1.52 <sup>ns</sup>	ns
DC (cap.mm <sup>-2</sup> )				
	EE - Vlat	417 ± 68	470 ± 68	ns
	ER - Del	435 ± 48 <sup>ns</sup>	461 ± 80 <sup>ns</sup>	ns

Groupe témoin		Semaine 0	Semaine 14	Effet période
LC/PF moyen (%)				
	Vlat	9.38 ± 1.00	10.76 ± 1.99	*
	Del	9.31 ± 2.04 <sup>ns</sup>	10.69 ± 2.19 <sup>ns</sup>	ns
LC/PF Vlat par type (%)				
	Type I	10.06 ± 1.61	11.39 ± 2.06	*
	Type IIA	8.82 ± 0.71 <sup>†</sup>	10.09 ± 1.91 <sup>††</sup>	ns
LC/PF Del par type (%)				
	Type I	10.11 ± 1.92	11.67 ± 2.21	ns
	Type IIA	7.29 ± 1.44 <sup>†††</sup>	8.74 ± 1.74 <sup>†††</sup>	*
LC moyen Vlat par type (µm)				
	Type I	6.45 ± 1.03	7.49 ± 1.18	*
	Type IIA	6.85 ± 1.05 <sup>ns</sup>	7.39 ± 1.14 <sup>ns</sup>	ns
LC moyen Del par type (µm)				
	Type I	5.80 ± 0.95	6.44 ± 1.03	ns
	Type IIA	5.90 ± 0.91 <sup>ns</sup>	6.61 ± 0.77 <sup>ns</sup>	ns
CAF Vlat par type				
	Type I	5,14 ± 0.90	5.14 ± 0.86	ns
	Type IIA	4,36 ± 0.51 <sup>ns</sup>	4.86 ± 1.22 <sup>ns</sup>	ns
CAF Del par type				
	Type I	5.44 ± 0.79	5.69 ± 0.90	ns
	Type IIA	4.17 ± 0.61 <sup>†††</sup>	4.68 ± 0.86 <sup>†</sup>	ns
DC (cap.mm <sup>-2</sup> )				
	Vlat	345 ± 56	355 ± 64	ns
	Del	401 ± 85 <sup>ns</sup>	409 ± 76 <sup>ns</sup>	ns

ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe ; Del : le deltoïde ; Vlat : le vaste externe ; LC/PF: rapport entre la longueur des capillaires en contact avec la fibre et le périmètre de la fibre, cela correspond au pourcentage du périmètre de la fibre en contact avec des capillaires ; LC : la longueur du capillaire ; CAF: nombre de capillaires au contact d'une fibre ; DC : densité capillaire.

Effet entraînement ou effet période: ns: pas de différence significative, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

Comparaisons entre vaste externe et deltoïde ou entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>: p<0.05, <sup>††</sup>: p<0.01, <sup>†††</sup>: p<0.001.

**Tableau 15:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les indices de la capillarisation dans le groupe d'entraînement (en haut) et dans le groupe témoin (en bas).

Avant l'entraînement, en fonction du type de fibre, nous avons observé une augmentation plus importante de l'indice LC/PF dans les fibres de types I que celles de types IIA dans les 2 muscle EE - VLat (P <0.05) et ER - Del (P <0.01) (**Tableau 15**-en haut).

Après l'entraînement, nous avons observé une augmentation significative de l'indice LC/PF moyen EE - VLat (P <0.001). C'était le résultat d'une augmentation de l'indice LC/PF à la fois des fibres de type I (P <0.001) et de type IIA (P <0.01). Cette augmentation n'a pas été observée dans ER - Del malgré qu'il y a avait une augmentation de l'indice LC/PF des fibres de type IIA (P<0.05). Avec l'indice LC moyen, aucune modification significative n'a

été observée ni dans EE - VLat ni dans ER - Del. Pour ce qui concerne de l'indice CAF, nous avons observé une augmentation significative à la fois les fibres de type I (P<0.01) et celles de type IIA (P<0.01) dans EE - VLat mais pas dans ER - Del.

### Phénotype contractile et la surface des fibres musculaires

Groupe d'entraînement		Avant entraînement	Après entraînement	Effet entraînement
% fibres EE - Vlat par type (%)				
	Type I	45.08 ± 7.89	40.04 ± 8.26	ns
	Type IIA	40.71 ± 11.97 <sup>ns</sup>	53.75 ± 9.60 <sup>ns</sup>	**
% fibres ER - Del par type (%)				
	Type I	63.85 ± 10.20	66.12 ± 10.64	ns
	Type IIA	29.58 ± 10.23 <sup>††</sup>	32.47 ± 9.72 <sup>††</sup>	ns
Surface EE - Vlat par type (µm <sup>2</sup> )				
	Type I	4722.38 ± 1132.87	5034.00 ± 675.64	ns
	Type IIA	5177.63 ± 791.83 <sup>ns</sup>	6072.75 ± 957.76 <sup>†</sup>	*
Surface ER - Del par type (µm <sup>2</sup> )				
	Type I	4581.00 ± 550.18	4902.50 ± 550.49	ns
	Type IIA	6137.63 ± 872.52 <sup>††</sup>	6633.50 ± 1790.41 <sup>†</sup>	ns
% surface occupée EE - Vlat par type				
	Type I	50.57 ± 11.11	38.50 ± 9.54	*
	Type IIA	49.43 ± 11.11 <sup>ns</sup>	61.50 ± 9.54 <sup>†</sup>	*
% surface occupée ER - Del par type				
	Type I	62.09 ± 13.46	60.68 ± 10.80	ns
	Type IIA	37.91 ± 13.46 <sup>†</sup>	39.32 ± 10.80 <sup>†</sup>	ns

Groupe témoin		Semaine 0	Semaine 14	Effet période
% fibres Vlat par type (%)				
	Type I	37.82 ± 9.12	37.51 ± 9.72	ns
	Type IIA	46.16 ± 9.09 <sup>ns</sup>	44.50 ± 10.18 <sup>ns</sup>	ns
% fibres Del par type (%)				
	Type I	65.00 ± 16.98	63.57 ± 8.93	ns
	Type IIA	26.68 ± 15.25 <sup>††</sup>	29.68 ± 10.06 <sup>†††</sup>	ns
Surface Vlat par type (µm <sup>2</sup> )				
	Type I	6180.63 ± 2264.51	6465.75 ± 1815.19	ns
	Type IIA	6115.50 ± 1164.84 <sup>ns</sup>	6617.50 ± 1623.83 <sup>ns</sup>	ns
Surface Del par type (µm <sup>2</sup> )				
	Type I	5362.00 ± 1118.67	5353.75 ± 1160.83	ns
	Type IIA	6129.25 ± 1005.38 <sup>ns</sup>	6534.50 ± 1049.35 <sup>†</sup>	ns
% surface occupée Vlat par type				
	Type I	44.27 ± 8.77	44.82 ± 11.23	ns
	Type IIA	55.73 ± 8.77 <sup>ns</sup>	55.18 ± 11.23 <sup>ns</sup>	ns
% surface occupée Del par type				
	Type I	68.04 ± 17.08	63.71 ± 11.11	ns
	Type IIA	31.96 ± 17.08 <sup>†</sup>	36.29 ± 11.11 <sup>†</sup>	ns

ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - Vlat : entraînement en endurance - le vaste externe ; Del : le deltoïde ; Vlat : le vaste externe ;

Effet entraînement ou effet période: ns: pas de différence significative, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01.

Comparaisons entre vaste externe et deltoïde ou entre le type I et le type IIA: <sup>ns</sup> pas de différence significative, <sup>†</sup>: p<0.05, <sup>††</sup>: p<0.01, <sup>†††</sup>: p<0.001.

**Tableau 16:** Effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance sur les activités enzymatiques dans le groupe d'entraînement (en haut) et le groupe témoin (en bas).

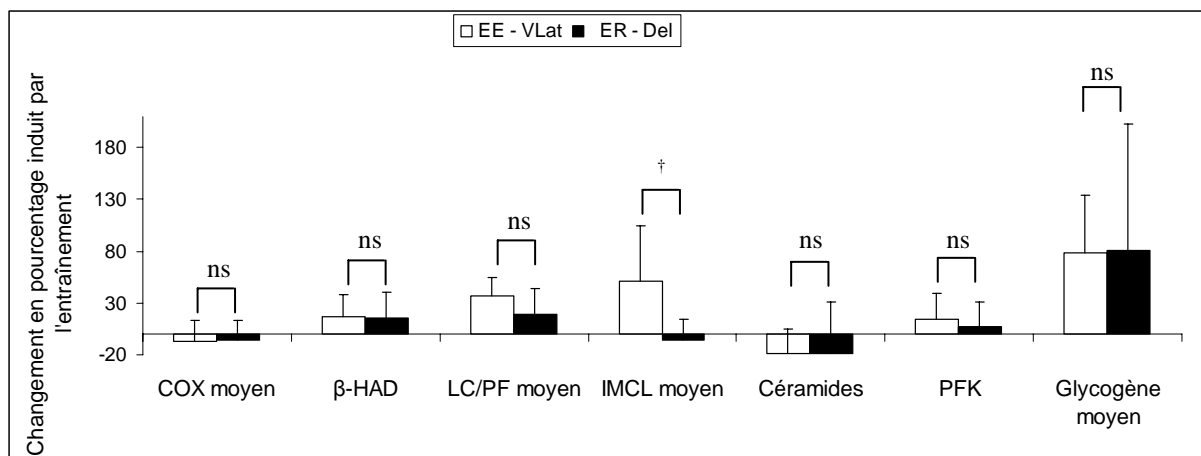
Avant l'entraînement, en fonction du type de fibre, la proportion de fibres de type IIA et la surface moyenne des fibres de type IIA étaient significativement plus élevées que celles de type I dans ER - Del que dans EE - Vlat, (P <0.01) et (P<0.01) ainsi que le pourcentage de surface occupé par fibres de type IIA (P <0.05). Ce pourcentage prend en compte à la fois la proportion du type de fibre et la surface moyenne de chaque type de fibre. En effet, la proportion de fibres de type I était significativement plus élevée dans ER - Del que dans EE - Vlat (P<0.001) ainsi que le pourcentage de surface occupée par fibres de type I (P<0,05). A l'inverse de cette observation, la proportion de fibres de type IIA était significativement plus élevée dans EE - Vlat que dans ER - Del (P<0.05) ainsi que le pourcentage de surface occupé par fibres de type IIA (P<0,05).

Après l'entraînement, nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de surface occupé par les fibres de type IIA dans EE - Vlat (P <0.05). C'était le

résultat d'une augmentation de la proportion des fibres de type IIA ( $P < 0.001$ ) et de la surface moyenne des fibres de type IIA ( $P < 0.05$ ). Par contre, nous avons observé une diminution significative du pourcentage de surface occupé par les fibres de type I dans EE - VLat ( $P < 0.05$ ) avec aucune modification significative de la proportion des fibres de type I et de la surface moyenne des fibres de type I (**Tableau 16**).

Le pourcentage de surface occupée par les fibres de type I n'était significativement modifié ni par l'entraînement en endurance ni par l'entraînement en résistance.

### Changement relatifs



ER - Del : entraînement en résistance - le deltoïde ; EE - VLat : entraînement en endurance - le vaste externe ; COX : cytochrome C oxydase ; β-HAD: 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; LC/PF: rapport entre la longueur du capillaire en contact avec la fibre et le périmètre de la fibre, cela correspond au pourcentage du périmètre de la fibre en contact avec des capillaire; IMCL: lipides intramyocellulaires; PFK: phosphofructokinase. Comparaisons entre vaste externe et deltoïde: ns pas de différence significative, †:  $p < 0.05$ .

**Figure 73:** Changement relatif des divers indicateurs induits par l'effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance dans le groupe d'entraînement.

Pour avoir une vue complémentaire sur des données absolues décrites précédemment et de localiser les plus fortes modifications induites par l'entraînement dans les principaux paramètres étudiés, les pourcentages moyens des modifications individuelles ont été également comparés. Sur la **Figure 73**, il n'y avait pas de différences significatives pour COX, β-HAD, LC/PF, PFK ou pour le glycogène musculaire entre EE - VLat et ER - Del. En revanche, IMCL moyen a démontré une différence significative ( $P < 0.05$ ) entre une augmentation significative d'environ 51% dans EE - VLat et une diminution non significative dans ER - Del.

Une vue synthèse l'effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance (dans le groupe d'entraînement) dans les populations différentes : chez des sujets seniors âgés et chez des sujets en surpoids sur divers indicateurs (**Tableau 17**).

Sujets seniors âgés			Sujets en surpoids	
ER - Del	EE - VLat		ER - Del	EE - VLat
	↑	IMCL moyen		↑
		Gly moyen		↑
↑	↑	LC/PF moyen		↑
ND	ND	LC moyen		
ND	ND	DC		
ND	ND	COX		
↑	↑	CS	ND	ND
	↑	β-HAD		↑
↑		PFK	↑	
ND	ND	Céramide		↓ (p=0.052)

Sujets seniors âgés					Sujets en surpoids			
ER - Del		EE - VLat			ER - Del		EE - VLat	
I	IIA	I	IIA		I	IIA	I	IIA
		↑	↑	IMCL			↑	↑
				Gly			↑	↑
ND	ND	ND	ND	LC/PF		↑	↑	↑
ND	ND	ND	ND	CAF			↑	↑

CS: citrate synthèse; COX : cytochrome C oxydase ; β-HAD: 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; LC/PF: rapport entre la longueur du capillaire en contact avec la fibre et le périmètre de la fibre, cela correspond au pourcentage du périmètre de la fibre en contact avec des capillaire; IMCL: lipides intramyocellulaires; PFK: phosphofruktokinase.

↑ : Augmentation significative ; ND : Pas de données ; cellule blanche : pas d'effet significatif

**Tableau 17:** Synthèse l'effet de l'entraînement combiné en endurance et en résistance (dans le groupe d'entraînement) dans les populations différentes : chez des sujets seniors âgés et chez des sujets en surpoids sur divers indicateurs.

La mise en parallèle des résultats des deux études d'entraînement (**Tableau 17**) permet de constater que les témoins du métabolisme lipidique (IMCL et  $\beta$ -HAD) ont évolué dans le même sens à la suite de EE et n'ont pas été modifiés par ER. Cependant, certaines adaptations associées étaient divergentes:

- pas de variations du glycogène chez les sujets âgés pour EE
- pas d'augmentation des capacités oxydatives chez les sujets en surpoids pour EE bien que les indices de vascularisation aient été améliorés.

## II. Discussion.

Dans cette étude, l'intérêt clinique de la pratique régulière de l'exercice, outre l'augmentation de la condition physique, a été une nouvelle fois montré à travers les évolutions favorables de la composition corporelle (diminution de la masse grasse et l'augmentation de la masse maigre) et de la sensibilité à l'insuline (article de synthèse en préparation avec Saafi et al.).

La présence du groupe témoin, pour lequel très peu de variations significatives ont été observées pour l'ensemble des paramètres étudiés, permet d'attester que l'essentiel des variations observées dans le groupe entraîné le sont en liaison seulement avec l'entraînement.

Dans le cadre de ce travail de thèse, à la suite de l'expérience sur les sujets âgés actifs, le but principal de l'étude était de reposer la question des capacités de l'entraînement combiné à modifier les réserves de lipides musculaires en comparant les effets des entraînements en endurance et en résistance chez des sujets en surpoids.

La mesure de la densité de coloration des fibres musculaires par l'huile rouge a permis de montrer que les réserves d'IMCL étaient augmentées dans EE - Vlat et non dans ER - Del, ce qui confirme les données de l'étude antérieure (Ngo *et al.*, 2012). Le résultat complémentaire concerne la baisse des céramides musculaires est à la limite de la significativité dans EE - Vlat et non dans ER - Del.

L'action de l'entraînement en endurance sur les réserves lipidiques de la fibre musculaire a fait l'objet de nombreuses études. Malgré les divergences des études longitudinales sur les variations d'IMCL (Bruce *et al.*, 2006; Dube *et al.*, 2008; Gan *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 2008), l'étude transversale d'Amati et al., (2011) sur des sujets soit



entraînés (athlètes) soit sédentaires (poids normal) soit obèses montrait clairement le paradoxe des triglycérides (élevés chez les athlètes et chez les obèses) et le rôle des céramides dans la résistance à l'insuline. Les résultats de notre étude longitudinale illustre et confirme ces observations. L'augmentation d'IMCL est accompagnée de celle de l'activité de  $\beta$ -HAD dans EE - Vlat, ce qui est en accord avec l'étude précédente (Ngo *et al.*, 2012). Ce résultat renforce une nouvelle fois la notion de coordination entre les capacités de stockage, de renouvellement et d'oxydation des lipides musculaires sous l'influence de l'entraînement en endurance (Bergman *et al.*, 2010) et élargit le phénomène à des sujets en surpoids présentant un risque potentiel de résistance à l'insuline. En accord avec les données de la littérature (Watt & Hoy, 2012), la baisse conjointe du contenu en céramides constitue une adaptation favorable à la diminution de ce risque.

L'augmentation d'IMCL dans les fibres IIA sous l'influence de l'entraînement en endurance est une donnée qui n'a été décrite que récemment chez des sujets obèses (Shaw *et al.*, 2012), d'autres études ne montrant que l'augmentation globale d'IMCL dans le tissu musculaire (Bruce *et al.*, 2004; Bruce *et al.*, 2006; Dube *et al.*, 2008; Dube *et al.*, 2011; Solomon *et al.*, 2008).

L'absence d'augmentation de la capacité oxydative dans EE - Vlat est un résultat inattendu (absence d'augmentation de COX). En effet, si les adaptations des activités enzymatiques mitochondriales sont quasi unanimement retrouvées chez les sujets de tout âge en bonne santé et de poids normal sous l'influence d'un entraînement en endurance bien conduit (voir revue Flück *et al.*, (2006)) et dont ceux de Ngo *et al.*, (2012), cela est également le cas pour les sujets en surpoids, obèses ou DT2 (Bruce *et al.*, 2004; Bruce *et al.*, 2006; Dube *et al.*, 2008). Ce manque d'adaptation oxydative mitochondriale n'est pas facilement explicable d'autant que le muscle EE - Vlat a présenté en parallèle une augmentation de sa vascularisation.

L'augmentation du stock de glycogène dans EE - Vlat est une autre évolution favorable de l'entraînement. En effet, chez des sujets en surpoids (Dube *et al.*, 2008) ou diabétiques (Vind *et al.*, 2011), l'entraînement en endurance s'accompagne d'une augmentation du taux de glycogène musculaire en association avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Cette adaptation est en partie la conséquence d'une augmentation du transporteur de glucose Glut-4 (O'Gorman *et al.*, 2006) et de l'enzyme glycogène synthétase (Christ-Roberts *et al.*, 2004b) également sous l'effet de l'entraînement à l'endurance.

L'absence de variation significative pour tous les paramètres histologiques étudiés dans ER - Del semble montrer que le programme d'entraînement en résistance n'a pas permis

d'induire les modifications musculaires attendues à l'issue d'un entraînement en résistance. Cette étude confirme donc les limites déjà suspectées dans Ngo et al., (2012) de l'entraînement en circuit réalisé sur de nombreux groupes musculaires. Ce type d'entraînement ne sollicite probablement pas suffisamment chaque groupe musculaire dont le deltoïde n'était qu'un exemple, et malgré le fait que dans chaque séance, des séries de répétitions étaient réservées au groupe musculaire de l'épaule. Il n'est donc pas possible de conclure dans l'absolu que l'entraînement en résistance n'a pas la capacité d'induire des adaptations métaboliques musculaires. L'argument essentiel de l'insuffisance de l'entraînement en résistance dans le cadre de ce protocole est l'absence d'augmentation de la surface de section des fibres musculaires du deltoïde (**Tableau 16**-en haut).

Au total, cette expérience chez les sujets en surpoids a permis d'illustrer une nouvelle fois l'intérêt de l'entraînement en endurance dans l'amélioration des caractéristiques métaboliques musculaires en lien avec la prévention du développement de la résistance à l'insuline. L'absence d'incidence apparente de l'entraînement en résistance sur cette conséquence préventive n'enlève cependant en rien l'intérêt potentiel de ce type de travail musculaire dans la prévention de la sarcopénie. L'association des deux entraînements constitue encore une démarche largement reconnue dans la réadaptation à l'exercice chez les sujets présentant des troubles métaboliques ou cardiovasculaires ainsi que dans l'accompagnement fonctionnel du vieillissement physiologique.

## CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVE

Dans ce travail de thèse, les modifications du contenu d'IMCL ont été observées dans deux conditions différentes; sous l'effet d'un exercice unique d'ultra-endurance et sous l'effet d'un entraînement combiné.

Bien que la spécificité contractile des fibres I et Iia s'accompagne d'une quantité d'IMCL supérieure au repos dans les fibres I retrouvée dans chacun des groupes étudiés, les modifications d'IMCL ont intéressé les deux types de fibres I et IIA soit dans le sens de leur utilisation au cours de l'exercice aigu d'endurance soit dans leur augmentation à la suite de l'entraînement en endurance.

- la description d'une utilisation significative d'IMCL par les fibres IIA lors de la performance d'ultra-endurance est originale d'autant qu'elle est associée à l'absence d'utilisation concomitante de glycogène.

- l'augmentation d'IMCL dans les fibres IIA sous l'influence de l'entraînement en endurance confirme également des données peu décrites.

Ces deux observations illustrent l'importance de la plasticité des réserves lipidiques des fibres IIA dans l'exercice d'endurance en parallèle avec le potentiel d'adaptation bien décrit de leurs capacités oxydatives.

La question relative à l'efficacité de l'entraînement en résistance par rapport à celle de l'entraînement en endurance pour l'évolution musculaire favorable à la sensibilité à l'insuline ne peut avoir de réponse tranchée. En effet, l'absence d'adaptation d'IMCL (augmentation) ou des céramides (diminution) dans le muscle deltoïde entraîné en résistance pourrait être liée au volume insuffisant des contractions lors des répétitions d'entraînement. Le choix d'une méthode visant à entraîner le même groupe musculaire soit en endurance soit en résistance aurait pu amener à des conclusions plus décisives. Parmi les stratégies possibles, l'entraînement unilatéral du muscle quadriceps (endurance d'un côté et résistance de l'autre) pourrait être envisagée. En effet, de nombreuses études ont recours au modèle du quadriceps unilatéral chez l'homme, en utilisant le membre opposé comme témoin. Cette stratégie représente cependant un moyen expérimental peu physiologique et d'un faible intérêt clinique pour les sujets volontaires.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achten J & Jeukendrup AE. (2004). Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition* **20**, 716-727.
- Adams JM, 2nd, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC & Mandarino LJ. (2004). Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* **53**, 25-31.
- Alsted TJ, Nybo L, Schweiger M, Fledelius C, Jacobsen P, Zimmermann R, Zechner R & Kiens B. (2009). Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E445-453.
- Alsted TJ, Ploug T, Prats C, Serup AK, Hoeg L, Schjerling P, Holm C, Zimmermann R, Fledelius C, Galbo H & Kiens B. (2013). Contraction-induced lipolysis is not impaired by inhibition of hormone-sensitive lipase in skeletal muscle. *J Physiol*.
- Amati F, Dube JJ, Alvarez-Carnero E, Edreira MM, Chomentowski P, Coen PM, Switzer GE, Bickel PE, Stefanovic-Racic M, Toledo FG & Goodpaster BH. (2011). Skeletal muscle triglycerides, diacylglycerols, and ceramides in insulin resistance: another paradox in endurance-trained athletes? *Diabetes* **60**, 2588-2597.
- Anastasiou CA, Kavouras SA, Lentzas Y, Gova A, Sidossis LS & Melidonis A. (2009). Diabetes mellitus is associated with increased intramyocellular triglyceride, but not diglyceride, content in obese humans. *Metabolism* **58**, 1636-1642.
- Andersen PH, Lund S, Schmitz O, Junker S, Kahn BB & Pedersen O. (1993). Increased insulin-stimulated glucose uptake in athletes: the importance of GLUT4 mRNA, GLUT4 protein and fibre type composition of skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **149**, 393-404.
- Anderson EJ, Lustig ME, Boyle KE, Woodlief TL, Kane DA, Lin CT, Price JW, 3rd, Kang L, Rabinovitch PS, Szeto HH, Houmard JA, Cortright RN, Wasserman DH & Neuffer PD. (2009). Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest* **119**, 573-581.
- Arkininstall MJ, Bruce CR, Nikolopoulos V, Garnham AP & Hawley JA. (2001). Effect of carbohydrate ingestion on metabolism during running and cycling. *J Appl Physiol* **91**, 2125-2134.
- Atkinson DE. (1968). The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* **7**, 4030-4034.
- Bachmann OP, Dahl DB, Brechtel K, Machann J, Haap M, Maier T, Loviscach M, Stumvoll M, Claussen CD, Schick F, Haring HU & Jacob S. (2001). Effects of intravenous and dietary lipid challenge on intramyocellular lipid content and the relation with insulin sensitivity in humans. *Diabetes* **50**, 2579-2584.
- Bartz R, Zehmer JK, Zhu M, Chen Y, Serrero G, Zhao Y & Liu P. (2007). Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res* **6**, 3256-3265.
- Bavenholm PN, Pigon J, Saha AK, Ruderman NB & Efendic S. (2000). Fatty acid oxidation and the regulation of malonyl-CoA in human muscle. *Diabetes* **49**, 1078-1083.
- Berggren JR, Boyle KE, Chapman WH & Houmard JA. (2008). Skeletal muscle lipid oxidation and obesity: influence of weight loss and exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E726-732.
- Bergman BC, Butterfield GE, Wolfel EE, Casazza GA, Lopaschuk GD & Brooks GA. (1999). Evaluation of exercise and training on muscle lipid metabolism. *Am J Physiol* **276**, E106-117.

- Bergman BC, Hunerdosse DM, Kerege A, Playdon MC & Perreault L. (2012). Localisation and composition of skeletal muscle diacylglycerol predicts insulin resistance in humans. *Diabetologia* **55**, 1140-1150.
- Bergman BC, Perreault L, Hunerdosse DM, Koehler MC, Samek AM & Eckel RH. (2010). Increased intramuscular lipid synthesis and low saturation relate to insulin sensitivity in endurance-trained athletes. *J Appl Physiol* **108**, 1134-1141.
- Bergmeyer H. 1974. *Methods in Enzymatic Analysis*. Academic, New York.
- Bergstrom J, Hermansen L, Hultman E & Saltin B. (1967). Diet, muscle glycogen and physical performance. *Acta Physiol Scand* **71**, 140-150.
- Bergstrom J, Hultman E & Saltin B. (1973). Muscle glycogen consumption during cross-country skiing (the Vasa ski race). *Int Z Angew Physiol* **31**, 71-75.
- Berthon P, Freyssenet D, Chatard JC, Castells J, Mujika I, Geysant A, Guezennec CY & Denis C. (1995). Mitochondrial ATP production rate in 55 to 73-year-old men: effect of endurance training. *Acta Physiol Scand* **154**, 269-274.
- Bickel PE, Tansey JT & Welte MA. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 419-440.
- Bird MI & Saggerson ED. (1984). Binding of malonyl-CoA to isolated mitochondria. Evidence for high- and low-affinity sites in liver and heart and relationship to inhibition of carnitine palmitoyltransferase activity. *Biochem J* **222**, 639-647.
- Blaak EE, Schiffelers SL, Saris WH, Mensink M & Kooi ME. (2004). Impaired beta-adrenergically mediated lipolysis in skeletal muscle of obese subjects. *Diabetologia* **47**, 1462-1468.
- Bloch-Damti A & Bashan N. (2005). Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1553-1567.
- Boesch C & Kreis R. (2000). Observation of intramyocellular lipids by 1H-magnetic resonance spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* **904**, 25-31.
- Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ & Glatz JF. (2007). Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. *Physiology (Bethesda)* **22**, 15-29.
- Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF & Tandon NN. (2000). Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase. *J Biol Chem* **275**, 14501-14508.
- Boni LT & Rando RR. (1985). The nature of protein kinase C activation by physically defined phospholipid vesicles and diacylglycerols. *J Biol Chem* **260**, 10819-10825.
- Boon H, Jonkers RA, Koopman R, Blaak EE, Saris WH, Wagenmakers AJ & LJ VANL. (2007). Substrate source use in older, trained males after decades of endurance training. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 2160-2170.
- Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, Fernandez-Rodriguez J, Ericson J, Nilsson T, Boren J & Olofsson SO. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* **9**, 1286-1293.
- Boyle KE, Canham JP, Consitt LA, Zheng D, Koves TR, Gavin TP, Holbert D, Neuffer PD, Ilkayeva O, Muoio DM & Houmard JA. (2011). A high-fat diet elicits differential responses in genes coordinating oxidative metabolism in skeletal muscle of lean and obese individuals. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 775-781.
- Brechtel K, Niess AM, Machann J, Rett K, Schick F, Claussen CD, Dickhuth HH, Haering HU & Jacob S. (2001). Utilisation of intramyocellular lipids (IMCLs) during exercise as assessed by proton magnetic resonance spectroscopy (1H-MRS). *Horm Metab Res* **33**, 63-66.

- Broskey NT, Daraspe J, Humbel BM & Amati F. (2013). Skeletal muscle mitochondrial and lipid droplet content assessed with standardized grid sizes for stereology. *J Appl Physiol* **115**, 765-770.
- Bruce CR, Brolin C, Turner N, Cleasby ME, van der Leij FR, Cooney GJ & Kraegen EW. (2007). Overexpression of carnitine palmitoyltransferase I in skeletal muscle in vivo increases fatty acid oxidation and reduces triacylglycerol esterification. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E1231-1237.
- Bruce CR, Hoy AJ, Turner N, Watt MJ, Allen TL, Carpenter K, Cooney GJ, Febbraio MA & Kraegen EW. (2009). Overexpression of carnitine palmitoyltransferase-1 in skeletal muscle is sufficient to enhance fatty acid oxidation and improve high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* **58**, 550-558.
- Bruce CR, Kriketos AD, Cooney GJ & Hawley JA. (2004). Disassociation of muscle triglyceride content and insulin sensitivity after exercise training in patients with Type 2 diabetes. *Diabetologia* **47**, 23-30.
- Bruce CR, Thrush AB, Mertz VA, Bezaire V, Chabowski A, Heigenhauser GJ & Dyck DJ. (2006). Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E99-E107.
- Bulankina AV, Deggerich A, Wenzel D, Mutenda K, Wittmann JG, Rudolph MG, Burger KN & Honing S. (2009). TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets. *J Cell Biol* **185**, 641-655.
- Bulow J & Madsen J. (1981). Influence of blood flow on fatty acid mobilization from lipolytically active adipose tissue. *Pflugers Arch* **390**, 169-174.
- Burke LM. (2003). The IOC consensus on sports nutrition 2003: new guidelines for nutrition for athletes. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* **13**, 549-552.
- Burke LM, Angus DJ, Cox GR, Cummings NK, Febbraio MA, Gawthorn K, Hawley JA, Minehan M, Martin DT & Hargreaves M. (2000). Effect of fat adaptation and carbohydrate restoration on metabolism and performance during prolonged cycling. *J Appl Physiol* **89**, 2413-2421.
- Cameron-Smith D, Burke LM, Angus DJ, Tunstall RJ, Cox GR, Bonen A, Hawley JA & Hargreaves M. (2003). A short-term, high-fat diet up-regulates lipid metabolism and gene expression in human skeletal muscle. *Am J Clin Nutr* **77**, 313-318.
- Carey AL, Staudacher HM, Cummings NK, Stepto NK, Nikolopoulos V, Burke LM & Hawley JA. (2001). Effects of fat adaptation and carbohydrate restoration on prolonged endurance exercise. *J Appl Physiol* **91**, 115-122.
- Carlson LA, Ekelund LG & Froberg SO. (1971). Concentration of triglycerides, phospholipids and glycogen in skeletal muscle and of free fatty acids and beta-hydroxybutyric acid in blood in man in response to exercise. *Eur J Clin Invest* **1**, 248-254.
- Charifi N, Kadi F, Feasson L, Costes F, Geysant A & Denis C. (2004). Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *J Physiol* **554**, 559-569.
- Charles M, Charifi N, Verney J, Pichot V, Feasson L, Costes F & Denis C. (2006). Effect of endurance training on muscle microvascular filtration capacity and vascular bed morphometry in the elderly. *Acta Physiol (Oxf)* **187**, 399-406.
- Chavez JA, Knotts TA, Wang LP, Li G, Dobrowsky RT, Florant GL & Summers SA. (2003). A role for ceramide, but not diacylglycerol, in the antagonism of insulin signal transduction by saturated fatty acids. *J Biol Chem* **278**, 10297-10303.
- Chernick S. (1969). Determination of glycerol in acyl glycerols. *Meth. Enzymol.* **14**, 627-630.

- Chi MM, Hintz CS, Coyle EF, Martin WH, 3rd, Ivy JL, Nemeth PM, Holloszy JO & Lowry OH. (1983). Effects of detraining on enzymes of energy metabolism in individual human muscle fibers. *Am J Physiol* **244**, C276-287.
- Chien D, Dean D, Saha AK, Flatt JP & Ruderman NB. (2000). Malonyl-CoA content and fatty acid oxidation in rat muscle and liver in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E259-265.
- Childress CC, Sacktor B & Traynor DR. (1967). Function of carnitine in the fatty acid oxidase-deficient insect flight muscle. *J Biol Chem* **242**, 754-760.
- Christ-Roberts CY & Mandarino LJ. (2004). Glycogen synthase: key effect of exercise on insulin action. *Exerc Sport Sci Rev* **32**, 90-94.
- Christ-Roberts CY, Pratipanawatr T, Pratipanawatr W, Berria R, Belfort R, Kashyap S & Mandarino LJ. (2004b). Exercise training increases glycogen synthase activity and GLUT4 expression but not insulin signaling in overweight nondiabetic and type 2 diabetic subjects. *Metabolism* **53**, 1233-1242.
- Christensen EH & Hansen O. (1939). Arbeitsfähigkeit und ernahrung. *Scand Arch Physiol* **81**, 160-171.
- Coen PM, Dube JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Ferrell RE, Toledo FG & Goodpaster BH. (2010). Insulin resistance is associated with higher intramyocellular triglycerides in type I but not type II myocytes concomitant with higher ceramide content. *Diabetes* **59**, 80-88.
- Coen PM & Goodpaster BH. (2012). Role of intramyocellular lipids in human health. *Trends Endocrinol Metab* **23**, 391-398.
- Coggan AR, Spina RJ, King DS, Rogers MA, Brown M, Nemeth PM & Holloszy JO. (1992). Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol* **72**, 1780-1786.
- Cohen J. (1985). Obesity: a review. *J R Coll Gen Pract* **35**, 435-441.
- Connet R & Sahlin K. 1996. Control of glycolysis and glycogen metabolism. *In Handbook of physiology. Section 12. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems. Vol. 12, New York. 870-911.*
- Constantin-Teodosiu D, Carlin JI, Cederblad G, Harris RC & Hultman E. (1991). Acetyl group accumulation and pyruvate dehydrogenase activity in human muscle during incremental exercise. *Acta Physiol Scand* **143**, 367-372.
- Cooper RH, Randle PJ & Denton RM. (1975). Stimulation of phosphorylation and inactivation of pyruvate dehydrogenase by physiological inhibitors of the pyruvate dehydrogenase reaction. *Nature* **257**, 808-809.
- Costill DL, Gollnick PD, Jansson ED, Saltin B & Stein EM. (1973). Glycogen depletion pattern in human muscle fibres during distance running. *Acta Physiol Scand* **89**, 374-383.
- Coyle EF, Coggan AR, Hemmert MK & Ivy JL. (1986). Muscle glycogen utilization during prolonged strenuous exercise when fed carbohydrate. *J Appl Physiol* **61**, 165-172.
- Coyle EF, Jeukendrup AE, Wagenmakers AJ & Saris WH. (1997). Fatty acid oxidation is directly regulated by carbohydrate metabolism during exercise. *Am J Physiol* **273**, E268-275.
- Crane JD, Devries MC, Safdar A, Hamadeh MJ & Tarnopolsky MA. (2010). The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**, 119-128.
- Cree MG, Newcomer BR, Katsanos CS, Sheffield-Moore M, Chinkes D, Aarsland A, Urban R & Wolfe RR. (2004). Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3864-3871.

- Dalen KT, Schoonjans K, Ulven SM, Weedon-Fekjaer MS, Bentzen TG, Koutnikova H, Auwerx J & Nebb HI. (2004). Adipose tissue expression of the lipid droplet-associated proteins S3-12 and perilipin is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* **53**, 1243-1252.
- De Bock K, Derave W, Eijnde BO, Hesselink MK, Koninckx E, Rose AJ, Schrauwen P, Bonen A, Richter EA & Hespel P. (2008). Effect of training in the fasted state on metabolic responses during exercise with carbohydrate intake. *J Appl Physiol* **104**, 1045-1055.
- De Bock K, Dresselaers T, Kiens B, Richter EA, Van Hecke P & Hespel P. (2007). Evaluation of intramyocellular lipid breakdown during exercise by biochemical assay, NMR spectroscopy, and Oil Red O staining. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E428-434.
- De Bock K, Richter EA, Russell AP, Eijnde BO, Derave W, Ramaekers M, Koninckx E, Leger B, Verhaeghe J & Hespel P. (2005). Exercise in the fasted state facilitates fibre type-specific intramyocellular lipid breakdown and stimulates glycogen resynthesis in humans. *J Physiol* **564**, 649-660.
- De Larichaudy J, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, Dessalle K, Desgeorges M, Piraud M, Cheillan D, Vidal H, Lefai E & Nemoz G. (2012). TNF-alpha- and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism. *Skelet Muscle* **2**, 2.
- Dean D, Dugaard JR, Young ME, Saha A, Vavvas D, Asp S, Kiens B, Kim KH, Witters L, Richter EA & Ruderman N. (2000). Exercise diminishes the activity of acetyl-CoA carboxylase in human muscle. *Diabetes* **49**, 1295-1300.
- Deevska GM & Nikolova-Karakashian MN. (2011). The twists and turns of sphingolipid pathway in glucose regulation. *Biochimie* **93**, 32-38.
- DeFronzo RA, Tobin JD & Andres R. (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* **237**, E214-223.
- Denis C, Dormois D, Linossier MT, Geysant A & Lacour JR. (1991). Total muscle NADH during 30-min submaximal exercise: effects of endurance training. *Acta Physiol Scand* **142**, 301-302.
- Denton RM & Randle PJ. (1967). Concentrations of glycerides and phospholipids in rat heart and gastrocnemius muscles. Effects of alloxan-diabetes and perfusion. *Biochem J* **104**, 416-422.
- Di Paola M, Cocco T & Lorusso M. (2000). Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry* **39**, 6660-6668.
- Dube J & Goodpaster BH. (2006). Assessment of intramuscular triglycerides: contribution to metabolic abnormalities. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **9**, 553-559.
- Dube JJ, Amati F, Stefanovic-Racic M, Toledo FG, Sauers SE & Goodpaster BH. (2008). Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E882-888.
- Dube JJ, Amati F, Toledo FG, Stefanovic-Racic M, Rossi A, Coen P & Goodpaster BH. (2011). Effects of weight loss and exercise on insulin resistance, and intramyocellular triacylglycerol, diacylglycerol and ceramide. *Diabetologia* **54**, 1147-1156.
- Dubowitz V. 1985. Oil red O stain for lipid. 32-33 pp.
- Dunstan DW, Daly RM, Owen N, Jolley D, De Courten M, Shaw J & Zimmet P. (2002). High-intensity resistance training improves glycemic control in older patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **25**, 1729-1736.
- Dyck DJ, Peters SJ, Glatz J, Gorski J, Keizer H, Kiens B, Liu S, Richter EA, Spriet LL, van der Vusse GJ & Bonen A. (1997). Functional differences in lipid metabolism in resting skeletal muscle of various fiber types. *Am J Physiol* **272**, E340-351.



- Dzamko N, Schertzer JD, Ryall JG, Steel R, Macaulay SL, Wee S, Chen ZP, Michell BJ, Oakhill JS, Watt MJ, Jorgensen SB, Lynch GS, Kemp BE & Steinberg GR. (2008). AMPK-independent pathways regulate skeletal muscle fatty acid oxidation. *J Physiol* **586**, 5819-5831.
- Edwards LM, Murray AJ, Holloway CJ, Carter EE, Kemp GJ, Codreanu I, Brooker H, Tyler DJ, Robbins PA & Clarke K. (2011). Short-term consumption of a high-fat diet impairs whole-body efficiency and cognitive function in sedentary men. *Faseb J* **25**, 1088-1096.
- Essen-Gustavsson B & Tesch PA. (1990). Glycogen and triglyceride utilization in relation to muscle metabolic characteristics in men performing heavy-resistance exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **61**, 5-10.
- Essen B, Hagenfeldt L & Kaijser L. (1977). Utilization of blood-borne and intramuscular substrates during continuous and intermittent exercise in man. *J Physiol* **265**, 489-506.
- Fluck M. (2006). Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli. *J Exp Biol* **209**, 2239-2248.
- Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509.
- Frayn KN. (2010). Fat as a fuel: emerging understanding of the adipose tissue-skeletal muscle axis. *Acta Physiol (Oxf)* **199**, 509-518.
- Galbo H, Holst JJ & Christensen NJ. (1975). Glucagon and plasma catecholamine responses to graded and prolonged exercise in man. *J Appl Physiol* **38**, 70-76.
- Gan SK, Kriketos AD, Ellis BA, Thompson CH, Kraegen EW & Chisholm DJ. (2003). Changes in aerobic capacity and visceral fat but not myocyte lipid levels predict increased insulin action after exercise in overweight and obese men. *Diabetes Care* **26**, 1706-1713.
- Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A & Fernandez-Checa JC. (1997). Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem* **272**, 11369-11377.
- Glatz JF, Luiken JJ & Bonen A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev* **90**, 367-417.
- Goedecke JH, Christie C, Wilson G, Dennis SC, Noakes TD, Hopkins WG & Lambert EV. (1999). Metabolic adaptations to a high-fat diet in endurance cyclists. *Metabolism* **48**, 1509-1517.
- Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert CWt, Piehl K & Saltin B. (1972). Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained men. *J Appl Physiol* **33**, 312-319.
- Gollnick PD, Piehl K & Saltin B. (1974). Selective glycogen depletion pattern in human muscle fibres after exercise of varying intensity and at varying pedalling rates. *J Physiol* **241**, 45-57.
- Goodpaster BH, He J, Watkins S & Kelley DE. (2001). Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 5755-5761.
- Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC & Kelley DE. (2000). Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* **49**, 467-472.
- Gosker HR, Schrauwen P, Broekhuizen R, Hesselink MK, Moonen-Kornips E, Ward KA, Franssen FM, Wouters EF & Schols AM. (2006). Exercise training restores uncoupling protein-3 content in limb muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E976-981.
- Granneman JG, Moore HP, Mottillo EP, Zhu Z & Zhou L. (2011). Interactions of perilipin-5 (Plin5) with adipose triglyceride lipase. *J Biol Chem* **286**, 5126-5135.

- Grimby G, Aniansson A, Hedberg M, Henning GB, Grangard U & Kvist H. (1992). Training can improve muscle strength and endurance in 78- to 84-yr-old men. *J Appl Physiol* **73**, 2517-2523.
- Guo Z, Burguera B & Jensen MD. (2000). Kinetics of intramuscular triglyceride fatty acids in exercising humans. *J Appl Physiol* **89**, 2057-2064.
- Hanada K, Kumagai K, Tomishige N & Yamaji T. (2009). CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 684-691.
- Hannun YA & Obeid LM. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 139-150.
- Hannun YA & Obeid LM. (2011). Many ceramides. *J Biol Chem* **286**, 27855-27862.
- Harber MP, Crane JD, Douglass MD, Weindel KD, Trappe TA, Trappe SW & Fink WF. (2008). Resistance exercise reduces muscular substrates in women. *Int J Sports Med* **29**, 719-725.
- Hardie DG. (2004). The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci* **117**, 5479-5487.
- Hardie DG. (2011). Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism. *Proc Nutr Soc* **70**, 92-99.
- Hargreaves M, McConell G & Proietto J. (1995). Influence of muscle glycogen on glycogenolysis and glucose uptake during exercise in humans. *J Appl Physiol* **78**, 288-292.
- Haus JM, Solomon TP, Lu L, Jesberger JA, Barkoukis H, Flask CA & Kirwan JP. (2011). Intramyocellular lipid content and insulin sensitivity are increased following a short-term low-glycemic index diet and exercise intervention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E511-516.
- Hawley JA. (2002). Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **29**, 218-222.
- Hawley JA. (2009). Molecular responses to strength and endurance training: are they incompatible? *Appl Physiol Nutr Metab* **34**, 355-361.
- Hawley JA, Brouns F & Jeukendrup A. (1998). Strategies to enhance fat utilisation during exercise. *Sports Med* **25**, 241-257.
- Hawley JA & Stepto NK. (2001). Adaptations to training in endurance cyclists: implications for performance. *Sports Med* **31**, 511-520.
- Helge JW. (2000). Adaptation to a fat-rich diet: effects on endurance performance in humans. *Sports Med* **30**, 347-357.
- Helge JW. (2010). Arm and leg substrate utilization and muscle adaptation after prolonged low-intensity training. *Acta Physiol (Oxf)* **199**, 519-528.
- Helge JW, Rehrer NJ, Pilegaard H, Manning P, Lucas SJ, Gerrard DF & Cotter JD. (2007a). Increased fat oxidation and regulation of metabolic genes with ultraendurance exercise. *Acta Physiol (Oxf)* **191**, 77-86.
- Helge JW, Stallknecht B, Richter EA, Galbo H & Kiens B. (2007b). Muscle metabolism during graded quadriceps exercise in man. *J Physiol* **581**, 1247-1258.
- Henriksson KG. (1979). "Semi-open" muscle biopsy technique. A simple outpatient procedure. *Acta Neurol Scand* **59**, 317-323.
- Hermansen L & Wachtlova M. (1971). Capillary density of skeletal muscle in well-trained and untrained men. *J Appl Physiol* **30**, 860-863.
- Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ & Summers SA. (2007). Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* **5**, 167-179.

- Holloszy JO & Coyle EF. (1984). Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. *J Appl Physiol* **56**, 831-838.
- Holloszy JO, Kohrt WM & Hansen PA. (1998). The regulation of carbohydrate and fat metabolism during and after exercise. *Front Biosci* **3**, D1011-1027.
- Holloway GP, Luiken JJ, Glatz JF, Spriet LL & Bonen A. (2008). Contribution of FAT/CD36 to the regulation of skeletal muscle fatty acid oxidation: an overview. *Acta Physiol (Oxf)* **194**, 293-309.
- Holten MK, Zacho M, Gaster M, Juel C, Wojtaszewski JF & Dela F. (2004). Strength training increases insulin-mediated glucose uptake, GLUT4 content, and insulin signaling in skeletal muscle in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* **53**, 294-305.
- Hoppeler H, Luthi P, Claassen H, Weibel ER & Howald H. (1973). The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. *Pflugers Arch* **344**, 217-232.
- Horn F, Lindenmeier G, Grillhösl C, Moc I, Berghold S, Schneider N & Münster B. 2005. *Biochimie Humaine. Médecine-Sciences*, Flammarion.
- Houmard JA, Tanner CJ, Slentz CA, Duscha BD, McCartney JS & Kraus WE. (2004). Effect of the volume and intensity of exercise training on insulin sensitivity. *J Appl Physiol* **96**, 101-106.
- Houmard JA, Tanner CJ, Yu C, Cunningham PG, Pories WJ, MacDonald KG & Shulman GI. (2002). Effect of weight loss on insulin sensitivity and intramuscular long-chain fatty acyl-CoAs in morbidly obese subjects. *Diabetes* **51**, 2959-2963.
- Howald H, Boesch C, Kreis R, Matter S, Billeter R, Essen-Gustavsson B & Hoppeler H. (2002). Content of intramyocellular lipids derived by electron microscopy, biochemical assays, and (1)H-MR spectroscopy. *J Appl Physiol* **92**, 2264-2272.
- Hue L & Taegtmeyer H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E578-591.
- Hulver MW, Berggren JR, Cortright RN, Dudek RW, Thompson RP, Pories WJ, MacDonald KG, Cline GW, Shulman GI, Dohm GL & Houmard JA. (2003). Skeletal muscle lipid metabolism with obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E741-747.
- Hurley BF, Nemeth PM, Martin WH, 3rd, Hagberg JM, Dalsky GP & Holloszy JO. (1986). Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J Appl Physiol* **60**, 562-567.
- Ibanez J, Izquierdo M, Arguelles I, Forga L, Larrion JL, Garcia-Unciti M, Idoate F & Gorostiaga EM. (2005). Twice-weekly progressive resistance training decreases abdominal fat and improves insulin sensitivity in older men with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **28**, 662-667.
- Ibrahimi A, Bonen A, Blinn WD, Hajri T, Li X, Zhong K, Cameron R & Abumrad NA. (1999). Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem* **274**, 26761-26766.
- Ishii T, Yamakita T, Sato T, Tanaka S & Fujii S. 1998. Resistance training improves insulin sensitivity in NIDDM subjects without altering maximal oxygen uptake. *In Diabetes Care*. Vol. 21. 1353-1355.
- Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F & Boden G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkkappaB-alpha. *Diabetes* **51**, 2005-2011.
- Iversen N, Krstrup P, Rasmussen HN, Rasmussen UF, Saltin B & Pilegaard H. (2011). Mitochondrial biogenesis and angiogenesis in skeletal muscle of the elderly. *Exp Gerontol* **46**, 670-678.

- Jacob S, Machann J, Rett K, Brechtel K, Volk A, Renn W, Maerker E, Matthaei S, Schick F, Claussen CD & Haring HU. (1999). Association of increased intramyocellular lipid content with insulin resistance in lean nondiabetic offspring of type 2 diabetic subjects. *Diabetes* **48**, 1113-1119.
- Jamart C, Francaux M, Millet GY, Deldicque L, Frere D & Feasson L. (2012). Modulation of autophagy and ubiquitin-proteasome pathways during ultra-endurance running. *J Appl Physiol* **112**, 1529-1537.
- Jeppesen J, Albers PH, Rose AJ, Birk JB, Schjerling P, Dzamko N, Steinberg GR & Kiens B. (2011). Contraction-induced skeletal muscle FAT/CD36 trafficking and FA uptake is AMPK independent. *J Lipid Res* **52**, 699-711.
- Jeppesen J & Kiens B. (2012). Regulation and limitations to fatty acid oxidation during exercise. *J Physiol* **590**, 1059-1068.
- Jeppesen J, Mogensen M, Prats C, Sahlin K, Madsen K & Kiens B. (2010). FAT/CD36 is localized in sarcolemma and in vesicle-like structures in subsarcolemma regions but not in mitochondria. *J Lipid Res* **51**, 1504-1512.
- Jeukendrup AE, Raben A, Gijsen A, Stegen JH, Brouns F, Saris WH & Wagenmakers AJ. (1999). Glucose kinetics during prolonged exercise in highly trained human subjects: effect of glucose ingestion. *J Physiol* **515** ( Pt 2), 579-589.
- Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N, Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y & Inokuchi J. (2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13678-13683.
- Kelley DE, He J, Menshikova EV & Ritov VB. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944-2950.
- Kien CL, Everingham KI, R DS, Fukagawa NK & Muoio DM. (2011). Short-term effects of dietary fatty acids on muscle lipid composition and serum acylcarnitine profile in human subjects. *Obesity (Silver Spring)* **19**, 305-311.
- Kiens B. (2006). Skeletal muscle lipid metabolism in exercise and insulin resistance. *Physiol Rev* **86**, 205-243.
- Kiens B, Essen-Gustavsson B, Christensen NJ & Saltin B. (1993). Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *J Physiol* **469**, 459-478.
- Kiens B & Richter EA. (1998). Utilization of skeletal muscle triacylglycerol during postexercise recovery in humans. *Am J Physiol* **275**, E332-337.
- Kiens B, Roemen TH & van der Vusse GJ. (1999). Muscular long-chain fatty acid content during graded exercise in humans. *Am J Physiol* **276**, E352-357.
- Kjaer M, Howlett K, Langfort J, Zimmerman-Belsing T, Lorentsen J, Bulow J, Ihlemann J, Feldt-Rasmussen U & Galbo H. (2000). Adrenaline and glycogenolysis in skeletal muscle during exercise: a study in adrenalectomised humans. *J Physiol* **528 Pt 2**, 371-378.
- Koopman R, Manders RJ, Jonkers RA, Hul GB, Kuipers H & van Loon LJ. (2006). Intramyocellular lipid and glycogen content are reduced following resistance exercise in untrained healthy males. *Eur J Appl Physiol* **96**, 525-534.
- Koopman R, Schaart G & Hesselink MK. (2001). Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* **116**, 63-68.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD & Muoio DM. (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* **7**, 45-56.

- Krogh A & Lindhard J. (1920). The Relative Value of Fat and Carbohydrate as Sources of Muscular Energy: With Appendices on the Correlation between Standard Metabolism and the Respiratory Quotient during Rest and Work. *Biochem J* **14**, 290-363.
- Lacour JR. (2001). [Lipid metabolism and exercise]. *Rev Prat* **51**, S36-41.
- Lambert EV, Speechly DP, Dennis SC & Noakes TD. (1994). Enhanced endurance in trained cyclists during moderate intensity exercise following 2 weeks adaptation to a high fat diet. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **69**, 287-293.
- LeBrasseur NK, Walsh K & Arany Z. (2011). Metabolic benefits of resistance training and fast glycolytic skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **300**, E3-10.
- Lee-Young RS, Palmer MJ, Linden KC, LePlastrier K, Canny BJ, Hargreaves M, Wadley GD, Kemp BE & McConell GK. (2006). Carbohydrate ingestion does not alter skeletal muscle AMPK signaling during exercise in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E566-573.
- Lee JS, Pinnamaneni SK, Eo SJ, Cho IH, Pyo JH, Kim CK, Sinclair AJ, Febbraio MA & Watt MJ. (2006). Saturated, but not n-6 polyunsaturated, fatty acids induce insulin resistance: role of intramuscular accumulation of lipid metabolites. *J Appl Physiol* **100**, 1467-1474.
- Lee K, Kerner J & Hoppel CL. (2011). Mitochondrial carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a) is part of an outer membrane fatty acid transfer complex. *J Biol Chem* **286**, 25655-25662.
- Leeuwenburgh C, Hollander J, Leichtweis S, Griffiths M, Gore M & Ji LL. (1997). Adaptations of glutathione antioxidant system to endurance training are tissue and muscle fiber specific. *Am J Physiol* **272**, R363-369.
- MacPherson RE, Herbst EA, Reynolds EJ, Vandenboom R, Roy BD & Peters SJ. (2012). Subcellular localization of skeletal muscle lipid droplets and PLIN family proteins OXPAT and ADRP at rest and following contraction in rat soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **302**, R29-36.
- Martin V, Kerherve H, Messonnier LA, Banfi JC, Geysant A, Bonnefoy R, Feasson L & Millet GY. (2010). Central and peripheral contributions to neuromuscular fatigue induced by a 24-h treadmill run. *J Appl Physiol* **108**, 1224-1233.
- Mashek DG, Li LO & Coleman RA. (2006). Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *J Lipid Res* **47**, 2004-2010.
- McGarry JD & Brown NF. (1997). The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem* **244**, 1-14.
- McGarry JD, Mills SE, Long CS & Foster DW. (1983). Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. Demonstration of the presence of malonyl-CoA in non-hepatic tissues of the rat. *Biochem J* **214**, 21-28.
- McLoughlin TJ. (2010). Tax sugar, save muscle? *J Appl Physiol* **108**, 3-4.
- Meex RC, Schrauwen P & Hesselink MK. (2009). Modulation of myocellular fat stores: lipid droplet dynamics in health and disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **297**, R913-924.
- Mencarelli C, Losen M, Hammels C, De Vry J, Hesselink MK, Steinbusch HW, De Baets MH & Martinez-Martinez P. (2010). The ceramide transporter and the Goodpasture antigen binding protein: one protein--one function? *J Neurochem* **113**, 1369-1386.
- Menshikova EV, Ritov VB, Toledo FG, Ferrell RE, Goodpaster BH & Kelley DE. (2005). Effects of weight loss and physical activity on skeletal muscle mitochondrial function in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E818-825.

- Meredith CN, Frontera WR, Fisher EC, Hughes VA, Herland JC, Edwards J & Evans WJ. (1989). Peripheral effects of endurance training in young and old subjects. *J Appl Physiol* **66**, 2844-2849.
- Meyer RA & Foely JM. 1996. Cellular processes integrating the metabolic responses to exercise. In *Handbook of Physiology*. Shepherd LBRJT, editor. Oxford University Press, New York. 841-869.
- Millet GY, Banfi JC, Kerherve H, Morin JB, Vincent L, Estrade C, Geysant A & Feasson L. (2011). Physiological and biological factors associated with a 24 h treadmill ultra-marathon performance. *Scand J Med Sci Sports* **21**, 54-61.
- Minnaard R, Schrauwen P, Schaart G, Jorgensen JA, Lenaers E, Mensink M & Hesselink MK. (2009). Adipocyte differentiation-related protein and OXPAT in rat and human skeletal muscle: involvement in lipid accumulation and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 4077-4085.
- Montell E, Turini M, Marotta M, Roberts M, Noe V, Ciudad CJ, Mace K & Gomez-Foix AM. (2001). DAG accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E229-237.
- Morio B, Holmback U, Gore D & Wolfe RR. (2004). Increased VLDL-TAG turnover during and after acute moderate-intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc* **36**, 801-806.
- Moro C, Bajpeyi S & Smith SR. (2008). Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E203-213.
- Muoio DM, Leddy JJ, Horvath PJ, Awad AB & Pendergast DR. (1994). Effect of dietary fat on metabolic adjustments to maximal VO<sub>2</sub> and endurance in runners. *Med Sci Sports Exerc* **26**, 81-88.
- Muoio DM & Neufer PD. (2012). Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metab* **15**, 595-605.
- Murphy DJ. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* **40**, 325-438.
- Nakagawa Y, Hattori M, Harada K, Shirase R, Bando M & Okano G. (2007). Age-related changes in intramyocellular lipid in humans by in vivo H-MR spectroscopy. *Gerontology* **53**, 218-223.
- Newsholme E & Leech A. 1983. *Biochemistry for the Medical Sciences*. John Wiley, Chichester.
- Ngo KT, Denis C, Saafi MA, Feasson L & Verney J. (2012). Endurance but not resistance training increases intra-myocellular lipid content and beta-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase activity in active elderly men. *Acta Physiol (Oxf)* **205**, 133-144.
- Nordby P, Saltin B & Helge JW. (2006). Whole-body fat oxidation determined by graded exercise and indirect calorimetry: a role for muscle oxidative capacity? *Scand J Med Sci Sports* **16**, 209-214.
- Novgorodov SA, Wu BX, Gudz TI, Bielawski J, Ovchinnikova TV, Hannun YA & Obeid LM. (2011). Novel pathway of ceramide production in mitochondria: thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J Biol Chem* **286**, 25352-25362.
- O'Gorman DJ, Karlsson HK, McQuaid S, Yousif O, Rahman Y, Gasparro D, Glund S, Chibalin AV, Zierath JR & Nolan JJ. (2006). Exercise training increases insulin-stimulated glucose disposal and GLUT4 (SLC2A4) protein content in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* **49**, 2983-2992.
- Odland LM, Heigenhauser GJ, Lopaschuk GD & Spriet LL. (1996). Human skeletal muscle malonyl-CoA at rest and during prolonged submaximal exercise. *Am J Physiol* **270**, E541-544.

- Odland LM, Heigenhauser GJ & Spriet LL. (2000). Effects of high fat provision on muscle PDH activation and malonyl-CoA content in moderate exercise. *J Appl Physiol* **89**, 2352-2358.
- Odland LM, Howlett RA, Heigenhauser GJ, Hultman E & Spriet LL. (1998). Skeletal muscle malonyl-CoA content at the onset of exercise at varying power outputs in humans. *Am J Physiol* **274**, E1080-1085.
- Olofsson SO, Bostrom P, Andersson L, Rutberg M, Perman J & Boren J. (2009). Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 448-458.
- Pan DA, Lillioja S, Milner MR, Kriketos AD, Baur LA, Bogardus C & Storlien LH. (1995). Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action. *J Clin Invest* **96**, 2802-2808.
- Perry CG, Heigenhauser GJ, Bonen A & Spriet LL. (2008). High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* **33**, 1112-1123.
- Peters SJ, Harris RA, Wu P, Pehleman TL, Heigenhauser GJ & Spriet LL. (2001). Human skeletal muscle PDH kinase activity and isoform expression during a 3-day high-fat/low-carbohydrate diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **281**, E1151-1158.
- Peters SJ, Samjoo IA, Devries MC, Stevic I, Robertshaw HA & Tarnopolsky MA. (2012). Perilipin family (PLIN) proteins in human skeletal muscle: the effect of sex, obesity, and endurance training. *Appl Physiol Nutr Metab* **37**, 724-735.
- Peters SJ, St Amand TA, Howlett RA, Heigenhauser GJ & Spriet LL. (1998). Human skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase activity increases after a low-carbohydrate diet. *Am J Physiol* **275**, E980-986.
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW & Shulman GI. (2003). Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* **300**, 1140-1142.
- Phillips SM, Green HJ, Tarnopolsky MA, Heigenhauser GJ & Grant SM. (1996). Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. *Am J Physiol* **270**, E265-272.
- Phinney SD, Bistrian BR, Evans WJ, Gervino E & Blackburn GL. (1983). The human metabolic response to chronic ketosis without caloric restriction: preservation of submaximal exercise capability with reduced carbohydrate oxidation. *Metabolism* **32**, 769-776.
- Praet SF, Jonkers RA, Schep G, Stehouwer CD, Kuipers H, Keizer HA & van Loon LJ. (2008). Long-standing, insulin-treated type 2 diabetes patients with complications respond well to short-term resistance and interval exercise training. *Eur J Endocrinol* **158**, 163-172.
- Prats C, Donsmark M, Qvortrup K, Londos C, Sztalryd C, Holm C, Galbo H & Ploug T. (2006). Decrease in intramuscular lipid droplets and translocation of HSL in response to muscle contraction and epinephrine. *J Lipid Res* **47**, 2392-2399.
- Proctor DN, Sinning WE, Walro JM, Sieck GC & Lemon PW. (1995). Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol* **78**, 2033-2038.
- Pruchnic R, Katsiaras A, He J, Kelley DE, Winters C & Goodpaster BH. (2004). Exercise training increases intramyocellular lipid and oxidative capacity in older adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E857-862.
- Randle PJ. (1998). Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* **14**, 263-283.

- Raney MA & Turcotte LP. (2006). Regulation of contraction-induced FA uptake and oxidation by AMPK and ERK1/2 is intensity dependent in rodent muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1220-1227.
- Richter EA & Ruderman NB. (2009). AMPK and the biochemistry of exercise: implications for human health and disease. *Biochem J* **418**, 261-275.
- Rimbert V, Boirie Y, Bedu M, Hocquette JF, Ritz P & Morio B. (2004). Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity. *Faseb J* **18**, 737-739.
- Roepstorff C, Donsmark M, Thiele M, Vistisen B, Stewart G, Vissing K, Schjerling P, Hardie DG, Galbo H & Kiens B. (2006). Sex differences in hormone-sensitive lipase expression, activity, and phosphorylation in skeletal muscle at rest and during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291**, E1106-1114.
- Roepstorff C, Halberg N, Hillig T, Saha AK, Ruderman NB, Wojtaszewski JF, Richter EA & Kiens B. (2005). Malonyl-CoA and carnitine in regulation of fat oxidation in human skeletal muscle during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **288**, E133-142.
- Roepstorff C, Steffensen CH, Madsen M, Stallknecht B, Kanstrup IL, Richter EA & Kiens B. (2002). Gender differences in substrate utilization during submaximal exercise in endurance-trained subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E435-447.
- Roepstorff C, Vistisen B, Donsmark M, Nielsen JN, Galbo H, Green KA, Hardie DG, Wojtaszewski JF, Richter EA & Kiens B. (2004). Regulation of hormone-sensitive lipase activity and Ser563 and Ser565 phosphorylation in human skeletal muscle during exercise. *J Physiol* **560**, 551-562.
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Gastaldelli A, Horowitz JF, Endert E & Wolfe RR. (1993a). Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol* **265**, E380-391.
- Romijn JA, Coyle EF, Sidossis LS, Zhang XJ & Wolfe RR. (1995). Relationship between fatty acid delivery and fatty acid oxidation during strenuous exercise. *J Appl Physiol* **79**, 1939-1945.
- Romijn JA, Klein S, Coyle EF, Sidossis LS & Wolfe RR. (1993b). Strenuous endurance training increases lipolysis and triglyceride-fatty acid cycling at rest. *J Appl Physiol* **75**, 108-113.
- Rouffet D, Villars C, Fissoune R, Sappey-Marinier D, Laville M, Ibarrola D, Sothier M, Monnet MF, Ovize M, Bonnefoy M, Boesch C & Canet-Soulas E. (2013). Intramyocellular lipid variations in active older men: relationship with aerobic fitness. *Acta Physiol (Oxf)* **207**, 516-523.
- Saafi MA, Frere-Meunier D, Feasson L, Boutahar N & Denis C. (2012). Physical fitness is independently related to blood leptin concentration and insulin sensitivity index in male subjects with central adiposity. *Obes Facts* **5**, 91-103.
- Sacchetti M, Saltin B, Olsen DB & van Hall G. (2004). High triacylglycerol turnover rate in human skeletal muscle. *J Physiol* **561**, 883-891.
- Sacchetti M, Saltin B, Osada T & van Hall G. (2002). Intramuscular fatty acid metabolism in contracting and non-contracting human skeletal muscle. *J Physiol* **540**, 387-395.
- Sahlin K. (1990). Muscle carnitine metabolism during incremental dynamic exercise in humans. *Acta Physiol Scand* **138**, 259-262.
- Sahlin K, Edstrom L & Sjoholm H. (1987). Force, relaxation and energy metabolism of rat soleus muscle during anaerobic contraction. *Acta Physiol Scand* **129**, 1-7.
- Sahlin K & Harris RC. (2008). Control of lipid oxidation during exercise: role of energy state and mitochondrial factors. *Acta Physiol (Oxf)* **194**, 283-291.
- Sahlin K, Mogensen M, Bagger M, Fernstrom M & Pedersen PK. (2007). The potential for mitochondrial fat oxidation in human skeletal muscle influences whole body fat



- oxidation during low-intensity exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E223-230.
- Saltin B. (1981). Muscle fibre recruitment and metabolism in prolonged exhaustive dynamic exercise. *Ciba Found Symp* **82**, 41-58.
- Saltin B, Nazar K, Costill DL, Stein E, Jansson E, Essen B & Gollnick D. (1976). The nature of the training response; peripheral and central adaptations of one-legged exercise. *Acta Physiol Scand* **96**, 289-305.
- Schenk S & Horowitz JF. (2007). Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* **117**, 1690-1698.
- Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MK, Schrauwen P & Kooi ME. (2006). Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. *Obesity (Silver Spring)* **14**, 357-367.
- Schrauwen-Hinderling VB, Schrauwen P, Hesselink MK, van Engelshoven JM, Nicolay K, Saris WH, Kessels AG & Kooi ME. (2003). The increase in intramyocellular lipid content is a very early response to training. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 1610-1616.
- Sebastian D, Guitart M, Garcia-Martinez C, Mauvezin C, Orellana-Gavalda JM, Serra D, Gomez-Foix AM, Hegardt FG & Asins G. (2009). Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. *J Lipid Res* **50**, 1789-1799.
- Seifert EL, Fiehn O, Bezaire V, Bickel DR, Wohlgemuth G, Adams SH & Harper ME. (2010). Long-chain fatty acid combustion rate is associated with unique metabolite profiles in skeletal muscle mitochondria. *PLoS One* **5**, e9834.
- Sesti G. (2006). Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **20**, 665-679.
- Shaw CS, Clark J & Wagenmakers AJ. (2010). The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity. *Annu Rev Nutr* **30**, 13-34.
- Shaw CS, Shepherd SO, Wagenmakers AJ, Hansen D, Dendale P & van Loon LJ. (2012). Prolonged exercise training increases intramuscular lipid content and perilipin 2 expression in type I muscle fibers of patients with type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E1158-1165.
- Shaw CS, Sherlock M, Stewart PM & Wagenmakers AJ. (2009). Adipophilin distribution and colocalization with lipid droplets in skeletal muscle. *Histochem Cell Biol* **131**, 575-581.
- Shepherd SO, Cocks M, Tipton KD, Ranasinghe AM, Barker TA, Burniston JG, Wagenmakers AJ & Shaw CS. (2012). Sprint interval and traditional endurance training increase net intramuscular triglyceride breakdown and expression of perilipin 2 and 5. *J Physiol* **591**, 657-675.
- Shulman G & Petersen K. 2009. Metabolism. In Medical physiology. Boron W and Boulpaep E, editors. Saunders-Elsevier, Philadelphia.
- Sial S, Coggan AR, Hickner RC & Klein S. (1998). Training-induced alterations in fat and carbohydrate metabolism during exercise in elderly subjects. *Am J Physiol* **274**, E785-790.
- Skovbro M, Baranowski M, Skov-Jensen C, Flint A, Dela F, Gorski J & Helge JW. (2008). Human skeletal muscle ceramide content is not a major factor in muscle insulin sensitivity. *Diabetologia* **51**, 1253-1260.
- Smekal G, von Duvillard SP, Pokan R, Tschann H, Baron R, Hofmann P, Wonisch M & Bachl N. (2003). Effect of endurance training on muscle fat metabolism during prolonged exercise: agreements and disagreements. *Nutrition* **19**, 891-900.

- Solomon TP, Sistrun SN, Krishnan RK, Del Aguila LF, Marchetti CM, O'Carroll SM, O'Leary VB & Kirwan JP. (2008). Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *J Appl Physiol* **104**, 1313-1319.
- Spangenburg EE, Pratt SJ, Wohlers LM & Lovering RM. (2011). Use of BODIPY (493/503) to visualize intramuscular lipid droplets in skeletal muscle. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 598358.
- Spriet LL & Watt MJ. (2003). Regulatory mechanisms in the interaction between carbohydrate and lipid oxidation during exercise. *Acta Physiol Scand* **178**, 443-452.
- St-Onge MP. (2005). Relationship between body composition changes and changes in physical function and metabolic risk factors in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **8**, 523-528.
- Stallknecht B, Kiens B, Helge JW, Richter EA & Galbo H. (2004). Interstitial glycerol concentrations in human skeletal muscle and adipose tissue during graded exercise. *Acta Physiol Scand* **180**, 367-377.
- Starling RD, Trappe TA, Parcell AC, Kerr CG, Fink WJ & Costill DL. (1997). Effects of diet on muscle triglyceride and endurance performance. *J Appl Physiol* **82**, 1185-1189.
- Steensberg A, van Hall G, Keller C, Osada T, Schjerling P, Pedersen BK, Saltin B & Febbraio MA. (2002). Muscle glycogen content and glucose uptake during exercise in humans: influence of prior exercise and dietary manipulation. *J Physiol* **541**, 273-281.
- Steffensen CH, Roepstorff C, Madsen M & Kiens B. (2002). Myocellular triacylglycerol breakdown in females but not in males during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E634-642.
- Stellingwerff T, Boon H, Gijzen AP, Stegen JH, Kuipers H & van Loon LJ. (2007a). Carbohydrate supplementation during prolonged cycling exercise spares muscle glycogen but does not affect intramyocellular lipid use. *Pflugers Arch* **454**, 635-647.
- Stellingwerff T, Boon H, Jonkers RA, Senden JM, Spriet LL, Koopman R & van Loon LJ. (2007b). Significant intramyocellular lipid use during prolonged cycling in endurance-trained males as assessed by three different methodologies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E1715-1723.
- Stellingwerff T, Spriet LL, Watt MJ, Kimber NE, Hargreaves M, Hawley JA & Burke LM. (2006). Decreased PDH activation and glycogenolysis during exercise following fat adaptation with carbohydrate restoration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E380-388.
- Stephens FB, Constantin-Teodosiu D & Greenhaff PL. (2007). New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J Physiol* **581**, 431-444.
- Stratford S, Hoehn KL, Liu F & Summers SA. (2004). Regulation of insulin action by ceramide: dual mechanisms linking ceramide accumulation to the inhibition of Akt/protein kinase B. *J Biol Chem* **279**, 36608-36615.
- Suzuki M, Shinohara Y, Ohsaki Y & Fujimoto T. (2011). Lipid droplets: size matters. *J Electron Microsc (Tokyo)* **60 Suppl 1**, S101-116.
- Talanian JL, Holloway GP, Snook LA, Heigenhauser GJ, Bonen A & Spriet LL. (2010). Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E180-188.
- Tang JE, Hartman JW & Phillips SM. (2006). Increased muscle oxidative potential following resistance training induced fibre hypertrophy in young men. *Appl Physiol Nutr Metab* **31**, 495-501.
- Tarnopolsky MA, Rennie CD, Robertshaw HA, Fedak-Tarnopolsky SN, Devries MC & Hamadeh MJ. (2007). Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and

- mitochondrial enzyme activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1271-1278.
- Thrush AB, Harasim E, Chabowski A, Gulli R, Stefanyk L & Dyck DJ. (2011). A single prior bout of exercise protects against palmitate-induced insulin resistance despite an increase in total ceramide content. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1200-1208.
- Thyfault JP, Kraus RM, Hickner RC, Howell AW, Wolfe RR & Dohm GL. (2004). Impaired plasma fatty acid oxidation in extremely obese women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E1076-1081.
- Timmers S, de Vogel-van den Bosch J, Hesselink MK, van Beurden D, Schaart G, Ferraz MJ, Losen M, Martinez-Martinez P, De Baets MH, Aerts JM & Schrauwen P. (2011). Paradoxical increase in TAG and DAG content parallel the insulin sensitizing effect of unilateral DGAT1 overexpression in rat skeletal muscle. *PLoS One* **6**, e14503.
- Timmers S, Schrauwen P & de Vogel J. (2008). Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiol Behav* **94**, 242-251.
- Tirodkar TS & Voelkel-Johnson C. (2012). Sphingolipids in apoptosis. *Exp Oncol* **34**, 231-242.
- Toledo FG, Menshikova EV, Azuma K, Radikova Z, Kelley CA, Ritov VB & Kelley DE. (2008). Mitochondrial capacity in skeletal muscle is not stimulated by weight loss despite increases in insulin action and decreases in intramyocellular lipid content. *Diabetes* **57**, 987-994.
- Tsintzas OK, Williams C, Boobis L & Greenhaff P. (1996). Carbohydrate ingestion and single muscle fiber glycogen metabolism during prolonged running in men. *J Appl Physiol* **81**, 801-809.
- Turcotte LP, Richter EA & Kiens B. (1992). Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs. untrained humans. *Am J Physiol* **262**, E791-799.
- Turinsky J, O'Sullivan DM & Bayly BP. (1990). 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* **265**, 16880-16885.
- Turner N, Bruce CR, Beale SM, Hoehn KL, So T, Rolph MS & Cooney GJ. (2007). Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes* **56**, 2085-2092.
- Ussher JR, Koves TR, Cadete VJ, Zhang L, Jaswal JS, Swyrd SJ, Lopaschuk DG, Proctor SD, Keung W, Muoio DM & Lopaschuk GD. (2010). Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* **59**, 2453-2464.
- van Hall G, Sacchetti M, Radegran G & Saltin B. (2002). Human skeletal muscle fatty acid and glycerol metabolism during rest, exercise and recovery. *J Physiol* **543**, 1047-1058.
- van Hees AM, Jans A, Hul GB, Roche HM, Saris WH & Blaak EE. (2011). Skeletal muscle fatty acid handling in insulin resistant men. *Obesity (Silver Spring)* **19**, 1350-1359.
- van Loon LJ. (2004). Use of intramuscular triacylglycerol as a substrate source during exercise in humans. *J Appl Physiol* **97**, 1170-1187.
- van Loon LJ & Goodpaster BH. (2006). Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* **451**, 606-616.
- van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WH & Wagenmakers AJ. (2001). The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *J Physiol* **536**, 295-304.

- van Loon LJ, Koopman R, Stegen JH, Wagenmakers AJ, Keizer HA & Saris WH. (2003a). Intramyocellular lipids form an important substrate source during moderate intensity exercise in endurance-trained males in a fasted state. *J Physiol* **553**, 611-625.
- van Loon LJ, Schrauwen-Hinderling VB, Koopman R, Wagenmakers AJ, Hesselink MK, Schaart G, Kooi ME & Saris WH. (2003b). Influence of prolonged endurance cycling and recovery diet on intramuscular triglyceride content in trained males. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**, E804-811.
- Van Proeyen K, Szlufcik K, Nielens H, Deldicque L, Van Dyck R, Ramaekers M & Hespel P. (2011b). High-fat diet overrules the effects of training on fiber-specific intramyocellular lipid utilization during exercise. *J Appl Physiol* **111**, 108-116.
- Van Proeyen K, Szlufcik K, Nielens H, Ramaekers M & Hespel P. (2011a). Beneficial metabolic adaptations due to endurance exercise training in the fasted state. *J Appl Physiol* **110**, 236-245.
- Varela GM, Antwi DA, Dhir R, Yin X, Singhal NS, Graham MJ, Crooke RM & Ahima RS. (2008). Inhibition of ADRP prevents diet-induced insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **295**, G621-628.
- Veech RL, Lawson JW, Cornell NW & Krebs HA. (1979). Cytosolic phosphorylation potential. *J Biol Chem* **254**, 6538-6547.
- Venkatraman JT, Feng X & Pendergast D. (2001). Effects of dietary fat and endurance exercise on plasma cortisol, prostaglandin E2, interferon-gamma and lipid peroxides in runners. *J Am Coll Nutr* **20**, 529-536.
- Verney J, Kadi F, Charifi N, Feasson L, Saafi MA, Castells J, Piehl-Aulin K & Denis C. (2008). Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects. *Muscle Nerve*.
- Verney J, Kadi F, Saafi MA, Piehl-Aulin K & Denis C. (2006). Combined lower body endurance and upper body resistance training improves performance and health parameters in healthy active elderly. *Eur J Appl Physiol* **97**, 288-297.
- Vind BF, Pehmoller C, Treebak JT, Birk JB, Hey-Mogensen M, Beck-Nielsen H, Zierath JR, Wojtaszewski JF & Hojlund K. (2011). Impaired insulin-induced site-specific phosphorylation of TBC1 domain family, member 4 (TBC1D4) in skeletal muscle of type 2 diabetes patients is restored by endurance exercise-training. *Diabetologia* **54**, 157-167.
- Vollestad NK & Blom PC. (1985). Effect of varying exercise intensity on glycogen depletion in human muscle fibres. *Acta Physiol Scand* **125**, 395-405.
- Walberg JL. (1989). Aerobic exercise and resistance weight-training during weight reduction. Implications for obese persons and athletes. *Sports Med* **7**, 343-356.
- Wall BT, Stephens FB, Constantin-Teodosiu D, Marimuthu K, Macdonald IA & Greenhaff PL. (2011). Chronic oral ingestion of L-carnitine and carbohydrate increases muscle carnitine content and alters muscle fuel metabolism during exercise in humans. *J Physiol* **589**, 963-973.
- Wang H, Bell M, Sreenevasan U, Hu H, Liu J, Dalen K, Londos C, Yamaguchi T, Rizzo MA, Coleman R, Gong D, Brasaemle D & Sztalryd C. (2011). Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem* **286**, 15707-15715.
- Watt MJ, Heigenhauser GJ, Dyck DJ & Spriet LL. (2002). Intramuscular triacylglycerol, glycogen and acetyl group metabolism during 4 h of moderate exercise in man. *J Physiol* **541**, 969-978.
- Watt MJ, Heigenhauser GJ & Spriet LL. (2002b). Intramuscular triacylglycerol utilization in human skeletal muscle during exercise: is there a controversy? *J Appl Physiol* **93**, 1185-1195.

- Watt MJ, Heigenhauser GJ & Spriet LL. (2003). Effects of dynamic exercise intensity on the activation of hormone-sensitive lipase in human skeletal muscle. *J Physiol* **547**, 301-308.
- Watt MJ, Holmes AG, Pinnamaneni SK, Garnham AP, Steinberg GR, Kemp BE & Febbraio MA. (2006). Regulation of HSL serine phosphorylation in skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E500-508.
- Watt MJ, Holmes AG, Steinberg GR, Mesa JL, Kemp BE & Febbraio MA. (2004a). Reduced plasma FFA availability increases net triacylglycerol degradation, but not GPAT or HSL activity, in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E120-127.
- Watt MJ & Hoy AJ. (2012). Lipid metabolism in skeletal muscle: generation of adaptive and maladaptive intracellular signals for cellular function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E1315-1328.
- Watt MJ & Steinberg GR. (2008). Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J* **414**, 313-325.
- Watt MJ, Steinberg GR, Chan S, Garnham A, Kemp BE & Febbraio MA. (2004b). Beta-adrenergic stimulation of skeletal muscle HSL can be overridden by AMPK signaling. *Faseb J* **18**, 1445-1446.
- Wendling PS, Peters SJ, Heigenhauser GJ & Spriet LL. (1996). Variability of triacylglycerol content in human skeletal muscle biopsy samples. *J Appl Physiol* **81**, 1150-1155.
- White AT & Schenk S. (2012). NAD(+)/NADH and skeletal muscle mitochondrial adaptations to exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **303**, E308-321.
- White LJ, Ferguson MA, McCoy SC & Kim H. (2003). Intramyocellular lipid changes in men and women during aerobic exercise: a (1)H-magnetic resonance spectroscopy study. *J Clin Endocrinol Metab* **88**, 5638-5643.
- Wijsman CA, van Opstal AM, Kan HE, Maier AB, Westendorp RG, Slagboom PE, Webb AG, Mooijaart SP & van Heemst D. (2012). Proton magnetic resonance spectroscopy shows lower intramyocellular lipid accumulation in middle-aged subjects predisposed to familial longevity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**, E344-348.
- Wojtaszewski JF, Birk JB, Frosig C, Holten M, Pilegaard H & Dela F. (2005). 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol* **564**, 563-573.
- Wojtaszewski JF, Nielsen JN, Jorgensen SB, Frosig C, Birk JB & Richter EA. (2003). Transgenic models--a scientific tool to understand exercise-induced metabolism: the regulatory role of AMPK (5'-AMP-activated protein kinase) in glucose transport and glycogen synthase activity in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* **31**, 1290-1294.
- Yang X, Lu X, Lombes M, Rha GB, Chi YI, Guerin TM, Smart EJ & Liu J. (2010). The G(0)/G(1) switch gene 2 regulates adipose lipolysis through association with adipose triglyceride lipase. *Cell Metab* **11**, 194-205.
- Yeo WK, Carey AL, Burke L, Spriet LL & Hawley JA. (2011). Fat adaptation in well-trained athletes: effects on cell metabolism. *Appl Physiol Nutr Metab* **36**, 12-22.
- Yeo WK, Lessard SJ, Chen ZP, Garnham AP, Burke LM, Rivas DA, Kemp BE & Hawley JA. (2008). Fat adaptation followed by carbohydrate restoration increases AMPK activity in skeletal muscle from trained humans. *J Appl Physiol* **105**, 1519-1526.
- Yoshida Y, Jain SS, McFarlan JT, Snook LA, Chabowski A & Bonen A. (2012). Exercise-, and Training-induced Upregulation of Skeletal Muscle Fatty Acid Oxidation are not Solely Dependent on Mitochondrial Machinery and Biogenesis. *J Physiol*.
- Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW & Shulman GI. (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-

- associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* **277**, 50230-50236.
- Yu J, Novgorodov SA, Chudakova D, Zhu H, Bielawska A, Bielawski J, Obeid LM, Kindy MS & Gudz TI. (2007). JNK3 signaling pathway activates ceramide synthase leading to mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* **282**, 25940-25949.
- Zanuso S, Jimenez A, Pugliese G, Corigliano G & Balducci S. (2010). Exercise for the management of type 2 diabetes: a review of the evidence. *Acta Diabetol* **47**, 15-22.
- Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, Zimmermann R & Lass A. (2009). Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* **50**, 3-21.
- Zechner R, Zimmermann R, Eichmann TO, Kohlwein SD, Haemmerle G, Lass A & Madeo F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab* **15**, 279-291.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A & Zechner R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* **306**, 1383-1386.

## ANNEXES

## ANNEXE 1 : Protocoles de coloration immunohistochimiques

### PROTOCOLE IMMUNOHISTOLOGIE PEROXYDASE (ex : Typologie et capillaires)

#### Tris fille pour 500ml :

- 3,03g de Trizma base.
- 4,26g de NaCl.
- 18,5 ml de HCl.
- Ajuster avec de l'eau distillée.

#### TSAB : 1 ml de sérum de bœuf à 30 % pour 100 ml de tris fille :

Sur lame préalablement fixées à l'acétone (10 minutes) et congelées. Les sortir et les laisser sécher 1 heure à température ambiante.

1. Laisser les lames dans le TSAB durant 5 minutes.
2. Sécher les lames
3. **Anticorps primaire** dilution dans le TSAB : (~ 100µl/lame)  
N2 et A4 : 1/100 (10µl dans 990µl de TSAB).  
CD31 : 1/20 (50µl dans 950µl de TSAB)  
Pendant 2 heures.  
N2 pas plus de 2 heures. (Juin 2007).  
Dans une chambre humide (M.I.S.T)
4. **Rinçage** dans le tris durant 5 minutes.
5. Passer dans le TSAB durant 5 minutes.
6. Sécher les lames
7. **Anticorps Secondaire** : (Dako P260) dilution dans TSAB :  
1/20 (50µl dans 950µl de TSAB).  
Pendant 1 heure.
8. **Rinçage** dans le tris 2 fois durant 5 minutes.
9. Passer dans le TSAB durant 5 minutes.
10. Sécher les lames.
11. **Anticorps tertiaire** : (Dako P217) dilution dans le TSAB :  
1/20 (50µl dans 950µl de TSAB)  
Pendant 1 heure.
12. **Rinçage** dans le tris 2 fois durant 5 minutes.
13. **Chromogène** : 2 ml de solution mère (i.e., 1 pastille/10ml de tris fille) + 15µl eau oxygéné
14. **Incubation** : 1 minute 30 (juin 20/06/07)
15. **Rinçage** : 5 fois durant 3 minutes
16. .Déshydratation et Montage à l'Eukitt.



**ANNEXE 2** : Article : K.T.A. Ngo, C. Denis, M.A. Saafi, L. Feasson, et J. Verney. Endurance but not resistance training increases intra-myocellular lipid content and  $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase activity in active elderly men. *Acta Physiol* 2012, 205, 133-144.

## Endurance but not resistance training increases intra-myocellular lipid content and $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase activity in active elderly men

K. T. A. Ngo,<sup>1,2</sup> C. Denis,<sup>1,2,3</sup> M. A. Saafi,<sup>2,3</sup> L. Feasson<sup>1,2,3</sup> and J. Verney<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Saint Etienne, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie de l'Exercice, Saint Etienne, France

<sup>3</sup> CHU, Saint Etienne, France

Received 25 November 2010,  
revision requested 20 January  
2011,

final revision received 28  
September 2011,

accepted 17 October 2011

Correspondence: J. Verney,  
Université Blaise Pascal,

Laboratoire de Biologie des APS,  
Biologie B, 24 Avenue des Landais,  
BP 80026, 63177 Aubière Cedex,  
France.

E-mail: Julien.verney@  
univ-bpclermont.fr

### Abstract

**Aim:** Endurance and resistance training (ET and RT, respectively) in older subjects have been proven beneficial against metabolic or cardiovascular disorders and against sarcopaenia respectively. Like ET, RT may also increase muscle oxidative capacities. In addition, it could be questioned whether RT, similarly to ET, is able to increase muscle energetic stores such as intra-myocellular lipids (IMCL) and glycogen contents. To evaluate a possible ET- and RT-induced parallel increase in oxidative capacity and energetic stores, active elderly men ( $72 \pm 2$  years) were submitted to a 14-week training programme (three times week<sup>-1</sup>) combining lower body endurance and upper body resistance.

**Methods:** Muscle samples were collected in ET vastus lateralis (VLat) and RT deltoid (Del) muscles before and after training. IMCL and glycogen contents were assessed by histochemistry (Oil Red O and periodic acid-Schiff staining, respectively) and by biochemical assay for glycogen. Citrate synthase (CS, marker of mitochondrial citric acid cycle),  $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase ( $\beta$ -HAD, beta-oxidation) and phosphofructokinase (PFK, glycolytic pathway) activities were determined and so was the capillary interface index (LC/PF).

**Results:** Both training regimens significantly increased CS and LC/PF in ET-VLat and RT-Del. IMCL content and  $\beta$ -HAD activity increased ( $P < 0.05$ ) only in ET-VLat, whereas PFK activity increased ( $P < 0.05$ ) only in RT-Del. Glycogen content was not significantly altered in response to training in both muscles.

**Conclusion:** Unlike RT, which induced an increase in PFK, ET is able to increase IMCL content and  $\beta$ -oxidation capacity in active elderly men, even though both training may improve CS activity and LC/PF.

**Keywords** ageing, exercise training, glycogen, intra-myocellular lipids, muscle, muscle fibre type.

Mitochondrial function (Phielix *et al.* 2011) and strength (Ryall *et al.* 2008) are both necessary to muscle work and exercise performance and decrease with ageing. Healthy elderly subjects have been clearly shown to regain muscle oxidative capacity (Spina 1999) and strength (Roth *et al.* 2000) through specific

physical training programmes. In addition, resistance training (RT) is able to increase muscle oxidative capacity in ageing healthy subjects (Jubrias *et al.* 2001). Consequently, combined training programmes have been designed with the clinical aim of maintaining or increasing both endurance and strength capacities in

older (Delecluse *et al.* 2004) or frail subjects, such as in chronic heart failure (Beckers *et al.* 2008).

This training approach was proposed to still-active older healthy male subjects using a combined lower body endurance (LB-ET) and upper body resistance training (UB-RT) (Verney *et al.* 2006). This method allowed independent functional testing of either endurance or strength on legs and arms before and after the training period. Peak aerobic power and strength were increased in both legs and arms, leading us to conclude that RT may also enhance muscle oxidative capacities, which confirms the results of other studies (Frontera *et al.* 1990, Grimby *et al.* 1992, Jubrias *et al.* 2001). However, these functional findings had to be confronted to specific training-induced changes in histochemical and biochemical oxidative capacities of muscle fibres, which was the first objective of this study. Therefore, biopsies of vastus lateralis (VLat) and deltoid (Del) muscles were taken to assess the respective ET and RT effects on capillary supply, citrate synthase (CS) and  $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase ( $\beta$ -HAD) activities. Contrary to changes in muscle oxidative capacity, phosphofructokinase (PFK) activity, a marker of glycolytic pathway, was found to be unchanged by ET in elderly (Coggan *et al.* 1992). To our knowledge, the effects of RT on muscle PFK activity were not studied in older subjects, but in younger subjects, no significant change was observed in muscle PFK activity after 12 weeks of progressive RT (Tang *et al.* 2006). We, therefore, aimed to assay PFK activity in both muscles to question whether its likely unchanged activity after LB-ET would also be observed after UB-RT.

Muscle endurance and strength performance require appropriated regulations of flux and stores of fatty acids (FA) and glucose (Kramer *et al.* 2007, Moro *et al.* 2008, Hue & Taegtmeier 2009). Concerning energy stores, ageing has been linked to increased intra-myocellular lipids (IMCL) (Cree *et al.* 2004, Nakagawa *et al.* 2007) and decreased muscle glycogen (Meredith *et al.* 1989), together with a decrease in muscle oxidative capacity. These ageing-induced alterations in muscle metabolic status are linked to the development of insulin resistance (Petersen *et al.* 2003, Moro *et al.* 2008), the main metabolic contributors being the lipid intermediates such as diacylglycerol and ceramides. However, in healthy elderly subjects, IMCL (Pruchnic *et al.* 2004) and glycogen contents (Meredith *et al.* 1989) were found to be increased after ET, concomitantly to the increase in oxidative capacity (Meredith *et al.* 1989, Pruchnic *et al.* 2004). In overweight or obese elderly subjects, results of IMCL changes following ET are contradictory. Two studies showed a significant increase in IMCL content (Dubé *et al.* 2008, Haus *et al.* 2011) associated with a decrease in lipid intermediates (Dubé *et al.* 2008), while Solomon *et al.* (2008)

found a significant decrease in IMCL content. Moreover, contradictory results also exist in younger active subjects with unchanged (De Bock *et al.* 2008, Van Proeyen *et al.* 2011) or increased (Tarnopolsky *et al.* 2007) IMCL content after ET. Finally, it is also well described that endurance-trained athletes are characterized by high IMCL (Dubé *et al.* 2008, Moro *et al.* 2008, Bergman *et al.* 2010). Consequently, the second objective of this study was to evaluate the potential effect of combined endurance and resistance training on IMCL and glycogen content in VLat and Del. Globally, because of the relatively high fitness level and normal body composition of the elderly subjects of this study and in line with the schematic view proposed by Moro *et al.* (2008) in the first figure of their paper, we aimed to examine whether the increase in muscle oxidative capacity expected in the ET-VLat and in the RT-Del was linked to higher levels of IMCL and muscle glycogen in both sites.

## Material and methods

### Subjects

Ten healthy elderly men (age:  $72 \pm 2$  years, body mass:  $74.5 \pm 6.7$  kg, height:  $168 \pm 6$  cm) were included in the study. All of them were physically active – they practiced cycling as a regular recreational activity (one to three times per week) – and had a peak oxygen uptake ( $38 \pm 6$  mL min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>) largely above the predicted values for their age (Jones *et al.* 1985, Neder *et al.* 1999). They all underwent standard medical evaluation, standard blood analysis and a maximal exercise stress before their inclusion in the study. All subjects were normoglycaemic. They were fully informed of the risks and discomforts involved in the experiment and signed an informed consent form. This study was approved by the Consultant Committee on Human Protection from Medical research of Rhône-Alpes-Loire Region in accordance with the French Law and with the Declaration of Helsinki.

### Functional evaluation and body composition

Peak oxygen uptake measurement and body composition were precisely described in a previous report (Verney *et al.* 2006). To sum up, LB peak oxygen uptake was measured on a Monark cycle ergometer during an incremental ramp test (75 rpm, 10W increase min<sup>-1</sup>). Respiratory gas exchanges were measured every 2 min. Two days after the LB test, we measured peak oxygen uptake in the upper limbs by asking the subject to crank a cycle ergometer (75 rpm, 5W increase min<sup>-1</sup>). Pedals were replaced by cranks, and the ergometer was heightened on a table. A seat was

positioned so that the crank axis was in level with the subject's shoulders. Peak aerobic power was defined as the maximal external mechanical power achieved by the end of the last gas collection. Body composition was assessed using underwater weighing to measure body volume and body density, taking into account lung residual volume. The Siri equation (1961) was then used to calculate body fat based on body density.

### Training

All training sessions (14 weeks, three sessions per week) were supervised by one of the authors and two physical trainers. Training sessions took place in the morning and in a fed state (homemade breakfast). After a 10-min warm up, each training session combined three bouts of 12-min LB-ET interspersed with three bouts of 12 min of UB-RT, adding up to a  $\approx 80$  min total training time. ET bouts were based on interval training using cycle ergometers and consisted in two sequences of 4 min at sustained intensity (75–85% of  $HR_{max}$ ) alternating with two 1-min sequences at high intensity (80–95% of  $HR_{max}$ ), followed by active recovery (10–12th min). RT bouts included three exercises with three sets per exercise, targeting UB. Arms and shoulders were trained (lateral dumbbell raises, biceps curls, triceps push-downs) with initial loads corresponding to the 20 repetitions maximum (RM), and intensity was increased throughout the training programme to reach loads corresponding to 10 RM. Chest and abdomen muscles were also trained. Heart rate was monitored and recorded (Polar S810; Polar, Kempele, Finland) during the whole session. During the training programme, subjects were asked to keep the same physical activity level and dietary habits as before their inclusion in the study, with the aim of keeping body weight unaffected by the training programme.

### Muscle biopsies

Subjects were asked to refrain from taking fatty meals and caffeine the day before the biopsies. Before the training programme and 3–5 days after the last training session, muscle biopsies were performed in the morning, at rest and in a fed state, after a standardized breakfast (decaffeinated tea, 10 g of jam and 60 g of wholemeal bread). Samples were collected from the VLat (at one-third of the distance from the upper side of the patella to the anterior superior iliac spine) and from the medial part of the Del muscle. After local anaesthesia (Xylocaine® 2%) had been administered, a  $\approx 7$ -mm-long incision was made into the skin and underlying fascia. A Weil-Blakesley's conchotome was introduced into the incision site, and a muscle sample weighing  $\approx 100$  mg was removed. After completion of the training programme,

the post-training biopsy was taken 2 cm away vertically and laterally from the site of the pre-training biopsy for VLat and 2 cm away vertically and 1 cm away laterally for Del. Muscle biopsies were performed simultaneously on both sites by two MDs acting independently either on Del or VLat. A part of each sample containing well-identified fascicles was orientated under a stereomicroscope, included in an embedding medium (Cryomount; Histolab, Göteborg, Sweden), frozen in isopentane cooled to its freezing point and stored in liquid nitrogen. The remainder of the sample was rapidly frozen and stored in liquid nitrogen until biochemical assays.

The effects of the training programme on 10 subjects' functional evaluation and body composition values have been previously published (Verney *et al.* 2006). However, among the ten subjects included in the study, all of the histological data could not be obtained in two subjects. Therefore, the results of this study include only eight subjects.

### Muscle fibre type

Serial 10- $\mu$ m-thick transverse sections of each sample were cut at  $-20$  °C using a microtome (HM 560; Microm, Walldorf, Germany), mounted on glass slides, air-dried at room temperature for 1 h and stored at  $-20$  °C until subsequent analysis. For all histochemical assays, pre- and post-training biopsies of both VLat and Del muscles from each subject were assayed at the same time. Frozen slides were air-dried at room temperature for 1 h and washed in TBS-BSA (1%) for 5 min. Sections were then incubated (dilution: 1/100 TBS-BSA) for 2 h with the well-characterized monoclonal antibodies (mAb) N2.261 or A4.951 (Alexis Biochemicals, Farmingdale, NY, USA). With mAb N2.261, type IIA fibres are stained strongly, type IIX are unstained and type I and type IIX are slightly stained. With mAb A4.951, type I fibres are strongly stained and type IIA, IIX and IIX are unstained. Type I/IIA fibres are moderately stained with both antibodies. Following incubation with primary antibodies and washing (twice 5-min TBS), sections were incubated for 1 h with rabbit anti-mouse (P260; Dako, Glostrup, Denmark) secondary antibody (1/20 TBS-BSA). After another washing step (twice 5-min TBS), sections were incubated for 1 h with swine anti-rabbit tertiary antibody (P217, Dako). Peroxidase labelling was performed using 3,3'-diaminobenzidine. Because of the fact that IIX fibres occupied an area inferior to 5% of total fibre area in both muscles and both training conditions, this fibre type was not included in the data presented.

### Capillary index evaluation

In VLat and Del muscles, microvessels were identified using the monoclonal antibody CD31 (M0823, Dako),

which targets PECAM-1 (Platelet–endothelial cell adhesion molecule), strongly expressed in endothelial cells. To quantify muscle microvascularization, LC/PF index was measured as the ratio between the length of microvascular wall in contact with the fibre (LC,  $\mu\text{m}$ ) and the perimeter of the fibre (PF,  $\mu\text{m}$ ) and was expressed as a percentage of the muscle fibre perimeter in contact with the microvascular wall. An average of eight fields was examined in each section, yielding analysis of about 80 fibres per individual sample. The LC/PF index results for VLat were previously published in nine subjects of this experiment in an attempt to show the relationship between microvascularization and capillary filtration (Charles *et al.* 2006). In this study, we will present the results of paired measurements performed before and after training in the Del and VLat of eight subjects, considering LC/PF as an indicator of capillary-to-fibre interface, as described previously (Charifi *et al.* 2004).

#### IMCL content

Triglyceride content was determined using Oil Red O (ORO) staining as described by Koopman *et al.* (2001). Briefly, 10- $\mu\text{m}$ -thick cryosections were mounted on glass slides and air-dried for 1 h at room temperature. The staining protocol started with a 1-h fixation in a 3.7% formaldehyde solution. Excess formaldehyde was removed by three successive rinses in deionised water for 30 s. Subsequently, the sections were incubated in a working solution of ORO for 30-min. Sections were then washed three times for 30 s in deionised water. Sections were finally covered with a coverslip using aqueous mounting medium (Aquatex; Merck, Darmstadt, Germany).

#### Glycogen content

Skeletal muscle glycogen was stained using periodic acid-Schiff (PAS). All sections were dried at room temperature for 1 h, fixed in Carnoy's fixative and washed in deionised water. The sections were then oxidized in 1% periodic acid for 5 min, washed in deionised water and incubated with Schiff for 15 min. After a last 10-min washing step in deionised water, slides were dehydrated in ethanol, cleared in xylene and permanently mounted with Eukitt (O. Kindler GmbH, Freiburg, Germany).

#### Digital image capture and analysis

The sections were visualized with light microscopy (Nikon Eclipse E400, Badhoevedorp, the Netherlands) using a  $\times 20$  objective, and images were captured using a digital camera (Coolpix 990; Nikon). Measurements of

lengths (capillaries), fibre areas and sarcoplasmic optical densities (OD) were performed on respective cross-sections with SIGMA SCAN PRO 5 software (SPSS Science, Chicago, IL, USA).

To semi-quantify the substrate contents in muscle fibres, a picture of an area of the slide without any tissue was taken to set the blank, and the same area was then photographed with a dark filter to set the 100% load. With the same light intensity and camera exposure, photographs of the muscle sections were then acquired. All pictures (muscle sections, blank and filter) were converted to greyscale, and optical density analysis was performed. For each biopsy, IMCL and glycogen contents were assessed at the level of the sarcoplasm surrounded manually in 50 type I and 50 type IIA fibres and were expressed in arbitrary units via a simple calculation  $[(\text{blank OD} - \text{fibre OD})/(\text{blank OD} - \text{dark filter OD})] \times 100$ . Because we had taken serial transverse sections, the same fibres were analysed for both IMCL and glycogen contents (Fig. 1). Mixed muscle IMCL and glycogen contents were calculated based on the percentage area occupied by each fibre type and the mean fibre type-specific IMCL and glycogen contents: (mean content of type I fibres  $\times$  area type I (%)) + (mean content of type IIA fibres  $\times$  area type IIA (%)).

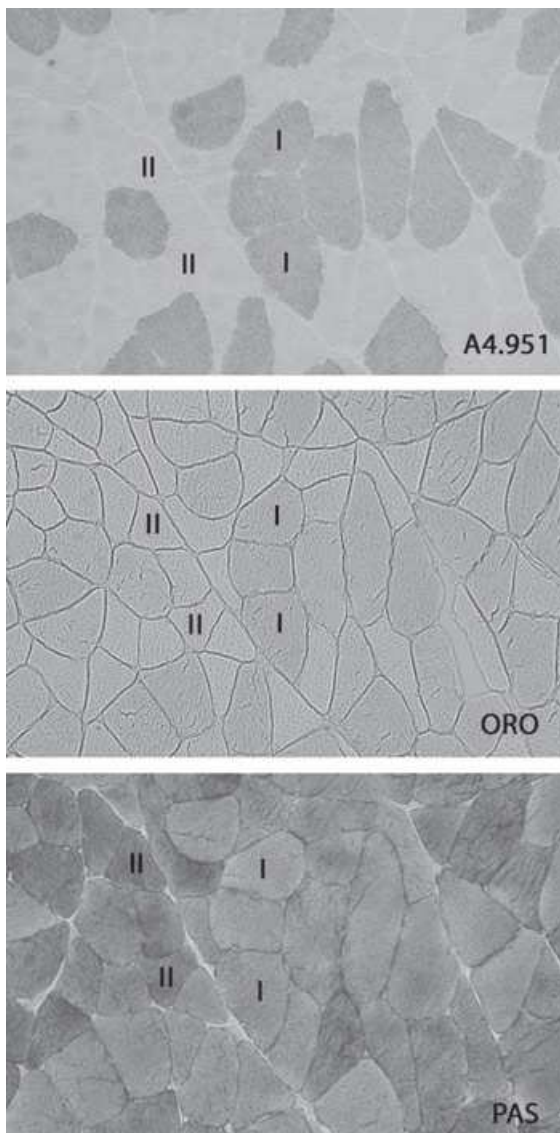
#### Enzyme activities and biochemical assays

Muscle samples were freeze-dried, dissected from connective tissue and blood and then powdered. The muscle powder was weighed at room temperature in a box with a hygrometric degree lower than 40%. Muscle tissue was homogenized at 4 °C in 0.1 M phosphate buffer (pH = 8.2) containing 2-mercaptoethanol (5 mM), NaF (30 mM),  $\text{MgCl}_2$  (5 mM) and ATP (0.5 mM). The activities of CS as an index of tricarboxylic acid cycle capacity,  $\beta$ -HAD as an index of  $\beta$ -oxidation capacity and PFK as a cytosolic glycolytic marker were determined fluorometrically (CS,  $\beta$ -HAD) or spectrophotometrically (PFK) as previously described (Essen-Gustavsson & Henriksson 1984). All enzyme activities were measured at 25 °C and expressed in  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$  dry weight.

The glycogen content of the muscle powder was determined using a fluorometric method based on glucose unit residues after hydrolysis in 1 M HCl at 100 °C for 2 h (Lowry & Passoneau 1972).

#### Statistical analysis

Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. Mean values of each variable were compared using two-way repeated-measures ANOVA (with muscle and training status as factors). The occurrence of two significant main



**Figure 1** Serial sections allow determination of muscle fibre type using A4.951 antibody (top) and the subsequent determination of intra-myocellular lipid content using Oil Red O staining (ORO, middle) and glycogen content using periodic acid-Schiff (PAS, bottom) in the same muscle fibres. I, type I fibres; II, type II fibres.

effects, or one significant main effect linked to a significant interaction, led to performing paired *t*-tests to allow comparison of mean values with isolated training effect (ET or RT on corresponding muscle) or muscle effect (VLat or Del for comparisons at baseline). Other comparisons of means were performed with paired *t*-tests. Linear regression was used to assess the degree of association between variables. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Physical capacities

As previously described in 10 subjects (Verney *et al.* 2006), body weight in this sample was not significantly altered as a result of physical training, but the percentage of body fat was significantly decreased while Del cross-sectional area and shoulder abduction maximal isometric torque were significantly increased (data not shown). Peak aerobic power was significantly increased during leg cycling ( $P < 0.001$ ) and arm cranking ( $P < 0.01$ ). Peak oxygen uptake was increased by  $10 \pm 7\%$  ( $P < 0.01$ ) in LB and by  $16 \pm 9\%$  in UB ( $P < 0.001$ ) (Table 1).

### Contractile phenotype and cross-sectional area of muscle fibres

The proportion of type I fibres was significantly higher ( $P < 0.001$ ) in Del compared with VLat and so was the percentage area occupied by type I fibres ( $P < 0.01$ ), which takes both fibre type proportion and mean fibre area into account. This percentage area occupied by type I fibres was not significantly altered either by LB-ET or by UB-RT. A training effect was observed only in the cross-sectional area of type I fibres (Table 2).

### Enzymatic activities

At baseline, CS and  $\beta$ -HAD activities were significantly higher in VLat than in Del. After 14 weeks of UB-RT and LB-ET, CS activity increased significantly in ET-VLat ( $P < 0.01$ ) and in RT-Del ( $P < 0.05$ ). However, an increase in  $\beta$ -HAD in response to training was

**Table 1** Functional and morphological characteristics of the subjects ( $n = 8$ ) before and after 14 weeks of combined upper body (UB) resistance and lower body (LB) endurance training

	Before training	After training
Weight (kg)	74.5 $\pm$ 7	73.5 $\pm$ 5 <sup>ns</sup>
BMI	26 $\pm$ 4	26 $\pm$ 3 <sup>ns</sup>
Body fat (%)	17.4 $\pm$ 3.5	16.2 $\pm$ 3.9*
LB peak aerobic power (W)	209 $\pm$ 34	241 $\pm$ 28***
LB VO <sub>2</sub> peak (L min <sup>-1</sup> )	2.82 $\pm$ 0.48	3.08 $\pm$ 0.47**
UB peak aerobic power (W)	98 $\pm$ 13	114 $\pm$ 18**
UB VO <sub>2</sub> peak (L min <sup>-1</sup> )	1.97 $\pm$ 0.31	2.27 $\pm$ 0.36**

Values are mean  $\pm$  SD. BMI, body mass index; VO<sub>2</sub> peak, peak oxygen uptake. Differences between pre- and post-training: ns: no significant differences, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

	Before training	After training	Muscle effect	Training effect	Interaction
Type I fibre proportion (%)					
ET-VLat	55 ± 16	59 ± 13	$P < 0.001$	ns	ns
RT-Del	70 ± 9	75 ± 10			
Type IIA fibre proportion (%)					
ET-VLat	36 ± 14	38 ± 11	$P < 0.01$	ns	ns
RT-Del	26 ± 8	23 ± 11			
Type I fibre CSA ( $\mu\text{m}^2$ )					
ET-VLat	6362 ± 1068	7068 ± 1228	ns	$P < 0.001$	ns
RT-Del	5115 ± 1044	5764 ± 1714			
Type IIA fibre CSA ( $\mu\text{m}^2$ )					
ET-VLat	5304 ± 1147	6010 ± 1602	$P < 0.05$	ns	ns
RT-Del	6825 ± 1584	7202 ± 2436			
% Type I fibre area					
ET-VLat	60 ± 15	63 ± 11	$P < 0.01$	ns	ns
RT-Del	65 ± 11	72 ± 12			
% Type IIA fibre area					
ET-VLat	33 ± 13	34 ± 10	ns	ns	ns
RT-Del	32 ± 9	27 ± 12			

Values are mean ± SD. CSA, cross-sectional area; ns, no significant differences; VLat, vastus lateralis; Del, deltoid; RT, resistance training; ET, Endurance training.

observed in ET-VLat, but not in RT-Del. PFK activity was significantly increased in RT-Del, but not in ET-VLat (Table 3).

a significant increase in the LC/PF index was observed in ET-VLat ( $P < 0.01$ ) and in RT-Del ( $P < 0.05$ ) (Table 3).

#### Capillary supply

At baseline, the LC/PF index was significantly higher in VLat than in Del. After 14 weeks of UB-RT and LB-ET,

#### IMCL content

At baseline, IMCL content was significantly higher in type I fibres compared with type IIA fibres in both VLat

	Before training	After training	Muscle effect	Training effect	Interaction
CS activity ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )					
ET-VLat	47 ± 10	67 ± 20**	$P < 0.01$	$P < 0.001$	ns
RT-Del	29 ± 11 <sup>‡</sup>	39 ± 17*			
$\beta$ -HAD activity ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )					
ET-VLat	9.8 ± 2.5	12.1 ± 3.3**	$P < 0.01$	$P < 0.05$	ns
RT-Del	8.1 ± 2.2 <sup>†</sup>	9.0 ± 4.2 <sup>ns</sup>			
PFK activity ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )					
ET-VLat	100 ± 7	110 ± 17 <sup>ns</sup>	$P < 0.001$	$P < 0.05$	ns
RT-Del	62 ± 15 <sup>‡</sup>	76 ± 15*			
LC/PF index (%)					
ET-VLat	23.9 ± 6.4	29.7 ± 6.5**	$P < 0.01$	$P < 0.01$	ns
RT-Del	17.8 ± 3.7 <sup>†</sup>	20.4 ± 2.8*			

Values are mean ± SD. CS, citrate synthase;  $\beta$ -HAD, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; PFK, phosphofructokinase; LC/PF, ratio (expressed in %) between the length of microvascular wall in contact with the fibre (LC,  $\mu\text{m}$ ) and the perimeter of the fibre (PF,  $\mu\text{m}$ ); VLat, vastus lateralis; Del, deltoid; RT, resistance training; ET, Endurance training.

Significance of differences between pre- and post-training: ns: no significant differences, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Significance of differences between VLat and Del at baseline: <sup>†</sup> $P < 0.05$ , <sup>‡</sup> $P < 0.01$ .

**Table 2** Effects of combined upper body resistance and lower body endurance training on muscle contractile phenotype and muscle fibre area

**Table 3** Effects of 14 weeks of combined training on enzymatic activities and capillary supply

( $P = 0.01$ ) and Del ( $P < 0.05$ ). Among type IIA fibres, IMCL content at baseline was also significantly higher ( $P < 0.05$ ) in VLat compared with Del. In response to training, we observed a significant increase in mixed muscle IMCL content in ET-VLat ( $P < 0.05$ ). This was the result of an increase in IMCL content in both type I ( $P < 0.01$ ) and type IIA ( $P < 0.05$ ) fibres. Such an increase was not observed in RT-Del (Table 4).

### Glycogen content

A muscle effect was observed for mixed muscle glycogen content, which was significantly higher in VLat than in Del with both PAS staining ( $P < 0.05$ ) and biochemical assay ( $P < 0.01$ ). Both before and after training, the mixed intensity of PAS staining in VLat and Del was significantly associated with the measures of glycogen content taken by biochemical assay ( $r = 0.762$ ,  $P < 0.001$  before training and  $r = 0.760$ ,  $P < 0.001$  after training). Taking fibre type into account, there was significantly more glycogen ( $P < 0.01$ ) in type IIA compared with type I fibres in both muscles at any time point. After 14 weeks of training, we did not observe any significant change in the glycogen content of ET-VLat or RT-Del. This lack of significant training

effect was found using both PAS staining and biochemical assay (Table 4).

### Relative changes

In complement to comparisons of absolute data described earlier and to localize the strongest training-induced changes in the main parameters studied, the mean percentages of individual changes were also compared. As shown in Figure 2, there were no significant differences for CS,  $\beta$ -HAD, LC/PF, PFK or muscle glycogen between ET-VLat and RT-Del. In contrast, IMCL content showed a clear-cut difference between an approx. 36% increase in ET-VLat and almost unchanged RT-Del values.

### Discussion

In response to the 14-week training programme, the increase in functional peak aerobic power in ET-LB, as previously published (Verney *et al.* 2006), was concomitant with an increase in CS and  $\beta$ -HAD activities, in the LC/PF index and in IMCL content in ET-VLat. These findings are in agreement with previous reports (Pruchnic *et al.* 2004, Dubé *et al.* 2008). How-

**Table 4** Effects of combined upper body resistance and lower body endurance training on intra-myocellular lipid (IMCL) and glycogen contents

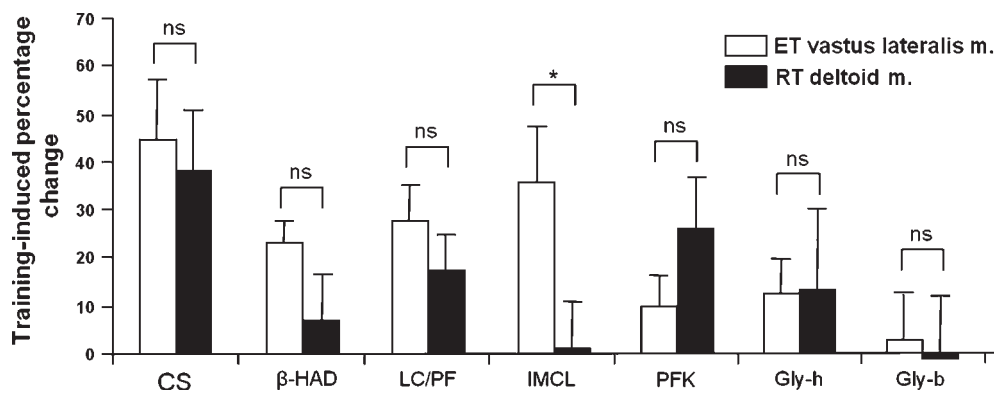
	Before training	After training	Muscle effect	Training effect	Interaction
IMCL mixed (AU)					
ET-VLat	21.2 ± 5.2	27.6 ± 4.2*	$P < 0.001$	ns	$P < 0.02$
RT-Del	18.4 ± 5.4	17.9 ± 5.5 <sup>ns</sup>			
IMCL type I (AU)					
ET-VLat	22.6 ± 5.5	29.2 ± 4.6**	$P < 0.001$	ns	$P < 0.001$
RT-Del	20.7 ± 6.3	19.1 ± 5.8 <sup>ns</sup>			
IMCL type IIA (AU)					
ET-VLat	19.1 ± 4.2	24.9 ± 5.0*	$P < 0.001$	ns	$P < 0.01$
RT-Del	15.7 ± 3.4 <sup>†</sup>	15.1 ± 6.3 <sup>ns</sup>			
Glycogen mixed (AU)					
ET-VLat	43.8 ± 11.2	47.9 ± 9.8	$P < 0.05$	ns	ns
RT-Del	34.3 ± 6.8	37.5 ± 14.1			
Glycogen Type I (AU)					
ET-VLat	39.7 ± 11.9	43.7 ± 9.7	ns	ns	ns
RT-Del	31.1 ± 5.9	32.0 ± 11.8			
Glycogen Type IIA (AU)					
ET-VLat	49.8 ± 9.3	56.1 ± 10.6	ns	ns	ns
RT-Del	40.3 ± 7.9	52.2 ± 22.6			
Glycogen content (mmol kg <sup>-1</sup> dw)					
ET-VLat	559 ± 151	618 ± 150	$P < 0.01$	ns	ns
RT-Del	468 ± 106	438 ± 88			

Values are mean ± SD. AU, arbitrary units; VLat, vastus lateralis; Del, deltoid; RT, resistance training; ET, Endurance training.

Significance of differences between pre- and post-training: ns: no significant differences, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

Significance of differences between VLat and Del at baseline: <sup>†</sup> $P < 0.05$ .





**Figure 2** Mean training-induced percentage change of various indicators of oxidative capacity, glycolysis, intra-myocellular lipid stores (IMCL) and glycogen stores in response to endurance training (ET, white bars) and resistance training (RT, black bars). A significant difference in these relative changes was observed only in IMCL stores. \* $P < 0.05$  in comparison to RT. Values are means  $\pm$  SD. CS, citrate synthase;  $\beta$ -HAD,  $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase; LC/PF, ratio between the length of microvascular wall in contact with the fibre (LC) and the perimeter of the fibre (PF); PFK, phosphofructokinase; Gly-h, glycogen content histochemically assessed; Gly-b, glycogen content biochemically assessed.

ever, in RT-Del, despite a significant increase in peak oxygen uptake (arm cranking test), CS activity and the LC/PF index, no statistical increase in  $\beta$ -HAD and IMCL was observed. Therefore, contrary to our hypothesis, a training-induced increase in oxidative capacity after UB-RT is not necessarily linked to an increase in Del IMCL content.

#### Oxidative capacity

At baseline, despite a lower percentage of area occupied by slow oxidative fibres in VLat and Del, the citric acid cycle potential assessed by CS activity or beta-oxidation potential assessed by  $\beta$ -HAD activity was significantly higher in VLat, and so was the capillary-to-fibre interface as assessed by the LC/PF index. Concerning CS data, these differences between Del and VLat lie within the range of values reported in a recent review in younger subjects (Helge 2010). This difference is probably partly because of the normal pattern of daily physical activity level, which stimulates the lower limbs to a larger extent in an endurance regimen, and the fact that most of the subjects had cycling as a common recreational activity.

Concomitant increases in muscle oxidative capacity and capillary supply in elderly subjects after ET have been shown in earlier studies (Coggan *et al.* 1992, Proctor *et al.* 1995) and were revisited in a recent transversal study (Iversen *et al.* 2011). The proportional link between CS and capillary supply was also described before and after training (Charifi *et al.* 2004). An endurance-training-induced increase in oxidative capacities in the elderly has been linked to an increase in lipid oxidative capacities measured on isolated mitochondria (Rimbert *et al.* 2004); a concomitant increase in CS and

$\beta$ -HAD has been also described (Coggan *et al.* 1992). However, in longitudinal ET studies on older subjects, an increase in CS was not necessarily associated with a significant increase in  $\beta$ -HAD (Berthon *et al.* 1995, Gosker *et al.* 2006).

The resistance-training-induced increase in CS activity in older subjects shown by Grimby *et al.* (1992) was not accompanied by any change in  $\beta$ -HAD activity, which is in line with the present study. Therefore, based on capillary supply and CS activity, it could be reiterated that RT in elderly subjects is able to stimulate and improve some aspects of muscle mitochondrial capacity (i.e.  $O_2$  supply and citric acid cycle) when performed in a circuit-training at an intensity of approx. 70–75% of 1 RM. However, this kind of training would not be an efficient way to improve  $\beta$ -HAD activity, a marker of the  $\beta$ -oxidation pathway of muscle mitochondrial capacity.

#### IMCL content

Endurance training increased overall muscle oxidative capacity and IMCL content within VLat. Consistent with the hypothesis that IMCL turnover is facilitated by an increase in lipid  $\beta$ -oxidation (Van Loon & Goodpaster 2006, Moro *et al.* 2008), this finding reinforces the theory according to which ET in still-active older subjects may further increase muscle lipid oxidation during exercise sessions (Sial *et al.* 1998). In addition to oxidative potential, recent studies in younger adults analysed muscle IMCL synthesis and lipolysis (Alsted *et al.* 2009, Bergman *et al.* 2010). Athletic status is linked both to higher IMCL content and to an increased rate of IMCL synthesis, compared with less active controls (Bergman *et al.* 2010). Concomitant to CS,  $\beta$ -

HAD and CPT1 increases, coordination was suggested between FA entry in muscle fibres and FA oxidation in mitochondria, based on a parallel increase observed in FA transport by plasmalemmal (FABPm) and by mitochondrial (FAT/CD36) membranes following high-intensity ET in women (Talanian *et al.* 2010). Nevertheless, a parallel increase in oxidative capacity and IMCL content is not reported in all studies. In young active subjects, two recent studies reported unchanged IMCL contents after ET undergone either in fasting or carbohydrate-fed states (De Bock *et al.* 2008, Van Proeyen *et al.* 2011). Concomitantly, CS and  $\beta$ -HAD activities were increased only after training in a fasted state (Van Proeyen *et al.* 2011), while succinate dehydrogenase activity was increased after training in both the fasted and the fed state (De Bock *et al.* 2008). In a third report in young untrained subjects, significant increases in CS and  $\beta$ -HAD were shown, but IMCL measured via a biochemical method was found to decrease significantly after ET (Alsted *et al.* 2009).

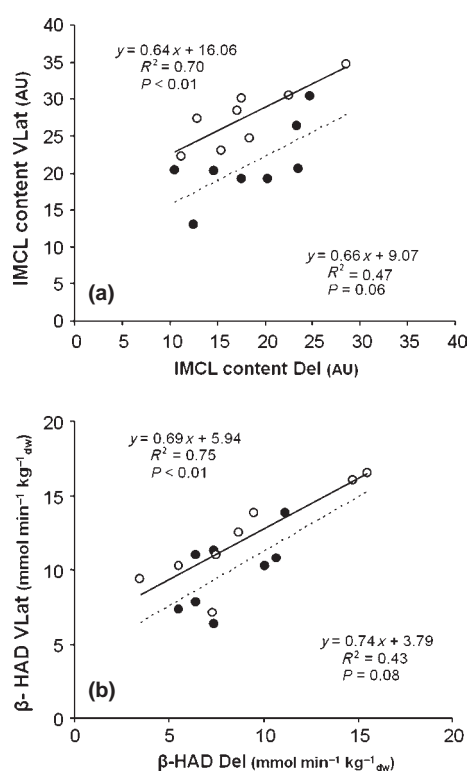
In the present study, RT did not induce any change in the IMCL content of Del muscle, which does not confirm our hypothesis of coordinated increase in oxidative capacities and IMCL content after RT. Moreover, the significant difference in the relative changes of IMCL content (36% in ET-VLat vs. 1% in RT-Del) points out the fact that a RT programme performed in the form of circuit training might be able to increase muscle oxidative capacity to a certain extent, but is not efficient, contrary to ET, to increase IMCL content. This reinforces the importance of the promotion of combined training in elderly to associate the specific effects of each training regimen.

### Muscle glycogen stores

After 14 weeks of LB-ET, no significant alteration in glycogen content, assessed by both PAS staining and biochemical assay, was observed in VLat. These results are in line with a previous report where no significant differences in PAS staining intensity were observed in either type I or type II fibres between sedentary and endurance-trained elderly men (Boon *et al.* 2007). They, however, differ from other studies where glycogen content was significantly increased in elderly subjects in response to ET (Meredith *et al.* 1989, Dubé *et al.* 2008). In these last two studies, the subjects had a low maximal oxygen uptake (26.6 and 18.5 mL min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>, respectively) associated with a high percentage of body fat (38 and 42%, respectively), which could have contributed to low muscle glycogen stores before training and increased stores after training (Christ-Roberts & Mandarino 2004). In the study by Boon *et al.* (2007), control subjects had a higher maximal oxygen uptake (37 mL min<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup>) and lower percent-

age of body fat (29%), which is more similar to the population of the present study. In young healthy men, in the context of training-induced lowering of glycogen depletion during endurance exercise, the significant increase in resting muscle glycogen content after ET was not consistently reported in earlier studies (Saltin *et al.* 1976, Hurley *et al.* 1986, Denis *et al.* 1991). More recently, the effects of the diet associated with training were also investigated, and some studies compared the consequences of a training performed in a fasted state or in a carbohydrate-fed state (De Bock *et al.* 2008, Van Proeyen *et al.* 2011). Contradictory results were observed; De Bock *et al.* (2008) reported a significant increase in muscle glycogen content only after training in a carbohydrate-fed state, whereas Van Proeyen *et al.* (2011) observed a significant increase in glycogen content only after training in a fasted state.

Fourteen weeks of UB-RT did not induce any change in Del muscle glycogen content. However, there was a significant increase in PFK activity in this same muscle.



**Figure 3** (a) Relationship between intra-myocellular lipid (IMCL) content in vastus lateralis (VLat) and deltoid (Del) before (●) and after (○) training. Dashed line indicates a tendency ( $P = 0.06$  before training), and solid line indicates a significant relationship ( $P < 0.01$  after training). AU, arbitrary units. (b) Relationship between  $\beta$ -hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase ( $\beta$ -HAD) activity in VLat and Del before (●) and after (○) training. Dashed line indicates a tendency ( $P = 0.08$  before training), and solid line indicates a significant relationship ( $P < 0.01$  after training). DW, dry weight.

Such a finding, to our knowledge, has never been reported in healthy older subjects. However, in young healthy men, PFK activity in VLat was found unchanged after a 12-week RT programme (Tang *et al.* 2006).

#### Limitations of the study

Endurance and resistance training procedures involved two different parts of the body on the same subject, making it difficult to conclude that changes in a given muscle (VLat or Del) were only because of the corresponding training regimen (ET or RT, respectively). However, numerous studies in humans have used a single-leg procedure to study the effect of any training regimen, using the untrained leg as control (Wojtaszewski *et al.* 2005), pointing out the importance of local mechanisms in training-induced physiological changes in muscle. However, because of clinical, ethical and inclusion constraints, this study's concomitant training regimen was chosen over a design with two groups using the same muscle either in ET or RT. Although unusual, this experimental procedure combining LB-ET and UB-RT in the same elderly individual enabled us to observe both histochemical baseline states and training-induced evolutions in two functionally different muscles in the same individual. It is, for instance, interesting to note that the intersubject variability in some metabolic characteristics for a muscle is not statistically independent from the corresponding variability for the other muscle. This was illustrated by the significant correlation between an individual's VLat and Del IMCL (Fig. 3a) and  $\beta$ -HAD (Fig. 3b) measurements before and after training. Such a finding was also described previously in the same group of subjects with a significant correlation of satellite cell pool at baseline between VLat and Del (Verney *et al.* 2008). Consequently, the present study illustrates that the plasticity of muscle  $\beta$ -HAD and IMCL phenotypes may be specifically modified by ET, without blunting the innate or chronically acquired characteristics shared by different muscles of each subject.

More time was devoted to VLat ET than to Del RT, because of the circuit design of RT, which was not continuously demanding on Del muscle, such as during biceps curls or abdominal exercises. This difference in training stimulus could induce a bias in favour of VLat regarding oxidative capacity. However, mean relative changes in CS and LC/PF were not significantly different between the two training regimens, whereas IMCL changes were clearly different. This observation leads us to suggest that a training-induced increase in oxidative capacity is not necessarily linked to an increase in IMCL.

A last limitation may be the lack of quantification of dietary intake throughout the training programme.

Dietary management was limited to general advices given individually to each subject and aimed only at maintaining body weight stable, with the exception of specific diet advices before muscle biopsies (see Material and methods).

#### Conclusion

The results of the present study indicate that 14 weeks of combined UB-RT and LB-ET in active elderly subjects induced an increase in muscle oxidative capacity both in ET and RT muscles. In ET-VLat, IMCL content was increased in type I and type IIA fibres in parallel with the activity of  $\beta$ -HAD, but neither IMCL nor  $\beta$ -HAD were significantly altered in RT-Del, despite a significant increase in capillary supply and CS activity.

Previously published data on this experiment reporting changes in physical fitness, body composition (increased lean and muscle masses) and muscle regenerative potential (increased satellite cells populations within both VLat and Del muscles) should be taken into account (Charles *et al.* 2006, Verney *et al.* 2006, 2008). Including the present results, this experiment highlighted many functional benefits to promoting combined ET and RT in older subjects.

#### Conflict of interest

None.

Marie-Pierre Blanc, Regis Bonnefoy, Josiane Castells and Dominique Gouttefangeas are gratefully acknowledged for their technical contribution. The authors also thank Pr Thierry Busso for his help with statistical analysis and Noélie Buisson-Descombes for proofreading.

#### References

- Alsted, T.J., Nybo, L., Schweiger, M., Fledelius, C., Jacobsen, P., Zimmermann, R., Zechner, R. & Kiens, B. 2009. Adipose triglyceride lipase in human skeletal muscle is upregulated by exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**, E445–E453.
- Beckers, P.J., Denollet, J., Possemiers, N.M., Wuyts, F.L., Vrints, C.J. & Conraads, V.M. 2008. Combined endurance-resistance training vs. endurance training in patients with chronic heart failure: a prospective randomized study. *Eur Heart J* **29**, 1858–1866.
- Bergman, B.C., Perreault, L., Hunerdosse, D.M., Koehler, M.C., Samek, A.M. & Eckel, R.H. 2010. Increased intramuscular lipid synthesis and low saturation relate to insulin sensitivity in endurance-trained athletes. *J Appl Physiol* **108**, 1134–1141.
- Berthon, P., Freyssen, D., Chatard, J.C., Castells, J., Mujika, I., Geysant, A., Guezennec, C.Y. & Denis, C. 1995. Mitochondrial ATP production rate in 55 to 73-year-old men:

- effect of endurance training. *Acta Physiol Scand* **154**, 269–274.
- Boon, H., Jonkers, R.A., Koopman, R., Blaak, E.E., Saris, W.H., Wagenmakers, A.J. & Van Loon, L.J. 2007. Substrate source use in older, trained males after decades of endurance training. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 2160–2170.
- Charifi, N., Kadi, F., Feasson, L., Costes, F., Geysant, A. & Denis, C. 2004. Enhancement of microvessel tortuosity in the vastus lateralis muscle of old men in response to endurance training. *J Physiol* **554**, 559–569.
- Charles, M., Charifi, N., Verney, J., Pichot, V., Feasson, L., Costes, F. & Denis, C. 2006. Effect of endurance training on muscle microvascular filtration capacity and vascular bed morphometry in the elderly. *Acta Physiol (Oxf)* **187**, 399–406.
- Christ-Roberts, C.Y. & Mandarino, L.J. 2004. Glycogen synthase: key effect of exercise on insulin action. *Exerc Sport Sci Rev* **32**, 90–94.
- Coggan, A.R., Spina, R.J., King, D.S., Rogers, M.A., Brown, M., Nemeth, P.M. & Holloszy, J.O. 1992. Skeletal muscle adaptations to endurance training in 60- to 70-yr-old men and women. *J Appl Physiol* **72**, 1780–1786.
- Cree, M.G., Newcomer, B.R., Katsanos, C.S., Sheffield-Moore, M., Chinkes, D., Aarsland, A., Urban, R. & Wolfe, R.R. 2004. Intramuscular and liver triglycerides are increased in the elderly. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3864–3871.
- De Bock, K., Derave, W., Eijnde, B.O., Hesselink, M.K., Koninckx, E., Rose, A.J., Schrauwen, P., Bonen, A., Richter, E.A. & Hespel, P. 2008. Effect of training in the fasted state on metabolic responses during exercise with carbohydrate intake. *J Appl Physiol* **104**, 1045–1055.
- Delecluse, C., Colman, V., Roelants, M., Verschueren, S., Derave, W., Ceux, T., Eijnde, B.O., Seghers, J., Pardaens, K., Brumagne, S., Goris, M., Buekers, M., Spaepen, A., Swinnen, S. & Stijnen, V. 2004. Exercise programs for older men: mode and intensity to induce the highest possible health-related benefits. *Prev Med* **39**, 823–833.
- Denis, C., Dormois, D., Linossier, M.T., Geysant, A. & Lacour, J.R. 1991. Total muscle NADH during 30-min submaximal exercise: effects of endurance training. *Acta Physiol Scand* **142**, 301–302.
- Dubé, J.J., Amati, F., Stefanovic-Racic, M., Toledo, F.G., Sauers, S.E. & Goodpaster, B.H. 2008. Exercise-induced alterations in intramyocellular lipids and insulin resistance: the athlete's paradox revisited. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E882–E888.
- Essen-Gustavsson, B. & Henriksson, J. 1984. Enzyme levels in pools of microdissected human muscle fibres of identified type. Adaptive response to exercise. *Acta Physiol Scand* **120**, 505–515.
- Frontera, W.R., Meredith, C.N., O'Reilly, K.P. & Evans, W.J. 1990. Strength training and determinants of VO<sub>2</sub>max in older men. *J Appl Physiol* **68**, 329–333.
- Gosker, H.R., Schrauwen, P., Broekhuizen, R., Hesselink, M.K., Moonen-Kornips, E., Ward, K.A., Franssen, F.M., Wouters, E.F. & Schols, A.M. 2006. Exercise training restores uncoupling protein-3 content in limb muscles of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E976–E981.
- Grimby, G., Aniansson, A., Hedberg, M., Henning, G.B., Grangard, U. & Kvist, H. 1992. Training can improve muscle strength and endurance in 78- to 84-yr-old men. *J Appl Physiol* **73**, 2517–2523.
- Haus, J.M., Solomon, T.P., Lu, L., Jesberger, J.A., Barkoukis, H., Flask, C.A. & Kirwan, J.P. 2011. Intramyocellular lipid content and insulin sensitivity are increased following a short-term low-glycemic index diet and exercise intervention. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E511–E516.
- Helge, J.W. 2010. Arm and leg substrate utilization and muscle adaptation after prolonged low-intensity training. *Acta Physiol (Oxf)* **199**, 519–528.
- Hue, L. & Taegtmeier, H. 2009. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**, E578–E591.
- Hurley, B.F., Nemeth, P.M., Martin, W.H. 3rd, Hagberg, J.M., Dalsky, G.P. & Holloszy, J.O. 1986. Muscle triglyceride utilization during exercise: effect of training. *J Appl Physiol* **60**, 562–567.
- Iversen, N., Krstrup, P., Rasmussen, H.N., Rasmussen, U.F., Saltin, B. & Pilegaard, H. 2011. Mitochondrial biogenesis and angiogenesis in skeletal muscle of the elderly. *Exp Gerontol* **46**, 670–678.
- Jones, N.L., Makrides, L., Hitchcock, C., Chypchar, T. & McCartney, N. 1985. Normal standards for an incremental progressive cycle ergometer test. *Am Rev Respir Dis* **131**, 700–708.
- Jubrias, S.A., Esselman, P.C., Price, L.B., Cress, M.E. & Conley, K.E. 2001. Large energetic adaptations of elderly muscle to resistance and endurance training. *J Appl Physiol* **90**, 1663–1670. Order.
- Koopman, R., Schaart, G. & Hesselink, M.K. 2001. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol* **116**, 63–68.
- Kramer, D.K., Al-Khalili, L., Guigas, B., Leng, Y., Garcia-Roves, P.M. & Krook, A. 2007. Role of AMP kinase and PPARdelta in the regulation of lipid and glucose metabolism in human skeletal muscle. *J Biol Chem* **282**, 19313–19320.
- Lowry, O.H. & Passoneau, J.V. 1972. *A Flexible System of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, NY, USA.
- Meredith, C.N., Frontera, W.R., Fisher, E.C., Hughes, V.A., Herland, J.C., Edwards, J. & Evans, W.J. 1989. Peripheral effects of endurance training in young and old subjects. *J Appl Physiol* **66**, 2844–2849.
- Moro, C., Bajpeyi, S. & Smith, S.R. 2008. Determinants of intramyocellular triglyceride turnover: implications for insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **294**, E203–E213.
- Nakagawa, Y., Hattori, M., Harada, K., Shirase, R., Bando, M. & Okano, G. 2007. Age-related changes in intramyocellular lipid in humans by in vivo H-MR spectroscopy. *Gerontology* **53**, 218–223.
- Neder, J.A., Nery, L.E., Castelo, A., Andreoni, S., Lerario, M.C., Sachs, A., Silva, A.C. & Whipp, B.J. 1999. Prediction of metabolic and cardiopulmonary responses to maximum cycle ergometry: a randomised study. *Eur Respir J* **14**, 1304–1313.

- Petersen, K.F., Befroy, D., Dufour, S., Dziura, J., Ariyan, C., Rothman, D.L., DiPietro, L., Cline, G.W. & Shulman, G.I. 2003. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* **300**, 1140–1142.
- Phielix, E., Szendroedi, J. & Roden, M. 2011. Mitochondrial function and insulin resistance during aging: a mini-review. *Gerontology* **57**, 387–396.
- Proctor, D.N., Sinning, W.E., Walro, J.M., Sieck, G.C. & Lemon, P.W. 1995. Oxidative capacity of human muscle fiber types: effects of age and training status. *J Appl Physiol* **78**, 2033–2038.
- Pruchnic, R., Katsiaras, A., He, J., Kelley, D.E., Winters, C. & Goodpaster, B.H. 2004. Exercise training increases intramyocellular lipid and oxidative capacity in older adults. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287**, E857–E862.
- Rimbert, V., Boirie, Y., Bedu, M., Hocquette, J.F., Ritz, P. & Morio, B. 2004. Muscle fat oxidative capacity is not impaired by age but by physical inactivity: association with insulin sensitivity. *FASEB J* **18**, 737–739.
- Roth, S.M., Ferrell, R.F. & Hurley, B.F. 2000. Strength training for the prevention and treatment of sarcopenia. *J Nutr Health Aging* **4**, 143–155.
- Ryall, J.G., Schertzer, J.D. & Lynch, G.S. 2008. Cellular and molecular mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and weakness. *Biogerontology* **9**, 213–228.
- Saltin, B., Nazar, K., Costill, D.L., Stein, E., Jansson, E., Essen, B. & Gollnick, D. 1976. The nature of the training response; peripheral and central adaptations of one-legged exercise. *Acta Physiol Scand* **96**, 289–305.
- Sial, S., Coggan, A.R., Hickner, R.C. & Klein, S. 1998. Training-induced alterations in fat and carbohydrate metabolism during exercise in elderly subjects. *Am J Physiol* **274**, E785–E790.
- Solomon, T.P., Sistrun, S.N., Krishnan, R.K., Del Aguila, L.F., Marchetti, C.M., O'Carroll, S.M., O'Leary, V.B. & Kirwan, J.P. 2008. Exercise and diet enhance fat oxidation and reduce insulin resistance in older obese adults. *J Appl Physiol* **104**, 1313–1319.
- Spina, R.J. 1999. Cardiovascular adaptations to endurance exercise training in older men and women. *Exerc Sport Sci Rev* **27**, 317–332.
- Talanian, J.L., Holloway, G.P., Snook, L.A., Heigenhauser, G.J., Bonen, A. & Spriet, L.L. 2010. Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**, E180–E188.
- Tang, J.E., Hartman, J.W. & Phillips, S.M. 2006. Increased muscle oxidative potential following resistance training induced fibre hypertrophy in young men. *Appl Physiol Nutr Metab* **31**, 495–501.
- Tarnopolsky, M.A., Rennie, C.D., Robertshaw, H.A., Fedak-Tarnopolsky, S.N., Devries, M.C. & Hamadeh, M.J. 2007. Influence of endurance exercise training and sex on intramyocellular lipid and mitochondrial ultrastructure, substrate use, and mitochondrial enzyme activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R1271–R1278.
- Van Loon, L.J. & Goodpaster, B.H. 2006. Increased intramuscular lipid storage in the insulin-resistant and endurance-trained state. *Pflugers Arch* **451**, 606–616.
- Van Proeyen, K., Szlufcik, K., Nielens, H., Ramaekers, M. & Hespel, P. 2011. Beneficial metabolic adaptations due to endurance exercise training in the fasted state. *J Appl Physiol* **110**, 236–245.
- Verney, J., Kadi, F., Saafi, M.A., Piehl-Aulin, K. & Denis, C. 2006. Combined lower body endurance and upper body resistance training improves performance and health parameters in healthy active elderly. *Eur J Appl Physiol* **97**, 288–297.
- Verney, J., Kadi, F., Charifi, N., Feasson, L., Saafi, M.A., Castells, J., Piehl-Aulin, K. & Denis, C. 2008. Effects of combined lower body endurance and upper body resistance training on the satellite cell pool in elderly subjects. *Muscle Nerve* **38**, 1147–1154.
- Wojtaszewski, J.F., Birk, J.B., Frosig, C., Holten, M., Pilegaard, H. & Dela, F. 2005. 5'AMP activated protein kinase expression in human skeletal muscle: effects of strength training and type 2 diabetes. *J Physiol* **564**, 563–573.

**TITRE:** Lipides intramyocellulaires (IMCL) et exercice.  
Evaluation par la technique histochimique dans les champs d'application:  
- Effet de l'exercice aigu de très longue durée  
- Effet de l'entraînement chez les sujets âgés et les sujets en surpoids

**RESUME:**

Le métabolisme lipidique est stimulé lors de l'exercice musculaire. La contribution énergétique des lipides s'accroît pendant l'exercice d'endurance d'intensité modérée de longue durée (40% à 60% de  $VO_2$ max). Outre les acides gras circulants, les réserves de lipides intramyocellulaires (IMCL) sont sensées être utilisées pendant des performances dépassant 4 heures. Devant le manque de preuves expérimentales jusqu'à ce jour, une 1<sup>ère</sup> étude a été entreprise sur 10 sportifs ( $40 \pm 6$  ans) lors d'une course de 24h. Les résultats obtenus sur le muscle vaste externe ont montré une baisse significative d'IMCL de 56% et 45% dans les fibres de type I et IIA respectivement, alors que le glycogène n'a diminué que dans les fibres I. Ces données indiquent un catabolisme d'IMCL plus efficace que celui du glycogène dans les fibres rapides lors de l'exercice d'ultra endurance, dont le mécanisme reste à déterminer.

IMCL s'accumule lors du vieillissement ou de l'obésité et peut constituer un risque de résistance à l'insuline (RI). Un entraînement combiné en endurance (EE) et en résistance (ER) de 14 semaines a été mené sur des sujets âgés ( $73 \pm 4$  ans) et d'autres en surpoids ( $58 \pm 5$  ans). Dans les deux groupes IMCL a augmenté ( $p < 0.05$ ) dans le muscle vaste externe (après EE) mais est resté stable dans le muscle deltoïde (après ER) et s'est accompagné de l'augmentation ( $p < 0.05$ ) de la capacité enzymatique de la  $\beta$ -oxydation après EE. Les céramides musculaires, une classe de lipides impliquée dans RI, ont été diminués ( $p = 0.052$ ) par EE et non par ER. Ces résultats confirment que l'augmentation d'IMCL n'est pas un facteur de risque métabolique et que EE se traduit par une diminution des céramides et de RI.

**MOTS CLES:** lipides musculaires, histochimie, exercice musculaire, endurance, résistance à l'insuline, vieillissement, obésité, céramides

**TITLE:** Intramyocellular lipids (IMCL) and exercise.  
Estimation by histochemical assay in practical applications  
- Effects of very long lasting exercise  
- Effects of exercise training in ageing and overweighting subjects

**ABSTRACT:**

Lipid metabolism is involved during muscle exercise. Energetic contribution of lipids increases during long lasting endurance exercise of moderate intensity (40% à 60% of  $VO_2$ max). As well as circulating free fatty acids, intramyocellular lipid storages (IMCL) are postulated to be used during performances longer than 4 hours. Due to the lack of experimental evidences until today, a first study was undertaken on 10 athletes ( $40 \pm 6$  yrs) during a 24h running. Results obtained on vastus lateralis muscle showed a significant 56% and 45% decrease of IMCL in type I and IIA fibres respectively while glycogen decreased only in type I fibres. These data indicate a more efficient catabolism of IMCL than those of glycogen in fast twitch fibres during ultra endurance exercise, of which mechanism remains to be explored.

IMCL accumulates during ageing or overweighting and may constitute a risk of insulin resistance (IR). A combined 14 weeks endurance (ET) and resistance (RT) training was followed by older ( $73 \pm 6$  yrs) and overweighted ( $58 \pm 5$  yrs) subjects. In the two groups IMCL increased ( $p < 0.05$ ) in vastus lateralis muscle (after ET) but remained stable in deltoidus muscle (after RT) and was linked to an increase ( $p < 0.05$ ) of  $\beta$ -oxydation enzymatic capacity after ET. Muscle ceramides, a category of lipids implicated in IR, decreased ( $p = 0.052$ ) after ET and not after RT. These results confirm that increase in IMCL is not a metabolic risk factor and that ET induces a decrease of both ceramides and IR.

**KEY WORDS:** muscular lipids, histochemistry, muscle exercise, endurance, insulin resistance, ageing, obesity, ceramides