



**HAL**  
open science

# Rôle physiologique joué par l'interleukine -6 au cours de l'exercice physique - Contribution à l'étude des mécanismes de production par le muscle et des réponses du tissu hépatique

Sébastien Banzet

► **To cite this version:**

Sébastien Banzet. Rôle physiologique joué par l'interleukine -6 au cours de l'exercice physique - Contribution à l'étude des mécanismes de production par le muscle et des réponses du tissu hépatique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2007. Français. NNT: . tel-00250458

**HAL Id: tel-00250458**

**<https://theses.hal.science/tel-00250458>**

Submitted on 12 Feb 2008

**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 JOSEPH FOURIER- GRENOBLE 1  
CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

ANNEE 2007

N°

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
**DISCIPLINE : PHYSIOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement le lundi 1<sup>er</sup> octobre 2007

par

**SEBASTIEN BANZET**

---

---

**ROLE PHYSIOLOGIQUE JOUE PAR L'INTERLEUKINE-6**  
**AU COURS DE L'EXERCICE PHYSIQUE**

—

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DES MECANISMES DE**  
**PRODUCTION PAR LE MUSCLE ET DES REPONSES DU**  
**TISSU HEPATIQUE**

---

---

**Directeur de thèse : Professeur Xavier BIGARD**

**Co-directeur de thèse : Docteur Damien FREYSSENET**

**Membres du Jury :**

**Professeur Patrick LEVY**

**Docteur Renée VENTURA-CLAPIER**

**Professeur Jacques MERCIER**

**Docteur Jean-Frédéric BRUN**

**Docteur Damien FREYSSENET,**

**Professeur Xavier BIGARD**

Département des Facteurs Humains et Pôle de génomique  
Centre de Recherches du Service de Santé des Armées Emile Pardé  
La Tronche, France.



*Mes remerciements s'adressent en premier lieu à **Xavier Bigard**. Vous m'avez d'abord préparé au concours d'assistant puis accueilli dans le laboratoire il y a 5 ans et formé au métier de chercheur. Très tôt vous m'avez accordé confiance et autonomie dans ce travail que je découvrais.*

*D'immenses remerciements à **Nathalie Koulmann** Tu m'as enseigné, au quotidien, la rigueur de la réflexion scientifique et du travail de laboratoire. D'une disponibilité sans faille depuis le premier jour, je te dois beaucoup, pour ce travail de thèse en particulier.*

*Milles merci à **André Peinnequin** dont j'ai assiégé le bureau sans relâche et qui a toujours été présent, dans la bonne humeur. Ta contribution à ma formation de chercheur et à ce travail de physiologie est considérable.*

*Des remerciements collectifs à tous les membres de cette équipe de recherche où on se sent bien. Merci à chacun de ceux qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre, **Bernard Serrurier, Hervé Sanchez, Olivier Birot, Nadine Simler, Rachel Chapot, Alexandra Malgoyre, Hélène Richard, Robert Carter, Marielle Padeloup**.*

*Mes remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes du CRSSA qui m'ont aidé ou soutenu, le Médecin Général **Gérard Martet, Christian Raphel, Frédéric Canini, Antonia Alonso, Nadine Fidier**, le personnel du Laboratoire d'Analyse Biologique et les animaliers de la Biologie Appliquée.*

*Merci à **Damien Freyssenet**, codirecteur de ce travail de thèse. Depuis plusieurs années nos échanges scientifiques sont riches et fructueux. J'ai beaucoup appris à ton contact.*

*Je remercie très sincèrement **Renée Ventura-Clapier** et **Jacques Mercier** de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse.*

*Je remercie aussi très sincèrement Monsieur **Patrick Lévy** et Monsieur **Jean-Frédéric Brun** d'avoir accepté de participer à ce jury.*

*A Catherine, mon épouse, mon amour, mon équilibre.*

*A Erwan, Margot et Arthur, les trois petits monstres nés de notre mariage et qui remplissent bien notre vie.*

*A mes parents, mes grands-parents et ma famille.*

*A Alain Buguet aux côtés de qui j'ai appris à aimer la recherche et l'Afrique.*

*A mes amis de toujours, de la boîte et d'ailleurs.*

*A ceux avec qui j'ai partagé joies et tristesse sur les terrains de rugby.*

*Aux légionnaires et sous-officiers du 3<sup>ème</sup> Régiment Etranger d'Infanterie, à ces deux années intenses passées à leurs côtés, dans ce petit bout d'Amazonie française.*

# ***SOMMAIRE***

# **SOMMAIRE**

<b>ABBREVIATIONS</b>	p 10
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	p 14
<b>ETAT DE LA LITTERATURE</b>	p 18
<b>1. PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE A L'EXERCICE.</b>	p 18
1.1. Les grandes voies de contrôle de la Production Hépatique de Glucose	p 18
1.2. La Production Hépatique de Glucose à l'exercice	p 19
1.3. La régulation de la Production Hépatique de Glucose à l'exercice	p 21
A. Régulation par rétrocontrôle	p 21
B. Régulation par anticipation	p 21
C. Régulation hormonale	p 22
1.4. Données moléculaires récentes sur le contrôle de la néoglucogenèse	p 23
<b>2. INTERLEUKINE-6 ET EXERCICE MUSCULAIRE</b>	p 25
2.1. Cytokines et exercice	p 25
2.2. Interleukine-6 : une myokine	p 26
A. Une molécule issue du muscle	p 26
B. Une molécule signal des réserves énergétiques	p 27
C. L'origine cellulaire de l'IL-6 musculaire	p 29
2.3. Le contrôle de la transcription du gène IL-6 a l'exercice	p 30
A. Voies de signalisation activées à l'exercice	p 30
B. Contrôle de l'expression d'IL-6 : les données in vitro	p 33
C. Régulation in vivo	p 34
2.4. IL-6 et signalisation autocrine musculaire	p 35
A. Existence d'une signalisation musculaire	p 35
B. Données in vitro et in vivo	p 35
C. Quel rôle pour il-6 dans le muscle a l'exercice ?	p 36
<b>3. IL-6 ET PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE</b>	p 38
3.1. La signalisation IL-6	p 38
3.2. IL-6 et Production Hépatique de Glucose : Données cellulaires	p 38
3.3. Influence d'IL-6 sur la Production Hépatique de Glucose à l'exercice	p 39
<b>OBJECTIFS SCIENTIFIQUES</b>	p 42
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	p 46
<b>1. CONDITIONNEMENT DES ANIMAUX</b>	p 46
1.1. Exercice physique	p 46
A. Modalités d'exercice	p 46
B. Traitement pharmacologique	p 46
1.2. Injections d'IL-6 recombinante	p 47
<b>2. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES TISSUS</b>	p 47
2.1. Prélèvements tissulaires	p 47
2.2. Préparation des fibres isolées	p 48



3. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE	p 48
3.1. Réalisation des coupes sériées	p 48
3.2. Coloration Periodic Acid Schiff (PAS)	p 48
3.3. Immunohistochimie des chaînes lourdes de la Myosine (MHC)	p 49
4. ANALYSES PROTEIQUES	p 49
4.1. Dosage d'IL-6 plasmatique par ELISA	p 49
4.2. Electrophorèse des MHC	p 50
A. Extraction des protéines	p 50
B. Electrophorèse	p 50
C. Fixation et coloration	p 50
4.3. Western blotting	p 51
A. Extraction des protéines	p 51
B. Electrophorèse	p 51
C. Electrotransfert	p 51
D. Immuno-détection	p 52
5. DOSAGE DU GLYCOGENE TISSULAIRE	p 52
5.1. Extraction	p 52
5.2. Hydrolyse du glycogène	p 53
5.3. dosage du glucose	p 53
5.4. Calcul des concentrations de glucose	p 54
6. MESURES DES ARNm	p 54
6.1. Préparation des ADNc à partir de tissus entiers	p 54
A. Extraction des ARN	p 54
B. Transcription inverse	p 55
6.2. Préparation des ADNc à partir de demi-fibres isolées	p 55
A. Extraction des ARN	p 55
B. Transcription inverse	p 56
6.3 RT-PCR en temps réel	p 56
6.4. Normalisation	p 57
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	p 60
1. ETUDE DE LA FIBRE-SPECIFICITE DE PRODUCTION D'IL-6 A L'ARRET D'UN EXERCICE UNIQUE.	p 60
1.1. Rappel des objectifs de l'expérimentation	p 60
1.2. Plan expérimental et méthodologie	p 60
A. Plan expérimental et validation du modèle d'étude	p 60
B. Méthodologie	p 61
B.1. Analyse sur fibres isolées	p 61
B.2. Analyses histologiques	p 61
B.3. Analyse statistique	p 61
1.3. Résultats	p 62
A. Validation du modèle animal	p 62
B. Analyse sur fibres isolées	p 62
B.1. Bilan des fibres incluses dans l'étude	p 62
B.2. Mesure des ARNm codant IL-6	p 62
B.3. Evaluation de l'activité calcineurine	p 63

C. Contenu en glycogène des fibres musculaires	p 63
1.4. Discussion	p 63
<b>2. ETUDE DE L'IMPLICATION DE LA VOIE CALCINEURINE DANS LA PRODUCTION D'IL-6 PAR LE MUSCLE A L'ARRET D'UN EXERCICE.</b>	<b>p 68</b>
2.1. Rappel des objectifs de l'expérimentation	p 68
2.2. Plan expérimental et méthodologie	p 68
A. Plan expérimental	p 68
B. Méthodologie	p 69
B.1. Contrôle du modèle	p 69
B.2. Étude de l'expression du gène IL-6	p 69
B.3. Analyse statistique	p 69
2.3. Résultats	p 69
A. Contrôle et validation du modèle	p 69
A.1. Poids et temps de course	p 69
A.2. Activité calcineurine	p 70
A.3. Statut glucidique	p 70
A.4. Phosphorylation de p38	p 70
B. Expression du gène codant IL-6	p 70
B.1. Transcription du gène IL-6 dans les muscles soleus	p 70
B.2. Concentrations plasmatiques d'IL-6	p 71
2.4. Discussion	p 71
<b>3. ETUDE DE L'ACTION DE LA PROTEINE IL-6 DANS LE FOIE A L'ARRET D'UN EXERCICE UNIQUE.</b>	<b>p 76</b>
3.1. Rappel des objectifs de l'expérimentation	p 76
3.2 Plan expérimental et méthodologie	p 76
A. Plan expérimental	p 76
B. Méthodologie	p 77
B.1. Etude de la signalisation IL-6 dans le foie	p 77
B.2. Etude du métabolisme glucidique et de la néoglucogénèse	p 77
B.3. Analyse statistique	p 77
3.3 Résultats	p 78
A. Réponse à l'exercice	p 78
A.1. Temps de course	p 78
A.2. Statut glucidique et néoglucogénèse	p 78
A.3. La signalisation IL-6	p 79
B. Réponse à l'IL-6 recombinante	p 79
B.1. La signalisation IL-6	p 79
B.2. La néoglucogénèse	p 79
3.4 Discussion	p 80
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>p 86</b>
<b>PERSPECTIVES</b>	<b>p 96</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>p 99</b>
<b>PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>p 112</b>

# ***ABBREVIATIONS***

## ***ABREVIATIONS***

Ac	Anticorps
ACC	<i>AcetylCoA carboxylase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine diphosphate
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
ARBP	<i>Acidic ribosomal protein</i>
AREs	<i>Adenylate uridylate rich elements</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CaM	Calmoduline
CaMK	<i>Ca<sup>2+</sup> - calmodulin-dependent protein kinase</i>
CaMKK	<i>CaMK kinases</i>
cAMP	<i>Cyclic AMP</i>
CD11b	<i>Cluster of differentiation 11b</i>
CD31	<i>Cluster of differentiation 31 (PECAM 1)</i>
C/EBP	<i>CAAT enhancer binding protein</i>
Cl <sup>-</sup>	Ion chorure
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
CP	<i>Crossing point</i>
CRE	<i>cAMP regulatory element</i>
CREB	<i>cAMP regulatory element binding protein</i>
CRSSA	Centre de Recherches du Service de Santé des Armées
CREB	cAMP response element binding protein
CsA	Ciclosporine A
CycA	Cyclophiline A
DAG	Di-acyl glycérol
dNTP	<i>Desoxyribonucleotide triphosphate</i>
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated protein kinase 1/2</i>
FOXO-1	<i>Forkhead box-containing protein, O sub family-1</i>
FXR	<i>Farnesoid X receptor</i>
G6P	<i>Glucose-6-phosphate</i>
G6Pase	<i>Glucose-6-phosphatase</i>

GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GLUT-4	<i>Glucose transporter 4</i>
GP130	<i>Glycoprotein 130</i>
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
GRU	<i>Glucocorticoid response unit</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HIF-1	<i>Hypoxia inducible factor-1</i>
HNF-4 $\alpha$	<i>Hepatic nuclear factor 4 alpha</i>
HPRT	<i>Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase</i>
IFN- $\gamma$	<i>Interféron-<math>\gamma</math></i>
IGF-1	<i>Insulin growth factor-1</i>
I $\kappa$ B	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B</i>
IKK	<i>I<math>\kappa</math>B-kinase</i>
IL-1, 6, 8, 15	<i>Interleukine-1, 6, 8, 15</i>
IL-1ra	<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>
IL-6R	<i>Interleukin-6 receptor</i>
IP3	<i>Inositol tri-phosphate 3</i>
IRE	<i>Insulin response element</i>
IRS-1	<i>Insulin receptor substrate-1</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal protein kinase</i>
KO	<i>Knock out</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCIP	<i>Modulatory calcineurin-interacting peptide</i>
$\beta$ -ME	<i>2-<math>\beta</math>-mercaptoéthanol</i>
MEF-2	<i>Myocyte enhancer factor 2</i>
MHC	<i>Myosin heavy chain</i>
MLC	<i>Myosin light chain</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
PFK	<i>Phospho-fructo-kinase</i>
PGC-1 $\alpha$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator alpha</i>
PHG	<i>Production hépatique de glucose</i>
PKA, B, C	<i>Protéine kinase-A, -B, -C</i>
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
RT	<i>Reverse transcription</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
SDS	<i>Sodium dodécyl sulfate</i>
SHP2	<i>SH2 domain containing protein</i>
SIRT-1	<i>Sirtuin-1</i>

sIL-6R	<i>Soluble IL-6 receptor</i>
SMPs	<i>Streptavidin Magnetic Particles</i>
SOCS-3	<i>Supressor of cytokines signaling-3</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
VO <sub>2</sub> max	Consommation maximale d'oxygène

# ***INTRODUCTION***

## ***GENERALE***

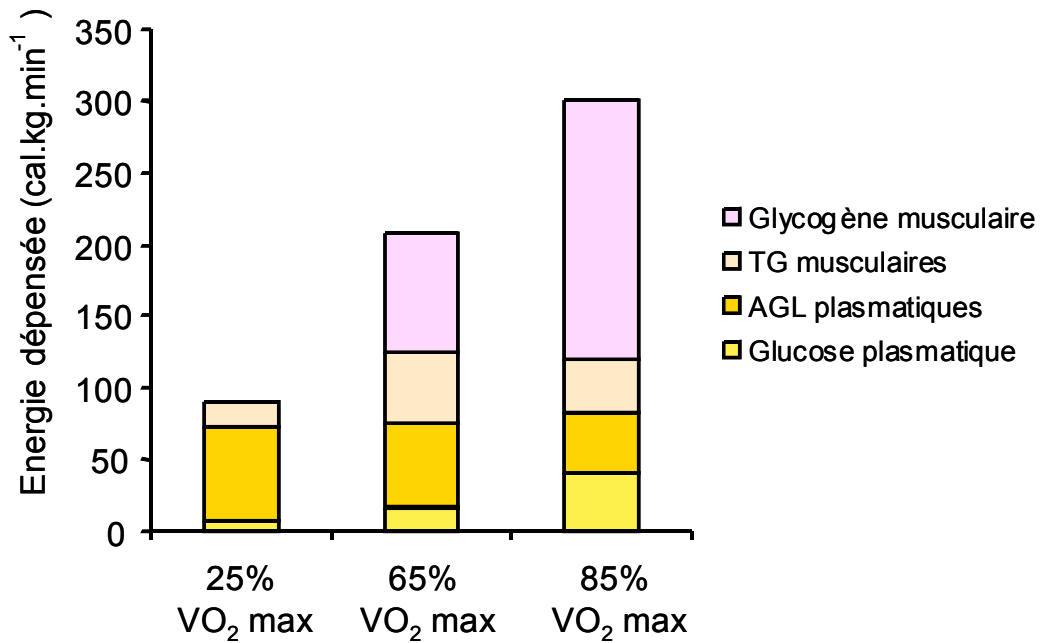


Figure 1 : Contribution des 4 principales sources de substrats énergétiques à la dépense après 30 minutes d'un exercice à 25, 65 ou 85% de la consommation maximale d'oxygène (VO<sub>2</sub> max). TG : triglycérides, AGL : acides gras libres (Romijn et al., 1993).

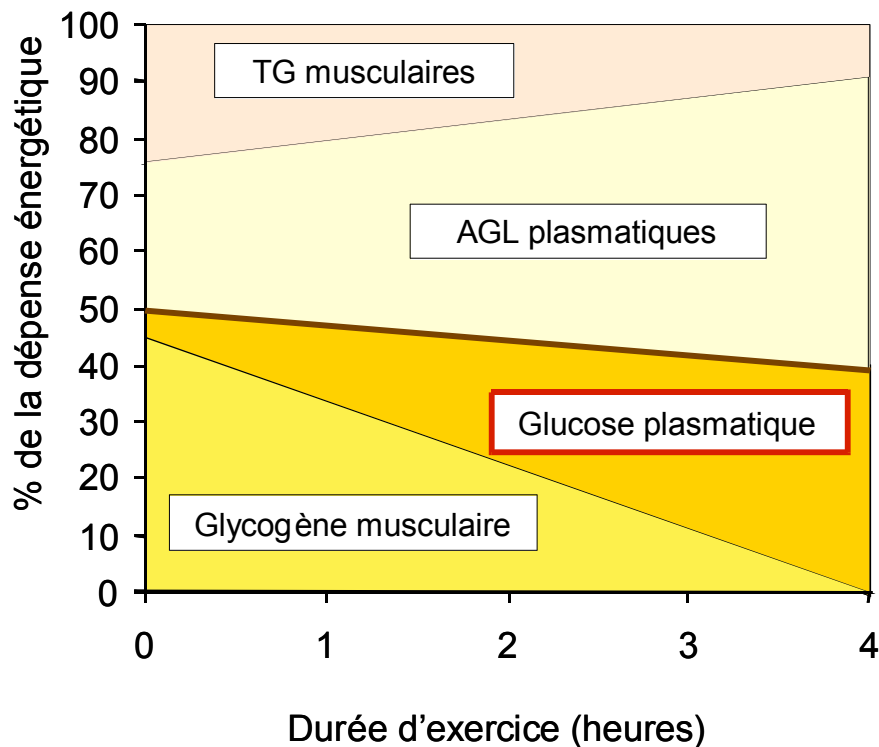


Figure 2 : Pourcentage de l'énergie issue des quatre principales sources de substrats au cours d'un exercice prolongé à 65-75% de la consommation maximale d'oxygène. TG : triglycérides, AGL : acides gras libres (d'après Coyle, 1995).



## ***INTRODUCTION GENERALE***

Les muscles striés squelettiques, de par leur capacité à produire une force, sont les moteurs du mouvement volontaire et du maintien de la posture. Le muscle est composé de fibres musculaires multinuclées qui possèdent un appareil contractile complexe. Les myofibrilles sont composées de filaments protéiques capables, moyennant la présence d'ATP, de coulisser les uns par rapport aux autres, assurant la production de force par la fibre. Les caractéristiques mécaniques de la contraction musculaire et le mode d'utilisation des substrats énergétiques permettent de définir les phénotypes contractile et métabolique des fibres musculaires.

Le phénotype contractile est déterminé par la vitesse de contraction et la force développée par la fibre musculaire. Ces propriétés mécaniques dépendent pour beaucoup des isoformes de chaînes lourdes de la myosine (MHC), dans une moindre proportion des isoformes de chaînes légères de la myosine (MLC) présentes dans la fibre, et d'autres protéines impliquées par exemple dans les mouvements du calcium. La vitesse de raccourcissement étant fortement corrélée à l'activité ATPasique des MHC, l'étude de la composition en MHC d'une fibre musculaire est un bon critère pour caractériser son phénotype contractile. On distingue ainsi des fibres lentes, exprimant la MHC de type I qui développent une force modérée. A l'opposé, les fibres exprimant les MHC de type II sont dites rapides et développent une force plus importante. Il existe plusieurs isoformes de MHC II. Sont décrites, dans un ordre croissant de vitesse de contraction, MHC IIa, IIx et IIb chez le rongeur, l'isoforme IIb n'existant pas chez l'homme. Une fibre peut exprimer une ou plusieurs isoformes de MHC et il existe donc, une grande variété de propriétés mécaniques possibles, réalisant un large continuum des fibres aux vitesses de contraction les plus lentes aux plus rapides. Les myosines, et en particulier les MHC étant de très loin les protéines les plus exprimées dans le muscle squelettique, il est classique de caractériser le phénotype contractile d'un muscle ou d'une fibre par son contenu en MHC.

Le phénotype métabolique détermine les voies métaboliques sollicitées pour la fourniture d'énergie, et donc l'équipement biochimique nécessaire pour resynthétiser l'ATP.

réserves en glycogène qui sont mobilisables en quelques minutes. Lorsque l'exercice dure, le foie active la néoglucogenèse qui lui permet de synthétiser du glucose à partir de précurseurs non glucidiques comme le lactate, le glycérol ou l'alanine. La disparition du glucose de l'organisme résulte exclusivement de sa dégradation par les cellules, au premier rang desquelles les fibres musculaires pendant l'exercice. La glycémie résulte donc d'un équilibre dynamique entre la libération de glucose dans le sang (production hépatique de glucose) et l'extraction du glucose circulant par les fibres musculaires. La régulation de la glycémie à l'exercice est assurée en grande partie par des interactions hormonales complexes dont les mécanismes d'actions sont assez bien compris, mais qui ne peuvent cependant rendre compte de tous les aspects du contrôle de la production hépatique de glucose. Des questions restent posées concernant la signalisation de l'état des réserves énergétiques de l'organisme, en particulier du muscle. A cet égard, les dernières années ont vu émerger une cytokine comme nouvel acteur potentiel de l'homéostasie du glucose à l'exercice, et qui pourrait représenter un tel signal .

Les cytokines sont des protéines de signalisation inter-cellulaire, identifiées d'abord dans le système immunitaire puis dans de très nombreux types cellulaires de sorte que ces molécules n'ont pas de véritable spécificité tissulaire. Elles peuvent agir localement sur le mode autocrine ou paracrine, mais aussi à distance par voie endocrine. A l'exercice, l'une d'entre elles, l'interleukine-6 (IL-6), est produite en grande quantité par le muscle actif, est libérée dans le plasma et semble agir comme un signal à destination du foie et, dans une moindre mesure, du tissu adipeux. Elle est capable d'augmenter la production endogène de glucose lors d'un exercice d'endurance, indépendamment des hormones glucorégulatrices. L'ensemble de ce travail de thèse concerne l'étude des déterminants moléculaires de la production d'IL-6 liée à la contraction musculaire et aux mécanismes d'action de cette cytokine au niveau hépatique.

Les fibres dites oxydatives sont capables de dégrader différents substrats énergétiques par voie aérobie, elles sont résistantes à la fatigue, synthétisent de grandes quantités d'ATP et possèdent de faibles réserves en glycogène. A l'inverse, les fibres glycolytiques utilisent plutôt les voies anaérobies qui permettent la resynthèse rapide de l'ATP à partir de la phospho-créatine, mais surtout par la dégradation rapide du glucose (glycolyse anaérobie). Elles sont donc très dépendantes du glucose, sont plus fatigables et possèdent d'importantes réserves en glycogène. Au-delà de cette dichotomie très descriptive et schématique, aucune fibre musculaire n'est strictement oxydative ou strictement glycolytique. Dans des conditions stables, le phénotype métabolique est assez bien corrélé au phénotype contractile, les fibres lentes et IIa étant très oxydatives et les fibres rapides de type IIx et IIb étant plutôt glycolytiques.

L'exercice physique prolongé se caractérise par une activité musculaire plus ou moins intense et soutenue dans le temps dont il résulte un accroissement très important des besoins en oxygène et substrats énergétiques du muscle, et une production accrue de déchets métaboliques. Si les réponses cardio-respiratoires assurent le maintien de l'hématose et de la convection sanguine, l'approvisionnement continu du moteur musculaire en substrats est un défi qui s'impose à l'organisme.

Lors d'un exercice d'intensité sous maximale, le muscle resynthétise l'ATP, très rapidement à partir de la phospho-créatine, puis du glucose, par voie anaérobie dans les premières secondes de l'effort et, ensuite par voie aérobie. A ce stade, ce sont soit le pyruvate dérivé de la glycolyse, soit les acides gras qui sont oxydés. Lorsque l'exercice se prolonge, la part prise par les acides gras augmente légèrement à condition que la puissance d'exercice reste très sous-maximale (50-55% de la consommation maximale d'oxygène). Le glucose est donc un substrat énergétique déterminant pour la fibre musculaire à l'exercice, surtout lorsque la puissance requise augmente (figure 1) (Brooks et Mercier, 1994). Ce glucose provient tout d'abord des réserves locales en glycogène musculaire puis, à mesure que ce stock de glycogène s'amenuise, le muscle puise le glucose dans le sang circulant. Ainsi, plus l'exercice se prolonge, plus le muscle devient dépendant du glucose plasmatique (figure 2) (Coyle, 1995). En l'absence d'apports exogènes, seul le foie est capable de libérer du glucose dans la circulation sanguine au cours de l'exercice. Il puise d'abord dans ses

# ***ÉTAT DE LA LITTÉRATURE***

## ***ÉTAT DE LA LITTÉRATURE***

### ***1. PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE A L'EXERCICE.***

#### ***1.1. LES GRANDES VOIES DE CONTROLE DE LA PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE***

Au repos, la production hépatique de glucose (PHG) est avant tout contrôlée par le couple hormonal insuline/glucagon avec comme point de mire la régulation de la glycémie. L'insuline est une hormone anabolisante, hypoglycémiant qui au niveau hépatique gère la mise en réserve du glucose dans les périodes d'abondance que sont les phases post-prandiales. Elle stimule la captation du glucose par les hépatocytes, active la glycogénogenèse (dans une moindre mesure la glycolyse) et inhibe les voies de production du glucose (néoglucogenèse et glycogénolyse). Le glucagon est au contraire une hormone catabolique hyperglycémiant qui stimule la mobilisation des substrats énergétiques. Ses effets hépatiques sont globalement opposés à ceux de l'insuline, il stimule la néoglucogenèse et la glycogénolyse. Ce couple d'hormones pancréatiques agit sur les enzymes clés des voies métaboliques soit par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation (glycogénolyse et glycogénogenèse) soit par un contrôle transcriptionnel sur les gènes codant ces enzymes (glycolyse et néoglucogenèse). Enfin d'autres hormones sont capables d'activer directement la PHG en agissant sur les mêmes voies métaboliques, c'est le cas des glucocorticoïdes, de l'hormone de croissance et des catécholamines qui exercent un effet hyperglycémiant, en agissant principalement sur la néoglucogenèse.

Lors d'un exercice physique, ces voies métaboliques et les systèmes de contrôle de la PHG sont sollicités pour assurer le maintien de la glycémie alors que la demande périphérique en glucose augmente brusquement.

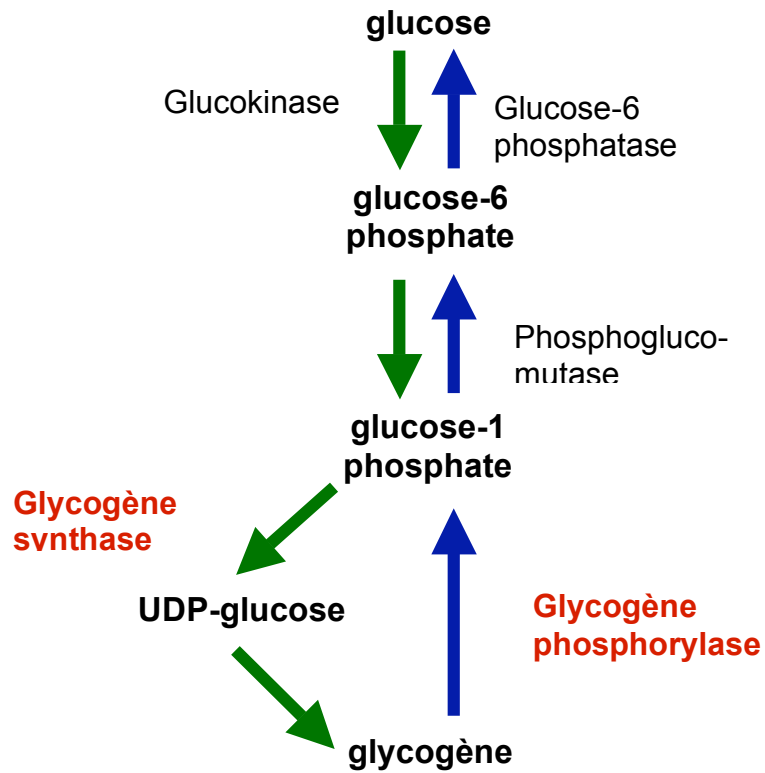


Figure 3 : Schéma des voies de la glycogénogenèse (flèches vertes) et de la glycogénolyse (flèches bleues). Les enzymes catalysant les étapes sont représentées. Les enzymes clés des voies (en rouge) sont contrôlées en miroir par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation. La glucose-6 phosphatase est strictement hépatique et est commune à la néoglucogenèse.

## ***1.2. LA PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE A L'EXERCICE***

Malgré un accroissement considérable de la consommation de glucose par les muscles, la glycémie reste remarquablement stable pendant l'exercice ; il a même été décrit une augmentation de cette dernière lors d'exercices intenses (>60% de VO<sub>2</sub>max, (Kjaer et al., 1987, Hargreaves et Proietto, 1994). Chez l'homme (Rowell et al., 1965, Ahlborg et al., 1974, Cooper et al., 1989) comme chez l'animal (Sonne et Galbo, 1985, Vissing et al., 1988), la PHG augmente d'un facteur 3 à 10 en fonction de l'intensité de l'exercice, assurant ainsi la fourniture de substrats (glucose) aux muscles actifs. Cependant, les mécanismes mis en jeu dans cette production endogène de glucose ainsi que leurs régulations ne sont pas encore parfaitement expliqués. La contribution respective de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse semble très dépendante du type d'exercice (durée et intensité) et du statut nutritionnel (Friedman, 1994, Petersen et al., 2004).

La glycogénolyse hépatique est activée par la phosphorylation *adenosine monophosphate cyclique* (AMPC)/*Protein kinase A* dépendante de la glycogène-phosphorylase qui libère des résidus de glucose 1-P, transformés en glucose-6-P (G6P) par une *phosphogluco-mutase*. Le G6P peut quitter la cellule après déphosphorylation par la *glucose-6-phosphatase* (G6Pase), enzyme commune à la néoglucogenèse (figure 3). Cette enzyme est absente dans le muscle squelettique, ce qui explique pourquoi la glycogénolyse musculaire ne peut pas participer au contrôle de la glycémie. Quand la glycogène-phosphorylase est activée, il existe une inactivation en miroir de la glycogène-synthase. La mobilisation du stock hépatique de glycogène permet ainsi de contribuer à la production hépatique de glucose pendant 90 à 120 minutes d'exercice modéré (Winder, 1988). La diminution de ces réserves est fonction du temps et de l'intensité du travail fourni. La glycogénolyse, contrôlée par un jeu de phosphorylations-déphosphorylations d'enzymes clés, est mise en route très rapidement et permet donc une grande réactivité hépatique en début d'exercice. Elle est responsable de la quasi-totalité de la PHG dans les 30 premières minutes d'exercice (Kjaer, 1998).

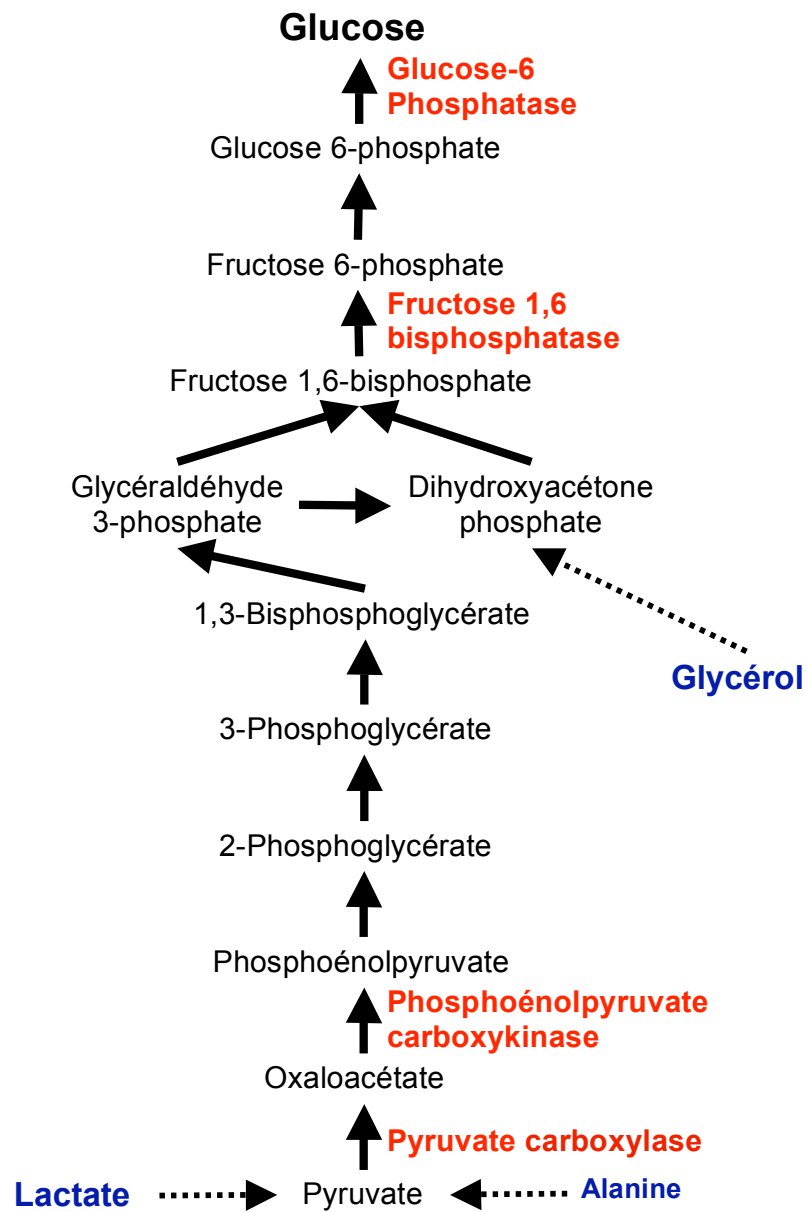


Figure 4 : Schéma de la voie de la néoglucogénèse. Les enzymes clés figurent en rouge. Les principaux substrats utilisés à l'exercice sont présentés en bleu.



La néoglucogenèse permet la synthèse de glucose à partir de substrats non glucidiques, à l'exercice il s'agit du lactate et du glycérol principalement. Cette voie métabolique comporte plusieurs étapes enzymatiques dont certaines sont très finement contrôlées (figure 4). Lors d'un exercice prolongé, l'activité maximale des enzymes de la néoglucogenèse et de la glycolyse anaérobie est modulée. Chez le rat courant sur un tapis roulant, la *phosphoénolpyruvate carboxykinase* (PEPCK), la *Fructose 2,6 bisphosphatase* et la G6Pase voient leurs activités augmenter alors qu'en miroir, l'activité maximale de la *phospho-fructo-kinase* (PFK), enzyme de la glycolyse, diminue (Dohm et al., 1985). L'enzyme clé de la néoglucogenèse la plus étudiée est la PEPCK car c'est la plus fortement impliquée dans le contrôle du flux de la voie. Elle catalyse la transformation de l'oxaloacétate issu de la mitochondrie en phosphoénolpyruvate (figure 4). Son activité croît dès 30 min de course et augmente jusqu'à l'arrêt de l'exercice (Dohm et al., 1985). L'importance physiologique de l'activation de la PEPCK est objectivée par le fait que son inhibition pharmacologique par l'acide 3-mercaptopicolinique réduit significativement le temps d'endurance de rats (Turcotte et al., 1990). Comme il n'existe aucun activateur allostérique de la PEPCK, son activité est directement dépendante de son abondance dans le cytosol. Par ailleurs sa demi-vie est courte (6 heures) et aucun mécanisme capable de modifier sa stabilité n'est connu (Hanson et Reshef, 1997). La quantité de PEPCK est donc contrôlée par la transcription de son gène et la stabilisation de ses ARNm (Hanson et Reshef, 1997). Il existe une augmentation importante des ARNm codant PEPCK dans le foie dès 30 min d'exercice (+ 270%), qui se poursuit jusqu'en fin d'épreuve (+ 510%) (Friedman, 1994). Cet accroissement est dû à une augmentation de la transcription du gène (+ 1000% à l'arrêt de l'exercice) ce qui fait de cette étape de l'expression génique un point de contrôle majeur de la néoglucogenèse à l'exercice.

### ***1.3. LA REGULATION DE LA PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE A L'EXERCICE***

La régulation de la PHG à l'exercice implique divers mécanismes dont les interactions complexes permettent à l'organisme de faire face très rapidement tant à un exercice court et très intense qu'à un exercice modéré mais durant plusieurs heures.

#### ***A. REGULATION PAR RETROCONTROLE***

Une perfusion de glucose mimant la libération hépatique de glucose durant un exercice modéré est capable de bloquer la PHG à l'effort (Jenkins et al., 1985, Jenkins et al., 1986) suggérant l'existence d'un rétrocontrôle de la glycémie et d'autres facteurs non connus sur la PHG. Par ailleurs la stimulation de la PHG par des efférences nerveuses musculaires a été suggérée car la stimulation de l'extrémité proximale du nerf fémoral sectionné provoque une augmentation de la PHG et de la glycémie chez le chat au repos. L'importance de ce mécanisme serait pourtant très limitée chez l'homme sain à l'exercice (Kjaer, 1998).

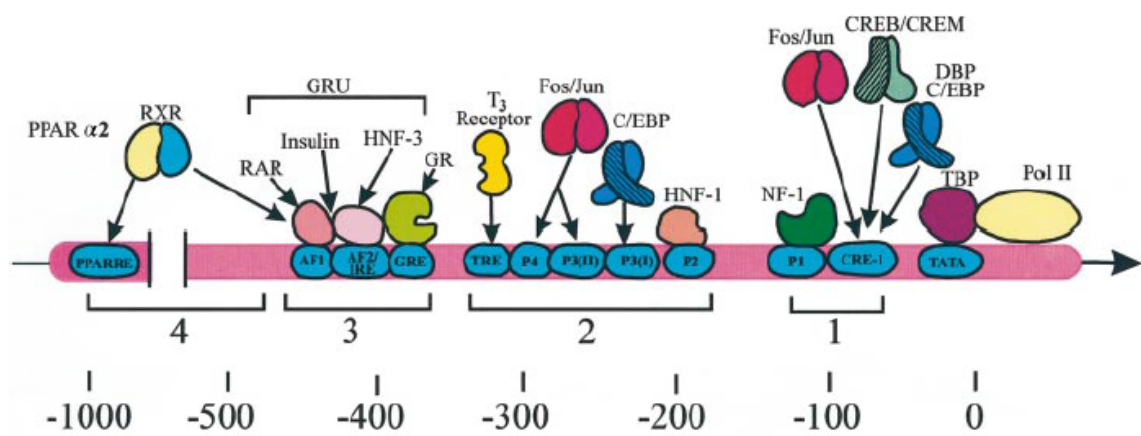
#### ***B. REGULATION PAR ANTICIPATION***

La régulation par rétrocontrôle ne peut cependant pas expliquer le fait que lors d'efforts intenses la PHG excède la captation de glucose par les muscles actifs avec pour conséquence une augmentation de la glycémie (Sonne et Galbo, 1985, Kjaer et al., 1986), en particulier en début d'exercice. De nombreux arguments expérimentaux permettent de penser que l'activation des centres moteurs du cortex cérébral favorise la mobilisation du glucose à partir du foie, soit directement par voie nerveuse soit indirectement en modulant les hormones glucorégulatrices (Kjaer et al., 1987). Ce phénomène est souvent observé en début d'exercice et a été comparé aux mécanismes d'« accrochages » ventilatoires et circulatoires qui correspondent à une augmentation des débits ventilatoires et circulatoires qui ont lieu dans les premières secondes d'un exercice, alors même que la demande n'a pas encore augmenté (Dejours et al., 1955).

### ***C. REGULATION HORMONALE***

La régulation hormonale par le couple insuline/glucagon est importante et nombre d'études ont démontré que la baisse de l'insulinémie (Vranic et al., 1976, Issekutz, 1980, Wasserman et al., 1989) et l'augmentation de la glucagonémie (Brockman, 1979, Wasserman et al., 1984, Wasserman et al., 1989), seules ou combinées (Marker et al., 1991) peuvent expliquer en grande partie l'augmentation de la PHG à l'exercice. Elles ne peuvent cependant pas l'expliquer totalement car l'augmentation de la PHG débute immédiatement en début d'exercice et la glycémie semble maintenue, au moins provisoirement, par des systèmes redondants (Hoelzer et al., 1986). Les catécholamines ont, dans ce cadre, un rôle controversé. Si leur capacité à induire la libération de glucose par des hépatocytes en culture est bien démontrée, leur action hépatique lors de l'exercice, à des concentrations circulantes physiologiques, a fait l'objet d'études aux résultats souvent contradictoires. Des études postulent, sur la base de corrélations entre les concentrations plasmatiques de catécholamines et la PHG, que la libération massive de ces hormones serait un stimulus majeur pour la libération de glucose par le foie (Sigal et al., 1996). L'ablation des glandes surrénales chez le rat ne semble cependant pas affecter le contrôle de la PHG (Carlson et al., 1985, Arnall et al., 1986, Marker et al., 1986). Des observations similaires ont été faites chez des patients adrénalectomisés qui étaient capables de maintenir leur glycémie à l'exercice (Jarhult et Holst, 1979). En somme si un rôle clé est retenu pour les hormones pancréatiques, il semble que les catécholamines circulantes ne tiennent qu'une place mineure dans la régulation de la PHG.

L'innervation sympathique du foie est abondante, mais là encore les résultats obtenus chez des patients transplantés hépatiques (Kjaer et al., 1995) ou après anesthésie du ganglion coeliaque (Kjaer et al., 1993) ne montrent pas de déficit de la régulation de la glycémie à l'exercice. Enfin, des résultats plus récents ont montré que l'administration intraportale d' $\alpha$  et  $\beta$  bloqueurs des récepteurs aux catécholamines n'avait aucun effet sur la PHG lors d'un exercice intense (Coker et al., 1997); ces résultats confirment le rôle mineur des catécholamines circulantes ou de l'innervation sympathique dans la PHG à l'exercice.

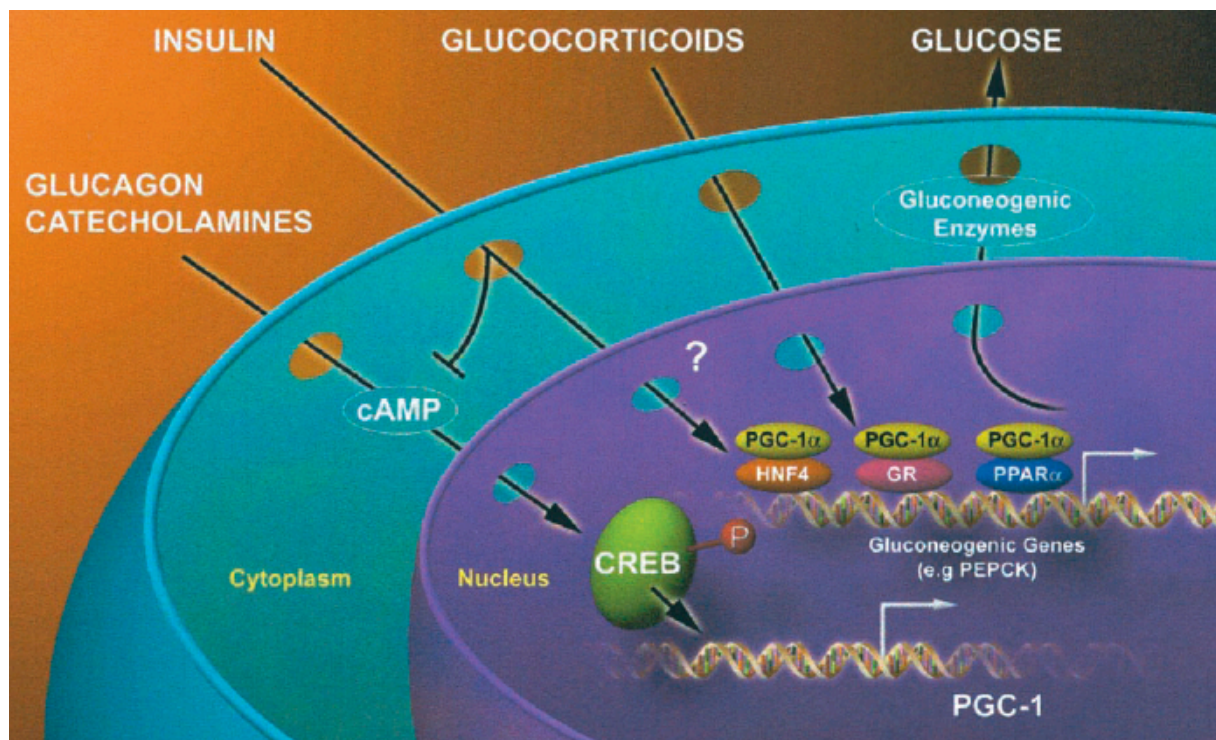


**Figure 5** : Représentation schématique du promoteur du gène codant la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Les quatre régions principales (1-4) et les facteurs de transcriptions susceptibles de s'y fixer sont représentés (Croniger et al., 1998).

#### **1.4. DONNEES MOLECULAIRES RECENTES SUR LE CONTROLE DE LA NEOGLUCOGENESE**

Des variations hormonales et nutritionnelles induisent des changements dans les niveaux hépatiques d'ARNm codant PEPCK et dans l'activité de cette enzyme (Finck et Kelly, 2006). L'insuline réprime la transcription du gène en période postprandiale alors que les glucocorticoïdes ont une action inverse lors d'un jeûne ou d'une de réaction de stress (Barthel et Schmoll, 2003). Le promoteur du gène PEPCK comprend 4 régions bien décrites contenant des sites de fixation pour divers facteurs de transcription (figure 5). La région 1 contient un *cAMP regulatory element* (CRE) capable de fixer des membres de la famille des *CAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP), la région 2 contient un autre site de fixation C/EBP appelé P3(I), la région 3 contient un *glucocorticoid response unit* (GRU) et un *insulin response element* (IRE), enfin la région 4 est plus importante dans le tissu adipeux (Croniger et al., 1998). Seules de rares études ont exploré le contrôle de la transcription du gène PEPCK à l'exercice. Les hormones glucocorticoïdes pourraient jouer un rôle car la suppression du GRU chez la souris bloque totalement l'activité du promoteur de la PEPCK (Friedman, 1994) et des souris adrénalectomisées ont des niveaux hépatiques de transcrits PEPCK faibles comparés à des animaux témoins. Par ailleurs une mutation ponctuelle des sites CRE-1, P3(I) ou des deux ensemble provoquent une diminution de l'ordre de 50% de l'activité du promoteur en réponse à l'exercice (Friedman, 1994, Nizielski et al., 1996). Ceci suggère l'implication de C/EBP- $\beta$  d'autant que la transcription de son gène et son abondance nucléaire augmentent à l'exercice.

Il a été montré récemment que le coactivateur transcriptionnel *Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) *coactivator alpha* (PGC-1 $\alpha$ ) joue un rôle clé dans le contrôle de l'homéostasie du glucose en période de jeûne (Yoon et al., 2001). Chez la souris, la privation alimentaire provoque une augmentation des ARNm codant les enzymes de la néoglucogenèse et PGC-1 $\alpha$ . L'injection d'un vecteur adénoviral codant PGC-1 $\alpha$  à des rats provoque une augmentation des ARNm de PEPCK et G6Pase, entraînant une augmentation de la glycémie et de l'insulinémie. L'activation hépatique de PGC-1 $\alpha$  par le jeûne est déclenchée par une augmentation de l'AMPc via la voie de signalisation PKA/*cAMP responsive element binding protein* (CREB) (Herzig et al., 2001), sous contrôle



**Figure 6** : Schéma du rôle joué par *peroxisome proliferator activated receptor* (PPAR) gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) dans le contrôle de la néoglucogenèse lors de la privation alimentaire. Les catécholamines et de glucagon augmentent la concentration d'AMP cyclique (cAMP) cytoplasmique, induisant la phosphorylation du *cAMP response element binding protein* (CREB) qui pénètre dans le noyau et induit la transcription du gène PGC-1 $\alpha$ . La protéine PGC-1 $\alpha$  se lie aux facteurs de transcription PPAR $\alpha$ , *hepatic nuclear factor 4* (HNF4) ou le récepteur aux corticoïdes (GR) pour induire l'expression des gènes de la néoglucogenèse comme phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (Puigserver et Spiegelman, 2003).

de la *mitogen activated protein* kinase (MAPK) p38 (Cao et al., 2005). PGC-1 $\alpha$  est un coactivateur de transcription et ne possède aucun site de fixation sur les promoteurs de ses gènes cibles. Il agit donc en se liant à des facteurs de transcription dont il favorise l'action. Dans le foie, les trois partenaires de PGC-1 $\alpha$  impliqués dans l'activation de la néoglucogenèse sont le récepteur *Hepatic nuclear factor 4 alpha* (HNF-4 $\alpha$ ), les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) et le facteur de transcription *forkhead box-containing protein, O sub family-1* (FOXO-1) (Yoon et al., 2001, Puigserver et al., 2003, Rhee et al., 2003) (figure 6). Une interaction originale avec la sirtuine SIRT-1 a été décrite. SIRT-1 est une molécule de la famille des *histone deacetylases* (HDAC) qui est aussi capable de déacétyler PGC-1 $\alpha$ . SIRT-1 module l'activité de PGC-1 $\alpha$  en réponse à des stimuli nutritionnels (jeûne ou pyruvate), en augmentant sa capacité à activer les gènes de la néoglucogenèse, mais pas ceux de la biogenèse mitochondriale (Rodgers et al., 2005). Enfin le récepteur aux acides biliaires *Farnesoid X receptor* (FXR) est fortement impliqué dans l'homéostasie du glucose (Ma et al., 2006). Il existe des résultats contradictoires concernant l'effet de l'activation de ce récepteur. Des ligands de FXR ont été impliqués soit dans une augmentation (Stayrook et al., 2005) soit une diminution (Ma et al., 2006) des ARNm codant PEPCK. Dans cette dernière étude l'activation de FXR s'accompagnait aussi d'une diminution de la transcription hépatique de PGC-1 $\alpha$  et HNF-4 $\alpha$ .

**En somme, le contrôle de la glycémie à l'exercice repose directement sur la capacité du foie à libérer du glucose par glycogénolyse et néoglucogenèse. Les voies de contrôles de la PHG au repos, en particulier les hormones pancréatiques, les glucocorticoïdes et les catécholamines sont impliquées à des degrés divers mais il est admis qu'elles ne peuvent rendre compte de la totalité des observations expérimentales. L'existence d'un « work factor » ou « exercise factor », probablement issu du muscle, a été proposée pour expliquer la capacité qu'à un muscle dénervé et stimulé à moduler à distance des grandes fonctions physiologiques (Pedersen et al., 2004). Ces dernières années une cytokine, l'interleukine-6, a été identifiée comme un facteur issu du muscle qui constituerait un candidat potentiel comme signal destiné à d'autres organes pendant l'exercice.**

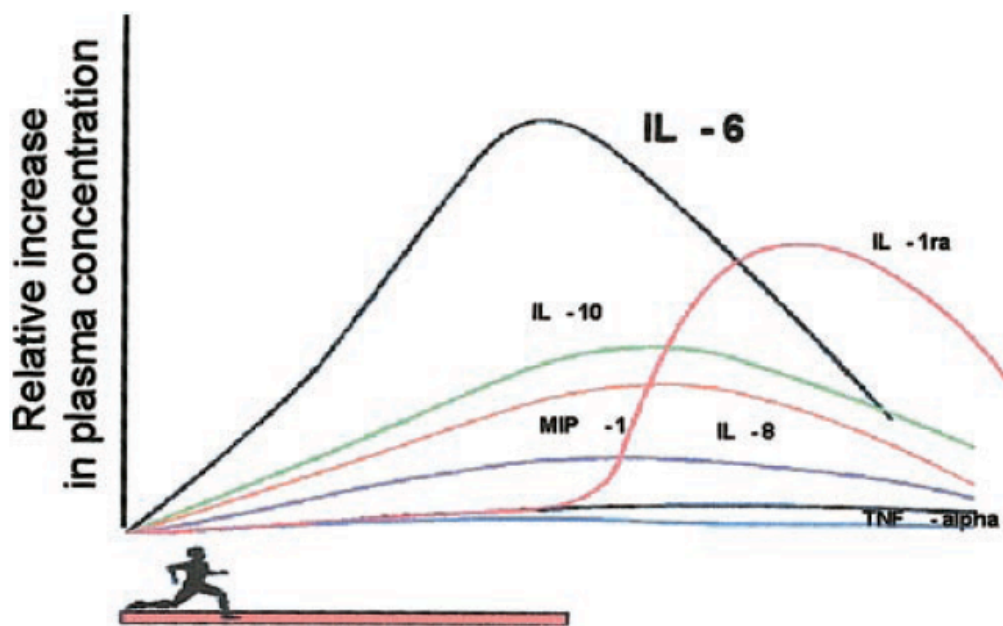


Figure 7 : Evolution des concentrations plasmatique de diverses cytokines en réponse à un exercice (augmentation relative par rapport au repos). Sont représentés les interleukines (IL) 6, 8 et 10, l'IL-1 receptor antagonist (IL-1ra), le tumor necrosis factor (TNF) alpha et macrophage inflammatory protein (MIP) (Febbraio et Pedersen, 2002).



## **2. INTERLEUKINE-6 ET EXERCICE MUSCULAIRE**

### **2.1. CYTOKINES ET EXERCICE**

Pour qu'un système complexe comme le système immunitaire puisse fonctionner, il faut que les différentes cellules qui le composent puissent se reconnaître et s'adresser des messages qui déclenchent, activent ou inhibent des réactions cellulaires. Les cytokines sont de petites protéines qui constituent le support de cette communication intercellulaire. Initialement décrites dans le système immunitaire, leur actions sont plus vastes et elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions (prolifération et différenciation cellulaire, hématopoïèse, neurogenèse ...).

Un ensemble de recherches récentes montre qu'il existe une augmentation de la concentration plasmatique de diverses cytokines au cours et au décours d'un exercice physique (figure 7) notamment s'il est soutenu et prolongé (Drenth et al., 1995, Castell et al., 1997, Ostrowski et al., 1998a). Normalement absents du plasma ou présents en très faible quantité chez le sujet sain au repos, l'IL-6, le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine-10 (IL-10), l'*interleukin-1 receptor antagonist* (IL-1ra) et le récepteur soluble du TNF ou l'IL-8 peuvent apparaître au cours ou au décours de l'exercice. Le TNF- $\alpha$  est retrouvé de façon inconstante, en quantité modérée, après des exercices très prolongés. Les cytokines dites anti-inflammatoires (l'IL-10, IL-1ra et TNF-R) apparaissent plus tardivement au cours de l'exercice ou après l'arrêt de l'exercice (Ostrowski et al., 1998a, Ostrowski et al., 1999). Parmi les cytokines citées plus haut, l'IL-6 semble avoir une place très particulière car c'est la plus constamment retrouvée, son pic plasmatique est très important et son apparition est la plus précoce.

L'amplitude du pic d'IL-6 plasmatique dépend du type d'exercice. Un exercice excentrique provoque une sécrétion d'IL-6 qui perdure après l'arrêt de l'exercice, d'amplitude souvent modérée et décroissant lentement pendant la récupération (Bruunsgaard et al., 1997). L'exercice excentrique, connu pour provoquer des micro-lésions musculaires, est à l'origine de phénomènes inflammatoires locaux susceptibles de recruter des cellules immunitaires dont le rôle est alors d'assurer la capture et l'évacuation des débris cellulaires et d'initier la réparation tissulaire par le recrutement de cellules myogéniques. Dans ce type d'exercice, l'importance de la sécrétion d'IL-6 est corrélée à la créatine kinase plasmatique,

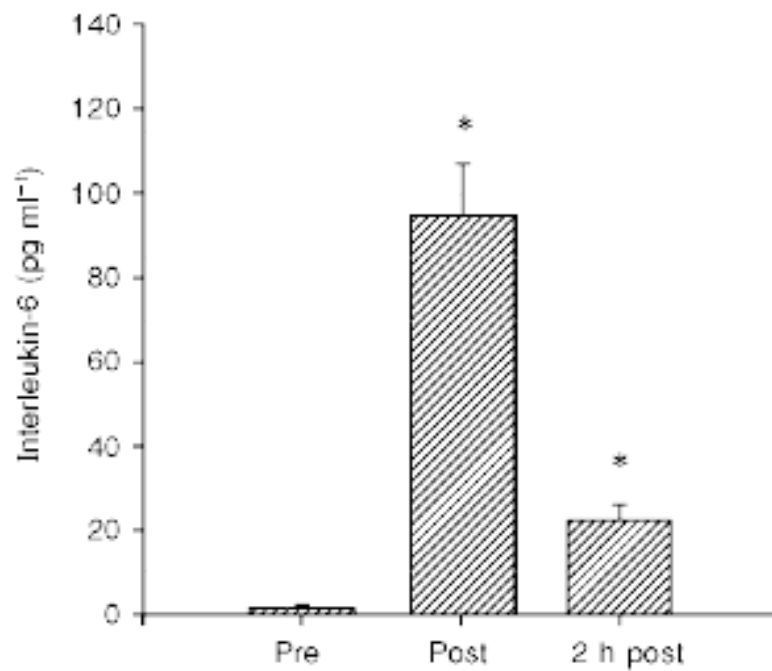


Figure 8 : Concentrations plasmatiques d'IL-6 avant (Pre), à l'arrêt (Post) et 2 heures après (2 h post) l'arrêt d'un marathon (Ostrowski et al., 1998).

marqueur biochimique indirect des lésions musculaires (Bruunsgaard et al., 1997, Nieman et al., 2005). L'IL-6 et le TNF- $\alpha$ , produits alors par les cellules monocytaires infiltrantes, semblent jouer un rôle important dans l'activation et le recrutement des cellules satellites (Merly et al., 1999). Cependant ces événements ont lieu dans les heures ou jours qui suivent l'exercice et ne constituent pas le propos de cette revue de question que nous cantonnerons aux exercices concentriques prolongés, bien tolérés, au cours desquels IL-6 joue un rôle physiologique très différent.

## **2.2. INTERLEUKINE-6 : UNE MYOKINE**

L'IL-6 est une cytokine qui peut-être produite par les cellules immunitaires mais également par un grand nombre d'autres cellules (chondrocytes, ostéoblastes, cellules  $\beta$  pancréatiques, thyrocytes, fibroblastes....) en réponse à des stimuli très divers (Kamimura et al., 2003). Elle appartient à une grande famille de molécules, dont l'IL-11, le *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) , le *leukemia inhibitory factor* (LIF) ou le *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) qui présentent des similarités de structure tridimensionnelle et qui partagent une même sous-unité de récepteur appelée *Glycoprotein 130* (GP130) (Akira, 1997). L'IL-6 est considérée comme une cytokine «répondant à l'inflammation ». En effet elle est sécrétée en réponse à des cytokines ou des stimuli de type pro-inflammatoires, mais elle est à l'origine de la mise en œuvre d'événements modérateurs de la réaction inflammatoire (sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, libération par le foie des protéines de la phase aiguë de l'inflammation).

### **A. UNE MOLECULE ISSUE DU MUSCLE**

Lors d'un exercice concentrique, la concentration plasmatique d'IL-6 augmente après 30 à 90 min d'exercice (Keller et al., 2001, Steensberg et al., 2001a) et le pic est ample et maximal à l'arrêt de l'épreuve. Il diminue ensuite rapidement avec un retour vers les valeurs de repos observé dans les deux heures qui suivent l'arrêt de l'exercice (figure 8) (Ostrowski et al., 1998a). L'augmentation des ARNm est détectée dès 30 min après une série d'électrostimulations sur muscle isolé chez le rongeur (Jonsdottir et al., 2000) ou d'exercice chez

l'homme (Steensberg et al., 2002). Il n'existe par ailleurs aucune corrélation avec les marqueurs classiques de lésions myocytaires (Ostrowski et al., 1998a). La production d'IL-6 dans ce type d'épreuve n'est donc pas en relation avec d'éventuelles atteintes cellulaires induites par l'exercice. Par contre, le pic plasmatique d'IL-6 est d'autant plus marqué que l'intensité de l'exercice (Ostrowski et al., 2000) et la masse musculaire sollicitée sont importantes (Helge et al., 2003).

Il est désormais acquis que le muscle actif est responsable de la sécrétion d'IL-6. Dans ce strict contexte d'exercice parfaitement toléré, l'hypothèse initialement émise d'une production par les leucocytes circulants en réponse à des lésions du muscle a été largement infirmée (Ullum et al., 1994, Moldoveanu et al., 2000, Starkie et al., 2001a, Starkie et al., 2001b). La mise en évidence d'une augmentation importante des ARNm codant IL-6 dans des biopsies de muscle permet d'affirmer que ce dernier est bien un lieu de production de la molécule chez l'homme pendant l'exercice (Ostrowski et al., 1998b, Keller et al., 2001) et chez l'animal pendant l'électro-stimulation (Jonsdottir et al., 2000). Par ailleurs, la mesure de la différence artério-veineuse fémorale de concentration d'IL-6 lors d'un exercice des membres inférieurs montre que le muscle contribue très largement à la concentration élevée mesurée dans le plasma (Steensberg et al., 2000, Steensberg et al., 2001a). Lors d'une expérimentation où des sujets réalisent un exercice de pédalage avec un membre inférieur uniquement, seul ce dernier libère de l'IL-6 (Steensberg et al., 2000), démontrant que cette libération est liée (en grande partie au moins) à la contraction musculaire elle-même et non à des facteurs systémiques liés à l'exercice. Les mouvements de calcium au sein des fibres musculaires ou la production locale de radicaux libres ont été proposés comme facteurs déclenchant l'expression du gène (Febbraio et Pedersen, 2002). Cependant l'ensemble de ces données ne permet pas de répondre à la question de l'origine cellulaire de la production d'IL-6 et des voies de contrôle de l'expression du gène. Le muscle est en effet composé certes de myocytes, mais aussi de nombreux autres types cellulaires susceptibles de produire IL-6 en grande quantité et en réponse à des stimuli très variés.

### ***B. UNE MOLECULE SIGNAL DES RESERVES ENERGETIQUES***

Une avancée importante dans l'identification du rôle biologique de l'IL-6 a été réalisée dès lors qu'il a été montré que l'ingestion d'hydrates de carbone (glucides) au cours d'exercices prolongés diminuait significativement la concentration plasmatique d'IL-6

(Nehlsen-Cannarella et al., 1997) mais pas la transcription du gène dans les muscles actifs (Starkie et al., 2001a). Certains auteurs ont alors postulé que les catécholamines circulantes, dont le pic plasmatique est fortement diminué par l'ingestion de glucose, pouvaient être responsables de la libération d'IL-6 (Nehlsen-Cannarella et al., 1997). Cependant, le faible pic plasmatique d'IL-6 obtenu par perfusion d'adrénaline à des sujets au repos suggère que le rôle des catécholamines circulantes n'est pas déterminant (Steensberg et al., 2001b). Très vite, on en est arrivé à la notion que le contenu en glycogène du muscle avant l'exercice, pouvait jouer un rôle déterminant dans la production d'IL-6 ; on a en effet pu montrer que chez des sujets réalisant un exercice dans une situation contrôle et dans une situation de déplétion préalable des muscles en glycogène (après une combinaison d'un exercice épuisant et d'un régime alimentaire pauvre en hydrates de carbone), la concentration plasmatique d'IL-6 et sa libération par les muscles sollicités étaient significativement plus élevées chez les sujets présentant de faibles réserves musculaires en glycogène avant l'exercice (Keller et al., 2001). Afin d'étudier l'effet propre du contenu en glycogène du muscle, des sujets ont réalisé un exercice avec un seul membre préalablement appauvri en glycogène. Dans ces conditions expérimentales, les membres étaient exposés aux mêmes facteurs circulants, mais le membre appauvri en glycogène sécrétait de l'IL-6 plus précocement et en quantité plus importante (Steensberg et al., 2001a). L'ensemble de ces résultats impliquant la disponibilité du glucose et le glycogène musculaire ont incité plusieurs auteurs à évoquer un possible rôle de l'IL-6 dans la régulation de la disponibilité du glucose à l'exercice (Pedersen et al., 2001, Febbraio et Pedersen, 2002). En effet, comme nous le détaillerons dans le chapitre 3 (« IL-6 et production hépatique de glucose ») de cette partie, IL-6 peut dans certaines conditions favoriser la libération de glucose par les hépatocytes (Ritchie, 1990, Tsigos et al., 1997, Kanemaki et al., 1998). D'autre part, de nombreuses études suggèrent que les modifications hormonales (Howlett et al., 1999) ou la stimulation nerveuse orthosympathique (Sigal et al., 2000) observées à l'exercice ne peuvent rendre compte à elles seules de l'augmentation très importante de la production hépatique de glucose. Enfin, il a été montré que la sphère hépatosplanchnique puise de l'IL-6 dans la circulation à l'exercice (Febbraio et al., 2003). L'ensemble de ces données permet d'envisager l'IL-6 comme une molécule de signalisation produite par le muscle, lieu de consommation du glucose, et agissant à distance par voie endocrine sur le foie, organe

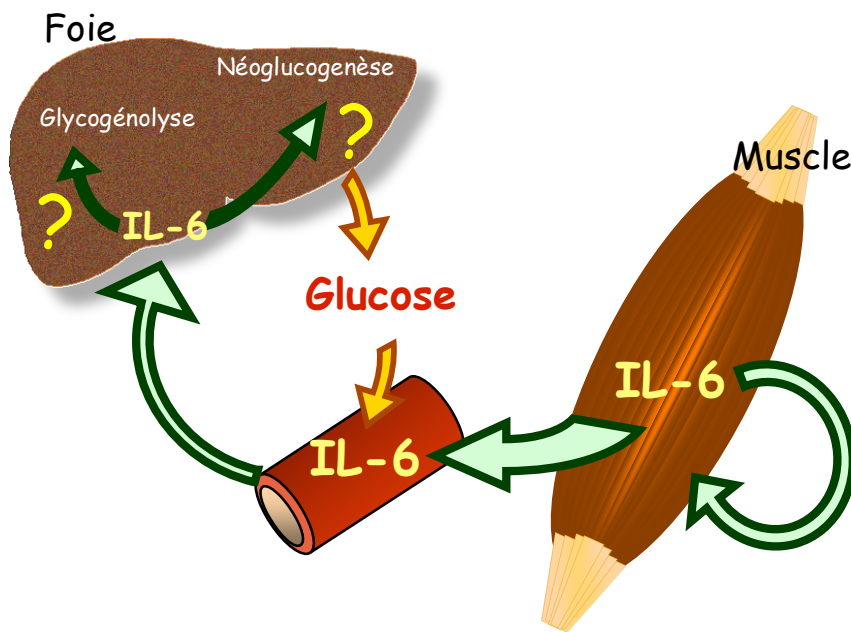


Figure 9 : Schéma du rôle proposé pour IL-6 au cours d'un exercice prolongé. IL-6 est produite par les muscles actifs en réponse à la contraction et à la baisse de leurs réserves en glycogène. IL-6 agit sur le muscle lui-même pour favoriser la captation du glucose. Elle agit également par voie endocrine sur le foie pour favoriser la production hépatique de glucose.

capable de fournir ce substrat (figure 9). La démonstration de cette signalisation a été faite chez l'homme où lors d'un exercice d'intensité modérée réalisé avec une perfusion soit de sérum physiologique soit d'IL-6, la production endogène de glucose, dont la seule origine possible est le foie, est significativement plus élevée avec IL-6 (Febbraio et al., 2004). IL-6 posséderait aussi des effets sur le métabolisme des acides gras, favorisant la lipolyse (van Hall et al., 2003, Petersen et al., 2005). Même si cet effet sur la mobilisation des acides gras semble moins important lors de l'exercice, il agit aussi dans le sens de la mise à disposition de substrats énergétiques pour le muscle qui travaille.

### ***C. L'ORIGINE CELLULAIRE DE L'IL-6 MUSCULAIRE***

Le tissu musculaire est composé en grande partie de fibres musculaires, véritables éléments fonctionnels de l'organe, mais aussi de nombreuses autres cellules formant le réseau vasculaire (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales), le tissu de soutien (fibroblastes) et de cellules satellites. Toutes ces cellules sont capables de sécréter des cytokines en grande quantité, dont IL-6, en particulier en réponse à des stimulations de type inflammatoire (Heinrich et al., 1998). La question de l'origine cellulaire de la production d'IL-6 lors de la contraction musculaire est donc cruciale pour l'interprétation du rôle joué par cette cytokine, car la signification physiologique de ce signal ne serait pas la même pour une protéine produite par les myocytes ou par exemple par des cellules vasculaires. Chez l'homme, un marquage immuno-histochimique de l'IL-6 montre la présence de la protéine dans le cytoplasme des myocytes au décours d'un exercice, sans différence de marquage entre les différents types de fibres (Penkowa et al., 2003) ou de façon prédominante dans les fibres lentes (Fischer et al., 2004). Cependant, seule la présence d'ARNm permet d'affirmer que la protéine visible est bien produite dans la cellule en question. Ainsi, l'hybridation in situ a permis de mettre en évidence la présence d'ARNm codant IL-6 dans les fibres musculaires sur une biopsie humaine obtenue à l'arrêt d'un exercice. Cependant cette méthode est descriptive et ne permet pas de quantification du niveau de transcription du gène cible (Hiscock et al., 2004). Étonnamment, le marquage prédomine dans les fibres rapides qui ont par ailleurs un contenu en glycogène bien conservé. Si l'IL-6 agit comme un signal sensible au niveau énergétique de la cellule, il est licite de penser que les fibres lentes à métabolisme oxydatif, fortement impliquées dans les exercices endurants, les plus précocement recrutées, et donc les plus rapidement appauvries en glycogène, sont plus

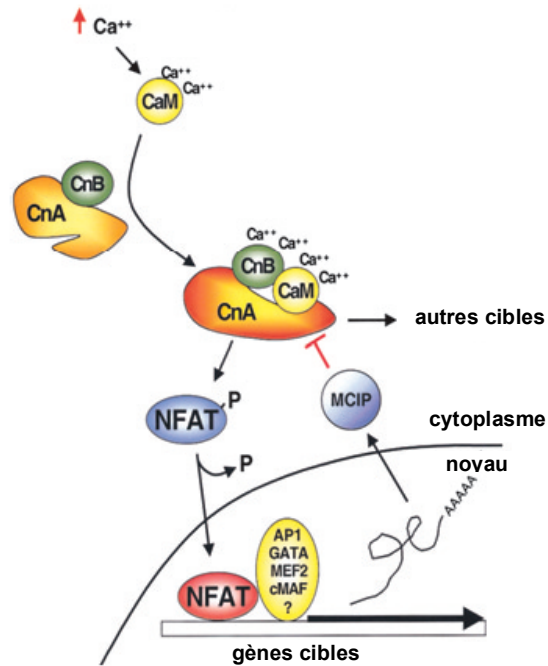


Figure 10 : Schéma général de la voie de signalisation calcineurine-*nuclear factor of activated T cells* (NFAT). La calcineurine inactive, constituée d'une sous-unité catalytique *calcineurin A* (CnA) et d'une sous-unité régulatrice *calcineurin B* (CnB), est activée par la fixation de  $Ca^{2+}$  et de calmoduline (CaM). La déphosphorylation de *nuclear factor of activated T-cell* (NFAT) permet son entrée dans le noyau où il s'associe avec d'autres facteurs de transcription et se fixe sur les promoteurs de ses gènes cibles. Parmi ces gènes, *modulatory calcineurin-interacting protein-1* (MCIP-1) établit une boucle de rétro-contrôle en inhibant calcineurine (d'après Rothermel et al., 2003).

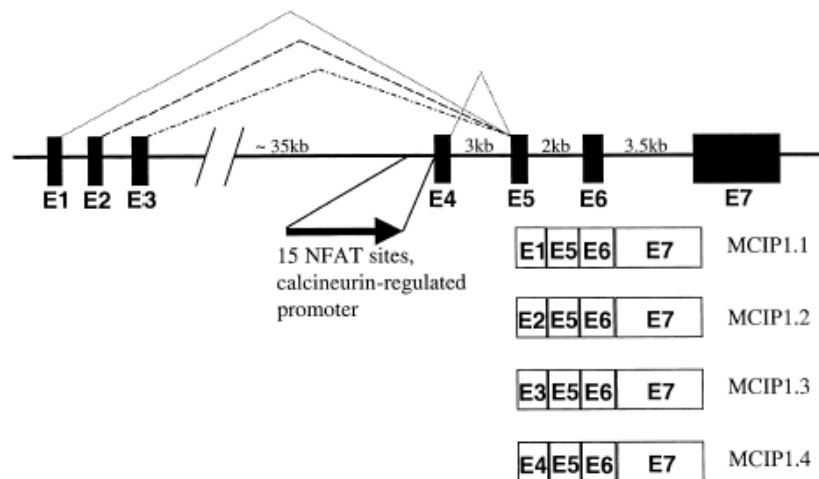


Figure 11 : Organisation du gène humain codant *modulatory calcineurin-interacting protein-1* (MCIP-1) montrant les 4 exons initiaux possibles (E1 à E4) et les 3 exons communs à toutes les formes (E5 à E7). Sont ainsi décrits 4 variants (MCIP1.1, MCIP1.2, MCIP1.3 et MCIP1.4). Le variant 4 est sous le contrôle d'un promoteur comportant 15 sites de fixation pour *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) (Rothermel et al., 2003).



facilement capables de produire IL-6 que les fibres glycolytiques rapides moins sollicitées dans les exercices prolongés.

*La première question abordée dans ce travail de thèse était donc celle de l'origine cellulaire d'IL-6 dans le muscle à l'exercice et de la spécificité de production en fonction du type de fibres musculaires.*

## **2.3. LE CONTROLE DE LA TRANSCRIPTION DU GENE IL-6 A L'EXERCICE**

### **A. VOIES DE SIGNALISATION ACTIVEES A L'EXERCICE**

Depuis quelques années, les voies de signalisations intracellulaires activées au cours de la contraction musculaire ont été largement étudiées aussi bien chez l'animal que chez l'homme, il apparaît que de nombreuses voies peuvent être activées par des stimuli très différents (Koulmann et Bigard, 2006). De plus, il existe des signalisations croisées entre ces voies, avec des interactions complexes et parfois contradictoires. Par souci de concision, nous nous attacherons à la revue des mécanismes bien décrits dans le cadre d'exercices endurants, sans composante excentrique majeure, qui constituent le cadre des travaux menés au cours de cette thèse.

*Les voies dépendantes du calcium.* Lors de la contraction, les fibres musculaires sont le lieu de nombreux événements moléculaires découlant de la stimulation des fibres par leurs motoneurones et sont soumises à de nombreuses contraintes de type métabolique ou mécanique. L'exercice en endurance recrute préférentiellement les fibres les plus lentes, qui se contractent sous l'effet d'une stimulation à basse fréquence des motoneurones, provoquant des mouvements calciques lents et d'amplitude modérée. Ce type de variation de la concentration intra-cellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) active la voie de la calcineurine (figure 10). Cette serine/threonine phosphatase joue un rôle de première importance dans le muscle strié squelettique adulte où elle est impliquée dans le contrôle combiné de l'expression de gènes codant pour des protéines contractiles ou métaboliques caractéristiques du phénotype lent/oxydatif (Chin et al., 1998, Bigard et al., 2000, Bassel-Duby et Olson, 2003). Elle agit principalement par activation (déphosphorylation) de facteurs de transcription de la famille

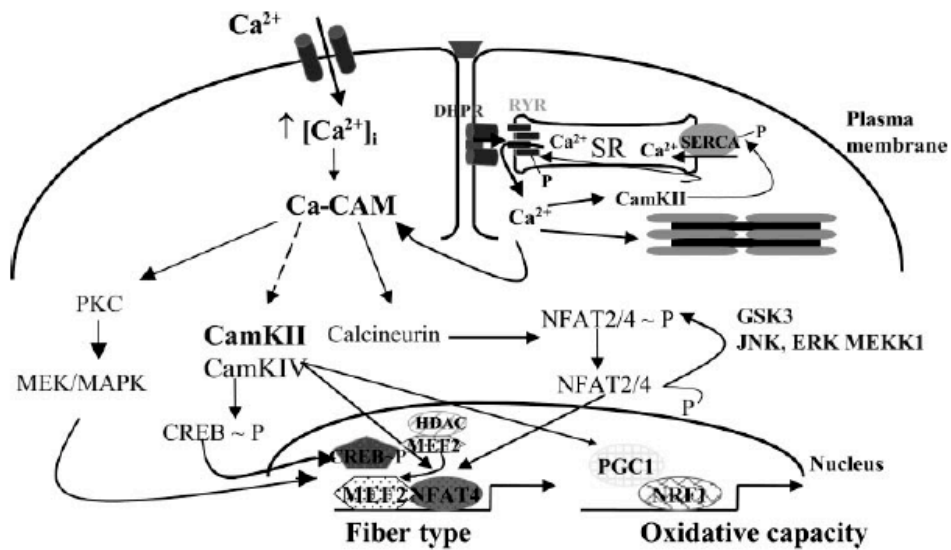


Figure 12 : Schéma représentant les voies de signalisations dépendantes du calcium (*Calcineurin- nuclear factor of activated T-cells (NFAT)*,  $Ca^{2+}$  *calmodulin dependent kinases (CaMK)* II et IV, et *Protein kinase C (PKC)* activées par la contraction musculaire (Chin, 2005).

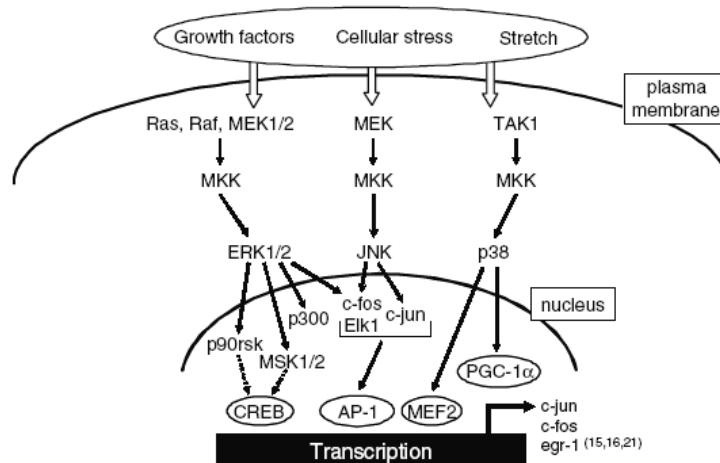


Fig. 3 Schematic diagram summarizing the involvement of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways in skeletal muscle. Members of the MAPK family are activated through phosphorylation by specific upstream MAPK-kinases and MAPK-kinase-kinases. Only relevant MAPKs are reported, including their presumed substrates. Each phosphorylated MAPK can be translocated to the nucleus, where they are able of regulating the activity of various transcription factors. Whether or not MAPK downstream substrates induce CREB phosphorylation through p90rsk and/or MSK1/2 in vivo remains to be clarified. MAPKs are mainly

involved in targeting specific transcription factors that bind to characteristic elements in promoters, such as AP-1, MEF2, CREB, PPARs, NFATs and PGC-1 $\alpha$ . Some of the downstream target genes of MAPKs through AP-1 activation, regardless of other transcription factors, are reported at the bottom of the figure. *Ras*, *Raf* serine/threonine kinases; *MEK* MAPK/ERK kinase; *ERK1/2* extracellular-signal-regulated kinase 1/2; *JNK* c-jun N-terminal kinase; *MSK1/2* mitogen- and stress-activated kinase 1/2; *p90rsk* p90 ribosomal S6 kinase; *CREB* cAMP-response element-binding protein; *MEF2* myocyte enhancer factor 2

Figure 13 : Schéma de l'implication des Mitogen-activated protein kinase (MAPK) dans les processus adaptatifs liés à l'exercice dans le muscle (Koulmann et Bigard, 2006).

*nuclear factor of activated T cells* (NFAT), qui sont alors capables de pénétrer dans le noyau. Ils s'associent alors à d'autres facteurs de transcription *myocyte enhancer factor-2* (MEF-2), GATA-4, *activator protein-1* (AP-1) et se fixent sur les promoteurs de leurs gènes cibles pour stimuler leur expression. Par ailleurs la calcineurine active MEF-2 déjà présent dans le noyau. L'activité de la voie de la calcineurine-NFAT peut être modulée à différents niveaux. Il existe ainsi des protéines ou des peptides endogènes qui inhibent la calcineurine en réponse à des stimulations (cain) ou sur le mode d'une boucle de rétrocontrôle comme c'est le cas des peptides *modulatory calcineurin-interacting peptide* (MCIP) 1 et 2 (Liu, 2003, Rothermel et al., 2003). Parmi ces derniers, le variant MCIP-1.4 présente un intérêt notable. Il résulte d'un épissage alternatif du gène, sous le contrôle d'un promoteur comportant 15 sites NFAT (figure 11). L'expression de MCIP-1.4 est donc un reflet fiable de l'activation de la calcineurine, et la mesure des ARNm codant ce variant a été proposée pour évaluer l'activité de la voie de signalisation (Yang et al., 2000). Un autre niveau d'inhibition de la voie calcineurine-NFAT repose sur la capacité qu'on des enzymes comme p38, JNK ou *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3) de déphosphoryler NFAT induisant sa sortie du noyau.

Les mouvements calciques induits par l'exercice sont également capables d'activer d'autres voies de signalisation dépendantes des  $Ca^{2+}$ - *calmodulin-dependent protein kinase* (CaMK) II et IV (figure 12). Une cible importante des CaMK est MEF-2 ; ce facteur de transcription peut être lié dans le noyau à des protéines de la famille des *histone deacetylase* (HDAC) qui ont pour propriété de compacter la chromatine et par là d'inhiber la transcription (Miska et al., 1999). Les mouvements calciques induits par la patron d'activité du motoneurone peuvent activer la CaMK nucléaire qui phosphoryle HDAC permettant sa sortie du noyau et la levée du frein qu'elle exerce (Mejat et al., 2005). Les autres cibles des CaMK sont le facteur de transcription CREB et le coactivateur PGC-1 $\alpha$ . Dans le muscle, les CaMK sont fortement impliquées dans la biogenèse mitochondriale et dans une moindre mesure l'expression de gènes codant pour des protéines contractiles (Chin, 2005).

*Les Mitogen-activated protein kinases (MAPK)*. Les contraintes mécaniques et métaboliques imposées au muscle au cours de la contraction sont susceptibles d'activer des voies de signalisation impliquant la famille des MAPK dont p38, *c-jun N-terminal kinase* (JNK) et ERK 1-2. Ces kinases sont activées selon un schéma général commun, par des

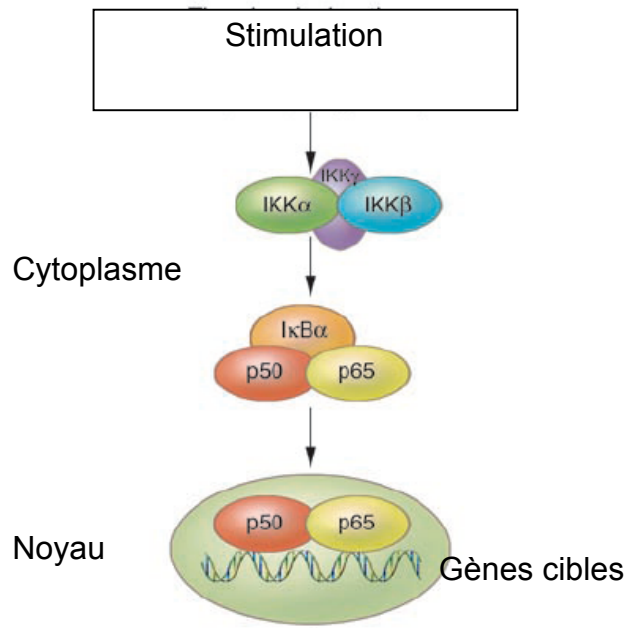


Figure 14 : Voies de signalisation classique impliquant *nuclear factor-κB* (NF-κB). En l'absence de stimulation, les isoformes p50 et p65 de NF-κB sont séquestrées dans le cytoplasme par l'*inhibitor-κB* (IκB). Un stimulus va activer les complexes *IκB Kinases* (IKK) qui phosphorylent IκB, libérant p50 et p65. Ces derniers entrent alors dans le noyau, forment des dimères et se fixent sur les promoteurs de leurs gènes cibles (d'après Viatour et al., 2005).

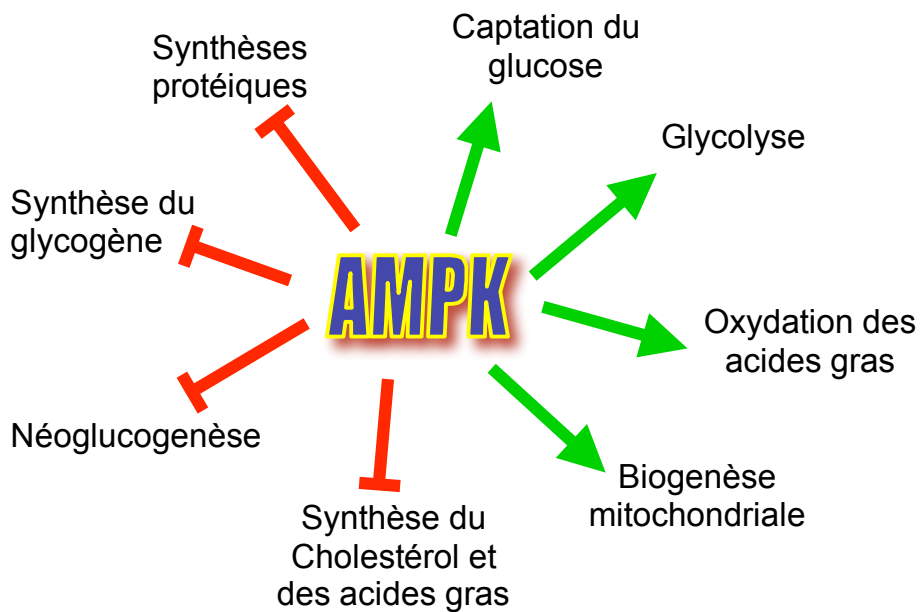


Figure 15 : Processus majeurs du métabolisme énergétique contrôlés par AMPK. Une flèche verte symbolise une activation, une flèche rouge symbolise une inhibition.

cascades de phosphorylations et agissent sur des substrats spécifiques pour moduler l'expression de gènes cibles (figure 13). Les fractions cytosolique et nucléaire de p38 sont phosphorylées en réponse à l'exercice, préférentiellement lors d'épreuves prolongées comportant une composante excentrique ou chez des sujets non ou peu entraînés (Long et al., 2004, McGee et Hargreaves, 2004, Koulmann et Bigard, 2006). La déplétion des réserves musculaires en glycogène est également capable d'activer p38 (Chan et al., 2004b), mais p38 est activée non seulement par des facteurs locaux, mais aussi par des facteurs systémiques car son activation est retrouvée dans des muscles non sollicités par l'exercice (Widegren et al., 1998). Une cible importante de p38 dans le muscle est le facteur de transcription MEF-2 qui est directement activé par phosphorylation. L'existence de cette signalisation a été mise en évidence dans le muscle, à l'exercice, où elle participe à l'augmentation de la transcription du *glucose transporter 4* GLUT-4 (McGee et Hargreaves, 2004). Ceci met en lumière la possibilité de signalisation croisées avec la voie de la calcineurine qui peut également activer MEF-2. Une autre interaction repose sur la capacité qu'a p38 de phosphoryler NFAT induisant son exclusion du noyau (Crabtree, 2001).

*La voie I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B.* Le facteur de transcription *nuclear factor kappa-B* (NF- $\kappa$ B) est impliqué dans nombre de mécanismes liés à l'inflammation, l'immunité ou l'apoptose (Viatour et al., 2005). En l'absence de stimulations, il est séquestré dans le cytoplasme sous forme de dimères par *inhibitor of nuclear factor kappa-B* (I $\kappa$ B)  $\alpha$ . Sous l'effet d'une stimulation le complexe *I $\kappa$ B-kinase* (IKK) phosphoryle I $\kappa$ B qui libère NF- $\kappa$ B. Ce dernier pénètre alors dans le noyau pour y exercer son activité transcriptionnelle (figure 14). Cette voie de signalisation est activée lors d'un exercice d'endurance chez le rat ou par la contraction de muscles ex-vivo, suggérant l'implication de facteurs locaux plus que systémiques. Les MAPK p38 et ERK 1-2 semblent être directement impliquées dans cette signalisation car leur inhibition diminue de façon importante la réponse NF- $\kappa$ B (Ho et al., 2005).

*La voie de l'AMPK.* L'*AMP-activated protein kinase* (AMPK) joue un rôle clé de senseur de l'état énergétique des cellules, en particulier dans la fibre musculaire. Il s'agit d'un hétéro-trimère de sous unités  $\alpha$  (catalytique),  $\beta$  et  $\gamma$  (régulatrices) dont il existe plusieurs isoformes. Dans des situations de déséquilibre énergétique cellulaire, le rapport

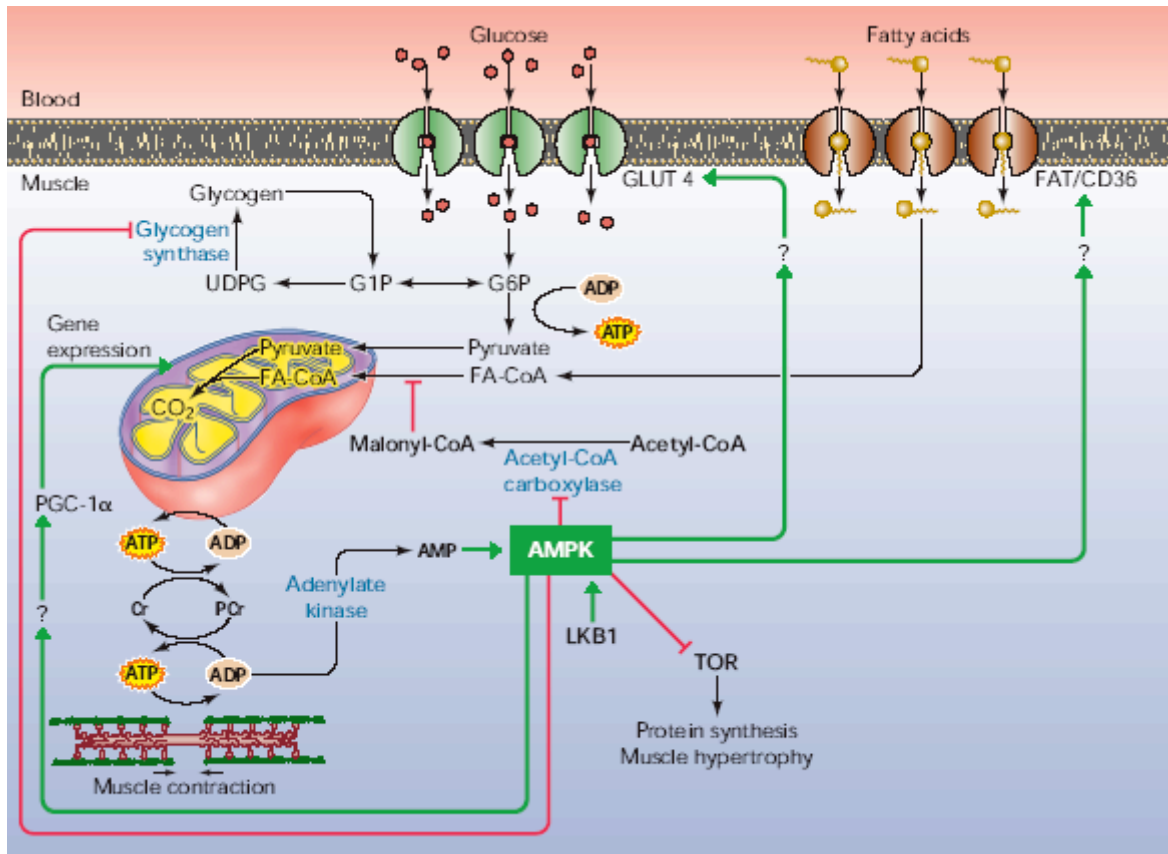


Figure 16 : Changements métaboliques induits par l'activation d'AMPK dans le muscle. Le schéma comprend les effets aigus tels que l'augmentation de la captation du glucose, des acides gras, oxydation de ces derniers, et les effets adaptatifs à long terme comme la biogenèse mitochondriale et l'inhibition de l'hypertrophie (Hardie et Sakamoto, 2006).

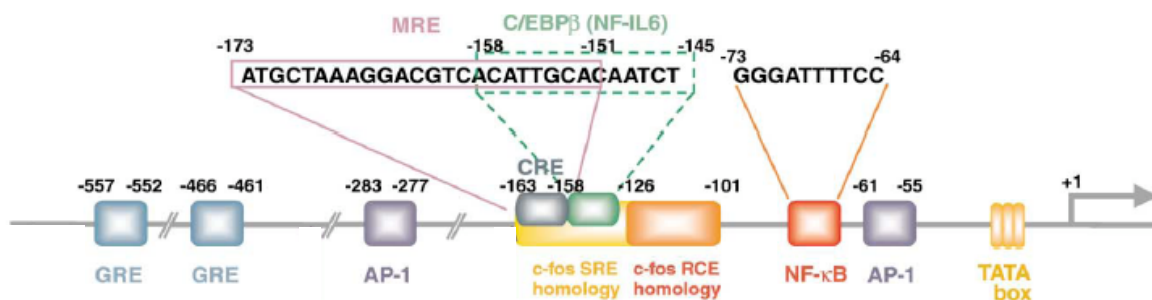


Figure 17 : Schéma du promoteur du gène IL-6 humain. Les sites de fixations des facteurs de transcription sont représentés ainsi que leur position par rapport au site d'initiation de la transcription (+1). GRE : glucocorticoids responsive element, AP-1 : activator protein-1, CRE : cAMP responsive element, C/EBP-β : CAAT/enhancer binding protein β, NF-κB : nuclear factor-κB (Kamimura et Hirano, 2003).

AMP/ATP augmente et l'AMP active AMPK de manière allostérique. Par ailleurs il existe des kinases capables d'activer AMPK plus fortement encore, dont LKB1 et les *CaMK kinases* (CaMKK). AMPK agit comme un intégrateur de l'état énergétique de la cellule et une fois activée elle va stimuler les voies de production de l'ATP, tout en diminuant la consommation d'énergie par des processus cellulaires, de synthèse en particulier, non immédiatement indispensable à la survie cellulaire (figure 15). Dans le muscle squelettique, la sous-unité  $\alpha 2$ -AMPK est activée par l'exercice sous l'effet du déséquilibre de la balance AMP/ATP et peut-être des CaMKK (Hardie et Sakamoto, 2006). Les effets immédiats de l'AMPK visent à favoriser la resynthèse d'ATP au cours de l'exercice. Elle augmente la captation de glucose et d'acides gras, elle stimule la glycolyse et l'oxydation des acides gras, et inhibe la synthèse du glycogène (Hardie et Sakamoto, 2006) (figure 16). AMPK est également impliquée dans les processus adaptatifs à long terme en modulant l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines métaboliques et mitochondriales (Freysenet, 2007).

### **B. CONTROLE DE L'EXPRESSION D'IL-6 : LES DONNEES IN VITRO**

La question des mécanismes moléculaires impliqués dans la transcription du gène IL-6 dans le muscle en contraction a été posée (Febbraio et Pedersen, 2002). Le promoteur du gène IL-6 humain est bien décrit et possède divers sites de fixation pour des facteurs de transcription : *glucocorticoid-responsive element* (GRE), AP-1 binding site, capable de fixer le complexe c-fos/c-jun, un site CRE, des sites C/EBP- $\beta$  et NF $\kappa$ B (figure 17). Des résultats obtenus sur culture de cellules musculaires type C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, L6 ou myotubes humains ont apporté des informations mécanistiques permettant d'émettre des hypothèses sur le contrôle du gène IL-6 dans le muscle. Ces cellules peuvent produire de l'IL-6 en réponse à des stimuli pro-inflammatoires ou des stimulations calciques et via des voies de signalisation variées (tableau 1). Cependant toutes ces études reposent sur des stimulations longues (de plusieurs heures) avec des doses le plus souvent supra-physiologiques d'agents pharmacologiques ou biologiques. D'autre part, il n'existe bien sûr aucun modèle cellulaire qui puisse rendre compte de la complexité des événements qui ont lieu au sein de la fibre musculaire qui se contracte, elle même placée dans un organisme à l'exercice. Il est donc difficile d'extrapoler les résultats obtenus in vitro à ceux décrits in vivo, mais des données sont pourtant

<b>Modèle</b>	<b>Stimulus</b>	<b>Mesure d'IL-6</b>	<b>Voie de signalisation et/ou facteurs de transcriptions</b>	<b>Référence</b>
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	IL-1	ARNm et protéine	p38, ERK1-2 et NFκB	(Luo et al., 2003)
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	Adrénaline	ARNm et protéine	JNK et HDAC	(Frost et al., 2004)
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ARNm et protéine	p38 et AP-1,	(Kosmidou et al., 2002)
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> et muscle in vivo (souris)	LPS, IL-1β et TNF-α	ARNm et protéine	TLR-4 et NFκB	(Frost et al., 2002)
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> et muscle in vivo (souris)	LPS et ligands TLRs	ARNm et gène rapporteur	TLRs et NFκB	(Frost et al., 2006)
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	différenciation	ARNm et gène rapporteur	p38 et NFκB	(Baeza-Raja et Munoz-Canoves, 2004)
C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> , myotubes de rats	Dépolarisation K <sup>+</sup>	ARNm et gène rapporteur	mouvements de Ca <sup>2+</sup> dépendants d'IP3· NFκB, AP-1	(Juretic et al., 2006)
Myotubes humains	Caféine, 4-chloro- <i>m</i> -cresol (agoniste RYR)	Protéine	calcineurine	(Ducreux et al., 2004)
Muscle soleus isolé (rat)	ionomycine	ARNm et protéine	?	(Holmes et al., 2004)
muscle in vivo (homme)	Adrénaline	protéine	?	(Steensberg et al., 2001)
muscle in vivo (homme)	IL-6	ARNm	?	(Keller et al., 2003)

Tableau 1 : Synthèse des stimuli, voies de signalisation et facteurs de transcription connus pour stimuler l'expression d'IL-6 dans des cellules musculaires.

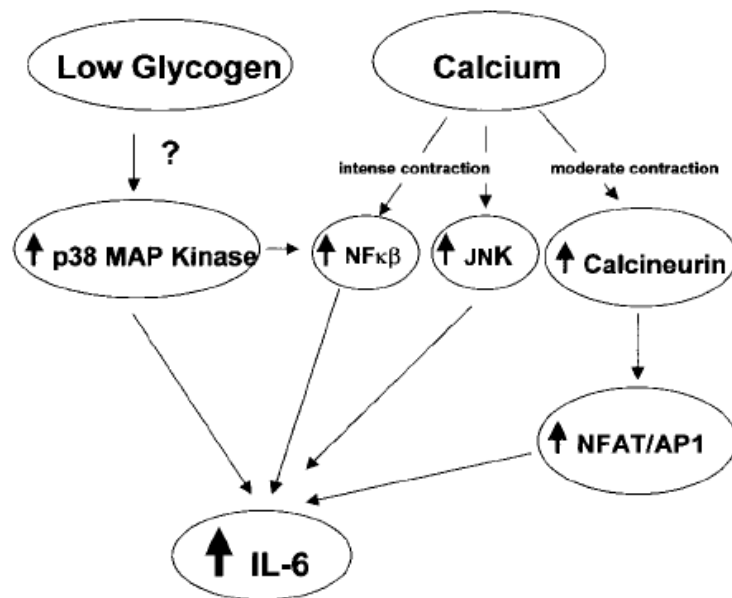


importantes à retenir : 1) les cellules musculaires sont capables de produire IL-6 ; 2) les MAPK (en particulier p38) et NFκB sont souvent impliqués ; 3) les mouvements intracellulaires de calcium sont capables d'induire la production d'IL-6.

### ***C. REGULATION IN VIVO***

Sur la base d'une partie de ces résultats et des connaissances concernant la production de cytokines comme IL-2 par les cellules immunitaires, un premier modèle de contrôle de l'expression du gène IL-6 à l'exercice a été proposé par Febbraio et Pedersen (Febbraio et Pedersen, 2002) (figure 18). Parce que l'activation du gène IL-6 est très précoce au cours de l'exercice (Keller et al., 2001), ce modèle propose que le *primum movens* de la transcription du gène sont les mouvements calciques cytoplasmiques, événements clé et immédiats de la contraction myocytaire participant au contrôle de nombreux gènes en réponse à la stimulation motoneuronale (Berchtold et al., 2000). L'implication de la voie de la calcineurine dans le contrôle du gène IL-6 a été proposée car elle est activée dans les fibres lentes recrutées à l'exercice endurant et déclenche la transcription de gènes codant pour d'autres cytokines (comme IL-2) dans les cellules immunitaires (Febbraio et Pedersen, 2002). Cette hypothèse est étayée par une étude où des myotubes humains stimulés par un agoniste du récepteur à la ryanodine produisent de l'IL-6, cet effet disparaissant en présence de cyclosporine A (CsA), un inhibiteur de la calcineurine (Ducreux et al., 2004). Cette donnée obtenue *in vitro* est plus proche des mouvements calciques physiologiques que ceux décrits dans des études utilisant des ionophores calciques (tableau 1) qui induisent des augmentations considérables et parfois léthales de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Cependant il n'existe pas d'arguments expérimentaux, obtenus *in vivo* à l'exercice, qui permettent d'appuyer cette hypothèse. Quand l'exercice se prolonge, les réserves musculaires en glycogène diminuent et le modèle propose alors une activation supplémentaire de la transcription du gène IL-6 par la voie p38, peut-être via le facteur NFκB. Une étude a depuis montré une augmentation de la phosphorylation de p38 dans des muscles appauvris en glycogène chez l'homme et une forte corrélation entre les niveaux d'ARNm codant IL-6 et phospho-p38 nucléaire (Chan et al., 2004b).

***S'appuyant sur l'hypothèse de Febbraio et Pedersen proposant l'implication de la calcineurine dans la transcription du gène IL-6, un autre objectif de ce travail de thèse***



**Figure 18** : Schéma hypothétique du contrôle du gène IL-6 dans le muscle à l'exercice. Lors d'un exercice d'intensité modérée, les mouvements lents du  $\text{Ca}^{2+}$  stimulent la transcription du gène IL-6 via la voie calcineurine/ *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT). Lors d'exercices intenses, les mouvements amples et rapides du  $\text{Ca}^{2+}$  stimulent la transcription du gène IL-6 via *c-jun N terminal kinase* (JNK) ou *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B). Parallèlement, l'appauvrissement du muscle en glycogène active p38 qui contribue à stimuler l'expression d'IL-6, directement ou indirectement via NF- $\kappa$ B (Febbraio et Pedersen, 2002).

*était d'évaluer in vivo le rôle joué par cette voie de signalisation au sein du muscle au cours de l'exercice.*

## **2.4. IL-6 ET SIGNALISATION AUTOCHRINE MUSCULAIRE**

### **A. EXISTENCE D'UNE SIGNALISATION MUSCULAIRE**

Le muscle est le site de production principal d'IL-6 en réponse à l'exercice. Si les concentrations plasmatiques d'IL-6 sont bien décrites, les concentrations intra musculaires le sont moins. Une seule étude utilisant la microdialyse a montré que les concentrations d'IL-6 dans le liquide interstitiel sont très importantes, même en réponse à un exercice très modéré qui ne provoque pas de libération de la cytokine dans le plasma (Rosendal et al., 2005). Ce travail suggère qu'IL-6 pourrait induire localement une signalisation de type auto ou paracrine même en l'absence d'effet endocrine, hypothèse confortée par le fait que l'exercice induit une augmentation de l'expression du récepteur IL-6 dans le muscle (Keller et al., 2005). L'augmentation de l'ARNm IL-6R débute 90 min après la fin de l'exercice, l'expression de la protéine à la membrane des myocytes est maximale dans les heures suivant l'exercice (6h à 9h) suggérant un rôle d'IL-6 dans la phase de récupération post-exercice, peut-être pour la reconstitution des réserves en glycogène (Keller et al., 2005).

### **B. DONNEES IN VITRO ET IN VIVO**

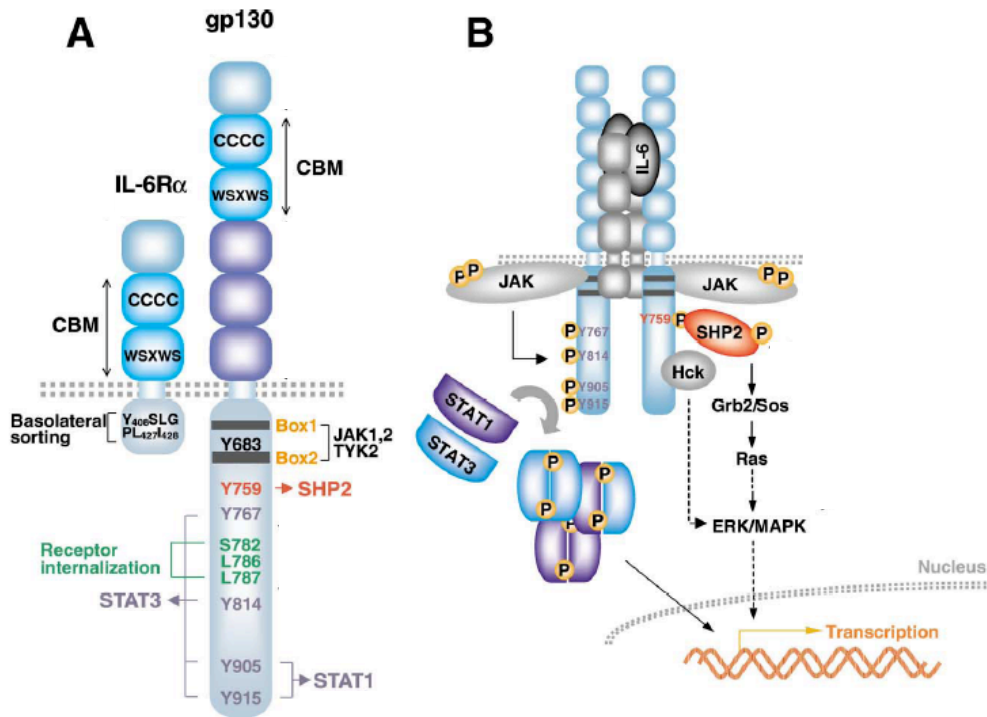
Des études réalisées sur modèle cellulaire (myotubes humains, L6 ou C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) montrent qu'IL-6 est capable d'augmenter les flux de glucose dans la cellule via une interaction avec la voie de transduction du signal insulinique *Insulin receptor substrate-1* IRS-1 et Akt (Weigert et al., 2005, Weigert et al., 2006). Des cellules L6 ou des myotubes humains voient leur réponses à l'insuline (captation de glucose, translocation de GLUT-4 à la membrane, synthèse du glycogène et oxydation du palmitate) augmentées de manière dose dépendante par la co-administration d'IL-6 (Al-Khalili et al., 2006, Carey et al., 2006). Ces effets reposent largement sur l'activation de l'AMPK par IL-6 via une signalisation encore mal comprise. Ces données contrastent cependant avec celles obtenues in vitro par d'autres équipes (Rieusset et al., 2004) ou chez la souris in vivo lors d'un clamp insulinique, où au contraire l'administration d'IL-6 réduit la sensibilité à l'insuline des myotubes ou du muscle

via une interaction avec IRS-1 en particulier (Kim et al., 2004). Enfin chez l'homme, la perfusion artérielle d'IL-6 à des doses mimant les niveaux obtenus à l'exercice ne modifie pas la captation de glucose par le muscle ni l'élimination du glucose de l'organisme (Steensberg et al., 2003).

### ***C. QUEL RÔLE POUR IL-6 DANS LE MUSCLE À L'EXERCICE ?***

Les données obtenues à l'exercice sont peu nombreuses et parfois contradictoires. Les bonnes corrélations observées chez l'homme entre libération d'IL-6 et captation de glucose par des groupes musculaires actifs à différentes intensités d'exercice sont un argument indirect pour penser qu'IL-6 pourrait favoriser la captation de glucose par le muscle (Helge et al., 2003). Le seul argument important en faveur de cette hypothèse est apporté par une étude où l'administration d'IL-6 lors d'un exercice modéré, en comparaison avec du sérum physiologique, augmente la consommation globale de glucose de l'organisme, indépendamment de l'intensité de l'exercice et de toute variation hormonale (Febbraio et al., 2004). Si la question du mode d'action d'IL-6 dans ce cadre reste posée, des éléments de réponse concernant l'implication de l'AMPK ont été proposés. Une forte corrélation a été décrite chez l'homme entre activité de l' $\alpha$ 2-AMPK et la libération d'IL-6. Par ailleurs, les souris dont le gène codant IL-6 a été invalidé (IL-6  $-/-$ ) ont une activité AMPK diminuée au repos, qui reste cependant activable par l'exercice (Kelly et al., 2004). Ainsi les résultats décrits plus haut sur modèle cellulaire (Carey et al., 2006) sont difficiles à transposer au muscle à l'exercice. L'activation d'AMPK à l'exercice repose pour beaucoup sur la modification du rapport AMP/ATP induite par la consommation d'énergie par les myofibrilles, IL-6 pourrait pourtant jouer un rôle de modulation positive de l'activité AMPK musculaire à l'exercice (Hardie et Sakamoto, 2006).

**En somme, un muscle qui se contracte et dont les réserves en hydrates de carbones diminuent est capable de produire de l'IL-6. Cette cytokine agit localement en favorisant la captation du glucose mais peut aussi être libérée dans la circulation sanguine. Cette molécule a vite été considérée comme un possible signal envoyé par le muscle aux organes qui sont capables de lui fournir des substrats énergétiques, au premier rang desquels le foie. Ce dernier est très fortement sollicité à l'exercice et IL-6 pourrait participer au contrôle de la production hépatique de glucose (PHG).**



**Figure 19** : Schéma de la transduction du signal IL-6 via son récepteur *IL-6 receptor* (IL-6R) et la *glycoprotein 130* (gp130). (A) : schéma des structures d'IL-6R $\alpha$  et gp130, les acides aminés sont représentés par leur lettre code suivie de leur position dans la séquence. CBM : *cytokine binding domain*. (B) : schéma de la transduction du signal. JAK : *janus kinase*, STAT : *signal transducer and activator of transcription*, SHP2 : *SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase* (d'après Kamimura et Hirano, 2003).

### **3. IL-6 ET PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE**

#### **3.1. LA SIGNALISATION IL-6 (figure 19)**

La sous unité  $\alpha$  du récepteur IL-6 (sous unité spécifique de la molécule) existe sous forme transmembranaire (IL-6R) mais aussi sous une forme soluble (sIL-6R) issue soit d'un clivage du premier, soit d'un épissage alternatif du transcrit qui aboutit à la disparition de la partie transmembranaire. IL-6 se fixe à son récepteur puis ce complexe provoque une homodimérisation de deux *glycoprotein 130* (GP130). Cette GP130, recrutée également par les récepteurs des autres cytokines de la famille IL-6, possède une partie intracellulaire sur laquelle repose la transduction du signal. Le complexe final est un hexamère de deux IL-6, deux IL-6R et deux GP130. La transduction du signal repose sur deux voies bien décrites. La première débute par le recrutement par la GP130 d'une tyrosine kinase de la famille des *Janus Kinase* (JAK). Cette enzyme phosphoryle la GP130 qui recrute alors des facteurs de transcription *signal transducer and activator of transcription* (STAT) qui sont phosphorylés à leur tour. Ces STAT dimérisent et entrent dans le noyau pour exercer leur activité transcriptionnelle. En parallèle, GP130 recrute une tyrosine kinase nommée *SH2 domain containing protein* (SHP2) qui active le facteur de transcription *CAAT enhancer binding protein  $\beta$*  (C/EBP- $\beta$ ) via les GTPases Ras et Raf puis les MAPK ERK 1 et 2.

#### **3.2. IL-6 ET PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE : DONNEES CELLULAIRES**

La compréhension des rôles pléiotropiques joués par les cytokines dans les réponses inflammatoires a conduit de nombreux auteurs à envisager leur implication dans les troubles de l'homéostasie du glucose bien décrits dans le choc septique avec une hyperglycémie transitoire puis une hypoglycémie (McCallum et Berry, 1973). C'est dans ce cadre qu'ont tout d'abord été étudiés les effets d'IL-6 sur le métabolisme glucidique dans le foie. Les premiers résultats sur hépatocytes isolés (Christ et al., 1997, Christ et al., 2000) ou chez le rat (Hill et McCallum, 1991) montrent un effet inhibiteur d'IL-6 sur la néoglucogenèse induite par le glucagon ou l'AMPc, via une inhibition de la transcription du gène codant

PEPCK. Cependant, IL-6 seule est capable d'augmenter la glycémie de rats au repos (Stith et Luo, 1994) et la néoglucogenèse et la glyco-génolyse d'hépatocytes isolés (Ritchie, 1990, Blumberg et al., 1995). Sans entrer dans le débat qui entoure l'influence d'IL-6 sur la sensibilité du foie et du muscle à l'insuline, il a été montré qu'in vitro, cette cytokine est capable de favoriser la libération de glucose ou d'inhiber sa captation par le foie par une inhibition de la signalisation insulinique via *supressor of cytokines signaling-3* SOCS-3 (Kanemaki et al., 1998, Senn et al., 2002, Senn et al., 2003). Les données obtenues in vivo sont plus contradictoires avec ou non des effets d'IL-6 sur la sensibilité à l'insuline et la PHG (Klover et al., 2003, Kim et al., 2004). Enfin chez l'homme, l'administration d'IL-6 à des sujets au repos augmente la libération hépatique de glucose de manière dose-dépendante (Tsigos et al., 1997). En somme, l'influence d'IL-6 sur le métabolisme glucidique n'est pas univoque, ce qui pourrait reposer sur le fait que ces études utilisent des doses d'IL-6 et des durées d'administrations très variables. Cependant lorsque l'administration est aiguë et déconnectée de toute stimulation hormonale, IL-6 semble favoriser la production de glucose par les hépatocytes.

### ***3.3. INFLUENCE D'IL-6 SUR LA PRODUCTION HEPATIQUE DE GLUCOSE A L'EXERCICE***

Une étude clé s'est intéressé à cette problématique dans le cadre de l'exercice chez l'homme (Febbraio et al., 2004). Des sujets ont réalisé un même exercice de faible intensité avec ou sans l'administration d'IL-6 mimant les concentrations plasmatiques observées lors d'un exercice plus intense. La production endogène de glucose (qui dépend essentiellement si ce n'est exclusivement du foie) est significativement plus importante dans le groupe traité par IL-6 où elle est comparable au groupe réalisant un exercice intense. Donc dans la situation physiologique qui nous intéresse, celle d'un exercice endurant et prolongé, l'augmentation transitoire des concentrations plasmatiques d'IL-6 est bien capable d'augmenter la PHG. Cependant, en dehors du fait que la sphère hépato-splanchnique « puise » de l'IL-6 dans la circulation (Febbraio et al., 2003), aucune donnée expérimentale ne permet de dire si IL-6 agit directement sur le tissu hépatique ou si l'augmentation de la PHG observée est secondaire à des variations hormonales, comme lors d'une perfusion d'IL-6 recombinante au repos (Tsigos et al., 1997). Comme IL-6 favorise la captation et



l'utilisation du glucose par le muscle, Febbraio suggère même que l'effet d'IL-6 sur la PHG pourrait tout simplement être secondaire et n'être qu'un reflet de la consommation périphérique accrue du glucose (Febbraio et al., 2004).

*Avec comme hypothèse de départ un effet direct d'IL-6 sur les hépatocytes, un dernier objectif de ce travail de thèse est donc d'explorer les événements cellulaires et moléculaires par lesquels IL-6 issue du muscle pourrait favoriser la PHG lors d'un exercice prolongé. Au cours de ce travail, notre attention s'est portée sur la PHG par la néoglucogenèse. Nous avons par ailleurs étudié des mécanismes moléculaires récemment décrits dans le contrôle de la néoglucogenèse lors des phases de jeûne prolongé, pour évaluer leur implication dans le contrôle de la PHG à l'exercice et l'effet éventuel de la signalisation IL-6 sur ces acteurs.*

**En somme, IL-6 est bien capable de moduler la PHG dans certaines situations physiologiques, dont l'exercice endurant, au cours duquel elle provoque une augmentation de la production endogène de glucose, par des mécanismes qui restent à définir. Dans cette situation, comme l'IL-6 circulante provient très majoritairement des muscles actifs, cette cytokine agit comme une hormone qui contribue à maintenir les concentrations plasmatiques en glucose, source de substrat dont le muscle est très dépendant quand l'exercice se prolonge.**

***OBJECTIFS***  
***SCIENTIFIQUES***

## ***OBJECTIFS SCIENTIFIQUES***

Ces 10 dernières années, un ensemble de recherches, issues principalement de l'expérimentation humaine, a mis en évidence un mécanisme original par lequel le muscle squelettique soumis à un exercice prolongé est capable de signaler à l'organisme la baisse de ses réserves énergétiques (Pedersen et Fischer, 2007). Au moment où le muscle devient très dépendant du glucose plasmatique, il produit de l'IL-6, qui par une action endocrine permet d'augmenter la production endogène de glucose par le foie (Febbraio et al., 2004). Si la production musculaire d'IL-6 a été bien décrite et caractérisée, un certain nombre de questions, relatives aux déterminants moléculaires de la transcription de son gène au de la contraction musculaire et à son mode d'action sur le foie, restent posées.

Le tissu musculaire est hétérogène sur le plan cellulaire et comporte, outre les fibres musculaires, des fibroblastes (tissu conjonctif), des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales (vaisseaux). Toutes ces cellules sont capables de produire de l'IL-6 en grande quantité, posant la question de l'origine cellulaire de la production d'IL-6 dans un muscle soumis à l'exercice (Penkowa et al., 2003). Si des arguments ont été apportés pour penser que les fibres musculaires sont bien les cellules productrices (Penkowa et al., 2003, Hiscock et al., 2004), la preuve expérimentale définitive ne peut être apportée que par la mesure des ARNm codant IL-6 dans les myocytes. Il existe au sein du muscle un autre niveau d'hétérogénéité cellulaire. Les fibres musculaires ne sont pas identiques et plusieurs grands types ont été décrits sur la base de leur phénotypes contractile (propriétés mécaniques) et métabolique (réserves en glycogène et mode d'utilisation préférentiel des substrats). Lors d'un exercice d'endurance chez le rongeur, les fibres de type I (lentes oxydatives) et IIa (rapides oxydatives) sont recrutées en priorité. Les fibres plus rapides et plus glycolytiques (IIx puis IIb) sont recrutées plus tardivement. Par ailleurs, les fibres oxydatives possèdent des réserves en glycogène moins importantes que les fibres glycolytiques plus dépendantes du glucose. ***Le premier objectif de ce travail de thèse est d'apporter une réponse claire à la question de l'origine cellulaire de la***

*production d'IL-6 dans un muscle à l'exercice chez le rat, grâce à une étude en RT-PCR sur fibres isolées. De plus, étant donné le recrutement temporel des différents types de fibres et les différences de contenu en glycogène, un autre objectif de cette thèse est de déterminer s'il existe une spécificité de production d'IL-6 en fonction du type de fibres.*

La production d'IL-6 apparaît comme un signal du niveau des réserves énergétiques du muscle. En effet, sa libération dans la circulation sanguine est d'autant plus précoce et importante que les stocks de glycogène du muscle actif sont bas (Keller et al., 2001, Steensberg et al., 2001a). Si cette relation est bien établie au niveau tissulaire, peu de choses sont connues au niveau cellulaire. *Un deuxième objectif de ce travail est de confronter, au niveau myocytaire, les niveaux d'ARNm codant IL-6 et le contenu en glycogène à l'arrêt d'un exercice.*

La contraction musculaire, et plus largement l'exercice, provoquent l'activation de plusieurs voies de signalisation intra cellulaires dans le muscle. Sous l'action de stimuli aussi divers que les mouvements calciques, les contraintes mécaniques ou métaboliques, l'expression de nombreux gènes est stimulée à des fins de réponses aiguës à l'exercice ou d'adaptations du tissu (à moyen ou long terme) (Koulmann et Bigard, 2006). Un modèle de contrôle de l'expression du gène IL-6 dans le muscle a été proposé (Febbraio et Pedersen, 2002). La transcription du gène IL-6 en réponse à l'exercice étant un événement précoce, ce modèle postule que le primum movens de l'activation du gène sont les mouvements du  $Ca^{2+}$  au sein des myocytes, possiblement via la voie de signalisation calcineurine-NFAT. La diminution des stocks de glycogène pourrait activer la MAPK p38 qui elle stimulerait elle aussi la transcription du gène. Cependant, cette conception repose sur l'analyse des caractéristiques de production d'IL-6 et sur des arguments bibliographiques, mais ce modèle reste hypothétique car aucun argument expérimental ne vient l'appuyer. *L'étude de l'implication de la voie de la calcineurine comme déterminant de l'expression du gène IL-6 dans le muscle à l'exercice est un autre objectif de ce travail. L'approche expérimentale repose sur une analyse descriptive de l'activité de la calcineurine et de la transcription du gène IL-6 dans des fibres musculaires isolées, puis sur une approche pharmacologique visant à évaluer*

***l'expression du gène dans une situation d'exercice après administration d'inhibiteurs de la calcineurine.***

Le maintien de la glycémie est un défi qui se présente à l'organisme au cours de l'exercice. En l'absence d'apports exogènes, seul le foie est en mesure de libérer du glucose dans le torrent circulatoire. Il dégrade d'abord son glycogène, source rapidement mobilisable, puis si l'exercice se prolonge, il synthétise du glucose à partir de substrats non glucidiques via la néoglucogenèse. Cette voie métabolique est fortement contrôlée par l'action coordonnée de plusieurs hormones (insuline, glucagon et glucocorticoïdes) sur la transcription de gènes codant pour les enzymes clés de la voie, dont la PEPCK qui est la plus importante et la plus étudiée (Hanson et Reshef, 1997). Si la régulation de son expression lors de phases de privation alimentaire est bien décrite et comprise, assez peu de choses sont connues sur le contrôle de son expression en réponse à l'exercice. Il existe une augmentation importante de la transcription de son gène en réponse à l'exercice (Friedman, 1994), en partie dépendante des glucocorticoïdes, mais l'implication d'acteurs moléculaires clés récemment identifiés lors du jeûne (dont PGC-1 $\alpha$  et FXR) n'a jamais été étudiée. Par ailleurs, si la capacité d'IL-6 à augmenter la production hépatique de glucose à l'exercice a été clairement mise en évidence (Febbraio et al., 2004), les mécanismes impliqués sont inconnus et l'existence même d'une action directe d'IL-6 sur le tissu hépatique à l'exercice reste à démontrer. ***Aussi, avec pour hypothèse une action directe d'IL-6 sur le foie, un dernier objectif de ce travail est d'étudier les mécanismes par lesquels cette cytokine favorise la PHG lors d'un exercice endurant chez le rat, en centrant nos études sur le contrôle de l'expression des enzymes de la néoglucogenèse.***

***MATERIELS  
ET  
MÉTHODES***

# ***MATERIELS ET METHODES***

## ***1. CONDITIONNEMENT DES ANIMAUX***

L'ensemble des expérimentations ont été réalisées sur modèle animal (rats Wistar de 3 mois environ). Avant le conditionnement, les animaux ont été maintenus dans des conditions standards d'animalerie : alternance jour 8h-20h / nuit de 20h-8h, T° ambiante : 22 ± 2°C, libre accès à l'eau et à la nourriture. Deux types de conditionnement ont été utilisés : la réalisation d'un exercice physique unique, prolongé et intense avec ou sans traitement pharmacologique, et une injection unique d'IL-6 recombinante humaine chez des animaux au repos. Toutes les expérimentations ont été menées conformément aux accords d'Helsinki sur le traitement humain des animaux de laboratoire et ont reçu un avis favorable du comité d'éthique du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées.

### ***1.1. EXERCICE PHYSIQUE***

#### ***A. MODALITES D'EXERCICE***

Le mode d'exercice retenu était la course sur tapis roulant. Les animaux actifs et témoins ont été familiarisés avec le tapis roulant pendant 5 jours, à une intensité de course modérée et croissante (10 à 20 m.min<sup>-1</sup>, 0 % de pente, 5 à 15 min). Après 48 h de repos, les animaux actifs ont réalisé un exercice unique à 25 m.min<sup>-1</sup>, 8° de pente (expérimentation 1) ou 22 m.min<sup>-1</sup>, 5° de pente (expérimentations 2 et 3) jusqu'à épuisement, défini comme l'incapacité de l'animal à maintenir le rythme imposé par le tapis malgré la stimulation par des chocs électriques au niveau de la queue. L'exercice débutait toujours à la même heure et les animaux témoins ont été opérés à des temps différents correspondant aux horaires d'opération des divers groupes d'animaux actifs.

#### ***B. TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE***

Les animaux concernés par l'expérimentation de blocage pharmacologique de la voie de la calcineurine (expérimentation 2) ont reçu un traitement à base de Ciclosporine A

(Sandimun®, Novartis Pharma, France) ou de FK506 (Tacrolimus) (Prograf®, Fujisawa, Ireland), leurs témoins ont été traités par l'excipient de ces molécules (Ricinon + 30% d'éthanol).

Les modalités d'administration des drogues étaient les suivantes :

- Ciclosporine A :  $12,5 \text{ mg.kg}^{-1}$  en injection intra péritonéale matin et soir, 5 injections au total.

- FK506 :  $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  en injection sous cutanée matin et soir, 3 injections au total.

- Excipient : même volume en injection intra péritonéale, 5 injections au total.

La dernière injection a été réalisée le matin de l'expérimentation, l'exercice ayant lieu l'après-midi.

## ***1.2. INJECTIONS D'IL-6 RECOMBINANTE***

Les rats ont été laissés à jeun une nuit afin de les mettre dans des conditions métaboliques et hormonales plus proches de l'exercice que des rats en phase post-prandiale. Ils ont reçu une injection intra péritonéale unique d'IL-6 recombinante humaine (Biosource, USA), active chez le rongeur, à raison de 3 ou  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . La voie intra péritonéale a été préférée à la voie intra veineuse car l'augmentation de l'IL-6 plasmatique est progressive et donc plus proche de la situation d'exercice. Le choix des doses injectées, a été réalisé sur la base des données de la littérature (Fernandez-Celemin et Thissen, 2001, Brennan et al., 2004, Andriambeloson et al., 2006). Les animaux témoins ont reçu une injection intra péritonéale du même volume de sérum physiologique. Les animaux traités ont été sacrifiés une heure après l'injection.

## ***2. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES TISSUS***

### ***2.1. PRELEVEMENTS TISSULAIRES***

Au moment du sacrifice, les animaux ont reçu une injection intra péritonéale de pentobarbital ( $70\text{mg.kg}^{-1}$ ). Les tissus destinés aux dosages de protéines, dosages de glycogène et histologie ont été prélevés et congelés immédiatement dans l'azote liquide puis conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les tissus destinés aux dosages d'ARNm ont été placés dans 5 volumes



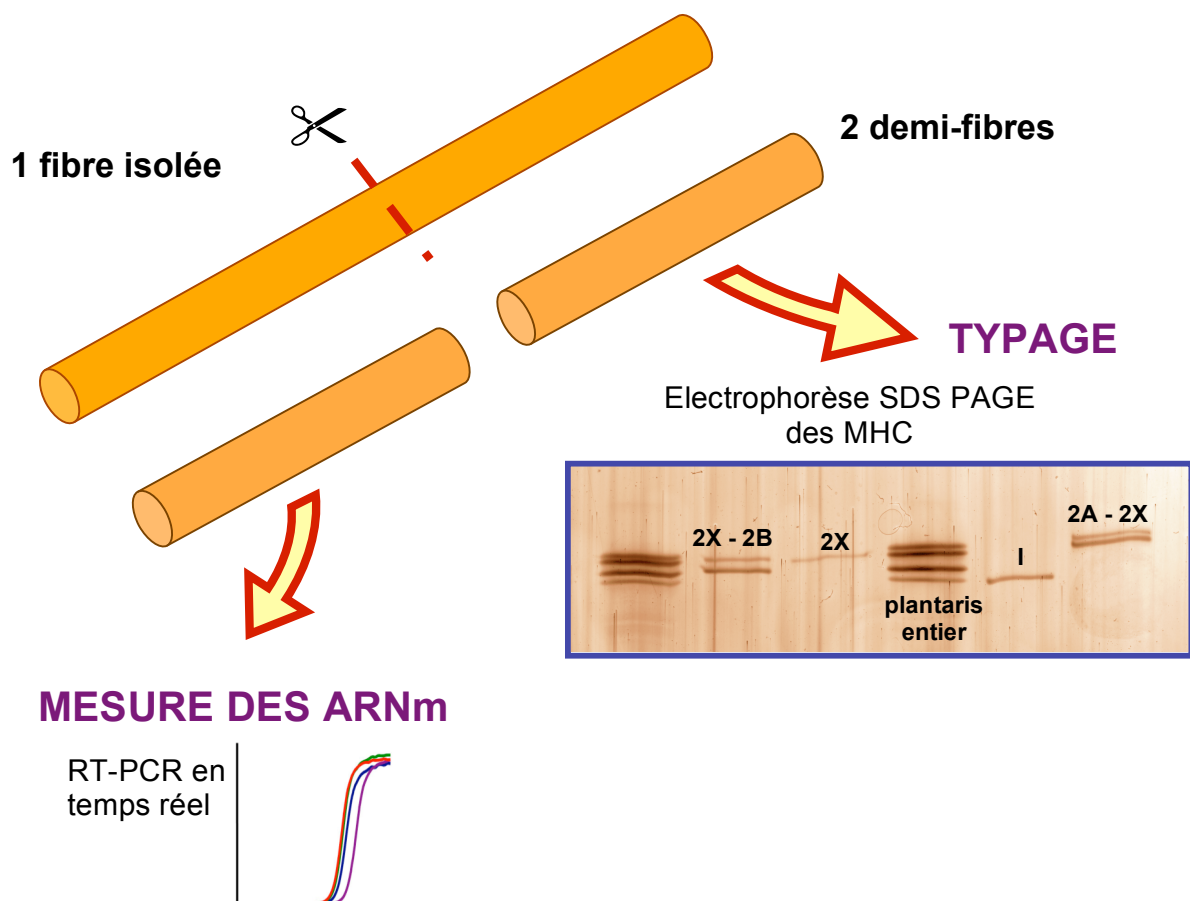


Figure 20 : Principe de la technique des demi-fibres. Des fibres musculaires sont isolées sous loupe binoculaire et coupée en deux moitiés. Une première demi-fibre est soumise à une électrophorèse des chaînes lourdes de la myosine (MHC) pour typer la fibre. Les fibres pures (n'exprimant qu'une isoforme de MHC) sont identifiées, les ARNm d'intérêt des demi-fibres correspondantes sont étudiées en RT-PCR.

de RNAlater® (Ambion, USA), conservés 24 heures à 4°C puis congelés à -20°C. Le sang a été prélevé sur tube d'héparinate de lithium ou EDTA, centrifugé pendant 10 min à 4000 tours.min<sup>-1</sup>, 4°C, puis le plasma a été aliquoté et congelé à -80°C.

## **2.2. PREPARATION DES FIBRES ISOLEES**

Après décongélation, les muscles plantaris (partie profonde) conservés dans le RNAlater® ont été placés dans une cupule et des fibres musculaires ont été isolées sous loupe binoculaire à l'aide de pinces de microdissection. Chaque fibre a été coupée en deux parties placées l'une dans 40 µl de tampon de lyse pour extraction des ARN (Nanoprep, Stratagene) additionné de 0,7% de 2-β-mercaptoéthanol (β-ME) et l'autre dans 20µl de tampon d'extraction des MHC (cf paragraphe 4-2) (figure 20).

## **3. HISTOLOGIE ET IMMUNOHISTOCHEMIE**

### **3.1. REALISATION DES COUPES SERIEES**

Des coupes sériées ont été réalisées au cryostat maintenu à -20°C (épaisseur 12 à 14µm) dans la partie médiane des muscles plantaris et soléaires.

### **3.2. COLORATION PERIODIC ACID SCHIFF (PAS)**

Le marquage du contenu en glycogène des fibres musculaires a été réalisé par la technique *Periodic acid Schiff* (PAS). L'acide périodique oxyde les glycols en aldéhydes, le réactif de Schiff colore ensuite les éléments cellulaires contenant ces glycols en rose. Une contre-coloration à l'hématoxyline permet le marquage des noyaux. Le kit PAS staining system (Sigma Aldrich) a été utilisé conformément aux indications du fabricant.

<b>Anticorps</b>	<b>Référence ou clone</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Type et espèce</b>	<b>Dilution</b>
Anti MHC I	NCLs	Novocastra	Ig G (souris) monoclonal	1/40
Anti Fast total (MHC IIa, IIx, IIb, embryonnaire et néonatale)	MY32	Sigma	Ig G (souris) monoclonal	1/600
Anti MHC IIa	SC71	Schiaffino	Ig G (souris) monoclonal	1/40

Tableau 2 : anticorps utilisés pour les marquages des MHC par immuno-histochimie sur coupes de muscles.

### **3.3. IMMUNOHISTOCHIMIE DES CHAINES LOURDES DE LA MYOSINE (MHC)**

Le kit ABC (Vectastain) a été utilisé pour ces colorations. Une goutte de sérum bloquant a été déposée sur les coupes qui ont été placées 20 min à l'étuve (39°C). Après séchage les coupes ont été recouvertes d'une goutte d'anticorps primaire (tableau 2), placées à l'étuve 75 min, puis lavées deux fois 10 min dans un bain de PBS. L'anticorps secondaire a ensuite été déposé et après 60 min à l'étuve, les coupes ont été à nouveau lavées (cf ci-dessus). Une goutte de réactif ABC a alors été déposée, les lames ont été incubées 30 min à l'étuve puis lavées (cf ci-dessus). Le substrat de la Peroxydase a été préparé (Vector, SK4000) : (5ml H<sub>2</sub>O distillée + 2 gouttes de Tampon concentré + 4 gouttes de Chromogène DAB + 2 gouttes de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 2 gouttes de Chlorure de Nickel) puis déposé sur chaque coupe. Après apparition de la coloration, les coupes ont été rincées dans l'eau distillée et séchées avant lecture sous microscope.

## **4. ANALYSES PROTEIQUES**

### **4.1. DOSAGE D'IL-6 PLASMATIQUE PAR ELISA**

Dans toutes les expérimentations, le dosage de l'IL-6 plasmatique a été réalisé par la technique « Enzyme linked immunosorbent assay » ou ELISA. Le kit choisi était le « Rat IL-6 Quantikine colorimetric sandwich assay » (R&D systems). Les dosages ont été réalisés par le laboratoire d'analyses biologiques du CRSSA. Il n'existe pas de kit hypersensible pour le rat qui permette un dosage précis des concentrations plasmatiques d'animaux sains. Un point de gamme minimal à 32 pg.ml<sup>-1</sup> a donc été réalisé.

## **4.2. ELECTROPHORESE DES MHC**

### **A. EXTRACTION DES PROTEINES**

Cette technique a été utilisée pour typer les fibres isolées en fonction de leur contenu en MHC. Chaque fibre a été lysée dans 20  $\mu$ l de tampon d'extraction [0,3 M NaCl ; 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 0,01 M Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> ; 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O ; 10 mM EDTA ; 1,4 mM  $\beta$ -ME ; pH=6,5]. Après une incubation de 24 h à 4°C, 20  $\mu$ l de glycérol ont été ajoutés à l'extrait avant conservation à (-20)°C.

### **B. ELECTROPHORESE**

Les électrophorèses ont été réalisées en conditions dénaturantes sur des gels de polyacrylamide de 0,75 mm d'épaisseur. Le gel de concentration (*stacking*) est composé de 30 % de glycérol ; 4 % d'acrylamide / bis-acrylamide (50:1) ; 70 mM de Tris ; 4 mM d'EDTA et 0,4 % de SDS. Le gel de séparation (*resolving*) est composé de 30 % de glycérol ; 8 % d'acrylamide / bis-acrylamide (50:1) ; 0,2 M de Tris ; 0,1 M de glycine et 0,4 % de SDS. Après décongélation, 10  $\mu$ l de tampon dénaturant (5 % de  $\beta$ -ME ; 100 mM de Tris-base ; 5 % de glycérol ; 4 % de SDS et du bleu de bromophénol) ont été ajoutés à 10  $\mu$ l d'échantillon puis chauffés à 100°C pendant 3 à 5 min. Les échantillons ont alors été déposés dans les puits du gel, un extrait de plantaris entier exprimant les quatre formes adultes de MHC a été déposé dans deux puits comme témoin. La migration s'est effectuée à voltage constant : 72 V, pendant 31 h.

### **C. FIXATION ET COLORATION**

Au terme de la migration, les gels ont été colorés à l'argent selon la technique décrite par Agbulut (Agbulut et al., 1996). Les gels ont été plongés dans une solution de fixation (45% méthanol, 10% acide acétique, formaldéhyde 37% 0,5 ml.l<sup>-1</sup>), 60 min puis lavés dans une solution d'éthanol à 50%. Après un prétraitement dans une solution de thiosulfate de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) à 0,2 g.l<sup>-1</sup> (<1 min), les gels ont été rincés (eau ultra-pure) puis colorés dans une solution de nitrate d'argent à 2 g.l<sup>-1</sup>. Enfin la révélation a été réalisée dans une solution contenant 60 g.l<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 ml.l<sup>-1</sup> de formaldéhyde à 37 % et 4 mg.l<sup>-1</sup> de

	Densité du gel de concentration	Densité du gel de séparation	Migration
p38	4%	10%	90 V, 2 h 30
ERK1/2	4%	10%	75 V, 3 h 30
AMPK et ACC	5%	8%	90 V, 2 h 30

Tableau 3 : Composition en acrylamide des gels d'électrophorèse et conditions de migration pour le dosage des protéines par Western-blot.

	Référence	Dilution	Ac Secondaire
p38 totale	p38 MAPK Cell Signaling #9212	1/1000	Donkey anti-rabbit 1/10 000
Phospho-p38	Phospho-p38 MAPK (Thr 180- Thr182) Cell Signaling #9211	1/500	Donkey anti-rabbit 1/10 000
ERK1/2	p42/p44 MAPK Cell Signaling #9102	1/1000	Donkey anti-rabbit 1/10 000
Phospho-ERK1/2	Phospho-p42/p44 MAPK (Tyr202- Tyr204) Cell Signaling #9101	1/500	Donkey anti-rabbit 1/10 000
AMPK	AMPK $\alpha$ Cell Signaling #2532	1/1000	Donkey anti-rabbit 1/10 000
Phospho-AMPK	Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr 172) Cell Signaling #2535	1/500	Donkey anti-rabbit 1/10 000
ACC	ACC Cell Signaling #3662	1/1000	Donkey anti-rabbit 1/10 000
Phospho-ACC	Phospho-ACC Cell Signaling #3662	1/1000	Donkey anti-rabbit 1/10 000

Tableau 4 : Anticorps utilisés pour le dosage des protéines par Western-blot.

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Après un dernier lavage à l'eau, la réaction a été stoppée dans une solution contenant 45 % de méthanol et 10 % acide acétique.

Les différentes bandes, correspondant aux différentes isoformes de MHC, ont été numérisées à l'aide d'un densitomètre (GS-700®, Biorad) (figure 20). L'identification du contenu en MHC de chaque fibre s'est faite visuellement par comparaison avec les quatre bandes obtenues dans les puits témoins.

### ***4.3. WESTERN BLOTTING***

Le dosage de protéines par la méthode du western-blot repose sur une séparation électrophorétique des protéines suivi d'un transfert sur une membrane puis d'une immuno-détection par des anticorps spécifiques.

#### ***A. EXTRACTION DES PROTEINES***

Pour chaque échantillon de foie ou de muscle, un morceau de 20 à 30 mg de tissu congelé a été broyé dans 20 µl.mg<sup>-1</sup> de tampon contenant 20 mM d'HEPES à pH 7.4, 2 mM d'EGTA, 50 mM de β-glycérophosphate, 1 mM de dithiothréitol, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% de Triton X-100, 10% de glycérol et 1 µl.ml<sup>-1</sup> de Protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem). La concentration en protéines de chaque échantillon a été mesurée par la technique du BCA (automate Roche/Hitachi 912 instrument) par le LAB du CRSSA.

#### ***B. ELECTROPHORESE***

Une quantité identique (50 µg) d'extrait protéique additionné de 10 µl de tampon de charge a été déposée dans les puits d'un gel de polyacrylamide d'1 mm d'épaisseur dont la densité dépend des protéines étudiées (tableau 3). Un marqueur de poids moléculaire et un échantillon choisi comme calibrateur ont été déposés sur chaque gel. Les électrophorèses ont été réalisées grâce au système Mini Protean II (Biorad) à 4°C selon des modalités différentes selon les protéines mesurées (tableau 3).

#### ***C. ELECTROTRANSFERT***

L'électrotransfert (4 h, 90 V à 4°C) sur membrane de nitro-cellulose (Hybond C-extra RPN 2020E, Amersham) a été réalisé grâce au Mini Protean II. Après un contrôle

visuel de la qualité du transfert par coloration au rouge Ponceau, la membrane a été saturée pendant 1 h dans une solution de TBS-Tween avec 5% de lait.

#### ***D. IMMUNO-DETECTION***

La membrane a subi une incubation (toute la nuit, 4°C, sous agitation) dans l'Ac primaire (tableau 4) dilué dans le TBS-Tween-lait puis rincée dans la même solution avant incubation dans l'Ac secondaire (2 h à T° ambiante). Après un dernier rinçage la révélation a été réalisée grâce au kit Enhanced chemiluminescence reagent kit (Amersham) sur film photographique Hyperfilm ECL RPN 3103K (Amersham).

La quantification des bandes obtenues sur les films photographiques a été réalisée à l'aide d'un densitomètre GS-700 Bio-Rad. Les valeurs mesurées pour chaque échantillon ont été rapportées à celle de l'échantillon choisi comme calibrateur de l'expérimentation.

Les expérimentations nécessitant la mesure de protéines totales et phosphorylées sur la même membrane, cette dernière a été débarrassée des Ac par « stripping ». Les membranes ont été placées pendant 30 min à 50°C dans 15 ml de solution (3 ml SDS 10%, 1,85 ml Tris 0,5M et 10,5 µl β-ME) puis rincée 3 fois dans du TBS/Tween avant incubation dans un nouvel Ac primaire selon le protocole décrit ci-dessus.

### ***5. DOSAGE DU GLYCOGENE TISSULAIRE***

Les dosages de glycogène ont été réalisés sur tissu entier (foie et muscle) selon le même protocole. Le principe du dosage repose sur une hydrolyse du glycogène puis une mesure spectrophotométrique du glucose libéré.

#### ***5.1. EXTRACTION***

Chaque échantillon de muscle (5 mg) ou de foie (10 mg) congelés a été digéré dans 50 volumes de NaOH 2N au bain marie pendant 2 h, 37°C sous agitation, puis à 4°C pendant 1 h. A l'issue, chaque extrait a été neutralisé par ajout de d'1 volume d'HCl 7,5M pour 5 volumes de NaOH.



## **5.2. HYDROLYSE DU GLYCOGENE**

Un volume de 50 à 100  $\mu\text{l}$  de chaque extrait a été placé dans deux tubes différents et 400  $\mu\text{l}$  de tampon acétate 0,3M ont été ajoutés. Un volume de 35  $\mu\text{l}$  (15 U) d'amyloglucosidase (enzyme d'hydrolyse) a été ajouté dans le tube 1, un même volume d'eau a été ajouté dans le tube 2 destiné au dosage du glucose libre. Après 2 h d'incubation à 37°C sous agitation, l'hydrolyse a été bloquée par 100 $\mu\text{l}$  de NaOH 1N. Les échantillons ont alors été centrifugés (10 min, 885g, 4°C) et le surnageant a été récupéré pour le dosage du glucose.

## **5.3. DOSAGE DU GLUCOSE**

Le tampon de dosage a été préparé comme suit : tampon Tris-HCl 0,1M , 1 ml de  $\text{MgCl}_2$  (20  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), 1 ml de NADP (8  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), 1 ml d'ATP (6  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) et 20  $\mu\text{l}$  (50 U) de glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Dans une cuve de spectrophotométrie de 1,5 ml ont été placés 200  $\mu\text{l}$  de chaque extrait (hydrolysé ou non), 300  $\mu\text{l}$  d'eau pure et 500  $\mu\text{l}$  de tampon de dosage. Une première mesure au spectrophotomètre (340 nm) a été réalisée. 1,5  $\mu\text{l}$  (4 U) d'hexokinase ont alors été ajoutés dans chaque extrait et une seconde mesure à 340 nm a été réalisée après 10 min d'incubation à température ambiante.

#### 5.4. *CALCUL DES CONCENTRATIONS DE GLUCOSE*

La concentration tissulaire en glycogène ( $\mu\text{mol d'unités glucose.g de tissu}^{-1}$ ) a été calculée pour chaque échantillon :

$$[\text{glycogène}] = \frac{(\Delta_1 - \Delta_0)}{6,22} \times \frac{V_d}{E_d} \times \frac{V_h}{E_h} \times \frac{V + P}{P}$$

$\Delta_1$  et  $\Delta_0$  : densité optique de la mesure 0 et 1 (unités DO)

$V_d$  : volume dans la cuve (ml)

$E_d$  : volume d'extrait dosé (ml)

$V_h$  : volume total d'hydrolyse (ml)

$E_h$  : volume d'extrait pour l'hydrolyse (ml)

$V$  : volume d'extraction

$P$  : poids de tissu

6,22 : coefficient d'extinction du NADPH

## 6. *MESURES DES ARNm*

### 6.1. *PREPARATION DES ADNc A PARTIR DE TISSUS ENTIERS*

#### A. *EXTRACTION DES ARN*

Les extractions d'ARN ont été réalisées grâce à l'automate MagNA Pure (Roche) qui permet d'extraire spécifiquement les ARNm à partir de broyats de 1 à 30 mg de tissus entiers. L'homogénat tissulaire est mis en présence d'oligodT couplés à de la biotine (Bi-oligodT). Ces molécules fixent spécifiquement les ARNm par leur queue polyA. Le complexe formé est capturé par des particules magnétiques recouvertes de streptavidine, grâce à l'interaction de cette dernière avec la biotine. L'ensemble est alors exposé à un champ magnétique et extrait de l'homogénat tissulaire. Cette méthode permet donc de n'extraire que les ARNm.

Une tranche de 10 à 15 mg de muscle conservé dans le RNA later a été découpée perpendiculairement à l'axe du muscle dans son milieu et broyée dans 200 $\mu\text{l}$  de tampon de

lyse du kit MagNA Pure LC mRNA Isolation kit II. Le broyage a été réalisé grâce au système Mixer Mill MM300 (Rescht) puis 100 µl de tampon de lyse frais ont été ajoutés.

Un morceau de foie conservé dans le RNAlater a été découpé (175 à 300 mg) puis broyé au Polytron (Kinematica) à concentration constante dans 1 ml de tampon RLT (Qiagen) additionné de 0,7% de β-ME pour 150 mg de tissu. Un volume de 50 µl de broyat (correspondant à 8 mg de tissu) a été ajouté à 300 µl de tampon de lyse du kit MagNA Pure LC mRNA Isolation kit II.

Pour les deux tissus, l'extraction s'est ensuite déroulée selon les indications du fabricant, avec un volume de prise de 880 µl et un volume d'élution de 50 µl. Cette méthode automatisée permet, outre un gain de temps, une meilleure reproductibilité inter-échantillons.

### ***B. TRANSCRIPTION INVERSE***

La transcription inverse a été réalisée avec le kit Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec) conformément aux indications du fabricant dans un volume final de 10 µl. Le mélange de réaction contenait 1 µl de tampon 10X, 2 µl de dNTP (2.5 mM de chaque dNTP), 0,5 µl d'oligo-dT (50 µM) en amorce, 0,2 µl de *RNase inhibitor* (20 unités.µl<sup>-1</sup>), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,25 µl de *reverse transcriptase* Euroscript (50 U.µl<sup>-1</sup>), 1,05 µl d'eau stérile et 3 µl d'ARNm isolés.

## ***6.2. PREPARATION DES ADNc A PARTIR DE DEMI-FIBRES ISOLEES***

Cette préparation d'ADNc à partir d'éléments cellulaires uniques a nécessité de nombreuses mises au point au cours desquelles ont été testées deux techniques d'extraction (minicolonnes échangeuses d'ions Nanoprep® et kit RNA Instapure®) et plusieurs modes de transcription inverses. Nous ne présenterons que la technique finalement adoptée.

### ***A. EXTRACTION DES ARN***

Contrairement à l'extraction sur tissu entier, celles réalisées sur éléments cellulaires isolés ne nécessitent aucun broyage, la fibre musculaire étant directement lysée par le

tampon d'extraction. Les ARN totaux ont été isolés selon la méthode de séparation de phases décrite par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987).

Les demi-fibres conservées à -80°C en tampon de lyse ont été décongelées puis les ARN ont été extraits grâce au réactif RNA Instapure® (Eurogentec) selon le protocole du fournisseur modifié lors des mises au point pour optimiser la quantité et la qualité des ARN extraits. Les adaptations retenues ont été une double précipitation au chloroforme, l'utilisation de 0,5 µl de glycogène pour fixer les ARN avant précipitation dans l'isopropanol, une double rinçage à l'éthanol et un volume de reprise final faible (10 µl) pour concentrer l'échantillon. Les ARN n'ont pas été dosés en raison de ce faible volume disponible.

### ***B. TRANSCRIPTION INVERSE***

La transcription inverse a été réalisée dans avec le kit Sensiscript® (Qiagen) optimisé pour les faibles quantité d'ARN. Le protocole a été conduit conformément aux indications du fabricant. Les oligodT ont été utilisés comme amorces et le volume d'ARN utilisé était le volume maximal autorisé pour le kit (4 µl pour un volume final de 10 µl). Le mélange de réaction contenait 1 µl de tampon 10X, 1 µl de dNTP mix (5 mM de chaque dNTP), 1 µl d'oligo-dT (10 µM), 0,5 µl de *RNase inhibitor* (10 unités/µl), 0,5 µl de *reverse transcriptase* Sensiscript, 2 µl d'eau stérile et 4 µl d'ARN.

### ***6.3. RT-PCR EN TEMPS REEL***

La technique d'amplification par extension d'amorces ou *polymerase chain reaction* (PCR) a pour but de réaliser l'amplification proportionnelle et sélective d'une séquence d'ADN choisie. La PCR nécessite une ADN polymérase permettant la synthèse d'une molécule d'ADN complémentaire d'un brin d'ADN donné à partir d'une amorce fixée sur ce dernier. La spécificité des amorces garantit la spécificité de la séquence amplifiée. En théorie, la quantité d'ADN initiale  $N_0$  est multipliée par 2 à chaque cycle d'amplification de sorte qu'au cycle  $n$  cette quantité est égale à  $N_0 \times 2^n$ . En réalité cette évolution exponentielle n'est retrouvée que lors des premiers cycles.

GENE	SEQUENCE CIBLE	AMORCES	Amorces (μM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Température d'anneau	Taille du produit (pb)
Actine β	NM_031144 (816-910)	F : TCAGGTCATCACTATCGGCAATG R : TTTCATGGATGCCACAGGATTC	0,6	4	58	95
ARBP	NM_022402 (659-732)	F : CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG R : CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG	0,5	4	57	74
PECAM	U77697 (234-351)	F : TGTCTGTCGCACTGAGCAGAAATCC R : TGCAGACTGCAACAGAGCAGTTCAG	0,3	5	65	118
CycA	M19533 (381-507)	F : TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R : CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	0,4	4	58	127
GAPDH	NM_017008 (1556-1633)	F : CCAATGTATCCGTTGTGGATCTGAC R : GCTTACCACCTTCTTGATGTCATC	0,5	4	57	78
C/EBP- β	NM_024125 (656-760)	F : TGGACAAGCTGAGCGACGAG R : TGTGCTGCGTCTCCAGGTTG	0,4	4	59	105
PEPCK	NM_198780 (846-952)	F : TACGGTGGGAACACTGCTTG R : ATGCCAGGATCAGCATGTG	0,4	4	59	107
G6PC	NM_013098 (173-304)	F : CCATCTGGTTCACATTCAAGAG R : CAGTGTCCAGGACCCACCAATAC	0,4	4	59	132
FXR	NM_021745 (857-961)	F : TGACCTCCACGACCAAGCTATG R : GTGGCATTCTCTGTTTGTGTATG	0,4	4	58	105
HPRT	S79292 (211-333)	F : CTCATGGACTGATTATGGCAGGAC R : GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	0,4	4	60	123
CD11b	AF268593 (2985-3079)	F : TTTCAGCAAGATTGCCGAGGAGAGG R : TTTGGAGAGCATTTCGCACACCTGG	0,3	4	65	95
IL-6 R	NM_017020 (696-812)	F : AAGCAGGTCCAGCCACAATGTAG R : CCAACTGACTTTGAGCCAACGAG	0,4	5	60	117
IL-6	E02522 (532-610)	F : TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC R : TTGGATGGTCTTGCTCCTTAGCC	0,4	3	65	79
SOCS-3	AF075383 (581-679)	F : CCTCCAGCATCTTTGTTCGGAAGAC R : TACTGGTCCAGGAACCTCCGAATG	0,4	4	65	99
MCIP-1	AB075973 (31-110)	F : GACTTTAACTACAATTTTAGCTCCCTGAT R : TTGGCCCTGGTCTCACTTTC	0,4	4	60	80
PGC-1α	NM_031347 (2249-2364)	F : ACGCAGGTCGAATGAACTGAC R : TGGTGGAAAGCAGGGTCAAATC	0,4	4	53	116

Tableau 5 : Amorces utilisées pour les mesures d'ARNm en RT-PCR.

Après une phase d'activation de la polymérase, la PCR consiste en une répétition de cycles d'amplification, chaque cycle comportant trois étapes caractérisées par leur température et leur durée. La dénaturation correspond à la séparation des deux brins d'ADN. L'annealing (*annealing*) correspond à la fixation des amorces, la température et la durée de cette étape dépendent directement de la taille et de la composition en bases des amorces. Enfin l'élongation correspond à la synthèse des brins d'ADN complémentaires.

Pour cette étude, les mesures ont été réalisées par PCR en temps réel grâce à un thermocycleur Lightcycler (Roche). Cette technique permet de mesurer la quantité d'ADN formé à chaque cycle grâce à l'incorporation de SYBR green, un intercalant qui émet une fluorescence lorsqu'il est incorporé dans un ADN double brin. Cette méthode permet une quantification dans la phase exponentielle où la PCR est réellement proportionnelle. La quantité d'ADN est évaluée en terme de « cycle de sortie » (Crossing point ou CP), cycle auquel la fluorescence mesurée est significativement différente du bruit de fond. En fin d'analyse, une montée lente en température jusqu'à 95°C permet au thermocycleur de mesurer une décroissance de la fluorescence. La courbe de fusion, dérivée négative de cette courbe, permet de déterminer la température de fusion (*melting temperature* ou  $T_m$ ) qui se définit comme la température à laquelle la moitié de l'ADN est dissocié en deux brins. Le  $T_m$  d'un fragment d'ADN dépendant de sa taille et de son contenu en G et C, il est utilisé pour contrôler la spécificité du produit amplifié.

Les PCR ont été réalisées avec le kit Fast Start DNA Master SYBR Green ® (Roche). Les amorces utilisées ont été dessinées grâce au logiciel Mac Vector ® (Accelrys), à partir des séquences des gènes ou des ARNm disponibles dans la genebank et synthétisées par le laboratoire Eurogentec. Elles sont présentées dans le tableau 5. Les PCR ont été réalisées à partir de 2µl de solution d'ADNc diluée au 1/12<sup>ème</sup> (muscle entier et demi-fibres) ou au 1/20<sup>ème</sup> (foie)

#### **6.4. NORMALISATION**

La quantification des ARNm d'un gène cible se fait par rapport à une référence supposée constante dans les conditions expérimentales étudiées, il s'agit donc d'une quantification relative. La référence choisie pour la première expérimentation était un « gène domestique » dont l'expression dans le tissu musculaire était considérée comme

permanente et non modifiée par le conditionnement des animaux à l'exercice. Par ailleurs il fallait un gène suffisamment exprimé pour être détectable dans les fibres isolées. Le gène de référence choisi était la cyclophylène A (CycA) dont l'expression ne varie pas à l'arrêt d'un exercice chez l'homme (Mahoney et al., 2004). La quantification a été réalisée selon à l'aide du logiciel Relquant<sup>®</sup> (Roche) avec un échantillon « calibrateur » constitué d'un pool des échantillons de l'expérimentation. Pour chaque échantillon, le logiciel calcule une valeur correspondant au quotient (Livak et Schmittgen, 2001) :

$$\frac{(\text{CP gène} - \text{CP CycA}) \text{ échantillon}}{(\text{CP gène} - \text{CP CycA}) \text{ calibrateur}}$$

Cependant, à la lumière de l'expérience accumulée au sein du pôle de génomique du CRSSA, il est apparu nécessaire d'augmenter le nombre de gènes de références pour gagner en fiabilité. Lors de la deuxième expérimentation, la quantification a donc été réalisée grâce à deux gènes de référence, CycA et *Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase* (HPRT), le résultat final étant la moyenne géométrique des quantifications réalisées comme décrit ci-dessus. Pour la troisième expérimentation, le même principe a été utilisé mais en utilisant au moins 3 gènes de référence ce qui a permis la validation de la normalisation par le logiciel Genorm (Vandesompele et al., 2002). Les gènes utilisés ont été : CycA, HPRT, *Acidic ribosomal protein* (ARBP), *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) et Actine  $\beta$  pour l'étude des rats à l'exercice ; CycA, HPRT et ARBP pour l'étude avec injection d'IL-6.

***RÉSULTATS***  
***ET***  
***DISCUSSION***



## ***RESULTATS ET DISCUSSION***

### ***1. ETUDE DE LA FIBRE-SPECIFICITE DE PRODUCTION D'IL-6 A L'ARRET D'UN EXERCICE UNIQUE.***

#### ***1.1. RAPPEL DES OBJECTIFS DE L'EXPERIMENTATION***

Les objectifs de cette première expérimentation étaient : 1) de confirmer l'origine myocytaire de la production d'IL-6 à l'exercice ; 2) de déterminer s'il existe une spécificité de production en fonction du type de fibre ; 3) de mettre en regard, au niveau cellulaire, la production d'IL-6, le contenu en glycogène et l'activité calcineurine.

#### ***1.2. PLAN EXPERIMENTAL ET METHODOLOGIE***

##### ***A. PLAN EXPERIMENTAL ET VALIDATION DU MODELE D'ETUDE***

Toutes les données disponibles sur la production musculaire d'IL-6 à l'exercice émanant d'études sur sujets humains, cette expérimentation a nécessité la mise au point et la validation d'un modèle animal. Ce dernier a consisté en un exercice de course sur tapis roulant, réalisé par des rats non entraînés et jusqu'à épuisement (modalités cf matériels et méthodes 2.1.). Les animaux ont été répartis de manière aléatoire dans trois groupes expérimentaux : témoins (n=10), arrêt d'exercice (n=10, sacrifiés à l'arrêt de l'exercice) et exercice + 2 heures (n=10, sacrifiés 2 h après l'arrêt de l'exercice). A l'issue du conditionnement, les animaux ont été anesthésiés et les muscles soleus et plantaris ont été prélevés.

La validation du modèle a nécessité de vérifier que chez l'animal, l'exercice imposé permet de reproduire la transcription du gène IL-6 et l'augmentation de l'activité calcineurine observés de manière reproductible chez l'homme au cours de l'exercice prolongé. Elle a

consisté en la mesure des ARNm codant IL-6 et MCIP-1, par RT-PCR sur tissu musculaire entier dans le plantaris et le soleus, tous deux recrutés lors de la course.

## ***B. METHODOLOGIE***

### *B.1. Analyse sur fibres isolées*

Le muscle plantaris de rat exprime les 4 isoformes adultes de MHC avec classiquement, dans la souche Wistar, une répartition du type : I 4 %, IIa 10 %, IIx 27 % et IIb 59 % (Bigard et al., 2001). Les fibres isolées ont été incluses dans l'étude après typage sur les critères suivants : 1) expression d'une seule isoforme de MHC 2) n'exprimant en PCR ni CD11b ni CD31, qui signent la présence de cellules monocytaires et de cellules endothéliales respectivement (cellules susceptibles de produire de l'IL-6 en grande quantité). Les fibres retenues ont alors fait l'objet d'une mesure d'ARNm codant IL-6 et MCIP-1.

### *B.2. Analyses histologiques*

Elles avaient pour but d'identifier les MHC exprimées par les fibres en immunohistochimie et de mettre en regard leur contenu en glycogène avant et après l'exercice par coloration au PAS.

### *B.3. Analyse statistique*

Les différences entre groupes ont été analysées grâce à un test t de Student pour valeurs non appariées.

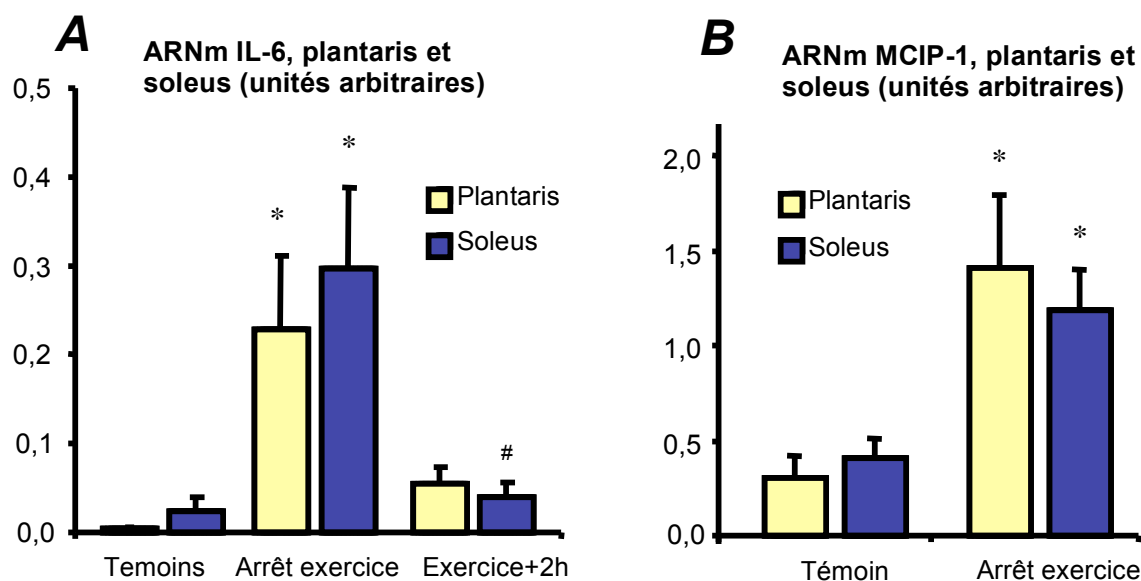


Figure 21 : Quantification des ARNm codant pour IL-6 (A) ou MCIP-1 (B), mesurés par RT-PCR dans les muscles soleus et plantaris de rats témoins, à l'arrêt d'un exercice unique ou après 2 heures de récupération (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. \* différent du groupe témoin,  $P < 0,05$ . # différent du groupe arrêt d'exercice,  $P < 0,05$ .

MHC exprimées	Fibres pures		Fibres hybrides
	I	IIa	I-IIa
Pourcentage	91,0%	1,8%	7,2%
Total	92,8%		7,2%

Tableau 6 : Pourcentage des différents types de fibres isolées des muscles soleus (n=279)

MHC exprimées	Fibres pures				Fibres hybrides			
	I	IIa	IIx	IIb	IIa-IIx	IIx-IIb	IIa-IIx-IIb	Autres
Pourcentage	5,4%	10,8%	18,0%	11,6%	11,1%	37,7%	3,0%	2,5%
Total	45,8%				54,2%			

Tableau 7 : Pourcentage des différents types de fibres isolées dans la partie profonde des muscles plantaris (n=406). Autres : I-IIx, I- IIa-IIx, IIx -néo- IIb ou IIa - IIx -néo- IIb.

### **1.3. RESULTATS**

#### **A. VALIDATION DU MODELE ANIMAL**

Les mesures d'ARNm codant IL-6 sur muscles plantaris et soleus entiers ont montré une évolution tout à fait comparable à celle décrite chez l'homme, avec une augmentation importante à l'arrêt de l'exercice ( $P < 0,05$ ) et un retour aux valeurs témoin 2 heures après (figure 21 A). Par ailleurs, l'augmentation de la transcription du gène codant MCIP-1 à l'arrêt de l'exercice a confirmé l'activation de la voie de la calcineurine dans les deux muscles considérés ( $P < 0,05$ ) (figure 21 B).

#### **B. ANALYSE SUR FIBRES ISOLEES**

##### *B.1. Bilan des fibres incluses dans l'étude*

Les fibres isolées des muscles soleus étaient à 91% des fibres I pures et à 9% des fibres mixtes I-IIa (tableau 6). Parmi les fibres issues de la partie profonde des muscles plantaris, seules 46% n'exprimaient qu'une isoforme de MHC (tableau 7). La répartition de ces fibres en type I, IIa, IIx et IIb est présentée dans le tableau 8. Après élimination des fibres « contaminées » par des cellules endothéliales et/ou des cellules monocytaires, seules 37% des fibres typées ont été incluses dans l'étude.

##### *B.2. Mesure des ARNm codant IL-6*

Les résultats de RT-PCR ont mis en évidence des niveaux d'ARNm IL-6 très faibles dans les fibres d'animaux témoins, sans différence d'expression entre les différents types de fibres. A l'arrêt de l'exercice, les résultats montraient une augmentation très importante de la transcription du gène IL-6 dans les fibres de muscles soleus ( $P < 0,05$ ) (figure 22 A) et dans les fibres de type I et IIa issues de muscles plantaris ( $P < 0,05$ ). Dans les fibres de type IIx et IIb issues de muscle plantaris, seule une tendance non significative à l'augmentation était observée (figure 22 B).

Type de fibres	I	IIa	IIx	IIb
Pourcentage	11,8%	23,6%	39,3%	25,3%
Nombre	n=22	n=44	n=73	n=47

Tableau 8 : Pourcentage et nombre des différents types de fibres pures isolées dans la partie profonde des muscles plantaris (n=186).

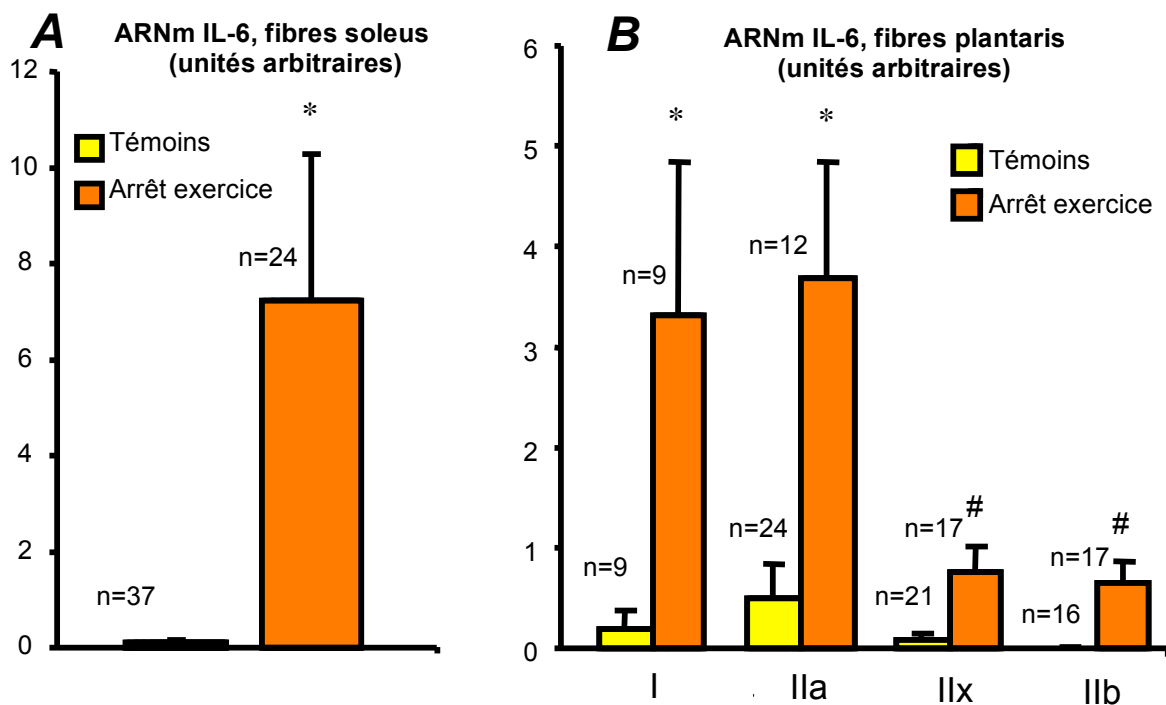


Figure 22 : Quantification des ARNm codant pour IL-6, mesurés par RT-PCR dans des fibres isolées de muscles soleus (A) et plantaris (B) de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent du groupe témoin pour le même type de fibre,  $P < 0,05$ .

# différent des fibres IIa du groupe arrêt d'exercice,  $P < 0,05$ .

### *B.3. Evaluation de l'activité calcineurine*

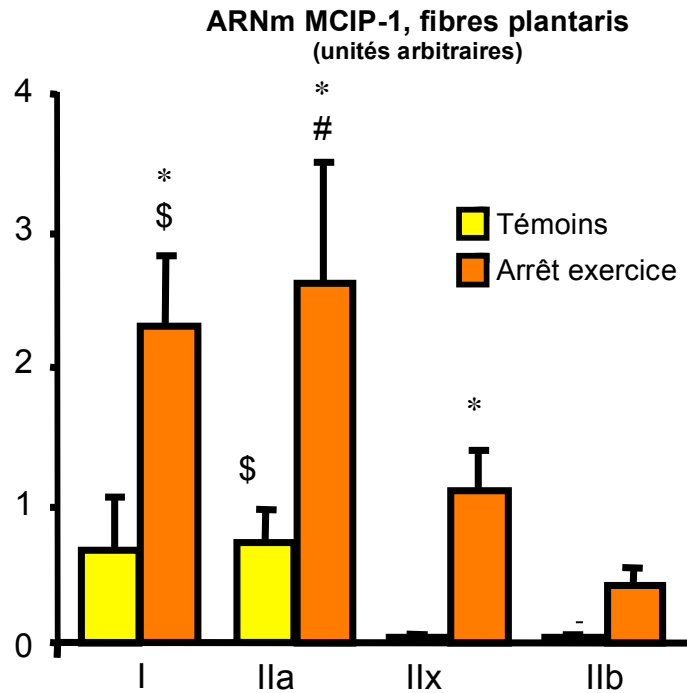
Comme nous l'avons détaillé plus avant dans le document, l'activité de la calcineurine a été évaluée par les niveaux de transcrits d'un des inhibiteurs endogènes majeurs de cette enzyme, MCIP-1. Les résultats de RT-PCR dans les fibres témoins issues de muscle plantaris ont montré des niveaux d'ARNm codant MCIP-1 plus élevés dans les fibres IIa que dans les fibres IIx et IIb ( $P < 0,05$ ), la même tendance, mais non significative, a été observée pour les fibres de type I. L'exercice a provoqué une augmentation importante des ARNm codant MCIP-1 dans les fibres de type I, IIa et dans une moindre mesure IIx ( $P < 0,05$ ) (figure 23).

### **C. CONTENU EN GLYCOGENE DES FIBRES MUSCULAIRES**

L'étude des colorations du glycogène et des marquages immuno-histochimiques sur coupes de muscles soleus montraient une déplétion glyco-génique importante dans les fibres de type I à l'arrêt de l'exercice. Dans les fibres de type IIa, la diminution des réserves en glycogène était moins marquée. Les mêmes observations étaient faites dans les muscles plantaris concernant les fibres de type I et IIa. Les fibres IIx et IIb montraient une grande hétérogénéité de coloration avec pour certaines une déplétion importante et pour d'autre un contenu en glycogène bien conservé (figure 24).

## **1.4. DISCUSSION**

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants : 1) à l'arrêt d'un exercice, les niveaux d'ARNm IL-6 sont fortement augmentés dans les fibres musculaires ; 2) IL-6 est produite préférentiellement par les fibres de type I et IIa ; 3) cette production est contemporaine d'une activité calcineurine augmentée ; 4) la relation forte entre contenu en glycogène et production d'IL-6 n'est pas retrouvée au niveau cellulaire.

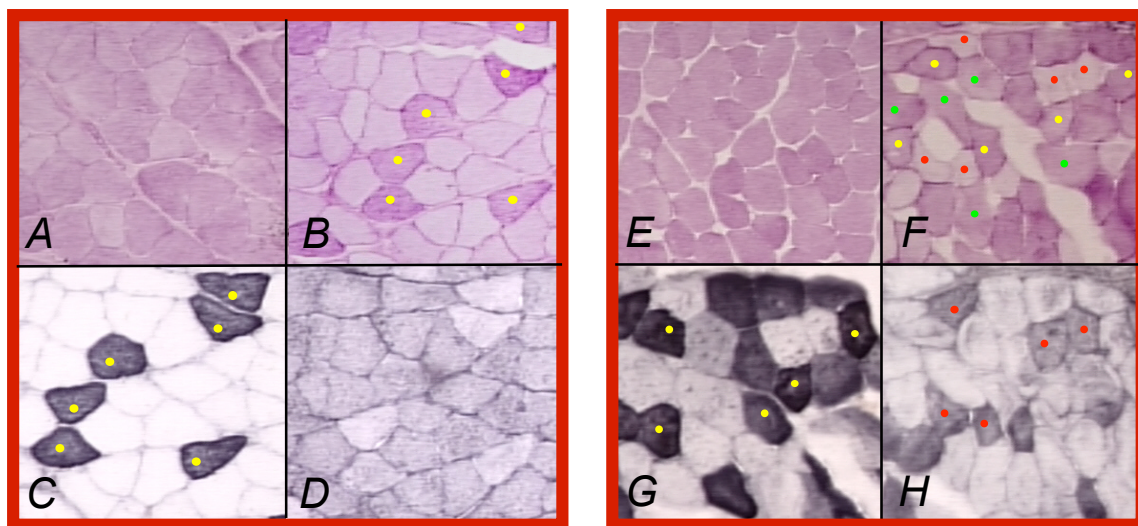


**Figure 23 :** Quantification des ARNm codant pour MCIP-1, mesurés par RT-PCR dans des fibres isolées de muscles plantaris de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent du groupe témoin pour le même type de fibre,  $P < 0,05$ .

\$ différent des fibres IIx du même groupe,  $P < 0,05$ .

# différent des fibres IIb du même groupe,  $P < 0,05$ .



**Soleus**

**Plantaris**

**Figure 24 :** Contenu en glycogène des fibres de muscles soleus (*A, B*) et plantaris (*E, F*) évaluée par coloration au PAS. Immuno-histochimie réalisée sur les mêmes coupes avec un anticorps anti MHC I (*D, H*) ou IIa (*C, G*). Au repos, le marquage PAS est homogène dans les deux muscles (*A, E*). A l'arrêt de l'exercice, les fibres de type I (●) sont très appauvries en glycogène, les fibres de type IIa (●) le sont beaucoup moins (*B, F*). Les autres types de fibres (IIx et IIb, ●) ont un contenu en glycogène très variable.

***A l'arrêt d'un exercice, les niveaux d'ARNm codant IL-6 sont fortement augmentés dans les fibres musculaires.***

S'il a bien été démontré que le muscle est le principal lieu de production d'IL-6 à l'exercice, responsable de l'augmentation des concentrations plasmatiques observée en fin d'épreuve, la question de l'origine cellulaire de la molécule n'était pas clairement tranchée. La présence de la protéine dans le cytoplasme des fibres musculaires humaines au décours d'un exercice, révélée par immuno-histochimie (Penkowa et al., 2003, Fischer et al., 2004), constituait un argument important mais insuffisant car seule la présence de l'ARNm, dans une cellule permet d'affirmer qu'une molécule est produite localement. La première preuve expérimentale a été apportée par des résultats d'hybridation in-situ des ARNm codant IL-6 dans des fibres musculaires (biopsie humaine) après 1 h de pédalage (Hiscock et al., 2004) ; cependant le fait que seules les fibres rapides étaient marquées à l'arrêt d'un exercice endurant, lequel recrute en priorité les fibres lentes et IIa, était troublant. La technique de dissection utilisée dans notre étude, mise au point dans notre laboratoire (Biro et al., 2003), permet d'isoler des fibres musculaires en les débarrassant du tissu conjonctif et des gros vaisseaux clairement visibles sous la loupe binoculaire. Nos résultats de RT-PCR IL-6 ont été obtenus après s'être assuré qu'aucune fibre incluse dans l'étude n'était contaminée ni par des cellules endothéliales ni par des monocytes infiltrants, cellules capables de produire IL-6 en grande quantité (Heinrich et al., 1998) et invisibles à la dissection. Ce contrôle a été réalisé par la détection en RT-PCR de marqueurs très exprimés par les cellules en question (PECAM et CD11b respectivement) et a conduit à l'élimination de nombreuses fibres. Si l'absence d'amplification de ces marqueurs ne peut stricto sensu éliminer complètement la présence de rares cellules contaminantes en deçà du seuil de détection, il est raisonnable de penser que l'immense majorité des ARNm mesurés sur nos échantillons sont bien issus de la fibre musculaire. La question de la participation éventuelle des cellules satellites à la production d'IL-6 s'est posée, car une fois activées ces cellules peuvent en produire, dans les processus de cicatrisation par exemple. Cependant, ces cellules sont normalement quiescentes, peu nombreuses et leur activation par l'exercice en un temps court (90 min) est improbable. Nos résultats démontrent donc bien que les fibres musculaires sont des éléments cellulaires producteurs d'IL-6 dans un muscle qui se contracte. De plus, l'élévation des niveaux



d'ARNm dans les éléments cellulaires isolés, à l'arrêt de l'exercice, est considérable, de l'ordre d'un facteur 1000 dans les fibres issues du soleus.

***IL-6 est produite préférentiellement par les fibres musculaires de type I et IIa.***

Lors d'un exercice sous-maximal, les différents types de fibres musculaires sont recrutées selon un ordre précis. Pour une puissance donnée, il y a d'abord recrutement des unités motrices lentes et éventuellement rapides oxydatives, puis quand l'exercice se prolonge, il y a recrutement des unités motrices plus rapides (Henneman et Olson, 1965). Etant donné le caractère temporel du recrutement des fibres musculaires, nous avons formulé l'hypothèse que la production d'IL-6 serait préférentiellement le fait des fibres les plus lentes sollicitées en priorité, comme le suggèrent des résultats obtenus sur biopsies humaines (Fischer et al., 2004), mais qui sont cependant contredits par d'autres données obtenues chez l'homme (Hiscock et al., 2004). Contrairement à l'immunohistochimie ou l'hybridation in situ utilisées dans ces travaux, la RT-PCR en temps réel permet une quantification fine et reproductible des ARNm. Nos résultats montrent des niveaux d'ARNm IL-6 très augmentés dans les fibres I et IIa, recrutées précocement, alors qu'aucune augmentation significative n'est retrouvée dans les fibres IIx et IIb, recrutées plus tardivement. Même si ce résultat n'exclue pas que les fibres plus rapides soient capables de produire IL-6 lors d'exercice à puissance plus élevée, dans le cadre de l'exercice endurant prolongé, ce sont bien les fibres les plus lentes et les plus oxydatives qui produisent IL-6. L'ensemble des études menées chez l'homme ont identifié deux déterminants importants de la production d'IL-6, les réserves en glycogène musculaire et la contraction musculaire, deux aspects que nous avons abordés au niveau cellulaire dans cette étude.

***La relation forte entre contenu en glycogène et production d'IL-6 n'est pas retrouvée au niveau cellulaire.***

Il existe une relation inverse très marquée entre production d'IL-6 par un muscle et son contenu en glycogène en début d'exercice (Keller et al., 2001, Steensberg et al., 2001a),

suggérant un contrôle de la production d'IL-6 par les réserves locales en hydrates de carbone. Dans notre étude, le marquage des coupes histologiques de muscle plantaris par la technique du PAS confronté au marquage des MHC par immuno-histochimie sur coupes sériées, montre que si les fibres de type I sont toutes appauvries en glycogène à l'arrêt de l'exercice, il n'en est pas de même pour les fibres IIa (figure 24). Par ailleurs, une déplétion en glycogène très marquée est également retrouvée dans de nombreuses fibres IIx et IIb. Ainsi, le lien étroit qui existe entre contenu en glycogène et production d'IL-6 au niveau de l'organe entier n'est pas retrouvée au niveau des cellules productrices. Notre étude ne permet pas de mettre en évidence les mécanismes qui relient la baisse des réserves énergétiques locales et la transcription d'IL-6, mais des hypothèses peuvent être proposées. La première pourrait être l'existence d'une signalisation paracrine issue des premières fibres appauvries en glycogène vers leurs voisines. Une autre hypothèse serait que, plus que le niveau même des réserves, la transcription d'IL-6 serait modulée par le flux d'utilisation de ces réserves. Ainsi les marquages au PAS en fin d'épreuve ne sont qu'un instantané figé et ne peuvent rendre compte du flux d'utilisation du glycogène ou du glucose. Par contre, les mesures de glycogène et d'ARNm IL-6 sur tissu entier moyennent les différences cellulaires et permettraient de mettre en évidence un relation forte au niveau de l'organe. En tout état de cause, nos résultats montrent qu'au sein d'une fibre qui se contracte, le niveau des réserves intra-cellulaires en glycogène n'est pas un déterminant important du contrôle du gène IL-6. Les mécanismes liant la baisse des réserves en glycogène et la transcription d'IL-6 restent donc à caractériser et à valider.

***A l'exercice, la production d'IL-6 par les fibres musculaires est contemporaine d'une augmentation de l'activité calcineurine.***

Il a été clairement démontré que dans un organisme à l'exercice, un muscle ne produit et ne libère de l'IL-6 que s'il est sollicité, mettant la contraction musculaire au cœur des processus contrôlant l'expression du gène (Steensberg et al., 2000, Steensberg et al., 2001a). Par ailleurs la transcription du gène commence rapidement après le début de l'exercice (Keller et al., 2001). C'est pour ces deux raisons que les mouvements de  $Ca^{2+}$ , événements clés et immédiats de la contraction musculaire, ont été évoqués comme stimuli importants de la

transcription du gène IL-6 et que l'implication de la voie de la calcineurine a été proposée (Febbraio et Pedersen, 2002). Nous avons évalué l'activation de cette voie par la mesure de l'ARNm codant pour le variant 4 de MCIP-1, seule méthode utilisable sur des fibres musculaires isolées et qui permet d'avoir un reflet certes indirect, mais validé et reproductible de l'activité de la calcineurine (Yang et al., 2000). Après avoir vérifié sur tissu entier que l'activité calcineurine augmentait en réponse à l'exercice réalisé dans nos conditions expérimentales, nous avons montré que les niveaux d'ARNm codant MCIP-1 augmentent de façon très importante dans les fibres I et IIa, et dans une moindre mesure dans les fibres IIx. Si l'on met en regard les niveaux d'ARNm IL-6 dans les mêmes fibres, il existe donc une concomitance entre activité calcineurine augmentée et transcription du gène IL-6. Si ce résultat ne démontre en rien un lien de causalité entre ces deux événements, il représente cependant une donnée majeure de l'étude car c'est le premier argument expérimental qui vient étayer l'hypothèse formulée par Febbraio et Pedersen (2002) de l'implication de cette voie de signalisation dans le contrôle du gène IL-6.

**En somme cette première expérimentation nous a permis d'aborder au niveau cellulaire, des mécanismes bien décrits au niveau de l'organe et de confirmer définitivement qu'IL-6 est produite par les fibres musculaires les plus recrutées (I et IIa), indépendamment de leur contenu en glycogène. Par ailleurs nous apportons un argument fort pour appuyer l'hypothèse d'un rôle de la voie de la calcineurine, avec une élévation concomitante de la transcription de MCIP-1 et d'IL-6. Notre deuxième expérimentation s'est donc très logiquement attachée à déterminer s'il existe ou non un lien de causalité entre ces deux événements.**

## **2. ETUDE DE L'IMPLICATION DE LA VOIE CALCINEURINE DANS LA PRODUCTION D'IL-6 PAR LE MUSCLE A L'ARRET D'UN EXERCICE UNIQUE.**

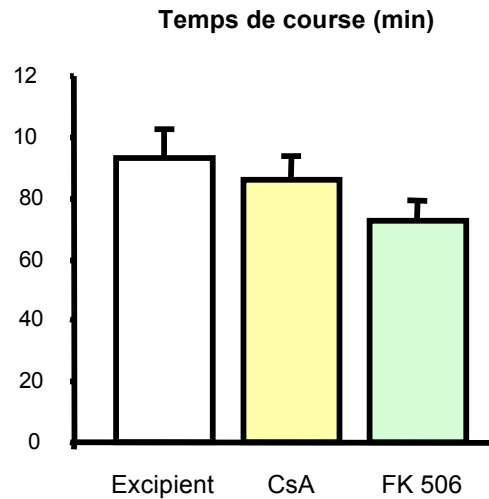
### **2.1. RAPPEL DES OBJECTIFS DE L'EXPERIMENTATION**

Les résultats de l'étude précédente ont montré que la transcription du gène codant IL-6 était plus marquée dans les fibres oxydatives (I et IIa) et qu'elle était associée à une activité calcineurine élevée. L'objectif de notre deuxième expérimentation était donc de vérifier s'il existe ou non un lien de causalité entre activation de la voie de la calcineurine et transcription du gène codant IL-6.

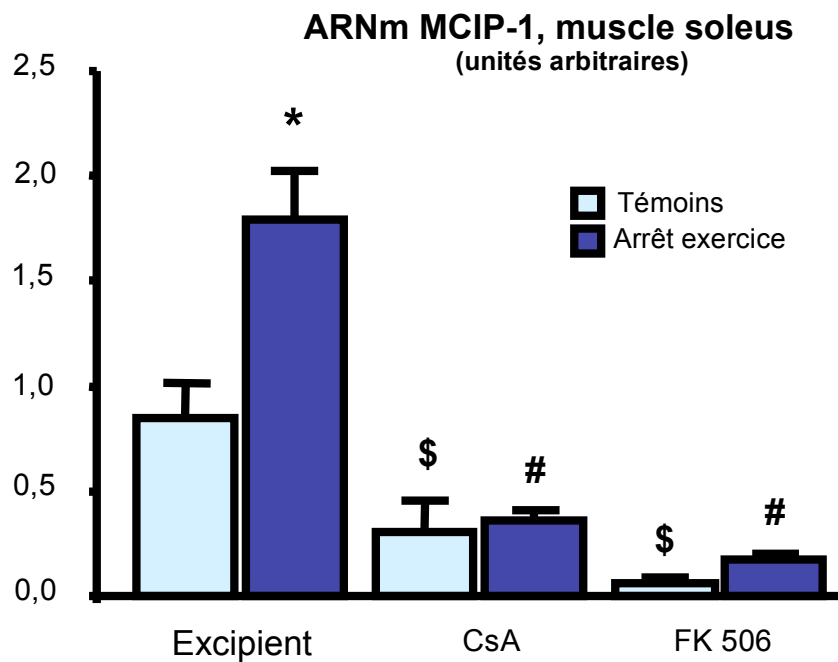
### **2.2. PLAN EXPERIMENTAL ET METHODOLOGIE**

#### **A. PLAN EXPERIMENTAL**

Le modèle validé de course sur tapis roulant lors de la première expérimentation a été utilisé pour cette étude. Des rats Wistar femelles ont été préférées car elles tolèrent mieux le traitement par la CsA. Ce constat, non expliqué à ce jour, est cependant très reproductible. Les animaux ont été répartis dans 3 lots traités par deux inhibiteurs de la calcineurine différents (CsA et FK506) ou leur excipient (modalités cf matériels et méthodes 2.1.). Chaque lot a alors été séparés en un groupe d'animaux témoins sédentaires (n=8) et un groupe d'animaux actifs (n=9) qui ont réalisé un exercice unique sur tapis roulant (modalités cf matériels et méthodes 2.1.). Les muscles soleus ont été choisis pour l'étude car ils sont bien recrutés à la course, produisent de l'IL-6, et sont sensibles à la CsA, contrairement aux muscles plantaris (Bigard et al., 2000).



**Figure 25** : Temps de course des animaux traités par CsA, FK506 ou leur excipient (minutes). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.



**Figure 26** : Quantification des ARNm codant MCIP-1, mesurés par RT-PCR dans les muscles soleus de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique, traités par CsA, FK506 ou leur excipient (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent du groupe témoin du même traitement,  $P < 0,05$ .

# différent du groupe arrêt d'exercice Excipient,  $P < 0,05$ .

\$ différent du groupe témoins Excipient,  $P < 0,05$ .

## ***B. METHODOLOGIE***

### *B.1. Contrôle du modèle*

L'activité calcineurine musculaire à été évaluée par la mesure des ARNm codant MCIP-1. D'autres facteurs connus pour moduler la transcription d'IL-6 à l'exercice ont été explorés (temps de course, glycogène musculaire et la phosphorylation de p38 dans le muscle) pour éliminer un effet indésirables des traitements sur ces variables.

### *B.2. Étude de l'expression du gène IL-6*

La transcription du gène codant IL-6 dans le tissu musculaire a été étudié par RT-PCR, les concentrations plasmatiques de la protéine IL-6 ont été mesurées par ELISA.

### *B.3. Analyse statistique*

Les résultats ont été analysés grâce à une ANOVA à deux voies permettant d'évaluer l'effet de exercice et l'effet du traitement. Les comparaisons intergroupes ont été réalisées avec un test post hoc de Newman-Keuls. Les temps de courses ont été comparés par une ANOVA à une voie.

## ***2.3. RESULTATS***

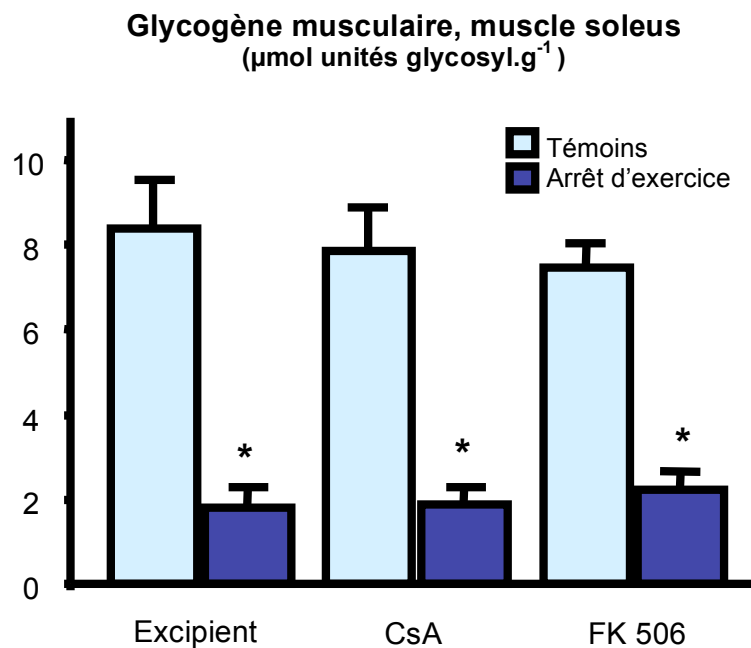
### ***A. CONTROLE ET VALIDATION DU MODELE***

#### *A.1. Poids et temps de course*

Les poids des animaux n'étaient pas différents dans les trois groupes. Il n'y avait pas d'effet de l'exercice sur les temps de course (figure 25).

	Excipient	CsA	FK 506
Témoins	8,51 ± 0,25	9,52 ± 0,30	9,98 ± 0,50
Arrêt exercice	8,63 ± 0,94	7,68 ± 0,42	8,79 ± 0,60

**Tableau 9** : Glycémies de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique, traités par CsA, FK506 ou leur excipient (mmol.l<sup>-1</sup>). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.



**Figure 27** : Contenu en glycogène du muscle soleus de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique, traités par CsA, FK506 ou leur excipient ( $\mu\text{mol d'unités glycosyl.g}^{-1}$ ). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.

\* différent du groupe témoin même traitement,  $P < 0,001$ .

### *A.2. Activité calcineurine*

Chez les animaux restés au repos, les traitements inhibiteurs par CsA et FK506 ont logiquement provoqué une diminution significative des niveaux d'ARNm codant MCIP-1 (respectivement -50 et -75%,  $P < 0,05$ ). Chez les animaux traités par l'excipient, l'exercice a provoqué une augmentation significative de la transcription du gène codant MCIP-1 ( $P < 0,01$ ). Les traitements par CsA et FK506 ont totalement bloqué cette activation de la voie de la calcineurine en réponse à l'exercice (figure 26)

### *A.3. Statut glucidique*

La glycémie des animaux n'a été affectée ni par l'exercice ni par les traitements pharmacologiques (tableau 9). L'exercice épuisant a provoqué une diminution de 75 à 80% du contenu musculaire en glycogène dans les trois conditions de traitement, excipient, CsA ou FK506 ( $P < 0,001$ ) (figure 27). Aucun effet du traitement n'a été trouvé.

### *A.4. Phosphorylation de p38*

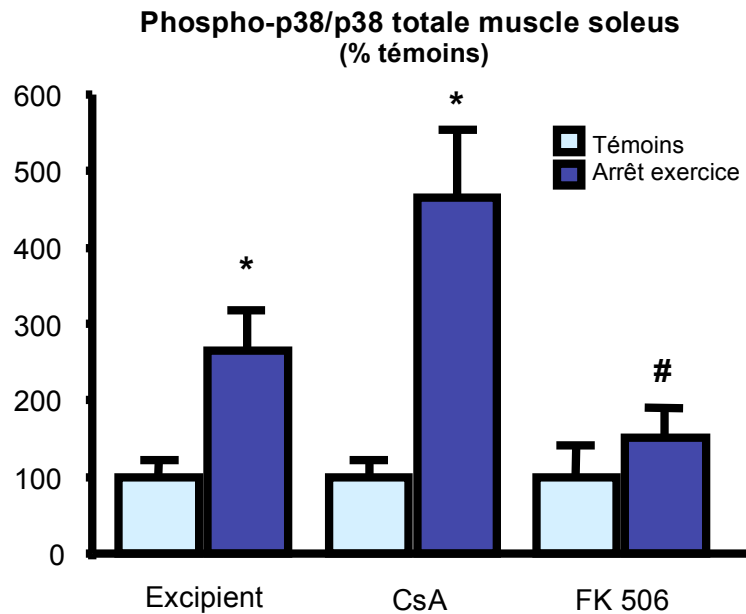
Dans les groupes témoin et CsA, l'exercice a provoqué une augmentation marquée de la phosphorylation de p38 ( $P < 0,05$ ) dans les muscles soleus. De façon inattendue, cette augmentation n'a pas été retrouvée dans les muscles des animaux traités par FK506 (figure 28). Par ailleurs l'augmentation du rapport phospho-p38/p38 totale semblait plus marquée dans le groupe CsA, bien que cette différence ne soit pas significative.

## **B. EXPRESSION DU GÈNE CODANT IL-6**

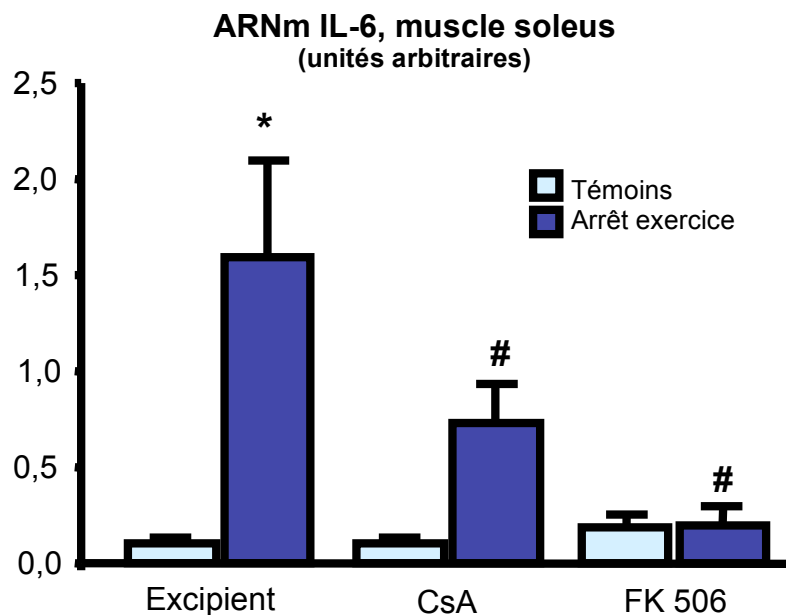
### *B.1. Transcription du gène IL-6 dans les muscles soleus*

Comme cela a été observé lors de la première étude chez les animaux témoins, l'expression de l'ARNm codant IL-6 était faible chez les animaux au repos traités par l'excipient. Les traitements par CsA et FK506 n'ont pas modifié l'expression d'IL-6 chez les animaux au repos. L'exercice a provoqué une augmentation importante et significative de la transcription du gène IL-6 dans les muscles soleus des animaux traités par l'excipient (x15,





**Figure 28** : Rapport Phospho-p38/p38 totale, mesuré par Western Blot dans les muscles soleus de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique, traités par CsA, FK506 ou leur excipient (% du témoin même traitement). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.  
 \* différent du groupe témoin même traitement,  $P < 0,05$ .  
 # différent des groupes arrêt d'exercice Excipient et CsA,  $P < 0,05$ .



**Figure 29** : Quantification des ARNm codant IL-6, mesurés par RT-PCR dans les muscles soleus de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique, traités par CsA, FK506 ou leur excipient (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.  
 \* différent du groupe témoin du même traitement,  $P < 0,05$ .  
 # différent du groupe arrêt d'exercice Excipient,  $P < 0,05$ .

P<0,001). Dans le groupe traité par CsA, l'augmentation des ARNm IL-6 observée n'a pas atteint le seuil de significativité (P=0,15), et était différente de celle observée dans le groupe traité par excipient (P<0,05). Enfin, aucune variation de l'expression du gène n'a été retrouvée dans les muscles soleus des animaux actifs traités par FK506 (figure 29).

### *B.2. Concentrations plasmatiques d'IL-6*

L'exercice a provoqué une augmentation importante de la concentration plasmatique d'IL-6 dans le groupe traité par l'excipient (x6, P<0,01). En revanche, aucune variation de cette concentration n'a été retrouvée à l'arrêt de l'exercice chez les animaux traités par CsA ou FK506 (figure 30).

## **2.4. DISCUSSION**

Le résultat principal de cette étude est que l'inhibition pharmacologique de la calcineurine entraîne une diminution de la transcription du gène IL-6 dans le muscle à l'arrêt de l'exercice, ainsi qu'une inhibition de la libération de la protéine dans le plasma.

***La CsA et le FK506 ont inhibé efficacement l'activité de la calcineurine dans les muscles soleus au repos et ont totalement bloqué son activation par en réponse à l'exercice.***

L'administration d'inhibiteurs de la calcineurine est connue pour entraîner de nombreux effets secondaires, que ce soit à doses thérapeutiques chez l'homme, où ils sont utilisés principalement dans la prévention des rejets de greffes, ou à doses plus élevées susceptibles d'inhiber la calcineurine dans le muscle chez le rongeur. Parmi ces effets indésirables certains posaient potentiellement des problèmes dans notre étude, ainsi la CsA peut diminuer la prise alimentaire, le poids des animaux (Bigard et al., 2000) et limiter le temps d'endurance des animaux (Mercier et al., 1995). Ces effets sont décrits lors de traitements chroniques (généralement plusieurs semaines), mais dans notre étude, l'administration de la CsA sur une durée très courte (2,5 jours) a permis de les éviter. Par

### Concentration plasmatique d'IL-6 (pg.ml<sup>-1</sup>)

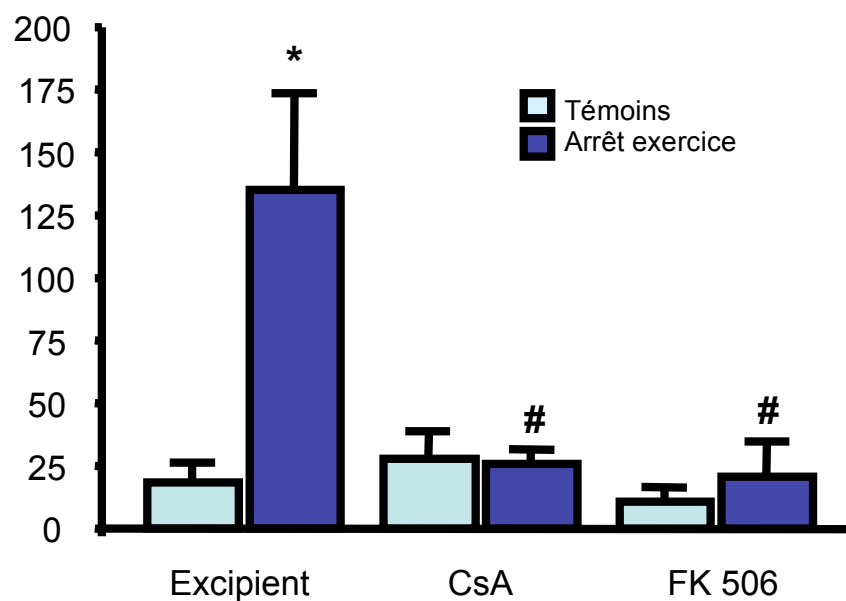


Figure 30 : Concentration plasmatique d'IL-6 mesurée par ELISA chez des rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique, traités par CsA, FK506 ou leur excipient (pmol.ml<sup>-1</sup>). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent du groupe témoin du même traitement,  $P < 0,01$ .

# différent du groupe arrêt d'exercice Excipient,  $P < 0,01$ .

ailleurs, le FK506 administré à des doses et selon des modalités classiquement décrites (3 à 5 mg.kg<sup>-1</sup> ip) s'est montré très délétère pour les animaux avec une perte de poids et des difficultés voire une incapacité à courir sur le tapis roulant. Là encore, l'adaptation de la durée du traitement (1,5 jour) mais aussi de la posologie (1 mg.kg<sup>-1</sup>) et de la voie d'administration (sous-cutanée) a permis d'éviter ces effets indésirables. Au final, les poids des animaux et les temps de course des animaux traités par les inhibiteurs de calcineurine ne sont pas significativement différents de ceux des animaux traités par l'excipient.

Comme dans l'étude précédente, nous avons évalué indirectement l'activité calcineurine par la mesure des ARNm codant le variant 4 de MCIP-1. Ce choix est motivé par la fiabilité et la simplicité de la technique, les mesures d'activités sur tissu entier étant par ailleurs sujettes à certaines limitations tant théoriques que techniques (Molkentin, 2004). L'activité calcineurine au repos est diminuée significativement dans les muscles soleus des animaux traités par CsA et FK506 (50% et 75% respectivement), signant l'efficacité des inhibiteurs dans les conditions de repos. Mais le résultat le plus marquant est que les deux traitements ont totalement bloqué l'activation de la calcineurine induite par l'exercice, retrouvée chez les animaux du groupe Excipient. Le conditionnement permet donc d'étudier l'expression d'ARNm ou de gènes dans les muscles d'animaux réalisant un exercice endurant sans élévation de l'activité calcineurine tissulaire. Il fallait cependant vérifier l'absence d'effets indésirables biologiques de la CsA et de FK 506 sur des variables susceptibles de moduler l'expression d'IL-6. La disponibilité en hydrates de carbones ayant une influence importante sur l'expression du gène IL-6, via la voie p38, nous avons contrôlé que les traitements administrés n'affectaient pas le contenu musculaire en glycogène, la glycémie et la phosphorylation de p38 dans le soleus. Si aucun effet des traitements n'a été trouvé pour les deux premières variables, de façon inattendue FK506 a totalement bloqué la phosphorylation de p38 induite par l'exercice.

***L'inhibition pharmacologique de la calcineurine a diminué la transcription du gène IL-6 dans les muscles soleus en réponse à l'exercice, et a prévenu l'apparition de la protéine IL-6 dans le plasma.***

L'administration de CsA, en bloquant l'activation de la calcineurine, a permis de diminuer de 50% la transcription du gène IL-6 et de prévenir son apparition dans le plasma, confirmant l'hypothèse de l'implication de cette voie de signalisation dans l'expression du gène IL-6 dans le muscle à l'exercice. La calcineurine est présente en grande quantité dans le muscle squelettique et intervient dans de très nombreux processus allant de la différenciation des cellules musculaires à l'adaptation du tissu aux stimuli environnementaux et à la sollicitation fonctionnelle (Bassel-Duby et Olson, 2003). Elle est en particulier un acteur important du contrôle du phénotype lent et oxydatif en réponse à la stimulation nerveuse (Chin et al., 1998, Bigard et al., 2000). Nos résultats montrent que son rôle peut être étendu au contrôle du gène IL-6 lors de cet événement unique et aigu que représente un exercice prolongé sur tapis roulant.

Dans ce travail, nous n'avons pas exploré les cibles de la calcineurine et cette question reste ouverte. Une large partie des effets de la calcineurine dans le muscle en réponse au régime lent d'activation motoneuronale, s'exercent via la translocation nucléaire de sa cible préférentielle, NFAT, ou de MEF-2 (Liu et al., 2001, Wu et al., 2001, Shen et al., 2006). Dans des cultures de cellules musculaires lisses ou d'artérioles, la production d'IL-6 en réponse à divers stimuli est directement dépendante de la voie calcineurine/NFAT, la CsA, le FK506 et des inhibiteurs spécifiques de NFAT bloquent la production d'IL-6 alors que la surexpression d'une forme constitutivement active de NFAT-c3 la stimule (Abbott et al., 2000, Nilsson et al., 2007). Ces données montrent un lien possible entre NFAT et l'activation du gène IL-6. Cependant, une étude réalisée chez l'homme a montré qu'il n'y avait pas d'augmentation de NFAT dans les noyaux issus de muscle à l'arrêt d'un exercice de pédalage d'1 heure (Chan et al., 2004b). Par ailleurs, comme nous l'avons exposé plus haut, il n'existe aucun site de fixation NFAT ou MEF-2 identifiés sur le promoteur du gène IL-6 humain et l'analyse de la région promotrice du gène IL-6 de rat par le logiciel de prédiction *Transcription Element Search Software* (university of Pennsylvania) ne montre aucun site de fixation possible pour NFAT. D'autres expérimentations devront s'intéresser aux molécules agissant en aval de la

calcineurine et aux facteurs de transcriptions capables de transactiver le promoteur IL-6 à l'exercice dans le muscle. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation du gène IL-6 par NFAT pourrait reposer assez largement sur une coopération entre la voie de la calcineurine et la voie NF $\kappa$ B (Abbott et al., 2000). Par ailleurs, si NFAT reste un candidat de choix, la calcineurine peut aussi contrôler des expression géniques par des mécanismes indépendants de NFAT (Parsons et al., 2004), via NF $\kappa$ B par exemple (Frantz et al., 1994, Alzuherri et Chang, 2003). Enfin, l'existence de coopérations et de signalisations croisées entre calcineurine et MAPK, en particulier p38, dans le cœur (Molkentin, 2004) ouvre encore d'autres perspectives dans la compréhension du contrôle du gène.

Le blocage complet de la phosphorylation de p38 en réponse à l'exercice est un effet inattendu du traitement par le FK506. Une telle inhibition de p38 a été décrite en réponse à des traitement par CsA ou FK506 sur des leucocytes en culture ou d'autres cellules in vitro (Kreideweiss et al., 1999, Matsuda et al., 2000, Sanchez-Perez et al., 2004). Cependant, bien que ces molécules aient été largement utilisées, l'inhibition de p38 dans le muscle n'a jamais été rapportée en réponse à un traitement visant à inhiber l'activité calcineurine in vivo. La calcineurine peut diminuer l'expression de p38 dans des cardiomyocytes isolés ou des souris surexprimant calcineurine dans le cœur (Lim et al., 2001). L'inhibition de la calcineurine pourrait donc favoriser l'activité p38, suggérant que le blocage de p38 que nous observons serait dû à un effet propre de FK506 sur p38 et non à son effet inhibiteur de la calcineurine. Cet propriété de FK506 pourrait en faire un outil pharmacologique original permettant le double blocage calcineurine-p38, il faut cependant noter que les animaux tolèrent mal ce traitement et que son administration chronique aux doses utilisées ici est difficilement envisageable. Dans notre expérimentation, dans le groupe d'animaux traité par FK506, le double blocage de la calcineurine et de p38 a eu pour conséquence une inhibition complète de la transcription du gène IL-6 en réponse à l'exercice. Bien qu'inattendu, ce résultat vient renforcer la notion d'un double contrôle du gène par calcineurine et p38 lors de la contraction musculaire (Febbraio et Pedersen, 2002, Chan et al., 2004b).

**En somme cette deuxième expérimentation a permis d'établir un lien de causalité partiel, mais assez probable, entre les deux événements concomitants décrits dans notre premier travail : augmentation de l'activité calcineurine et transcription du gène IL-6 à l'arrêt de l'exercice dans le muscle. Nous apportons par ailleurs un argument**

supplémentaire pour affirmer le rôle joué par p38 dans le contrôle du gène IL-6 à l'exercice. Au-delà de l'éclairage mécanistique qu'apportent ces données sur le contrôle du gène IL-6, la signification physiologique de la production d'IL-6 à l'exercice s'en trouve clarifiée : les muscles expriment bien cette protéine parce qu'ils se contractent et non en réponse à une quelconque forme de souffrance. Ce constat abonde donc dans le sens de toute la littérature obtenue chez l'homme et conforte la notion d'un signal produit par un muscle qui se contracte et qui doit puiser des substrats dans le sang circulant car ses propres réserves sont basses. Un cible importante de ce signal semble être le foie, organe capable d'assurer un débit de glucose permettant de couvrir les besoins des muscles actifs. Notre troisième expérimentation s'est donc intéressée à cet organe, afin d'étudier les mécanismes par lesquels IL-6 pourrait favoriser la PHG et en particulier la néoglucogenèse.

### **3. ETUDE DE L'ACTION DE LA PROTEINE IL-6 DANS LE FOIE A L'ARRET D'UN EXERCICE UNIQUE.**

#### **3.1. RAPPEL DES OBJECTIFS DE L'EXPERIMENTATION**

Les objectifs de cette expérimentation étaient : 1) d'évaluer l'existence d'une signalisation IL-6 in vivo, sur les cellules hépatiques, lors d'un exercice endurant ; 2) de définir si IL-6 peut avoir un effet sur la PHG via la voie de la néoglucogenèse en agissant sur la transcription de ses enzymes clés.

#### **3.2. PLAN EXPERIMENTAL ET METHODOLOGIE**

##### **A. PLAN EXPERIMENTAL**

Cette expérimentation a concerné des rats Wistar femelles, deux conditionnements ont été réalisés.

1) Le premier a consisté en un exercice réalisé selon les mêmes modalités que dans les deux premiers travaux (cf matériels et méthode 2.1.). Les animaux ont été répartis de manière aléatoire dans 4 groupes expérimentaux : Témoin (n=8), Arrêt d'exercice (n=10), Exercice + 2h (n=8) et Exercice + 6h (n=8).

2) Dans un second temps, pour isoler les effets propres d'IL-6 de ceux de l'exercice lui-même (en particulier les variations hormonales) sur la PHG, nous avons procédé à des injections d'IL-6 recombinante selon les modalités décrites précédemment (cf matériels et méthode 2.1.). Les animaux, à jeun de 12 heures, ont été répartis de manière aléatoire dans 3 groupes expérimentaux : IL-6, 3  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (n=8) ; IL-6, 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (n=8) et témoins recevant du sérum physiologique (n=8) ; tous les animaux ont été sacrifiés 1 heure après l'injection.

À l'issue du conditionnement, les animaux ont été anesthésiés. Le foie a été prélevé, une partie a été congelée dans l'azote liquide une autre a été plongée dans le RNAlater. Le plasma a été prélevé.



## ***B. METHODOLOGIE***

### *B.1. Etude de la signalisation IL-6 dans le foie*

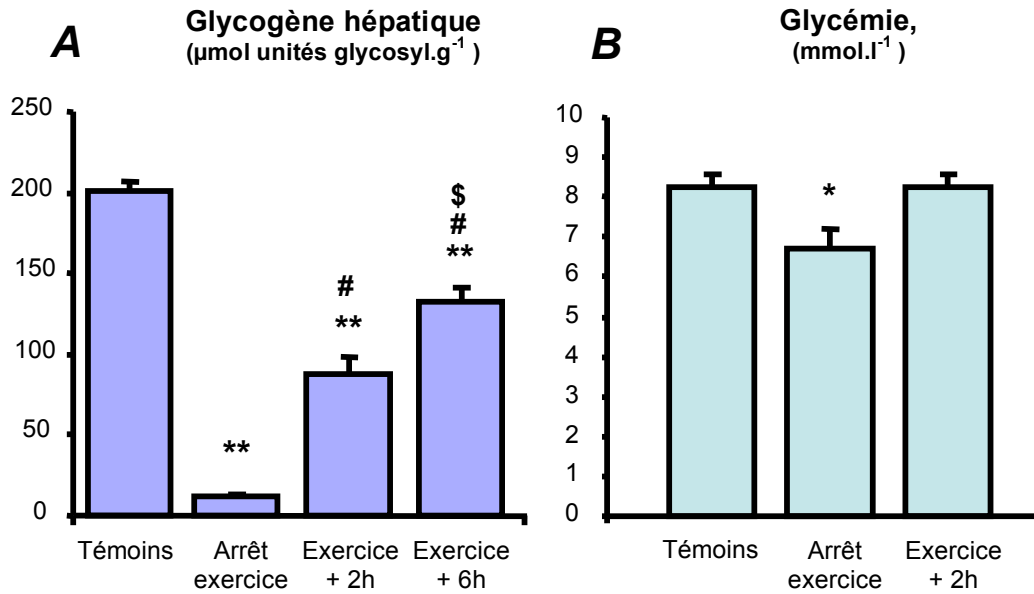
La signalisation IL-6 a été explorée par l'étude des ARNm codant pour des gènes répondant à l'IL-6 (IL-6R, SOCS-3 et C/EBP $\beta$ ), et au niveau protéique par l'étude de la phosphorylation de ERK 1-2.

### *B.2. Etude du métabolisme glucidique et de la néoglucogenèse*

Le métabolisme glucidique a été exploré par une mesure de la consommation de glycogène hépatique et de la glycémie. Les ARNm codant PEPCK et G6Pase ont été mesurés pour explorer la néoglucogenèse. Des modulateurs de l'expression des enzymes de la néoglucogenèse ont été étudiés : les ARNm codant PGC-1 $\alpha$  et FXR ont été mesurés. La phosphorylation de deux activateurs connus de PGC-1 $\alpha$  (p38 et AMPK) a été mesurée au repos et à l'arrêt de l'exercice, la phosphorylation de l'ACC, substrat essentiel de l'AMPK, a été mesurée aux mêmes temps comme reflet de l'activité de l'AMPK.

### *B.3. Analyse statistique*

Les différences entre groupes ont été analysées grâce à une ANOVA à une voie permettant d'évaluer l'effet de l'exercice ou de l'injection d'IL-6. Les comparaisons intergroupes ont été réalisées avec un test post hoc de Newman-Keuls. Les variables mesurées uniquement au repos et à l'arrêt de l'exercice ont été comparées grâce à un test t de Student pour valeurs non appariées.



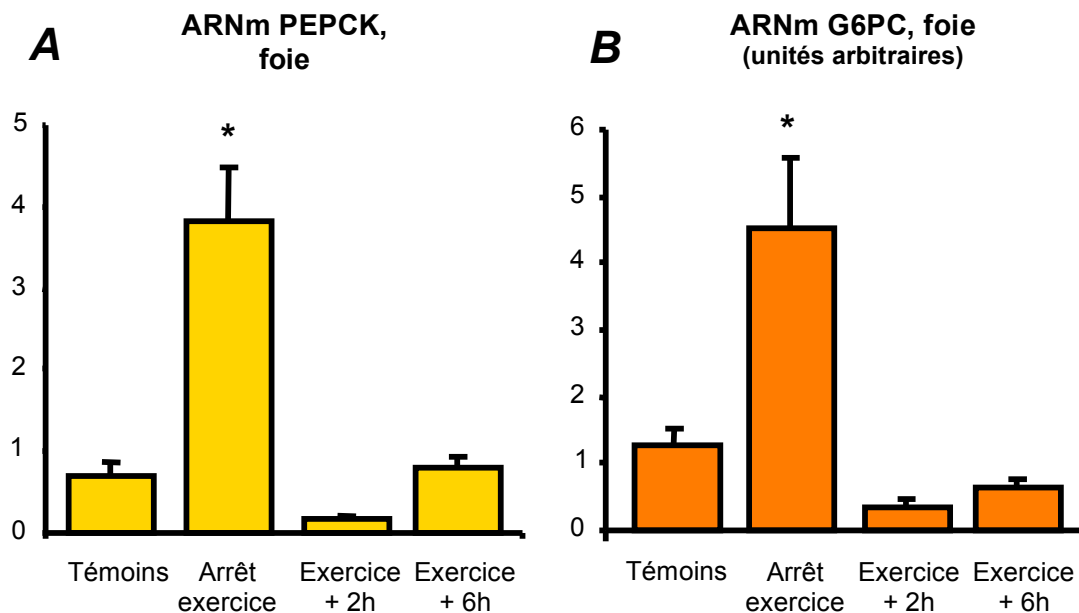
**Figure 31** : Contenu en glycogène hépatique (A) et glycémie (B) de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique, et après 2 heures ou 6 heures de récupération ( $\mu\text{mol d'unités glycosyl.g}^{-1}$  et  $\text{mmol.l}^{-1}$  respectivement). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent du groupe témoin  $P < 0,05$ .

\*\* différent du groupe témoin  $P < 0,001$ .

# différent du groupe arrêt d'exercice,  $P < 0,001$ .

\$ différent du groupe exercice + 2 heures,  $P < 0,001$ .



**Figure 32** : Quantification des ARNm codant pour PEPCK (A) ou G6PC (B), mesurés par RT-PCR dans les foies de rats témoins, à l'arrêt d'un exercice unique, et après 2 heures ou 6 heures de récupération (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent des 3 autres groupes,  $P < 0,001$ .

### **3.3. RESULTATS**

#### ***A. REPONSE A L'EXERCICE***

##### *A.1. Temps de course*

Les animaux ont couru en moyenne  $123 \pm 11$  min, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes arrêt d'exercice, exercice + 2h et exercice + 6h.

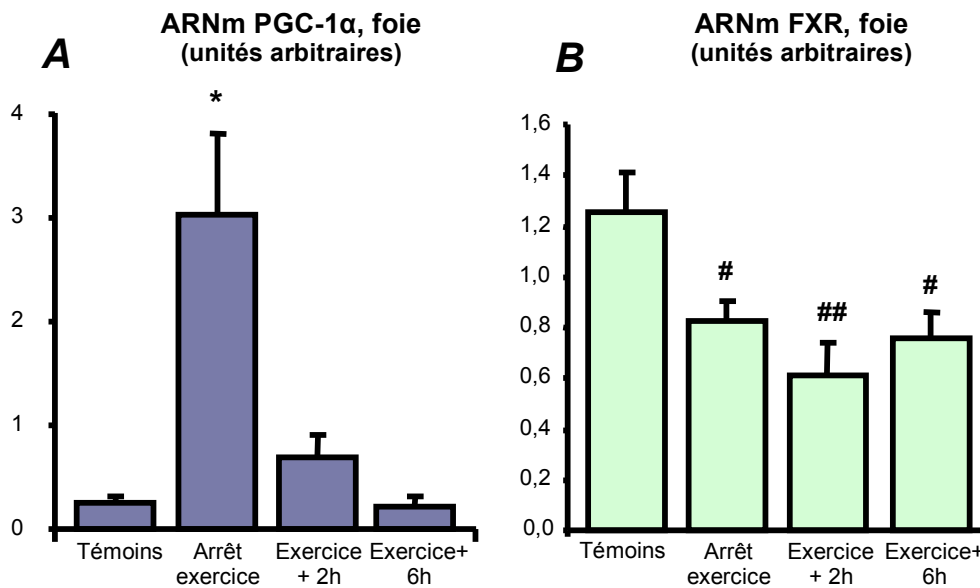
##### *A.2. Statut glucidique et néoglucogenèse*

Le contenu hépatique en glycogène a très fortement diminué en réponse à l'exercice réalisé (-95%,  $P < 0,001$ ), puis a augmenté dans la phase de récupération sans retrouver les valeurs témoins 6 heures après l'arrêt de l'exercice (65% de la valeur témoin,  $P < 0,001$ ) (figure 31A).

A l'arrêt de l'exercice, la glycémie des animaux actifs était significativement plus basse que celle des animaux témoins (respectivement  $6,71 \pm 0,51$  et  $8,25 \pm 0,33$  mmol.l<sup>-1</sup>,  $P < 0,05$ ). Les valeurs de glycémie du groupe 2 heures n'étaient pas différentes de celles des témoins ( $8,26 \pm 0,34$  mmol.l<sup>-1</sup>) (figure 31B).

L'exercice a augmenté très significativement les niveaux d'ARNm des gènes codant PEPCK et G6PC (+550% et +360% respectivement,  $P < 0,001$ ) (figure 32 A et B). A 2 heures de récupération, les niveaux d'ARNm ont diminué pour atteindre des valeurs non significativement différentes de celles des animaux témoins.

L'exercice a provoqué une augmentation très marquée des ARNm codant PGC-1 $\alpha$  dans le foie (+1200%,  $P < 0,001$ ), avec un retour aux valeurs témoins dès 2 heures de récupération (figure 33 A). A l'inverse, l'exercice a provoqué une diminution significative et durable des ARNm codant FXR, avec des niveaux demeurant abaissés à 2 et 6 heures de récupération (figure 33 B). Aucun effet de l'exercice sur la quantité totale de protéines AMPK, ACC et p38 n'a été mis en évidence. A l'arrêt de l'exercice, le rapport AMPK phosphorylée/AMPK totale a diminué (-55%,  $P < 0,05$ ) (figure 34 A). Seule une tendance à la diminution a été observée pour le rapport ACC phosphorylée/ACC totale, reflet de

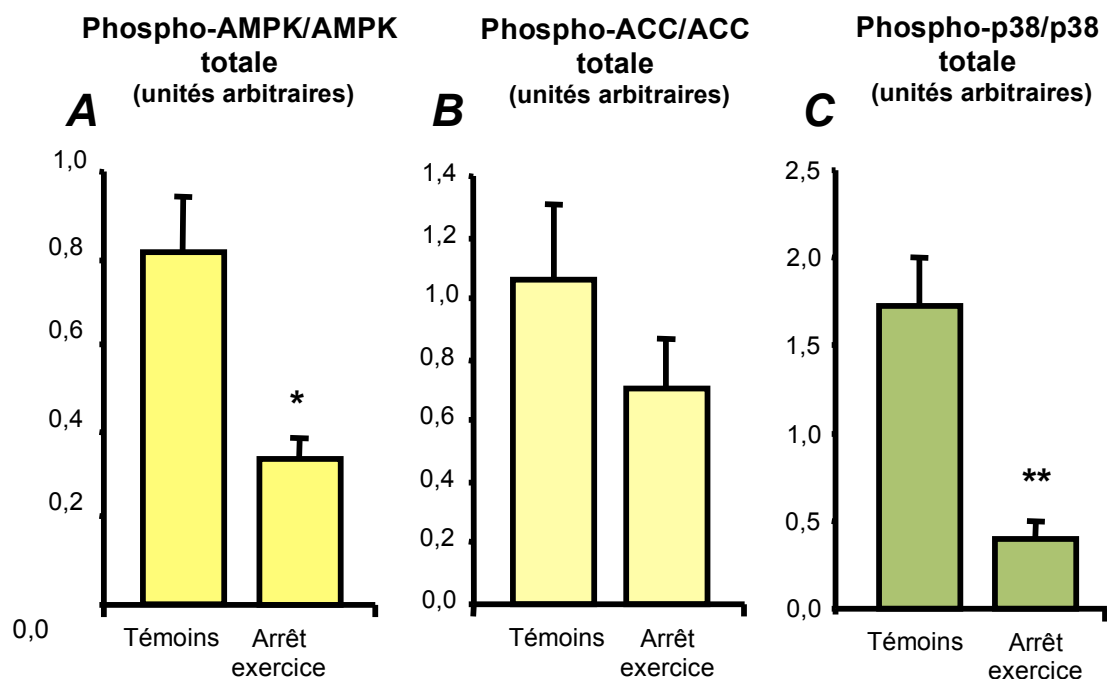


**Figure 33** : Quantification des ARNm codant pour PGC-1α (A) ou FXR (B), mesurés par RT-PCR dans les foies de rats témoins, à l'arrêt d'un exercice unique, et après 2 heures ou 6 heures de récupération (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.

\* différent des 3 autres groupes,  $P < 0,001$ .

# différent du groupe témoin,  $P < 0,05$ .

## différent du groupe témoin,  $P < 0,01$ .



**Figure 34** : Rapports Phospho-AMPK/AMPK totale (A), Phospho-ACC/ACC totale (B) et Phospho-p38/p38 totale (C) mesurés par Western Blot dans les foies de rats témoins et à l'arrêt d'un exercice unique (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.

\* différent du groupe témoin  $P < 0,05$ .

\*\* différent du groupe témoin  $P < 0,01$ .

l'activité AMPK (figure 34 B). Enfin, le rapport p38 phosphorylée/p38 totale a fortement diminué (-75%,  $P<0,01$ ) (figure 34 C).

### *A.3. La signalisation IL-6*

Comme lors de l'expérimentation précédente, les concentrations d'IL-6 plasmatique étaient augmentées à l'arrêt de l'exercice (+800%,  $P<0,05$ ) et sont revenues à des valeurs non différentes de celles des animaux témoins dès 2 heures de récupération (figure 35).

Dans le foie, l'exercice s'est accompagné d'une augmentation significative des niveaux d'ARNm codant IL-6R (+350%,  $P<0,001$ ) (figure 36 A), SOCS-3 (+1400%,  $P<0,001$ ) (figure 36 B) et C/EBP $\beta$  (+400%,  $P<0,001$ ) (figure 37). Pour les ARNm codant IL-6R et C/EBP $\beta$ , un retour aux valeurs témoins à 2 heures de récupération était observé, alors que pour SOCS-3 les niveaux d'ARNm sont restés significativement élevés 2 heures après l'arrêt (+450% de la valeur des témoins,  $P<0,05$ ). Enfin une augmentation de la phosphorylation de ERK-2 a été observée dans le foie à l'arrêt de l'exercice ( $P<0,05$ ) avec une forte tendance persistant à 2 heures de récupération ( $P=0,055$ ) (figure 38 A), il n'y a eu aucun effet de l'exercice sur la phosphorylation de ERK-1 (figure 38 B).

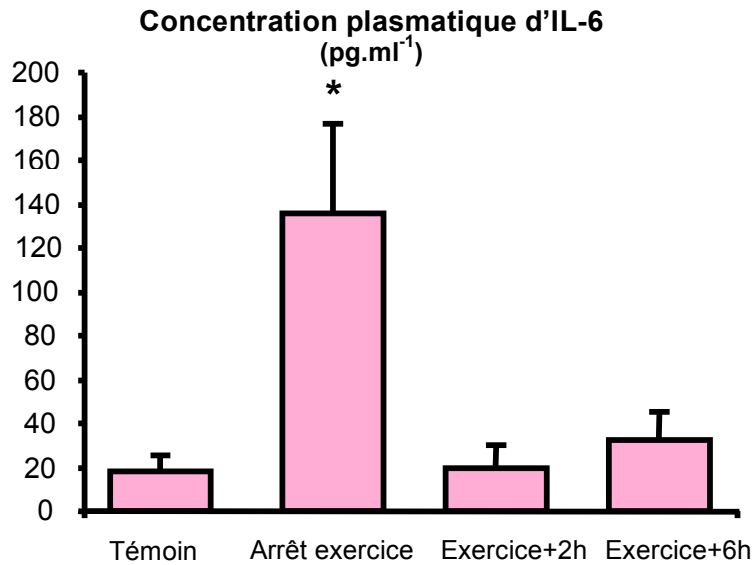
## **B. REponse A L'IL-6 RECOMBINANTE**

### *B.1. La signalisation IL-6*

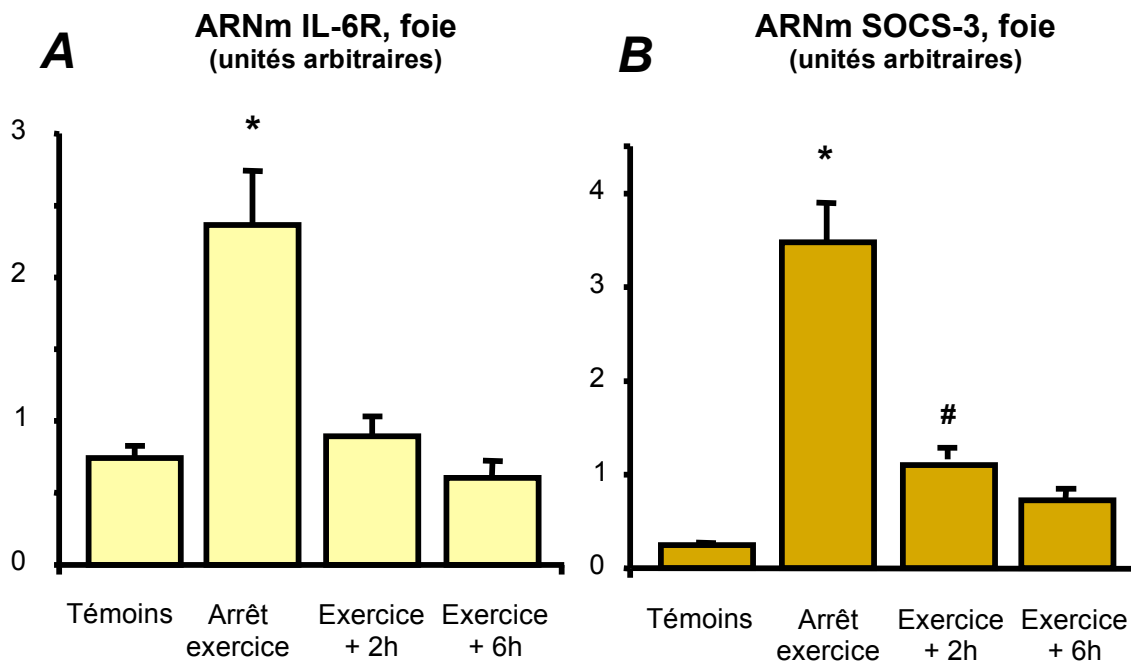
L'injection d'IL-6 recombinante a provoqué une augmentation significative et dose dépendante des ARNm codant SOCS-3 dans le foie ( $P<0,01$ ) (figure 39 A). De même, une augmentation des ARNm IL-6R était observée ( $P<0,05$ ) (figure 39 B).

### *B.2. La néoglucogenèse*

L'administration d'IL-6 a provoqué une augmentation importante et dose dépendante des ARNm codant PEPCK dans le foie ( $P<0,01$ ) (figure 40 A). Par contre,



**Figure 35** : Concentration plasmatique d'IL-6 mesurée par ELISA chez des rats témoins, à l'arrêt d'un exercice unique, et après 2 heures ou 6 heures de récupération (pmol.ml<sup>-1</sup>). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.  
\* différent du groupe témoin, P<0,01.



**Figure 36** : Quantification des ARNm codant pour IL-6R (A) ou SOCS-3 (B), mesurés par RT-PCR dans les foies de rats témoins, à l'arrêt d'un exercice unique, et après 2 heures ou 6 heures de récupération (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.  
\* différent des 3 autres groupes, P<0,001.  
# différent du groupe témoin, P<0,05.

aucun effet n'a été retrouvé sur les niveaux d'ARNm codant G6PC (figure 40 B) et PGC-1 $\alpha$  (figure 41). La glycémie n'était pas différente entre les groupes.

### **3.4. DISCUSSION**

Les résultats majeurs de ces expérimentations suggèrent que : 1) il existe bien des signes objectifs d'une signalisation IL-6 active dans le foie à l'arrêt d'un exercice ; 2) IL-6 pourrait moduler la néoglucogenèse en activant la transcription du gène codant PEPCCK.

#### ***Il existe des signes en faveur d'une signalisation IL-6 active dans le foie à l'arrêt de l'exercice.***

L'action d'IL-6 sur le métabolisme glucidique à l'exercice a été clairement démontrée dans un travail clé qui montre que cette cytokine est capable d'augmenter significativement la production endogène de glucose lors d'un exercice d'endurance (Febbraio et al., 2004). Cette production endogène de glucose ne peut reposer que sur la PHG dans ces conditions d'exercice. Par ailleurs, les effets d'IL-6 interviennent sans aucune variation plasmatique des hormones de contrôle de la glycémie. Si ces résultats suggèrent fortement une action directe d'IL-6 sur le foie, ils ne la démontrent pas. Les auteurs suggèrent même que l'augmentation de la production endogène de glucose pourrait être secondaire à l'augmentation d'utilisation du glucose dans l'organisme, vraisemblablement par les muscles, induite par IL-6. Dans notre expérimentation, l'augmentation des ARNm codant SOCS-3, C/EBP $\beta$  et IL-6R dans le foie à l'arrêt de l'exercice, trois gènes inductibles par IL-6 (Bauer et al., 1989, Ramji et Foka, 2002, Fujimoto et Naka, 2003), est un argument qui supporte l'idée d'une action directe d'IL-6 sur le foie. L'augmentation de la phosphorylation de ERK-2, activée via SHP2 par le complexe IL-6R-gp130, pourrait elle aussi reposer sur une stimulation par IL-6. Prises individuellement, ces données sont indirectes et ne peuvent constituer une démonstration de l'activation du récepteur IL-6. En effet, SOCS-3 est inductible par d'autres cytokines, hormones et facteurs de croissance (Fujimoto et Naka, 2003) et C/EBP $\beta$  est inductible par des variations d'AMPc via CREB (Ramji et Foka, 2002). Cependant, le foie est une cible privilégiée d'IL-6 lors de la

**ARNm C/EBP $\beta$ , foie**  
(unités arbitraires)

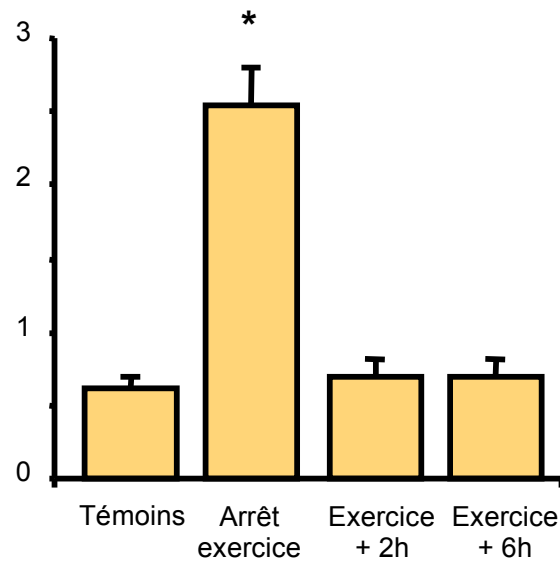


Figure 37 : Quantification des ARNm codant pour C/EBP $\beta$ , mesurés par RT-PCR dans les foies de rats témoins, à l'arrêt d'un exercice unique, et après 2 heures ou 6 heures de récupération (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent des 3 autres groupes,  $P < 0,001$ .

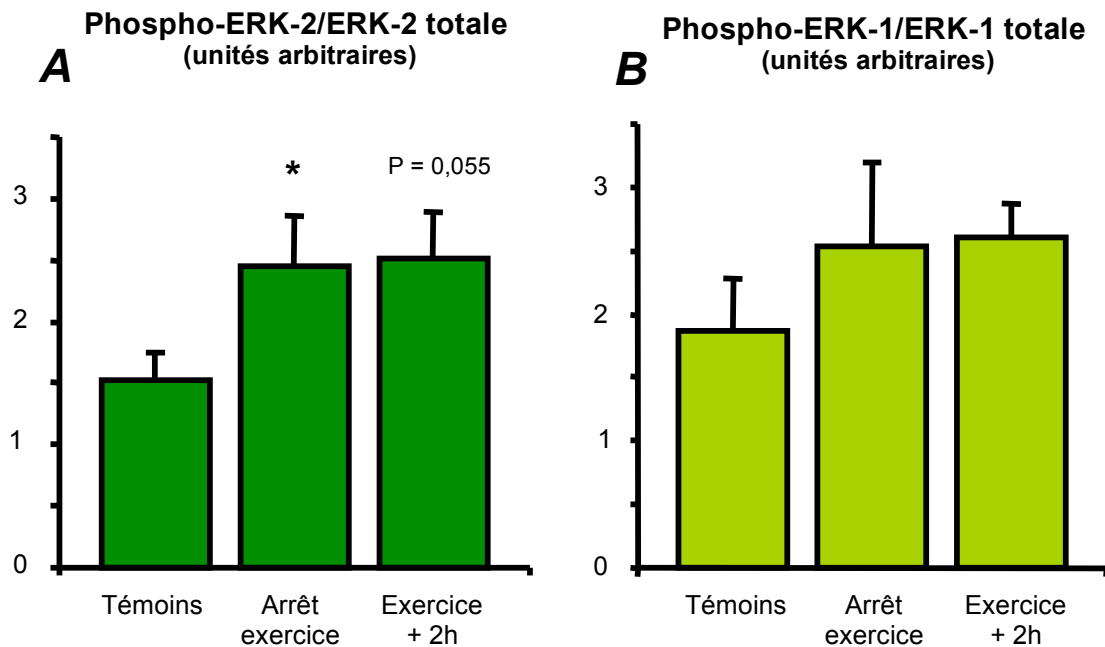


Figure 38 : Rapports Phospho-ERK-2/ERK-2 totale (A) et Phospho-ERK-1/ERK-1 totale (B), mesurés par Western Blot dans les foies de rats témoins, à l'arrêt d'un exercice unique, et après 2 heures de récupération (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

\* différent du groupe témoin  $P < 0,05$ .

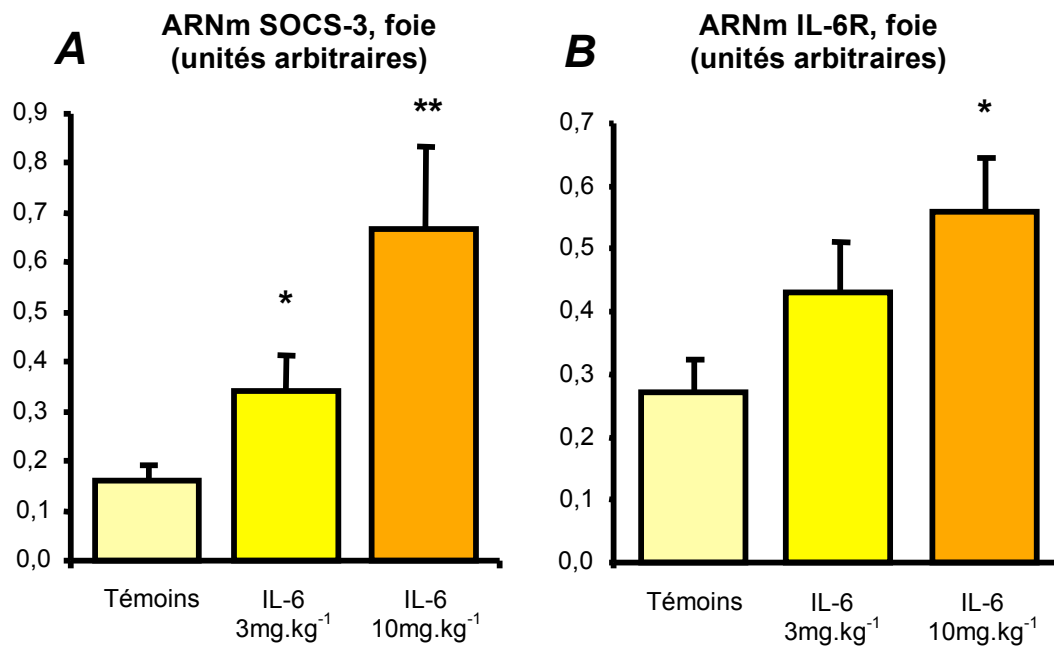


phase aiguë de l'inflammation associée à des infections ou des traumatismes aigus, et lors de la régénération hépatique (Kamimura et Hirano, 2003). Il est donc possible que les modifications que nous observons à l'exercice soient bien liées à une action directe d'IL-6 sur le tissu hépatique.

L'induction du gène IL-6R dans le foie par l'exercice est un résultat nouveau et particulièrement intéressant. Le même événement a été décrit précédemment dans le muscle (Keller et al., 2005) où sa transcription est augmentée à 1,5 h et maximale à 3 h après la fin de l'épreuve, l'apparition de la protéine à la membrane des myocytes étant concomitante. Au contraire dans le foie, la transcription du gène est augmentée dès l'arrêt de l'exercice puis diminue rapidement. Nous n'avons pas encore mesuré la protéine IL-6R. Si dans le muscle le contrôle du gène est indépendant d'IL-6 (car inchangé chez les souris KO IL-6), il est possible qu'il n'en soit pas de même dans le foie : en effet l'injection d'IL-6 est bien capable d'activer sa transcription dans le foie. Ainsi dans deux organes cibles d'IL-6 à l'exercice, il existe une différence notable de régulation de son récepteur : le mécanisme hépatique semble adapté à une production immédiate de la protéine qui pourrait être fonctionnelle pendant l'exercice, alors que dans le muscle le gène codant le récepteur IL-6 n'est activé que pendant la récupération, peut-être pour favoriser la captation de glucose par le muscle et de reconstituer les stocks de glycogène (Keller et al., 2005).

### ***IL-6 semble capable d'augmenter la néoglucogenèse via la transcription du gène codant PEPCK.***

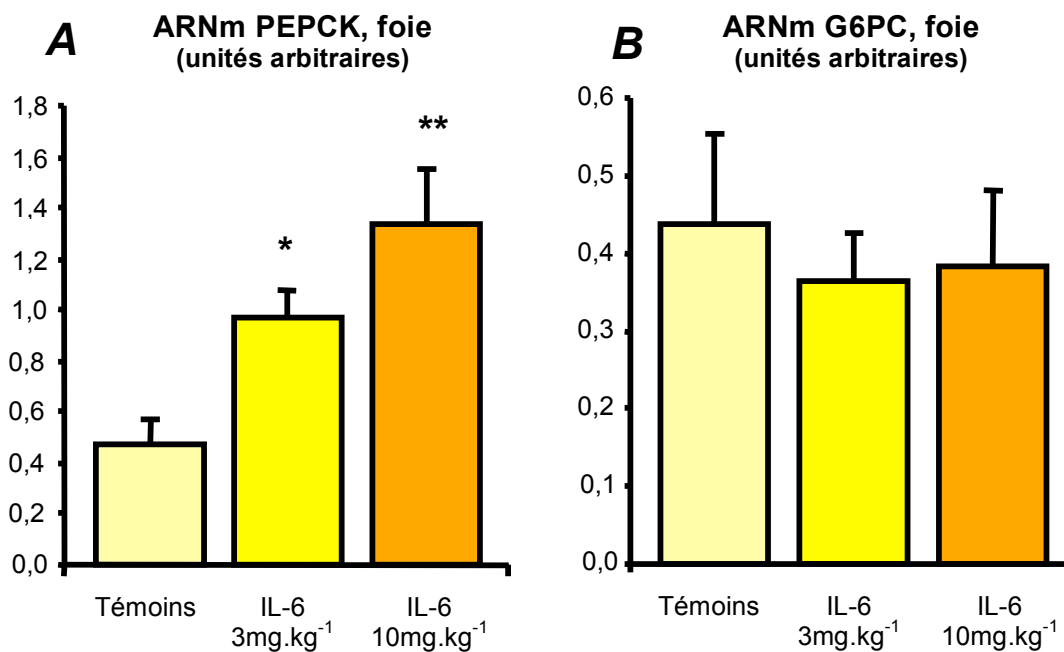
La PEPCK représente le point de contrôle majeur de la néoglucogenèse. Le gène codant PEPCK est inductible extrêmement rapidement (de l'ordre de 20 min) (Hanson et Reshef, 1997) et l'augmentation des niveaux d'ARNm dans le foie à l'exercice a été décrite précédemment (Friedman, 1994). Elle résulte bien d'une augmentation de la transcription du gène et se traduit par une élévation de l'activité de l'enzyme (Dohm et al., 1985). Nous retrouvons cette augmentation des transcrits codant PEPCK. L'injection d'IL-6 recombinante provoque une augmentation dose dépendante des transcrits PEPCK sans modification associée de la glycémie. Nous proposons donc l'hypothèse que lors d'un exercice prolongé qui épuise les réserves en glycogène musculaire et hépatique, IL-6 pourrait favoriser la PHG



**Figure 39** : Quantification des ARNm codant pour SOCS-3 (A) ou IL-6R (B), mesurés par RT-PCR dans les foies de rats témoins, et traités par 3 mg.kg<sup>-1</sup> ou 10 mg.kg<sup>-1</sup> d'IL-6 recombinante (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.

\* différent du groupe témoin, P<0,05.

\*\* différent du groupe témoin, P<0,01.



**Figure 40** : Quantification des ARNm codant pour PEPCK (A) ou G6PC (B), mesurés par RT-PCR dans les foies de rats témoins, et traités par 3 mg.kg<sup>-1</sup> ou 10 mg.kg<sup>-1</sup> d'IL-6 recombinante (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne ± SEM.

\* différent du groupe témoin, P<0,05.

\*\* différent du groupe témoin, P<0,01.

en modulant la transcription du gène PEPCK. Le contrôle du gène PEPCK repose sur l'intégration de nombreux signaux dont peu ont été étudiés à l'exercice. Une mutation du site CRE entraîne une baisse de la transcription du gène en réponse à l'exercice (Nizielski et al., 1996). Si le facteur de transcription CREB est un ligand important de ce site, C/EBP $\beta$  en est un autre. A l'exercice, une augmentation importante de la transcription de C/EBP $\beta$  et de son abondance nucléaire a été décrite dans le foie de souris après 120 min de course. De plus, des études de retard sur gel ont montré une fixation de ce facteur de transcription aux sites CRE et P3I du promoteur PEPCK (Nizielski et al., 1996) en réponse à l'exercice. C/EBP $\beta$  joue donc un rôle important dans le contrôle du gène PEPCK, mais c'est aussi un facteur de transcription qui peut être activé par IL-6 tant au niveau transcriptionnel que post-transcriptionnel via ERK1-2. L'IL-6 circulante issue du muscle pourrait donc activer le promoteur PEPCK via C/EBP $\beta$ .

L'exercice a provoqué également une augmentation des transcrits codant G6PC, enzyme commune à la glycogénolyse et à la néoglucogénèse et contrôlée au niveau transcriptionnel. L'absence d'effet d'IL-6 recombinante sur G6PC pourrait s'expliquer par le fait que les animaux étant à jeun depuis la veille, l'enzyme pourrait avoir été activée précédemment pour exporter le glucose issu de la glycogénolyse. En l'état actuel des résultats, on ne peut donc exclure une action d'IL-6 sur la transcription du gène codant la G6Pase.

### ***L'exercice provoque une augmentation marquée de la transcription hépatique du gène codant PGC-1 $\alpha$ , indépendante de p38 et AMPK.***

Le coactivateur de transcription PGC-1 $\alpha$  joue un rôle crucial dans le contrôle de la néoglucogénèse lors d'un jeûne prolongé où la transcription de son gène augmente de façon importante (Finck et Kelly, 2006). Son rôle dans le contrôle de la PHG à l'exercice n'a jamais été envisagé et nous avons mesuré les niveaux d'ARNm PGC-1 $\alpha$  hépatiques dans nos conditions d'exercice. Malgré la brièveté relative de l'exercice (120 min environ) par rapport aux situations de jeûnes étudiées (24 à 48 heures), les niveaux de transcrits PGC-1 $\alpha$  ont très fortement augmenté à l'arrêt de l'exercice (X12) pour revenir à des niveaux non différents de ceux des animaux témoins à 2h de récupération. Ce résultat suggère que PGC-1 $\alpha$  pourrait intervenir dans le contrôle de la PHG à l'exercice. Nous avons donc cherché à définir si IL-6

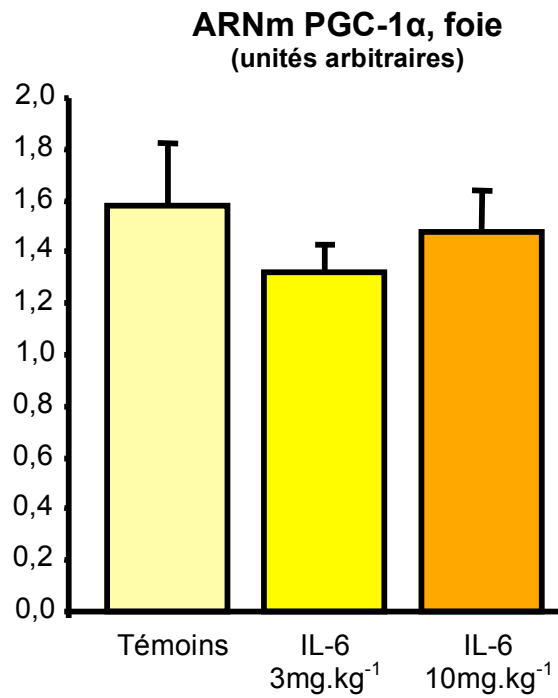


Figure 41 : Quantification des ARNm codant pour PGC-1 $\alpha$ , mesurés par RT-PCR dans les foies de rats témoins, et traités par 3 mg.kg<sup>-1</sup> ou 10 mg.kg<sup>-1</sup> d'IL-6 recombinante (unités arbitraires). Résultats exprimés en moyenne  $\pm$  SEM.

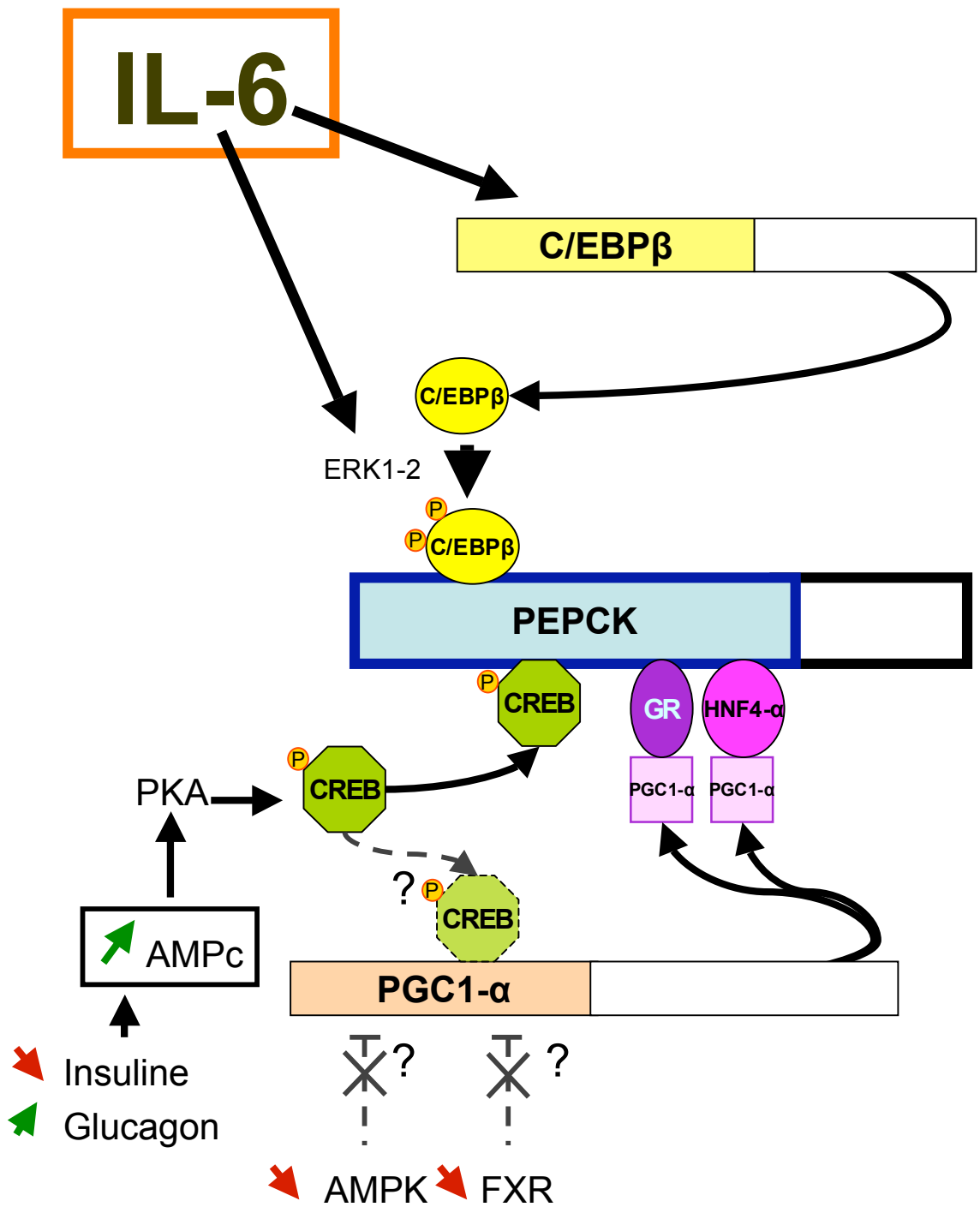
pouvait participer au contrôle de son gène. L'injection d'IL-6 recombinante n'a eu aucun effet sur la transcription du gène PGC-1 $\alpha$ , suggérant que ce que nous mesurons à l'arrêt de l'exercice est indépendant de l'IL-6 circulante.

Cette augmentation des ARNm PGC-1 $\alpha$  étant une donnée nouvelle et potentiellement importante pour la compréhension du contrôle de la PEPCK à l'exercice, nous avons mesuré la phosphorylation de p38, MAPK qui contrôle la transcription du gène lors du jeûne (Cao et al., 2005). Contrairement à notre hypothèse, l'exercice a fortement diminué la phosphorylation de p38. Ce résultat ne peut être comparé à la littérature car aucune donnée concernant la phosphorylation de p38 hépatique n'est disponible à l'arrêt d'un exercice unique.

L'AMPK a été impliquée dans le contrôle du gène PGC-1 $\alpha$  dans le muscle squelettique et une activation de cette kinase a été décrite dans le foie à l'arrêt d'un exercice unique chez les rongeurs (Park et al., 2002, Camacho et al., 2006), peut-être en réponse à IL-6 (Ruderman et al., 2003, Ruderman et al., 2006). Cependant, ces données sont en contradiction avec d'autres résultats montrant que l'activation d'AMPK par l'AICAR diminue la glycémie en réduisant la PHG (Vincent et al., 1996) et qu'AICAR est capable de bloquer l'activité du promoteur du gène codant la G6PC dans des hépatocytes en culture (Barthel et al., 2002). Par ailleurs, l'effet hypoglycémiant de la metformine pourrait en partie reposer sur la capacité qu'a cette molécule à activer AMPK (Schimmack et al., 2006). Nous avons mesuré la phosphorylation d'AMPK et d'un ses substrats l'ACC pour évaluer son activation dans notre étude. Là encore, contrairement au résultat attendu la phosphorylation d'AMPK a diminué en réponse à l'exercice, la même tendance étant observée pour ACC. La diminution de l'activité AMPK mise en évidence dans notre étude pourrait donc être interprétée comme la levée d'un frein exercé sur la PHG. Ces résultats discordants doivent être expliqués, mais aucun stimulus potentiel n'a pu être mis en évidence pour PGC-1 $\alpha$  dans notre étude.

### ***L'exercice provoque une diminution durable des ARNm codant le récepteur hépatique FXR.***

Un dernier acteur moléculaire a été étudié dans ce travail, le récepteur hépatique FXR qui est impliqué dans le contrôle du métabolisme des hydrates de carbone au repos et lors du



jeûne (Duran-Sandoval et al., 2005, Caron et al., 2006). Les données concernant l'action de FXR sur le métabolisme glucidique sont contradictoires, en particulier les souris FXR<sup>-/-</sup> sont hyperglycémiques et résistantes à l'insuline au repos, alors que l'activation de FXR par l'acide cholique chez des animaux sains provoque une diminution de glycémie. Cette dernière repose sur une baisse de transcription de PEPCK et G6Pase, accompagnée d'une baisse des ARNm codant PGC1- $\alpha$  et HNF4- $\alpha$  (Ma et al., 2006). Dans notre étude, l'exercice a provoqué une baisse significative des ARNm codant FXR dès l'arrêt de l'exercice, maximale 2h plus tard et qui a perduré jusqu'à la 6<sup>ème</sup> heure de récupération. Ceci pourrait représenter un mécanisme facilitateur de la néoglucogenèse pendant l'exercice, par un effet sur la transcription du gène PEPCK via PGC1- $\alpha$  ou ses partenaires (HNF4- $\alpha$ ). La persistance de niveaux d'ARNm FXR bas pendant la récupération alors que les niveaux de transcrits des enzymes de la néoglucogenèse sont fortement diminués est plus difficile à interpréter, mais pourrait résulter d'une augmentation de l'insulinémie à l'arrêt de l'exercice chez ces animaux qui avaient libre accès à la nourriture. Cette hormone est en effet capable de réprimer la transcription du gène FXR (Duran-Sandoval et al., 2004). Enfin le récepteur FXR est soumis à d'autres régulations car il est fortement impliqué dans le métabolisme des acides biliaires et des lipides (Duran-Sandoval et al., 2005).

**En somme, les premiers résultats de cette troisième expérimentation apportent pour la première fois des arguments en faveur d'un effet direct d'IL-6 sur le foie lors d'un exercice prolongé. L'IL-6 produite par le muscle pourrait stimuler à la fois la production de son récepteur et la transcription de la PEPCK, modulant ainsi la néoglucogenèse qui est responsable de la plus grande part de la PHG en fin d'exercice. Ces hypothèses doivent être confirmées par une étude dans une situation de blocage de la signalisation IL-6. Par ailleurs en explorant les voies d'actions possibles d'IL-6, nous avons mis en évidence une augmentation très importante de la transcription de PGC1- $\alpha$  dans le foie, selon un mécanisme non connu mais différent des voies décrites lors du jeûne. Enfin, l'exercice pourrait lever le frein exercé par FXR sur la transcription de PEPCK. La figure 42 présente schéma hypothétique du contrôle du gène codant PEPCK à l'exercice prolongé.**

# ***DISCUSSION GENERALE***



## *DISCUSSION GENERALE*

La réalisation d'un exercice physique, quelle que soit son intensité, est une situation de perturbation de l'homéostasie qui engendre des réponses adaptatives immédiates de nombreux systèmes de tout organisme vivant ; on peut considérer que c'est l'une des démonstrations les plus élégantes de physiologie intégrée, mettant en évidence les réponses coordonnées de différents systèmes, face à un état de stress. Le travail réalisé au cours de cette thèse entre dans ce cadre, et a pour objectif général de mieux connaître les acteurs biologiques de la communication entre les muscles squelettiques, moteurs du mouvement, et le foie, envisagé ici comme le pourvoyeur essentiel de glucose.

### *Importance et nouveautés de la signalisation IL-6 à l'exercice*

Les premières recherches portant sur la production de cytokines à l'exercice avaient pour but de comprendre les effets que l'on observait sur le système immunitaire. Si nombre de cytokines peuvent être modulées par la pratique de l'exercice, IL-6 a rapidement émergé comme un acteur important, car l'augmentation de ses concentrations plasmatiques est retrouvée de façon très reproductible. Ces modulations interviennent indépendamment de toute lésion musculaire ou réaction inflammatoire. Le muscle squelettique actif est le lieu de production d'IL-6 et l'importance de cette production dépend de la masse musculaire mise en jeu et de la durée de l'exercice. L'appauvrissement des réserves en glycogène augmente la libération d'IL-6 par le muscle alors qu'au contraire l'ingestion répétée de glucose en cours d'exercice la freine. Par ailleurs, dans certaines conditions, IL-6 stimule la production de glucose par des hépatocytes et une étude récente a montré qu'au cours d'un exercice endurant chez l'homme, elle est capable d'augmenter la production endogène de glucose. IL-6 apparaît donc comme une jauge de l'état des réserves énergétiques d'un muscle qui, avec des réserves locales en glucides basses devient de plus en plus dépendant du glucose circulant. Ce signal issu du muscle pourrait agir comme une hormone, et être perçu par le foie qui possède des réserves en glucides mobilisables rapidement (glycogénolyse) et qui est capable de synthétiser du glucose à partir de substrats non glucidiques (néoglucogenèse). Les résultats exposés dans

ce travail de thèse s'inscrivent dans le cadre de cette signalisation originale et se sont intéressés plus particulièrement à l'origine cellulaire de l'IL-6 dans le muscle, aux déterminants moléculaires de la transcription du gène dans les fibres musculaires à l'exercice et enfin à la signalisation IL-6 dans le foie et son action sur la néoglucogénèse.

### ***Modalités de production d'IL-6 par les fibres musculaires***

Les résultats des expérimentations présentées dans ce mémoire de thèse contribuent à confirmer la fonction endocrine supposée de l'IL-6. La démonstration de l'origine cellulaire d'IL-6 (fibres musculaires) et de l'implication de la voie de la calcineurine dans le contrôle de la transcription du gène IL-6 contribuent directement à la compréhension des mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression d'IL-6 à l'exercice. Mais au-delà des connaissances apportées, nos données permettent de confirmer, au niveau cellulaire, que la contraction musculaire, via les mouvements calciques, est bien un événement déterminant de l'expression d'IL-6 dans les myocytes. Nous montrons qu'au sein d'un même muscle, les fibres les plus sollicitées par l'exercice endurant (I et IIa) produisent de l'IL-6, en partie sous le contrôle de la calcineurine. Ces données permettent de mieux comprendre les études antérieures qui ont montré que les muscles actifs produisent d'autant plus d'IL-6 que l'intensité de l'exercice et la masse musculaire sollicitée augmentent (Ostrowski et al., 2000, Helge et al., 2003). Il semble donc bien exister un effet « dose-réponse » dans la relation entre muscle actif et production d'IL-6 ; cette relation peut tout simplement être liée au recrutement progressif des unités motrices. La gradation du travail musculaire est rendue possible grâce au recrutement progressif de nouvelles unités motrices, chaque motoneurone recruté délivrant une force unitaire, jusqu'à atteinte du niveau de force requis ; c'est la notion de recrutement spatial, en fonction du type d'unité motrice, selon le « principe de la taille » de Henneman (1957). L'autre moyen d'ajuster le niveau de force requis en fonction de la demande, est de moduler la fréquence de décharge des potentiels d'action sur le motoneurone, ce qui permet de faire varier la force unitaire développée par les fibres musculaires, selon que le tétanos sera parfait ou imparfait ; c'est le recrutement temporel des unités motrices. Les variations de production d'IL-6 avec la force développée peuvent donc être liées au moins en partie, au nombre d'unités motrices sollicitées dans le cadre du recrutement spatial des motoneurones ; de

même, l'augmentation de production d'IL-6 avec le temps d'exercice peut aussi être liée au recrutement additionnel d'unités motrices.

Compte tenu de ces notions, nos données amènent à se poser des questions importantes sur les mécanismes de contrôle du gène IL-6. La première concerne la spécificité de production par les fibres I et IIa qui certes sont les premières recrutées par le type d'exercice utilisé, mais qui sont aussi des fibres oxydatives. Ces fibres produisent-elles de l'IL-6 uniquement parce qu'elles sont plus sollicitées, selon le « principe de la taille » évoqué ci-dessus, ou leur caractère oxydatif est-il nécessaire à l'expression du gène ? En effet, les fibres glycolytiques IIx et IIb possèdent elles aussi de la calcineurine et l'activité de cette dernière, quasi indétectable au repos, augmente de manière importante et significative dans les fibres IIx. Cependant, nous ne montrons pas d'augmentation significative de la transcription du gène IL-6 dans ces fibres qui pourtant sont sollicitées, comme en témoigne la baisse du contenu en glycogène de nombre d'entre elles. Si le recrutement plus tardif de ces fibres peut expliquer l'absence de production d'IL-6 ou notre incapacité à la mesurer, il n'est pas possible d'exclure que ces fibres glycolytiques n'ont pas l'équipement protéique nécessaire pour assurer cette production lors d'un exercice endurant. Pourtant, chez l'homme, la protéine IL-6 a été mise en évidence dans le cytoplasme de fibres glycolytiques suggérant que ces dernières seraient bien capables de produire IL-6 (Penkowa et al., 2003, Hiscock et al., 2004). **Existe-t-il donc une vraie fibre-spécificité d'expression d'IL-6 dans le muscle, ou la transcription du gène n'est-elle que liée au niveau d'activation et de recrutement des fibres musculaires, quel que soit leur type ?** Des éléments de réponse à cette question pourraient être apportés en utilisant un modèle de recrutement de l'ensemble des unités motrices d'un muscle donné. Le modèle le plus adéquat dans ce contexte semble être celui de l'électrostimulation continue de basse fréquence par voie neuronale (Booth et Thomason, 1991). Ce mode de conditionnement permet de stimuler simultanément l'ensemble des unités motrices d'un muscle, de manière prolongée ; l'évaluation de la transcription du gène IL-6 permettrait ainsi de vérifier s'il existe une spécificité du type de fibre dans la réponse du gène, ou si la production d'ARNm n'est liée qu'à l'activité de contraction des fibres, indépendamment de leur type.

Une autre question importante peut être posée : quelle est l'importance du mode contraction de la fibre dans le déclenchement de la transcription du gène IL-6 et dans la spécificité de production par les différents types de fibres (si elle est réelle) ? Les différentes

modalités d'exercice que l'on peut envisager, de l'exercice dynamique de moyenne intensité, prolongé (de type course à pied), à l'exercice très intense, à haute puissance, localisé (exercice de musculation) ou global (de type sprint) ont des conséquences très différentes sur le muscle. Les spécificités de réponse d'un muscle à un exercice bien défini, tiennent essentiellement aux signaux qu'il perçoit, en particulier ceux de nature métabolique (hypoxie, statut énergétique cellulaire), mécanique, hormonale ou liés au trafic neuronal et à la contraction des fibres (Figure 43).

Au cours de notre travail, nous avons principalement centré notre attention sur les exercices de longue durée, au cours duquel les fibres glycolytiques, appartenant aux unités motrices les plus rapides, sont recrutés tardivement, lorsqu'elles le sont. Par contre, ces fibres glycolytiques sont rapidement recrutées lors d'exercices à puissance élevée, activées de manière phasique, après que le trafic neuronal ait induit des mouvements calciques amples, rapides et de haute fréquence, peu susceptibles d'activer la calcineurine. Il serait intéressant d'évaluer le niveau de production d'IL-6 par les fibres glycolytiques au cours d'exercices plus intenses que celui utilisé dans nos travaux, soit en réponse aux mouvements calciques typiques de ce mode de contraction, via des voies autres que la calcineurine (Febbraio et Pedersen, 2002), soit en réponse à d'autres voies de signalisations plus caractéristiques de ce mode de contraction comme les voies liées à la mécanotransduction, en particulier celle des MAPK (revue de Flück et Hoppeler, 2003).

La démonstration de l'origine myocytaire d'IL-6 et de l'implication de la voie de la calcineurine dans la transcription du gène IL-6 confirment bien que la contraction musculaire, via les mouvement du calcium et l'activation de la calcineurine, est un événement clé de l'expression d'IL-6 par le muscle en réponse à un exercice endurant. Autrement dit, les cellules musculaires produisent IL-6 parce qu'elles se contractent et qu'elles ont « un problème énergétique » à résoudre, celui de leur approvisionnement en substrat rapidement utilisable pour synthétiser de l'ATP, c'est à dire en glucose. Il reste à déterminer s'il existe une véritable spécificité du type de fibre dans la production d'IL-6, ou si seule l'activation d'une fibre musculaire, quel que soit son type, suffit à transcrire le gène IL-6. L'identification des principaux signaux mécaniques et physiologiques susceptibles de contrôler la transcription d'IL-6 constitue aussi un domaine de recherches intéressant pour l'avenir.

Nos travaux se sont alors intéressés à une des cibles potentielles d'IL-6, le tissu hépatique.

### *Place de l'IL-6 dans le contrôle de l'homéostasie glucidique*

Les principaux résultats de ces premières expérimentations portant sur la signalisation IL-6 dans le foie en réponse à un exercice ou à une injection d'IL-6 recombinante nous ont permis d'apporter les premiers arguments expérimentaux qui suggèrent l'existence d'une signalisation directe d'IL-6 sur le foie et une action positive de cette dernière sur la néoglucogenèse via la transcription du gène codant PEPCK. Nous mettons ainsi en lumière un mécanisme par lequel IL-6 pourrait augmenter la PHG, donnant plus de poids encore à la notion de rôle endocrine et de signal métabolique d'IL-6. Ces données viennent cependant s'inscrire dans une littérature complexe et discordante au sujet des effets d'IL-6 sur la glycémie et la PHG. Au repos tout d'abord, les très faibles concentrations d'IL-6 circulantes ne semblent pas impliquées dans la régulation de la glycémie car les souris knock-out (KO) pour le gène codant IL-6 ne présentent pas d'anomalie du métabolisme glucidique (Di Gregorio et al., 2004) ou des anomalies tardives de type résistance à l'insuline liées à l'obésité qu'elles développent parfois en vieillissant (Wallenius et al., 2002). L'administration d'IL-6 à des hépatocytes en culture augmente la néoglucogenèse (Blumberg et al., 1995) mais diminue la transcription de la PEPCK en réponse au glucagon (Christ et al., 1997). In vivo, l'injection d'IL-6 chez le rat (Stith et Luo, 1994) ou chez l'homme (Tsigos et al., 1997) augmente la PHG de manière dose dépendante. Le mécanisme par lequel IL-6 exerce cet effet est méconnu et semble reposer sur des effets directs sur le parenchyme hépatique mais aussi sur des variations d'hormones circulantes, en particulier les glucocorticoïdes (Stith et Luo, 1994). En effet, dans des situations d'activation massive du système immunitaire, l'IL-6 circulante est capable de stimuler les trois étages de l'axe corticotrope, noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, cellules corticotropes de l'hypophyse et cortex surrénalien (revue Chesnokova et Melmed, 2002). Cette interaction entre système immunitaire et axe corticotrope est particulièrement important dans les réactions de stress ou les agressions bactériennes et virale. Elle nécessite cependant une stimulation soutenue et la coopération de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ). En somme, les effets d'IL-6 sur le métabolisme glucidique in vivo est fortement intriqué avec l'actions des diverse hormones

glucorégulatrices de sorte qu'il est difficile de dégager un rôle univoque de cette cytokine. Le cas de l'inflammation systémique aiguë illustre bien cette diversité d'action d'IL-6 qui est massivement libérée par les macrophages pour stimuler les lymphocytes B activés, activer les lymphocytes T et favoriser la libération des protéines de l'inflammation par le foie (revue Kamimura, 2003). Lors des sepsis sévères il est décrit d'abord une hyperglycémie résistante à l'insuline et qui reposerait pour beaucoup sur une glycogénolyse massive puis sur une néoglucogenèse mal contrôlée, en réponse aux glucocorticoïdes et aux catécholamines (revue Maxime et Annane, 2005). Or, comme nous l'avons rappelé, l'activation de l'axe corticotrope est entretenue par l'IL-6. Cette dernière a donc une action positive, en partie indirecte, sur la PHG. A l'inverse, lors des évolutions plus péjoratives des sepsis, une hypoglycémie parfois sévère s'installe, qui reposerait sur une inhibition puissante de la néoglucogenèse impliquant là encore IL-6 et d'autres cytokines (Christ et al., 1997) avec cette fois un effet direct sur le parenchyme hépatique. Dans ces conditions, il est malaisé de tirer parti des informations présentées ci-dessus pour comprendre le rôle d'IL-6 dans le métabolisme des glucides à l'exercice. Une information est cependant importante : l'effet d'IL-6 semble être fortement dépendant de l'environnement hormonal et cytokinique dans lequel elle agit. En ce sens l'exercice est une situation originale car l'ensemble des variations hormonales favorisent la libération de glucose par le foie, l'activation de l'axe corticotrope est modérée et contrôlée et IL-6 est la seule cytokine dont la concentration plasmatique augmente de façon reproductible et significative. Dans ces conditions, IL-6 est bien capable d'augmenter la production endogène de glucose indépendamment des hormones glucorégulatrices (Febbraio et al., 2004). Nos données préliminaires abondent dans ce sens car elles sont en faveur d'un effet direct de la molécule sur le tissu hépatique (augmentation de la transcription d'IL-6R, augmentation de SOCS-3, activation d'ERK-2). Cependant ces résultats sont partiels et doivent être complétés par d'autres expérimentations actuellement en cours de réalisation au laboratoire, impliquant des rats soumis à un exercice endurant avec un blocage de la signalisation IL-6 hépatique. Ces travaux devraient permettre de répondre de manière claire à cette interrogation.

Se pose alors la question de l'importance physiologique de cette signalisation muscle-foie dans le maintien de l'homéostasie glucidique à l'exercice. Autrement dit, s'agit-il d'un mécanisme redondant avec les ajustements hormonaux et peut-être accessoire, ou au contraire l'IL-6 est-elle un acteur important des régulations mises en place ? Les souris KO IL-6

soumises à un exercice intense ont un temps d'endurance réduit qui ne peut être expliqué par la disponibilité du glucose mais plutôt à leur capacité à consommer de l'oxygène qui semble réduite (Fäldt et al., 2004). Pour expliquer cette limitation, les auteurs avancent une fonction cardiaque diminuée ou une capillarisation musculaire insuffisante. Par ailleurs, l'exercice imposé était relativement intense, les souris KO ont couru de 23 à 33 min seulement et les auteurs n'ont pas mesuré les concentrations plasmatiques d'IL-6 chez les souris témoins dans ces délais. Il est donc difficile de discuter l'implication de l'IL-6 produite de manière aiguë en réponse à l'exercice dans ces expérimentations. Là encore les expérimentations futures procureront peut-être des réponses. Il est cependant licite de penser qu'étant donné l'extrême redondance des systèmes hyperglycémiant, l'absence de production musculaire d'IL-6 peut facilement être compensée lors d'un exercice unique. Par contre, en l'absence de données expérimentales, il est difficile de répondre à la même question pour un organisme soumis à des exercices répétés, avec impossibilité de reconstituer les réserves en glycogène du foie et des muscles et éventuellement un déficit de la balance énergétique associé. A chaque répétition d'exercice, la probabilité de produire IL-6 est plus élevée et son rôle dans le maintien de la disponibilité des glucides pourrait alors être plus important.

### ***IL-6, exercice et inflammation de bas grade et sensibilité à l'insuline.***

L'inflammation systémique de bas grade se définit comme une augmentation modérée (de 2 à 4 fois) des concentrations circulantes de cytokines pro-inflammatoires (dont IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ), anti-inflammatoires (IL-1ra) et des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (CRP). Cet état inflammatoire chronique est fortement associé à l'obésité, la sédentarité et présente un risque accru de maladies cardiovasculaires ou de diabète non insulino-dépendant (revue Bruunsgaard, 2005). Comme nous l'avons exposé dans la revue de la littérature, l'exercice physique est lui aussi susceptible d'engendrer des augmentations plus ou moins marquées des concentrations plasmatiques de diverses cytokines. La pratique régulière de l'exercice est pourtant associée à un risque de mortalité (toute cause confondue) diminué (Myers et al., 2004, Hu et al., 2005) et l'exercice diminue la résistance à l'insuline et le risque d'athérosclérose (Blair et al., 2001). L'hypothèse a été émise que ces effets bénéfiques pourraient en partie reposer sur les effets musculaires et systémiques d'IL-6 au cours de

l'exercice (Bruunsgaard, 2005). IL-6 fait partie des cytokines dont les concentrations plasmatiques sont augmentées dans les états inflammatoires chroniques, et son implication dans la résistance à l'insuline des tissus musculaire et hépatique, via SOCS-3 a été proposée (Rieusset et al., 2004). Cependant, IL-6 est aussi capable d'activer l'AMPK musculaire et d'augmenter la sensibilité du muscle à l'insuline (Carey et al., 2006, Ruderman et al., 2006). Cette dualité d'action d'IL-6, qui fait l'objet de très vives discussions dans la communauté scientifique (Pedersen et Febbraio, 2007), pourrait reposer sur des différences de concentrations plasmatiques (plus élevées à l'exercice) et sur le caractère transitoire de l'augmentation d'IL-6 circulante à l'exercice contrairement aux états inflammatoires chroniques où la stimulation est certes modérée mais permanente. Par ailleurs le TNF- $\alpha$ , qui induit incontestablement une résistance à l'insuline (Plomgaard et al., 2005), n'est pas augmenté dans le plasma lors d'un exercice bien toléré, et plus encore, IL-6 a un effet anti TNF- $\alpha$  qui pourrait réduire l'insulino-résistance (Pedersen et Fischer, 2007). Cette autre différence peut contribuer à expliquer des résultats expérimentaux qui peuvent paraître contradictoires. En tout état de cause, il semble bien qu'IL-6 peut, dans de nombreuses conditions, avoir un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline, mais aussi sur les concentrations plasmatiques de cholestérol ou la masse grasse (revue Pedersen et Febbraio, 2007). C'est le cas également du ciliary neurotrophic factor (CNTF) qui partage avec IL-6 la sous-unité de récepteur gp130. Cette dernière a même été récemment proposée comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle de l'obésité et des dysmétabolismes associés (Febbraio, 2007).

#### *Autres aspects des fonctions sécrétoire et endocrine du muscle squelettique*

L'existence d'un ou plusieurs facteurs sécrété (s) par le muscle pendant l'exercice au profit d'autres organes a été proposée il y a plusieurs années (Asmussen, 1967). IL-6 pourrait être un de ces « work factors » ou « exercise factors » jusque là non identifiés et le terme de « myokine » a été proposé pour définir les peptides produits et sécrétés par le muscle (Pedersen et al., 2004). Il semble que la signalisation IL-6 au cours de l'exercice soit pour beaucoup destinée au muscle lui-même, permettant en particulier d'augmenter la captation et l'utilisation du glucose par les fibres musculaires. Cependant la capacité qu'a IL-6 à



transmettre un signal à distance, au foie en particulier, est la première démonstration concrète d'une fonction endocrine du muscle.

Deux autres cytokines, IL-8 et IL-15, dont l'expression peut être modulée par l'exercice, répondent aux critères de myokines. L'expression de l'ARNm et de la protéine IL-8 est augmentée en réponse à un exercice prolongé de type concentrique, mais elle semble n'être que très peu libérée dans le plasma (Nieman et al., 2003, Chan et al., 2004a, Akerstrom et al., 2005). Elle serait sécrétée par le muscle à son propre profit et sa fonction reste inconnue. La mise en évidence de récepteurs à l'IL-8 sur les cellules endothéliales dans le muscle humain oriente vers un rôle angiogénique, qui reste cependant à démontrer (Frydelund-Larsen et al., 2007). L'IL-15 est fortement exprimée dans le muscle squelettique où elle possède un effet anabolisant bien caractérisé, via une inhibition de la protéolyse musculaire (Quinn et al., 1995, Carbo et al., 2000). Outre cet effet sur le muscle, IL-15 possède un effet sur le tissu adipeux où elle stimule la lipolyse et l'expression d'adiponectine, suggérant l'existence possible d'une signalisation muscle-tissu adipeux par cette cytokine (Quinn et al., 2005). Il semble que l'exercice endurant ne module pas l'expression de l'ARNm IL-15 dans le muscle ou de la protéine dans le plasma (Nieman et al., 2003, Chan et al., 2004a), contrairement à l'exercice en force qui provoque une augmentation très modérée des concentrations plasmatiques (Riechman et al., 2004).

A ces cytokines s'ajoutent d'autres protéines sécrétées par le muscle dont la myostatine, un régulateur clé de la masse musculaire qui possède aussi en effet sur la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux (Feldman et al., 2006) et la musculine dont la fonction est encore inconnue mais qui induit une résistance à l'insuline *in vitro* (Nishizawa et al., 2004). Par ailleurs, des souris dont le gène PPAR $\gamma$  est invalidé de manière spécifique dans le muscle ont une masse grasse augmentée et une plus grande résistance à l'insuline dans le foie. L'ensemble de la masse musculaire squelettique représente le plus gros organe chez l'homme et si la communauté scientifique s'est longtemps intéressée à sa fonction de contraction puis à ses propriétés métaboliques, le muscle a souvent été considéré surtout comme « destinataire » d'un certain nombre de signaux hormonaux et métaboliques visant à assurer son ravitaillement en substrats et sa trophicité. L'ensemble des connaissances récentes sur IL-6 et plus largement sur la fonction sécrétoire du muscle strié squelettique suggèrent maintenant que ce dernier est véritablement au cœur d'un réseau de communication entre le foie, le tissu

adipeux et peut-être le pancréas et le système nerveux central (Pedersen et Febbraio, 2005, Engler, 2007).

# ***PERSPECTIVES***

## *PERSPECTIVES*

### *Mieux comprendre les mécanismes moléculaires contrôlant la transcription d'IL-6 dans le muscle à l'exercice.*

Les deux premières études de notre thèse ont permis d'identifier clairement la voie de la calcineurine comme un déterminant de l'activation du gène IL-6 dans le muscle en réponse à l'exercice. Cependant, comme nous l'avons discuté précédemment, aucun site de fixation du facteur de transcription NFAT, cible préférentielle de la calcineurine, n'est identifié dans la zone promotrice du gène IL-6. Par ailleurs, la MAPK p38 est une autre voie impliquée dans la transcription du gène IL-6 en réponse à la diminution des réserves en glycogène (Chan et al., 2004b), mais les cibles aval de cette kinase et le ou les facteurs de transcription qui transactivent le promoteur IL-6 ne sont pas identifiés. Enfin nous avons évoqué la possibilité de signalisations croisées entre les voies calcineurine, p38 et NF- $\kappa$ B pour contrôler l'expression d'IL-6. Dans ce cadre, nous envisageons une approche expérimentale différente de celles employées dans ce travail, avec pour point de départ le promoteur du gène IL-6.

Parmi les outils issus de la biologie cellulaire et développés secondairement en physiologie, la transfection de gène *in vivo* dans le muscle d'un rongeur est une méthode qui permet par exemple de sur-exprimer une molécule (ou de l'inhiber par un dominant négatif) offrant une alternative intéressante à l'utilisation d'animaux modifiés génétiquement. Cette technique permet également d'utiliser des gènes rapporteurs ( $\beta$ -galactosidase, luciférase, protéines fluorescentes) qui, quand ils sont placés sous le contrôle du promoteur d'un gène d'intérêt, permettent une évaluation de l'expression du gène en question. Plus intéressant encore, l'utilisation de promoteurs porteurs de mutation sur les sites de fixation de facteurs de transcription connus, permet d'évaluer leur importance pour l'expression du gène dans une situation physiologique donnée. C'est la méthodologie que nous nous proposons d'utiliser pour étudier les facteurs de transcriptions impliqués dans l'expression du gène IL-6 dans le muscle en réponse à l'exercice, en nous appuyant sur l'expérience du transfert de gène de l'unité PPEH EA 3062, et sur la technique d'électrotransfert de gène dans le muscle développée au sein de cette équipe (Durieux et al., 2002, Durieux et al., 2004, Durieux et al., 2005). Nous utiliserons des plasmides, décrits dans la littérature, codant pour la luciférase contrôlée par le promoteur IL-6 humain « sauvage » ou muté sur les sites de fixation AP-1,

C/EBP- $\beta$  ou NF- $\kappa$ B (Eickelberg et al., 1999). Une première approche consistera à transfecter ces plasmides dans des muscles soleus de rats soumis ou non à un exercice, afin de déterminer si un ou plusieurs de ces facteurs de transcription sont déterminants pour le contrôle de la transcription d'IL-6 dans le muscle à l'exercice. Ce point de départ permettra d'orienter les expérimentations futures vers les voies capables d'activer ce ou ces facteurs.

***Déterminer l'action d'IL-6 sur la production hépatique de glucose à l'exercice enduring.***

Les résultats préliminaires de notre expérimentation portant sur le foie suggèrent fortement que l'augmentation de la concentration plasmatique d'IL-6 en réponse à l'exercice provoque une signalisation IL-6 active dans le foie. Nous proposons par ailleurs qu'IL-6 pourrait favoriser la production hépatique de glucose en augmentant la transcription de la PEPCK, enzyme clé de la néoglucogenèse. Pour mieux comprendre le rôle de la signalisation IL-6 au niveau hépatique, la réalisation d'un exercice avec inhibition de la signalisation IL-6 peut apporter des informations concluantes. L'outil pharmacologique utilisé dans notre 2<sup>ème</sup> étude (inhibition de la calcineurine par la CsA) n'a pas donné satisfaction car la CsA a provoqué une baisse du glycogène hépatique et de la transcription des gènes de la néoglucogenèse au repos, rendant impossible toute analyse des résultats obtenus à l'exercice. Notre prochaine expérimentation consistera donc à neutraliser l'IL-6 plasmatique par l'administration préalable, par voie systémique, d'un anticorps anti-IL6. Cette méthode a déjà démontré son efficacité dans d'autres expérimentations (Smith et al., 2007) et devrait permettre de diminuer notablement la fixation de l'IL-6 à son récepteur dans le foie.

Nous avons aussi montré qu'il existe une augmentation très importante de la transcription du gène codant PGC-1 $\alpha$  dans le foie à l'exercice. Ce coactivateur de transcription est un acteur clé du contrôle de la néoglucogenèse lors de la privation alimentaire, et nous proposons qu'il puisse jouer un rôle similaire à l'exercice. Cependant, il nous faut au préalable vérifier que cette élévation des niveaux d'ARNm provoque bien une augmentation de l'expression de la protéine. Dans un second temps, pour définir si la transcription que nous observons relève d'une réponse aiguë (augmentation de la PHG) et non un processus adaptatif à moyen terme, nous envisageons de bloquer cette transcription par l'administration d'un ARN antisens anti-PGC-1 $\alpha$  administré par voie systémique (Oliveira et al., 2004) et d'évaluer la transcription des gènes de la néoglucogenèse à l'exercice.

# ***BIBLIOGRAPHIE***

## *BIBLIOGRAPHIE*

- Abbott, K. L., Loss, J. R., 2nd, Robida, A. M. and Murphy, T. J., 2000. Evidence that Galpha(q)-coupled receptor-induced interleukin-6 mRNA in vascular smooth muscle cells involves the nuclear factor of activated T cells. *Mol Pharmacol.* 58, 946-953.
- Agbulut, O., Li, Z., Mouly, V. and Butler-Browne, G. S., 1996. Analysis of skeletal and cardiac muscle from desmin knock-out and normal mice by high resolution separation of myosin heavy-chain isoforms. *Biol Cell.* 88, 131-135.
- Ahlborg, G., Felig, P., Hagenfeldt, L., Hendler, R. and Wahren, J., 1974. Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J Clin Invest.* 53, 1080-1090.
- Akerstrom, T., Steensberg, A., Keller, P., Keller, C., Penkowa, M. and Pedersen, B. K., 2005. Exercise induces interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *J Physiol.* 563, 507-516.
- Akira, S., 1997. IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 29, 1401-1418.
- Al-Khalili, L., Bouzakri, K., Glund, S., Lonnqvist, F., Koistinen, H. A. and Krook, A., 2006. Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol.* 20, 3364-3375.
- Alzuherri, H. and Chang, K. C., 2003. Calcineurin activates NF-kappaB in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal.* 15, 471-478.
- Andriambelason, E., Baillet, C., Vitte, P. A., Garotta, G., Dreano, M. and Callizot, N., 2006. Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology.* 26, 32-42.
- Arnall, D. A., Marker, J. C., Conlee, R. K. and Winder, W. W., 1986. Effect of infusing epinephrine on liver and muscle glycogenolysis during exercise in rats. *Am J Physiol.* 250, E641-649.
- Asmussen, E., 1967. Exercise: general statment of unsolved problems. *Circ Res.* 20, 12-15.
- Baeza-Raja, B. and Munoz-Canoves, P., 2004. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell.* 15, 2013-2026.
- Barthel, A. and Schmoll, D., 2003. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285, E685-692.
- Barthel, A., Schmoll, D., Kruger, K. D., Roth, R. A. and Joost, H. G., 2002. Regulation of the forkhead transcription factor FKHR (FOXO1a) by glucose starvation and AICAR, an activator of AMP-activated protein kinase. *Endocrinology.* 143, 3183-3186.
- Bassel-Duby, R. and Olson, E. N., 2003. Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 311, 1133-1141.
- Bauer, J., Lengyel, G., Bauer, T. M., Acs, G. and Gerok, W., 1989. Regulation of interleukin-6 receptor expression in human monocytes and hepatocytes. *FEBS Lett.* 249, 27-30.
- Berchtold, M. W., Brinkmeier, H. and Muntener, M., 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* 80, 1215-1265.
- Bigard, A. X., Zoll, J., Ribera, F., Mateo, P., Sanchez, H., Serrurier, B. and Ventura-Clapier, R., 2001. Influence of overload on phenotypic remodeling in regenerated skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281, C1686-1694.
- Bigard, X., Sanchez, H., Zoll, J., Mateo, P., Rousseau, V., Veksler, V. and Ventura-Clapier, R., 2000. Calcineurin Co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J Biol Chem.* 275, 19653-19660.
- Biro, O. J., Koulmann, N., Peinnequin, A. and Bigard, X. A., 2003. Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol.* 552, 213-221.
- Blair, S. N., Cheng, Y. and Holder, J. S., 2001. Is physical activity or physical fitness more important in defining health benefits? *Med Sci Sports Exerc.* 33, S379-399; discussion S419-320.
- Blumberg, D., Hochwald, S., Brennan, M. F. and Burt, M., 1995. Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism.* 44, 145-146.

- Booth, F. W. and Thomason, D. B., 1991. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. *Physiol Rev.* 71, 541-585.
- Brennan, F. X., Beck, K. D. and Servatius, R. J., 2004. Proinflammatory cytokines differentially affect leverpress avoidance acquisition in rats. *Behav Brain Res.* 153, 351-355.
- Brockman, R. P., 1979. Effect of somatostatin on plasma glucagon and insulin, and glucose turnover in exercising sheep. *J Appl Physiol.* 47, 273-278.
- Brooks, G. A. and Mercier, J., 1994. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J Appl Physiol.* 76, 2253-2261.
- Bruunsgaard, H., 2005. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol.* 78, 819-835.
- Bruunsgaard, H., Galbo, H., Halkjaer-Kristensen, J., Johansen, T. L., MacLean, D. A. and Pedersen, B. K., 1997. Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol.* 499 (Pt 3), 833-841.
- Camacho, R. C., Donahue, E. P., James, F. D., Berglund, E. D. and Wasserman, D. H., 2006. Energy state of the liver during short-term and exhaustive exercise in C57BL/6J mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290, E405-408.
- Cao, W., Collins, Q. F., Becker, T. C., Robidoux, J., Lupo, E. G., Jr., Xiong, Y., Daniel, K. W., Floering, L. and Collins, S., 2005. p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem.* 280, 42731-42737.
- Carbo, N., Lopez-Soriano, J., Costelli, P., Busquets, S., Alvarez, B., Baccino, F. M., Quinn, L. S., Lopez-Soriano, F. J. and Argiles, J. M., 2000. Interleukin-15 antagonizes muscle protein waste in tumour-bearing rats. *Br J Cancer.* 83, 526-531.
- Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., Prelovsek, O., Hohnen-Behrens, C., Watt, M. J., James, D. E., Kemp, B. E., Pedersen, B. K. and Febbraio, M. A., 2006. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes.* 55, 2688-2697.
- Cariou, B. and Staels, B., 2006. FXR: More than a bile acid receptor? *Endocrinology.* 147, 4022-4024.
- Carlson, K. I., Marker, J. C., Arnall, D. A., Terry, M. L., Yang, H. T., Lindsay, L. G., Bracken, M. E. and Winder, W. W., 1985. Epinephrine is unessential for stimulation of liver glycogenolysis during exercise. *J Appl Physiol.* 58, 544-548.
- Castell, L. M., Poortmans, J. R., Leclercq, R., Bresseur, M., Duchateau, J. and Newsholme, E. A., 1997. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 75, 47-53.
- Chan, M. H., Carey, A. L., Watt, M. J. and Febbraio, M. A., 2004a. Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287, R322-327.
- Chan, M. H., McGee, S. L., Watt, M. J., Hargreaves, M. and Febbraio, M. A., 2004b. Altering dietary nutrient intake that reduces glycogen content leads to phosphorylation of nuclear p38 MAP kinase in human skeletal muscle: association with IL-6 gene transcription during contraction. *Faseb J.* 18, 1785-1787.
- Chesnokova, V., and Melmed, S., 2002. Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology.* 143, 1571-1574.
- Chin, E. R., 2005. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. *J Appl Physiol.* 99, 414-423.
- Chin, E. R., Olson, E. N., Richardson, J. A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J. M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S., 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* 12, 2499-2509.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162, 156-159.
- Christ, B., Nath, A. and Jungermann, K., 1997. Mechanism of the impairment of the glucagon-stimulated phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression by interleukin-6 in rat hepatocytes: inhibition of the increase in cyclic 3',5' adenosine monophosphate and the downstream cyclic 3',5' adenosine monophosphate action. *Hepatology.* 26, 73-80.



- Christ, B., Yazici, E. and Nath, A., 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C contribute to the inhibition by interleukin 6 of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured rat hepatocytes. *Hepatology*. 31, 461-468.
- Coker, R. H., Krishna, M. G., Lacy, D. B., Bracy, D. P. and Wasserman, D. H., 1997. Role of hepatic alpha- and beta-adrenergic receptor stimulation on hepatic glucose production during heavy exercise. *Am J Physiol*. 273, E831-838.
- Cooper, D. M., Barstow, T. J., Bergner, A. and Lee, W. N., 1989. Blood glucose turnover during high- and low-intensity exercise. *Am J Physiol*. 257, E405-412.
- Coyle, E. F., 1995. Substrate utilization during exercise in active people. *Am J Clin Nutr*. 61, 968S-979S.
- Crabtree, G. R., 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem*. 276, 2313-2316.
- Croniger, C., Leahy, P., Reshef, L. and Hanson, R. W., 1998. C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver. *J Biol Chem*. 273, 31629-31632.
- Dejours, P., Raynaud, J., Cuenod, C. L. and Labrousse, Y., 1955. [Instantaneous modifications of ventilation at the beginning and at the cessation of muscular exercise; interpretation.]. *J Physiol (Paris)*. 47, 155-159.
- Di Gregorio, G. B., Hensley, L., Lu, T., Ranganathan, G. and Kern, P. A., 2004. Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: absence of development of age-related obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 287, E182-187
- Dohm, G. L., Kaspersek, G. J. and Barakat, H. A., 1985. Time course of changes in gluconeogenic enzyme activities during exercise and recovery. *Am J Physiol*. 249, E6-11.
- Drenth, J. P., Van Uum, S. H., Van Deuren, M., Pesman, G. J., Van der Ven-Jongekrijg, J. and Van der Meer, J. W., 1995. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *J Appl Physiol*. 79, 1497-1503.
- Ducieux, S., Zorzato, F., Muller, C., Sewry, C., Muntoni, F., Quinlivan, R., Restagno, G., Girard, T. and Treves, S., 2004. Effect of ryanodine receptor mutations on interleukin-6 release and intracellular calcium homeostasis in human myotubes from malignant hyperthermia-susceptible individuals and patients affected by central core disease. *J Biol Chem*. 279, 43838-43846.
- Duran-Sandoval, D., Cariou, B., Fruchart, J. C. and Staels, B., 2005. Potential regulatory role of the farnesoid X receptor in the metabolic syndrome. *Biochimie*. 87, 93-98.
- Duran-Sandoval, D., Mautino, G., Martin, G., Percevault, F., Barbier, O., Fruchart, J. C., Kuipers, F. and Staels, B., 2004. Glucose regulates the expression of the farnesoid X receptor in liver. *Diabetes*. 53, 890-898.
- Durieux, A. C., Bonnefoy, R., Busso, T. and Freyssenet, D., 2004. In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J Gene Med*. 6, 809-816.
- Durieux, A. C., Bonnefoy, R. and Freyssenet, D., 2005. Kinetic of transgene expression after electrotransfer into skeletal muscle: importance of promoter origin/strength. *Biochim Biophys Acta*. 1725, 403-409.
- Durieux, A. C., Bonnefoy, R., Manissolle, C. and Freyssenet, D., 2002. High-efficiency gene electrotransfer into skeletal muscle: description and physiological applicability of a new pulse generator. *Biochem Biophys Res Commun*. 296, 443-450.
- Eickelberg, O., Roth, M., Musmann, R., Rudiger, J. J., Tamm, M., Perruchoud, A. P. and Block, L. H., 1999. Calcium channel blockers activate the interleukin-6 gene via the transcription factors NF-IL6 and NF-kappaB in primary human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 99, 2276-2282.
- Engler, D., 2007. Hypothesis: Musculin is a hormone secreted by skeletal muscle, the body's largest endocrine organ. Evidence for actions on the endocrine pancreas to restrain the beta-cell mass and to inhibit insulin secretion and on the hypothalamus to co-ordinate the neuroendocrine and appetite responses to exercise. *Acta Biomed*. 78 Suppl 1, 156-206.
- Fäldt, J., Wernstedt, I., Fitzgerald, S. M., Wallenius, K., Bergström, G. and Jansson, J. O., 2004. Reduced exercise endurance in interleukin-6 deficient mice. *Endocrinology*. 145 2680-2686.
- Febbraio, M. A., 2007. gp130 receptor ligands as potential therapeutic targets for obesity. *J Clin Invest*. 117, 841-849.
- Febbraio, M. A., Hiscock, N., Sacchetti, M., Fischer, C. P. and Pedersen, B. K., 2004. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes*. 53, 1643-1648.

- Febbraio, M. A., Ott, P., Nielsen, H. B., Steensberg, A., Keller, C., Krstrup, P., Secher, N. H. and Pedersen, B. K., 2003. Hepatosplanchnic clearance of interleukin-6 in humans during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285, E397-402.
- Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K., 2002. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *Faseb J.* 16, 1335-1347.
- Feldman, B. J., Streeper, R. S., Farese, R. V., Jr. and Yamamoto, K. R., 2006. Myostatin modulates adipogenesis to generate adipocytes with favorable metabolic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 15675-15680.
- Fernandez-Celemin, L. and Thissen, J. P., 2001. Interleukin-6 stimulates hepatic insulin-like growth factor binding protein-4 messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology.* 142, 241-248.
- Finck, B. N. and Kelly, D. P., 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 116, 615-622.
- Fischer, C. P., Hiscock, N. J., Penkowa, M., Basu, S., Vessby, B., Kallner, A., Sjöberg, L. B. and Pedersen, B. K., 2004. Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J Physiol.* 558, 633-645.
- Flück, M., Hoppeler, H., 2003. Molecular basis of skeletal muscle plasticity : from gene to form and function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 146, 159-216.
- Frantz, B., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J. and O'Neill, E. A., 1994. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I kappa B/MAD3, an inhibitor of NF-kappa B. *Embo J.* 13, 861-870.
- Freyssenet, D., 2007. Energy sensing and regulation of gene expression in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 102, 529-540.
- Friedman, J. E., 1994. Role of glucocorticoids in activation of hepatic PEPCK gene transcription during exercise. *Am J Physiol.* 266, E560-566.
- Frost, R. A., Nystrom, G. J. and Lang, C. H., 2002. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283, R698-709.
- Frost, R. A., Nystrom, G. J. and Lang, C. H., 2004. Epinephrine stimulates IL-6 expression in skeletal muscle and C2C12 myoblasts: role of c-Jun NH2-terminal kinase and histone deacetylase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286, E809-817.
- Frost, R. A., Nystrom, G. J. and Lang, C. H., 2006. Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 290, R773-784.
- Frydelund-Larsen, L., Penkowa, M., Akerstrom, T., Zankari, A., Nielsen, S. and Pedersen, B. K., 2007. Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. *Exp Physiol.* 92, 233-240.
- Fujimoto, M. and Naka, T., 2003. Regulation of cytokine signaling by SOCS family molecules. *Trends Immunol.* 24, 659-666.
- Hanson, R. W. and Reshef, L., 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem.* 66, 581-611.
- Hardie, D. G. and Sakamoto, K., 2006. AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda).* 21, 48-60.
- Hargreaves, M. and Proietto, J., 1994. Glucose kinetics during exercise in trained men. *Acta Physiol Scand.* 150, 221-225.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L., 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J.* 334 (Pt 2), 297-314.
- Helge, J. W., Stallknecht, B., Pedersen, B. K., Galbo, H., Kiens, B. and Richter, E. A., 2003. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. *J Physiol.* 546, 299-305.
- Henneman, E., 1957. Relation between size of neurons and their susceptibility to discharge. *Science* 16, 1345-1347.
- Henneman, E. and Olson, C. B., 1965. Relations Between Structure And Function In The Design Of Skeletal Muscles. *J Neurophysiol.* 28, 581-598.

- Herzig, S., Long, F., Jhala, U. S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B. and Montminy, M., 2001. CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*. 413, 179-183.
- Hill, M. and McCallum, R., 1991. Altered transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in rats following endotoxin treatment. *J Clin Invest*. 88, 811-816.
- Hiscock, N., Chan, M. H., Bisucci, T., Darby, I. A. and Febbraio, M. A., 2004. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. *Faseb J*. 18, 992-994.
- Ho, R. C., Hirshman, M. F., Li, Y., Cai, D., Farmer, J. R., Aschenbach, W. G., Witczak, C. A., Shoelson, S. E. and Goodyear, L. J., 2005. Regulation of IkappaB kinase and NF-kappaB in contracting adult rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 289, C794-801.
- Hoelzer, D. R., Dalsky, G. P., Clutter, W. E., Shah, S. D., Holloszy, J. O. and Cryer, P. E., 1986. Glucoregulation during exercise: hypoglycemia is prevented by redundant glucoregulatory systems, sympathochromaffin activation, and changes in islet hormone secretion. *J Clin Invest*. 77, 212-221.
- Holmes, A. G., Watt, M. J., Carey, A. L. and Febbraio, M. A., 2004. Ionomycin, but not physiologic doses of epinephrine, stimulates skeletal muscle interleukin-6 mRNA expression and protein release. *Metabolism*. 53, 1492-1495.
- Howlett, K., Febbraio, M. and Hargreaves, M., 1999. Glucose production during strenuous exercise in humans: role of epinephrine. *Am J Physiol*. 276, E1130-1135.
- Hu, G., Sarti, C., Jousilahti, P., Silventoinen, K., Barengo, N. C. and Tuomilehto, J., 2005. Leisure time, occupational, and commuting physical activity and the risk of stroke. *Stroke*. 36, 1994-1999.
- Issekutz, B., Jr., 1980. The role of hypoinsulinemia in exercise metabolism. *Diabetes*. 29, 629-635.
- Jarhult, J. and Holst, J., 1979. The role of the adrenergic innervation to the pancreatic islets in the control of insulin release during exercise in man. *Pflugers Arch*. 383, 41-45.
- Jenkins, A. B., Chisholm, D. J., James, D. E., Ho, K. Y. and Kraegen, E. W., 1985. Exercise-induced hepatic glucose output is precisely sensitive to the rate of systemic glucose supply. *Metabolism*. 34, 431-436.
- Jenkins, A. B., Furler, S. M., Chisholm, D. J. and Kraegen, E. W., 1986. Regulation of hepatic glucose output during exercise by circulating glucose and insulin in humans. *Am J Physiol*. 250, R411-417.
- Jonsdottir, I. H., Schjerling, P., Ostrowski, K., Asp, S., Richter, E. A. and Pedersen, B. K., 2000. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol*. 528 Pt 1, 157-163.
- Juretic, N., Garcia-Huidobro, P., Iturrieta, J. A., Jaimovich, E. and Riveros, N., 2006. Depolarization-induced slow Ca<sup>2+</sup> transients stimulate transcription of IL-6 gene in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 290, C1428-1436.
- Kamimura, D. and Hirano, T., 2003. Interleukin-6. *Encyclopedia of Hormones*. Academic Press, New York, pp. 430.
- Kanemaki, T., Kitade, H., Kaibori, M., Sakitani, K., Hiramatsu, Y., Kamiyama, Y., Ito, S. and Okumura, T., 1998. Interleukin 1beta and interleukin 6, but not tumor necrosis factor alpha, inhibit insulin-stimulated glycogen synthesis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 27, 1296-1303.
- Keller, C., Steensberg, A., Pilegaard, H., Osada, T., Saltin, B., Pedersen, B. K. and Neufer, P. D., 2001. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J*. 15, 2748-2750.
- Keller, P., Keller, C., Carey, A. L., Jauffred, S., Fischer, C. P., Steensberg, A. and Pedersen, B. K., 2003. Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem Biophys Res Commun*. 310, 550-554.
- Keller, P., Penkowa, M., Keller, C., Steensberg, A., Fischer, C. P., Giralt, M., Hidalgo, J. and Pedersen, B. K., 2005. Interleukin-6 receptor expression in contracting human skeletal muscle: regulating role of IL-6. *Faseb J*. 19, 1181-1183.
- Kelly, M., Keller, C., Avilucea, P. R., Keller, P., Luo, Z., Xiang, X., Giralt, M., Hidalgo, J., Saha, A. K., Pedersen, B. K. and Ruderman, N. B., 2004. AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 320, 449-454.

- Kim, H. J., Higashimori, T., Park, S. Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y. J., Noh, H. L., Cho, Y. R., Cline, G., Kim, Y. B. and Kim, J. K., 2004. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 53, 1060-1067.
- Kjaer, M., 1998. Hepatic metabolism during exercise. In: Hargreaves, M. S., LL (Ed.), *Exercise metabolism. human kinetics*, Champaign, IL, pp. 73-97.
- Kjaer, M., Engfred, K., Fernandes, A., Secher, N. H. and Galbo, H., 1993. Regulation of hepatic glucose production during exercise in humans: role of sympathoadrenergic activity. *Am J Physiol*. 265, E275-283.
- Kjaer, M., Farrell, P. A., Christensen, N. J. and Galbo, H., 1986. Increased epinephrine response and inaccurate glucoregulation in exercising athletes. *J Appl Physiol*. 61, 1693-1700.
- Kjaer, M., Keiding, S., Engfred, K., Rasmussen, K., Sonne, B., Kirkegaard, P. and Galbo, H., 1995. Glucose homeostasis during exercise in humans with a liver or kidney transplant. *Am J Physiol*. 268, E636-644.
- Kjaer, M., Secher, N. H., Bach, F. W. and Galbo, H., 1987. Role of motor center activity for hormonal changes and substrate mobilization in humans. *Am J Physiol*. 253, R687-695.
- Klover, P. J., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G. and Mooney, R. A., 2003. Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*. 52, 2784-2789.
- Kosmidou, I., Vassilakopoulos, T., Xagorari, A., Zakynthinos, S., Papapetropoulos, A. and Roussos, C., 2002. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 26, 587-593.
- Koulmann, N. and Bigard, A. X., 2006. Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflugers Arch*. 452, 125-139.
- Kreideweiss, S., Ahlers, C., Nordheim, A. and Ruhlmann, A., 1999. Ca<sup>2+</sup>-induced p38/SAPK signalling inhibited by the immunosuppressant cyclosporin A in human peripheral blood mononuclear cells. *Eur J Biochem*. 265, 1075-1084.
- Lim, H. W., New, L., Han, J. and Molkenin, J. D., 2001. Calcineurin enhances MAPK phosphatase-1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 276, 15913-15919.
- Liu, J. O., 2003. Endogenous protein inhibitors of calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun*. 311, 1103-1109.
- Liu, W., Youn, H. D., Zhou, X. Z., Lu, K. P. and Liu, J. O., 2001. Binding and regulation of the transcription factor NFAT by the peptidyl prolyl cis-trans isomerase Pin1. *FEBS Lett*. 496, 105-108.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25, 402-408.
- Long, Y. C., Widegren, U. and Zierath, J. R., 2004. Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. *Proc Nutr Soc*. 63, 227-232.
- Luo, G., Hershko, D. D., Robb, B. W., Wray, C. J. and Hasselgren, P. O., 2003. IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 284, R1249-1254.
- Ma, K., Saha, P. K., Chan, L. and Moore, D. D., 2006. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 116, 1102-1109.
- Mahoney, D. J., Carey, K., Fu, M. H., Snow, R., Cameron-Smith, D., Parise, G. and Tarnopolsky, M. A., 2004. Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiol Genomics*. 18, 226-231.
- Marker, J. C., Arnall, D. A., Conlee, R. K. and Winder, W. W., 1986. Effect of adrenalectomy on metabolic responses to high-intensity exercise. *Am J Physiol*. 251, R552-559.
- Marker, J. C., Hirsch, I. B., Smith, L. J., Parvin, C. A., Holloszy, J. O. and Cryer, P. E., 1991. Catecholamines in prevention of hypoglycemia during exercise in humans. *Am J Physiol*. 260, E705-712.
- Matsuda, S., Shibasaki, F., Takehana, K., Mori, H., Nishida, E. and Koyasu, S., 2000. Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell activation. *EMBO Rep*. 1, 428-434.
- Maxime, V. and Annane, D., 2005. Manifestations endocriniennes liées au sepsis. *Réanimation*. 14, 230-237.
- McCallum, R. E. and Berry, L. J., 1973. Effects of endotoxin on gluconeogenesis, glycogen synthesis, and liver glycogen synthase in mice. *Infect Immun*. 7, 642-654.
- McGee, S. L. and Hargreaves, M., 2004. Exercise and myocyte enhancer factor 2 regulation in human skeletal muscle. *Diabetes*. 53, 1208-1214.

- Mejat, A., Ramond, F., Bassel-Duby, R., Khochbin, S., Olson, E. N. and Schaeffer, L., 2005. Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nat Neurosci.* 8, 313-321.
- Mercier, J. G., Hokanson, J. F. and Brooks, G. A., 1995. Effects of cyclosporine A on skeletal muscle mitochondrial respiration and endurance time in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 151, 1532-1536.
- Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F. and Gardahaut, M. F., 1999. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve.* 22, 724-732.
- Miska, E. A., Karlsson, C., Langley, E., Nielsen, S. J., Pines, J. and Kouzarides, T., 1999. HDAC4 deacetylase associates with and represses the MEF2 transcription factor. *Embo J.* 18, 5099-5107.
- Moldoveanu, A. I., Shephard, R. J. and Shek, P. N., 2000. Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol.* 89, 1499-1504.
- Molkentin, J. D., 2004. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res.* 63, 467-475.
- Myers, J., Kaykha, A., George, S., Abella, J., Zaheer, N., Lear, S., Yamazaki, T. and Froelicher, V., 2004. Fitness versus physical activity patterns in predicting mortality in men. *Am J Med.* 117, 912-918.
- Nehlsen-Cannarella, S. L., Fagoaga, O. R., Nieman, D. C., Henson, D. A., Butterworth, D. E., Schmitt, R. L., Bailey, E. M., Warren, B. J., Utter, A. and Davis, J. M., 1997. Carbohydrate and the cytokine response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol.* 82, 1662-1667.
- Nieman, D. C., Davis, J. M., Henson, D. A., Walberg-Rankin, J., Shute, M., Dumke, C. L., Utter, A. C., Vinci, D. M., Carson, J. A., Brown, A., Lee, W. J., McAnulty, S. R. and McAnulty, L. S., 2003. Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3-h run. *J Appl Physiol.* 94, 1917-1925.
- Nieman, D. C., Dumke, C. L., Henson, D. A., McAnulty, S. R., Gross, S. J. and Lind, R. H., 2005. Muscle damage is linked to cytokine changes following a 160-km race. *Brain Behav Immun.* 19, 398-403.
- Nilsson, L. M., Sun, Z. W., Nilsson, J., Nordstrom, I., Chen, Y. W., Molkentin, J. D., Wide-Svensson, D., Hellstrand, P., Lydrup, M. L. and Gomez, M. F., 2007. Novel blocker of NFAT activation inhibits IL-6 production in human myometrial arteries and reduces vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 292, C1167-1178.
- Nishizawa, H., Matsuda, M., Yamada, Y., Kawai, K., Suzuki, E., Makishima, M., Kitamura, T. and Shimomura, I., 2004. Musclin, a novel skeletal muscle-derived secretory factor. *J Biol Chem.* 279, 19391-19395.
- Nizielski, S. E., Arizmendi, C., Shteyngarts, A. R., Farrell, C. J. and Friedman, J. E., 1996. Involvement of transcription factor C/EBP-beta in stimulation of PEPCK gene expression during exercise. *Am J Physiol.* 270, R1005-1012.
- Oliveira, R. L., Ueno, M., de Souza, C. T., Pereira-da-Silva, M., Gasparetti, A. L., Bezzer, R. M., Alberici, L. C., Vercesi, A. E., Saad, M. J. and Velloso, L. A., 2004. Cold-induced PGC-1alpha expression modulates muscle glucose uptake through an insulin receptor/Akt-independent, AMPK-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 287, E686-695.
- Ostrowski, K., Hermann, C., Bangash, A., Schjerling, P., Nielsen, J. N. and Pedersen, B. K., 1998a. A trauma-like elevation of plasma cytokines in humans in response to treadmill running. *J Physiol.* 513 (Pt 3), 889-894.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Asp, S., Schjerling, P. and Pedersen, B. K., 1999. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol.* 515 (Pt 1), 287-291.
- Ostrowski, K., Rohde, T., Zacho, M., Asp, S. and Pedersen, B. K., 1998b. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol.* 508 (Pt 3), 949-953.
- Ostrowski, K., Schjerling, P. and Pedersen, B. K., 2000. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans--effect of intensity of exercise. *Eur J Appl Physiol.* 83, 512-515.
- Park, H., Kaushik, V. K., Constant, S., Prentki, M., Przybytkowski, E., Ruderman, N. B. and Saha, A. K., 2002. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem.* 277, 32571-32577.

- Parsons, S. A., Millay, D. P., Wilkins, B. J., Bueno, O. F., Tsika, G. L., Neilson, J. R., Liberatore, C. M., Yutzey, K. E., Crabtree, G. R., Tsika, R. W. and Molkentin, J. D., 2004. Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *J Biol Chem.* 279, 26192-26200.
- Pedersen, B. K. and Febbraio, M., 2005. Muscle-derived interleukin-6--a possible link between skeletal muscle, adipose tissue, liver, and brain. *Brain Behav Immun.* 19, 371-376.
- Pedersen, B. K. and Febbraio, M. A., 2007. Point: Interleukin-6 does have a beneficial role in insulin sensitivity and glucose homeostasis. *J Appl Physiol.* 102, 814-816.
- Pedersen, B. K. and Fischer, C. P., 2007a. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci.* 28, 152-156.
- Pedersen, B. K. and Fischer, C. P., 2007b. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 10, 265-271.
- Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., Wolsk-Petersen, E. and Febbraio, M., 2004. The metabolic role of IL-6 produced during exercise: is IL-6 an exercise factor? *Proc Nutr Soc.* 63, 263-267.
- Pedersen, B. K., Steensberg, A. and Schjerling, P., 2001. Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *J Physiol.* 536, 329-337.
- Penkowa, M., Keller, C., Keller, P., Jauffred, S. and Pedersen, B. K., 2003. Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *Faseb J.* 17, 2166-2168.
- Petersen, A. M. and Pedersen, B. K., 2005. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 98, 1154-1162.
- Petersen, E. W., Carey, A. L., Sacchetti, M., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K., 2005. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 288, E155-162.
- Petersen, K. F., Price, T. B. and Bergeron, R., 2004. Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise: impact of type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 4656-4664.
- Plomgaard, P., Bouzakri, K., Krogh-Madsen, R., Mittendorfer, B., Zierath, J. R. and Pedersen, B. K., 2005. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces skeletal muscle insulin resistance in healthy human subjects via inhibition of Akt substrate 160 phosphorylation. *Diabetes.* 54, 2939-2945.
- Puigserver, P., Rhee, J., Donovan, J., Walkey, C. J., Yoon, J. C., Oriente, F., Kitamura, Y., Altomonte, J., Dong, H., Accili, D. and Spiegelman, B. M., 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature.* 423, 550-555.
- Puigserver, P. and Spiegelman, B. M., 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$  (PGC-1  $\alpha$ ): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 24, 78-90.
- Quinn, L. S., Haugk, K. L. and Grabstein, K. H., 1995. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology.* 136, 3669-3672.
- Quinn, L. S., Strait-Bodey, L., Anderson, B. G., Argiles, J. M. and Havel, P. J., 2005. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. *Cell Biol Int.* 29, 449-457.
- Ramji, D. P. and Foka, P., 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 365, 561-575.
- Rhee, J., Inoue, Y., Yoon, J. C., Puigserver, P., Fan, M., Gonzalez, F. J. and Spiegelman, B. M., 2003. Regulation of hepatic fasting response by PPAR $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100, 4012-4017.
- Riechman, S. E., Balasekaran, G., Roth, S. M. and Ferrell, R. E., 2004. Association of interleukin-15 protein and interleukin-15 receptor genetic variation with resistance exercise training responses. *J Appl Physiol.* 97, 2214-2219.
- Rieusset, J., Bouzakri, K., Chevillotte, E., Ricard, N., Jacquet, D., Bastard, J. P., Laville, M. and Vidal, H., 2004. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 53, 2232-2241.
- Ritchie, D. G., 1990. Interleukin 6 stimulates hepatic glucose release from prelabeled glycogen pools. *Am J Physiol.* 258, E57-64.

- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M. and Puigserver, P., 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*. 434, 113-118.
- Romijn, J. A., Coyle, E. F., Sidossis, L. S., Gastaldelli, A., Horowitz, J. F., Endert, E. and Wolfe, R. R., 1993. Regulation of endogenous fat and carbohydrate metabolism in relation to exercise intensity and duration. *Am J Physiol*. 265, E380-391.
- Rosendal, L., Sogaard, K., Kjaer, M., Sjogaard, G., Langberg, H. and Kristiansen, J., 2005. Increase in interstitial interleukin-6 of human skeletal muscle with repetitive low-force exercise. *J Appl Physiol*. 98, 477-481.
- Rothermel, B. A., Vega, R. B. and Williams, R. S., 2003. The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med*. 13, 15-21.
- Rowell, L. B., Masoro, E. J. and Spencer, M. J., 1965. Splanchnic metabolism in exercising man. *J Appl Physiol*. 20, 1032-1037.
- Ruderman, N. B., Keller, C., Richard, A. M., Saha, A. K., Luo, Z., Xiang, X., Giralt, M., Ritov, V. B., Menshikova, E. V., Kelley, D. E., Hidalgo, J., Pedersen, B. K. and Kelly, M., 2006. Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 55 Suppl 2, S48-54.
- Ruderman, N. B., Park, H., Kaushik, V. K., Dean, D., Constant, S., Prentki, M. and Saha, A. K., 2003. AMPK as a metabolic switch in rat muscle, liver and adipose tissue after exercise. *Acta Physiol Scand*. 178, 435-442.
- Sanchez-Perez, I., Rodriguez-Hernandez, C. J., Manguan-Garcia, C., Torres, A., Perona, R. and Murguía, J. R., 2004. FK506 sensitizes mammalian cells to high osmolarity by modulating p38 MAP kinase activation. *Cell Mol Life Sci*. 61, 700-708.
- Schimmack, G., Defronzo, R. A. and Musi, N., 2006. AMP-activated protein kinase: Role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab*. 8, 591-602.
- Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A. and Mooney, R. A., 2002. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 51, 3391-3399.
- Senn, J. J., Klover, P. J., Nowak, I. A., Zimmers, T. A., Koniaris, L. G., Furlanetto, R. W. and Mooney, R. A., 2003. Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem*. 278, 13740-13746.
- Shen, T., Liu, Y., Cseresnyes, Z., Hawkins, A., Randall, W. R. and Schneider, M. F., 2006. Activity- and calcineurin-independent nuclear shuttling of NFATc1, but not NFATc3, in adult skeletal muscle fibers. *Mol Biol Cell*. 17, 1570-1582.
- Sigal, R. J., Fisher, S., Halter, J. B., Vranic, M. and Marliss, E. B., 1996. The roles of catecholamines in glucoregulation in intense exercise as defined by the islet cell clamp technique. *Diabetes*. 45, 148-156.
- Sigal, R. J., Fisher, S. J., Manzon, A., Morais, J. A., Halter, J. B., Vranic, M. and Marliss, E. B., 2000. Glucoregulation during and after intense exercise: effects of alpha-adrenergic blockade. *Metabolism*. 49, 386-394.
- Smith, C., Wilson, N. W., Louw, A. and Myburgh, K. H., 2007. Illuminating the interrelated immune and endocrine adaptations after multiple exposures to short immobilization stress by in vivo blocking of IL-6. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292, R1439-1447.
- Sonne, B. and Galbo, H., 1985. Carbohydrate metabolism during and after exercise in rats: studies with radioglucose. *J Appl Physiol*. 59, 1627-1639.
- Starkie, R. L., Arkinstall, M. J., Koukoulas, I., Hawley, J. A. and Febbraio, M. A., 2001a. Carbohydrate ingestion attenuates the increase in plasma interleukin-6, but not skeletal muscle interleukin-6 mRNA, during exercise in humans. *J Physiol*. 533, 585-591.
- Starkie, R. L., Rolland, J., Angus, D. J., Anderson, M. J. and Febbraio, M. A., 2001b. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF-alpha levels after prolonged running. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280, C769-774.
- Stayrook, K. R., Bramlett, K. S., Savkur, R. S., Ficorilli, J., Cook, T., Christe, M. E., Michael, L. F. and Burris, T. P., 2005. Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology*. 146, 984-991.
- Steensberg, A., Febbraio, M. A., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Saltin, B. and Pedersen, B. K., 2001a. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol*. 537, 633-639.

- Steensberg, A., Fischer, C. P., Sacchetti, M., Keller, C., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K., 2003. Acute interleukin-6 administration does not impair muscle glucose uptake or whole-body glucose disposal in healthy humans. *J Physiol.* 548, 631-638.
- Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R. L., Osada, T., Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K., 2002. IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283, E1272-1278.
- Steensberg, A., Toft, A. D., Schjerling, P., Halkjaer-Kristensen, J. and Pedersen, B. K., 2001b. Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of epinephrine. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281, C1001-1004.
- Steensberg, A., van Hall, G., Osada, T., Sacchetti, M., Saltin, B. and Klarlund Pedersen, B., 2000. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 529 Pt 1, 237-242.
- Stith, R. D. and Luo, J., 1994. Endocrine and carbohydrate responses to interleukin-6 in vivo. *Circ Shock.* 44, 210-215.
- Tsigos, C., Papanicolaou, D. A., Kyrou, I., Defensor, R., Mitsiadis, C. S. and Chrousos, G. P., 1997. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 4167-4170.
- Turcotte, L. P., Rovner, A. S., Roark, R. R. and Brooks, G. A., 1990. Glucose kinetics in gluconeogenesis-inhibited rats during rest and exercise. *Am J Physiol.* 258, E203-211.
- Ullum, H., Haahr, P. M., Diamant, M., Palmo, J., Halkjaer-Kristensen, J. and Pedersen, B. K., 1994. Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, or TNF- $\alpha$  pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol.* 77, 93-97.
- van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Moller, K., Saltin, B., Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K., 2003. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 88, 3005-3010.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V. and Chariot, A., 2005. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 30, 43-52.
- Vincent, M. F., Erion, M. D., Gruber, H. E. and Van den Berghe, G., 1996. Hypoglycaemic effect of AICARiboside in mice. *Diabetologia.* 39, 1148-1155.
- Vissing, J., Sonne, B. and Galbo, H., 1988. Regulation of hepatic glucose production in running rats studied by glucose infusion. *J Appl Physiol.* 65, 2552-2557.
- Vranic, M., Kawamori, R., Pek, S., Kovacevic, N. and Wrenshall, G. A., 1976. The essentiality of insulin and the role of glucagon in regulating glucose utilization and production during strenuous exercise in dogs. *J Clin Invest.* 57, 245-255.
- Wallenius, V., Wallenius, K., Ahrén, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S. N., Ohlsson, C. and Jansson, J. O., 2002. Interleukin-6 deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med.* 8, 75-79.
- Wasserman, D. H., Lickley, H. L. and Vranic, M., 1984. Interactions between glucagon and other counterregulatory hormones during normoglycemic and hypoglycemic exercise in dogs. *J Clin Invest.* 74, 1404-1413.
- Wasserman, D. H., Spalding, J. A., Lacy, D. B., Colburn, C. A., Goldstein, R. E. and Cherrington, A. D., 1989a. Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am J Physiol.* 257, E108-117.
- Wasserman, D. H., Williams, P. E., Lacy, D. B., Goldstein, R. E. and Cherrington, A. D., 1989b. Exercise-induced fall in insulin and hepatic carbohydrate metabolism during muscular work. *Am J Physiol.* 256, E500-509.
- Weigert, C., Hennige, A. M., Brodbeck, K., Haring, H. U. and Schleicher, E. D., 2005. Interleukin-6 acts as insulin sensitizer on glycogen synthesis in human skeletal muscle cells by phosphorylation of Ser473 of Akt. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 289, E251-257.



- Weigert, C., Hennige, A. M., Lehmann, R., Brodbeck, K., Baumgartner, F., Schauble, M., Haring, H. U. and Schleicher, E. D., 2006. Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 281, 7060-7067.
- Widegren, U., Jiang, X. J., Krook, A., Chibalin, A. V., Bjornholm, M., Tally, M., Roth, R. A., Henriksson, J., Wallberg-henriksson, H. and Zierath, J. R., 1998. Divergent effects of exercise on metabolic and mitogenic signaling pathways in human skeletal muscle. *Faseb J.* 12, 1379-1389.
- Winder, W. W., 1988. Role of cyclic AMP in regulation of hepatic glucose production during exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 20, 551-559.
- Wu, H., Rothermel, B., Kanatous, S., Rosenberg, P., Naya, F. J., Shelton, J. M., Hutcheson, K. A., DiMaio, J. M., Olson, E. N., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S., 2001. Activation of MEF2 by muscle activity is mediated through a calcineurin-dependent pathway. *Embo J.* 20, 6414-6423.
- Yang, J., Rothermel, B., Vega, R. B., Frey, N., McKinsey, T. A., Olson, E. N., Bassel-Duby, R. and Williams, R. S., 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res.* 87, E61-68.
- Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K., Newgard, C. B. and Spiegelman, B. M., 2001. Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature.* 413, 131-138.

***PUBLICATIONS***  
***SCIENTIFIQUES***

*PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES DANS LE CADRE DE LA THESE*

- Banzet, S., Koulmann, N., Simler, N., Birot, O., Sanchez, H., Chapot, R., Peinnequin, A. and Bigard, X., 2005. Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during muscle contraction in rat: association with calcineurin activity. *J Physiol.* 566, 839-847.
- Banzet, S., Koulmann, N., Sanchez, H., Serrurier, B., Peinnequin, A., Alonso, A. and Bigard, X., 2007. Contraction-induced interleukin-6 transcription in rat slow-type muscle is partly dependent on calcineurin activation. *J Cell Physiol.* 210, 596-601.

*AUTRES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES*

- Banzet, S., Koulmann, N., Sanchez, H., Serrurier, B., Peinnequin, A. and Bigard, A. X., 2007. Musclin gene expression is strongly related to fast-glycolytic phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 353, 713-718.
- Durieux, A. C., Amirouche, A., Banzet, S., Koulmann, N., Bonnefoy, R., Padeloup, M., Mouret, C., Bigard, X., Peinnequin, A. and Freyssenet, D., 2007. Ectopic expression of myostatin induces atrophy of adult skeletal muscle by decreasing muscle gene expression. *Endocrinology.* 148, 3140-3147.
- Malgoyre, A., Banzet, S., Mouret, C., Bigard, A. X. and Peinnequin, A., 2007. Quantification of low-expressed mRNA using 5' LNA-containing real-time PCR primers. *Biochem Biophys Res Commun.* 354, 246-252.
- Sanchez, H., Chapot, R., Banzet, S., Koulmann, N., Birot, O., Bigard, A. X. and Peinnequin, A., 2006. Quantification by real-time PCR of developmental and adult myosin mRNA in rat muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 340, 165-174.
- Koulmann, N., Banzet, S. and Bigard, A. X., 2003. L'activité physique à la chaleur : de la physiologie aux recommandations d'apport hydrique. *Med Trop (Mars).* 63, 617-626.

# Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during muscle contraction in rat: association with calcineurin activity

Sébastien Banzet, Nathalie Koulmann, Nadine Simler, Olivier Birot, Hervé Sanchez, Rachel Chapot, André Peinnequin and Xavier Bigard

Department of Human Factors, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche, France

**In this study, we quantified the transcription of the interleukin-6 (IL-6) gene in individual fibres and the associated changes in calcineurin activity assessed at the cellular level during prolonged muscle contraction. Individual myofibres were isolated from plantaris and soleus muscles of rats at the end of an exhaustive running exercise test ( $n = 10$ ), categorized according to their myosin heavy chain isoform content, and compared to those of resting rats ( $n = 10$ ). Using real-time PCR analysis in individual fibres, a marked rise in IL-6 transcript levels occurred in type I and IIa fibres at the end of exercise ( $P < 0.05$ ). Transcription of the gene encoding for the modulatory calcineurin-interacting protein-1 (MCIP-1), a sensitive indicator of calcineurin activity, also mainly increased in type I and IIa fibres ( $P < 0.05$ ). Moreover, a slight increase in MCIP-1 mRNA levels was observed in type IIx ( $P < 0.05$ ). Fibre types determined by immunohistochemistry were qualitatively examined for glycogen content using periodic acid–Shiff staining, and no direct relationship was found, at the cellular level, between glycogen content, fibre-type and IL-6 transcription. Our data clearly suggest that IL-6 gene transcription was mainly observed in early recruited myofibres and that contraction-induced IL-6 transcription could be associated with enhanced calcineurin activity.**

(Resubmitted 25 April 2005; accepted 12 May 2005; first published online 19 May 2005)

**Corresponding author** X. Bigard: Département des facteurs humains, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, BP 87, 38702 La Tronche Cédex, France. Email: xbigard@crssa.net

It has been recently shown that interleukin-6 (IL-6) plasma levels increase dramatically during prolonged concentric exercise in man (for review see Febbraio & Pedersen, 2002). Increased IL-6 mRNA levels were reported in human muscle biopsies at the end of exercise, related to mechanisms other than muscle damage (Ostrowski *et al.* 1998). In a one-legged exercise test, high muscle IL-6 net release occurred only in the contracting limb (Steensberg *et al.* 2000). Together, these results strongly suggest that muscle is the main source of plasma IL-6 during exercise and that this production is directly associated with muscle contraction and does not result from an exercise-related systemic effect. Subjects exercising with low intramuscular glycogen levels showed a higher plasma IL-6 peak (Keller *et al.* 2001), independent of systemic influences (Steensberg *et al.* 2001). It has thus been hypothesized that muscle-derived IL-6 is linked to energy availability and could play an important role in carbohydrate homeostasis during exercise by contributing to contraction-mediated glucose uptake and by acting as an endocrine signal of muscle energy stores to favour hepatic

glucose production and white adipose tissue lipolysis (for review see Febbraio & Pedersen, 2002).

However, skeletal muscle contains several cell types that are known to be able to produce IL-6. Blood mononuclear cells do not account for the exercise-induced increase in IL-6 plasma levels (Ullum *et al.* 1994; Starkie *et al.* 2000; Moldoveanu *et al.* 2000). Human myoblasts (Bartoccioni *et al.* 1994), smooth muscle cells (Detmer *et al.* 2001) and endothelial cells (Sterpetti *et al.* 1993) can produce IL-6 when exposed to several stimuli such as inflammatory cytokines, endotoxins or mechanical stress. The cellular origin of IL-6 production in muscle has been examined in two recent studies. The immunohistochemical detection of IL-6 protein in skeletal muscle showed an increase in positive myofibres at the end of exercise, suggesting that myofibres *per se* could be a source of IL-6 production during contraction (Penkowa *et al.* 2003). Moreover, using *in situ* hybridization in human muscle, it has recently been shown that myofibres contain IL-6 mRNA at the end of prolonged exercise (Hiscock *et al.* 2004). These findings clearly show that muscle fibres are a source of

IL-6, and because myofibres consume and need energy during muscle contraction, they reinforce the hypothesis of an energy-sensing function of IL-6.

Adult rat skeletal muscles comprise at least four fibre types ranging from slow-twitch predominantly oxidative fibres (type I) to fast-twitch predominantly oxidative, intermediate oxidative and low oxidative fibres (types IIa, IIx and IIb, respectively). Muscle fibres are distributed among motor units and it is well accepted that during muscle contraction, motor units are recruited in an orderly manner. According to the 'size principle' of Henneman & Olson (1965), the smallest motor units comprising type I fibres are first recruited, while the largest, comprising type IIx and type IIb fibres, are recruited long after the beginning of muscle contraction, when local fatigue occurs in slow and oxidative motor units (Fallentin *et al.* 1993). Because type I and type IIa fibres have small glycogen stores, whereas type IIx and IIb fibre have large glycogen stores, and IL-6 may work as a sensor of carbohydrate availability (Febbraio & Pedersen, 2002), a fibre-type specificity of IL-6 gene expression could be expected at the end of prolonged exercise. This issue has been recently addressed and controversial findings were reported. No difference was detected between muscle fibre types at the protein level at the end of exercise (Penkowa *et al.* 2003), whereas Fischer *et al.* (2004) described preferential staining in type I fibres. More recent data suggest that type II fibres predominantly produce IL-6 during exercise in humans (Hiscock *et al.* 2004). Moreover, the results of this latter study suggested that a reduced level of glycogen was not directly involved in IL-6 gene expression during muscle contractile activity. Whether the expression of the IL-6 gene varies between fibre types during exercise therefore remains to be elucidated.

Because the nuclear transcriptional rate of the IL-6 gene is remarkably rapid after the onset of exercise, it has been hypothesized that rapid changes in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration could be involved in IL-6 gene expression (Febbraio & Pedersen, 2002). Changes in intracellular free calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) is a key event during myocyte contraction, which has recently been shown to induce a rapid increase in IL-6 mRNA and protein expression in rat isolated muscles (Holmes *et al.* 2004). Prolonged contractile activity is characterized by low-amplitude and sustained elevations in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , leading to increased activity of calcineurin, a ubiquitous  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin-dependent protein phosphatase known to be a key mediator of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in muscle cells. Several downstream effectors of calcineurin have been identified in skeletal muscle, including the nuclear factor of the activated T cell (NFAT), and the calcineurin-NFAT pathway is involved in the acquisition and maintenance of the slow oxidative phenotype (for review see Bassel-Duby & Olson, 2003). Whether this transcription factor is involved in IL-6 gene transcription has recently been

examined (Chan *et al.* 2004). No evidence was provided that IL-6 gene transcription is activated by NFAT, whereas the phosphorylation of nuclear p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) was considered as an activator for candidate transcription factors that may bind to the IL-6 promoter region in myofibres. However, whether the increased cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation expected within single specific fibres during prolonged muscle contraction is associated with activated calcineurin and enhanced IL-6 gene expression has not been examined to date.

The aims of this study were to examine the fibre-type specificity of IL-6 gene transcription in individual myofibres at the end of prolonged exercise and the involvement of calcineurin activity in the control of IL-6 gene expression. In light of the recruitment pattern of muscle fibres during prolonged submaximal exercise and the differences in pre-exercise glycogen content, we hypothesized that (1) IL-6 production could be fibre-type specific and that IL-6 mRNA levels could be higher in type I and type IIa fibres than in type IIx and type IIb at the end of exercise, and (2) high IL-6 mRNA levels could be observed in fibres showing high calcineurin activity. To address these issues, we first quantified the level of IL-6 gene transcription within individual fibres taken from two skeletal muscles at the end of exercise in rat. Second, we examined whether IL-6 gene expression was associated with high levels of calcineurin activity. As previously suggested, transcription of the gene encoding for the modulatory calcineurin-interacting protein-1 (MCIP-1) was used as a sensitive indicator of calcineurin activity (Yang *et al.* 2000).

## Methods

### Animals

Three-month-old male Wistar rats ( $n=30$ ) were purchased from Charles River (L'Arbresle, France). They were housed three per cage in a thermoneutral environment ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), on a 12–12 h light–dark period, and were provided with food and water *ad libitum*. They were randomly assigned to three experimental groups: (1) control rats ( $n=10$ ); (2) active rats ( $n=10$ ); and (3) recovering rats ( $n=10$ ). Experiments received prior approval from the animal ethics committee of the Centre de Recherche du Service Santé des Armées (La Tronche, France).

### Exercise protocol

All animals were accustomed to running on a rodent treadmill for 15 min per day for 5 days at a moderate level ( $10\text{--}20 \text{ m min}^{-1}$ ;  $0^\circ$  gradient). After 3 days at rest, active and recovering animals ran on the treadmill ( $25 \text{ m min}^{-1}$ ,  $8^\circ$  gradient) until exhaustion, defined as the moment

where animals were unable to keep in pace with the treadmill.

### Tissue processing

Animals were removed and anaesthetized either immediately (active group), or 2 h after the end of exercise (recovering group), with intraperitoneal injection of pentobarbital ( $70 \text{ mg (kg body weight)}^{-1}$ ). Plantaris and soleus muscles of both hindlimbs were excised and cleaned of adipose and connective tissue. Plantaris muscles were also separated in superficial and deep portions. While the left muscles were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ , the right muscles were placed in  $400 \mu\text{l}$  RNAlater solution (Ambion, Austin, TX, USA), kept at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h and then frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . Animals were killed by removal of the heart.

### Single-fibre isolation

The single-fibre study was adapted from the methods of Birot *et al.* (2003). Muscle conserved in RNAlater was thawed on ice and placed in a small dish containing RNAlater. A small bundle of muscle fibres was first isolated under the light microscope using sharp-ended tweezers. Single muscle fibres were then separated and cut into two equal parts. One half was placed in  $40 \mu\text{l}$  Nanoprep lysis buffer supplemented with 0.7% 2- $\beta$ -mercaptoethanol (Stratagene, La Jolla, CA, USA), kept for 2 h at  $4^\circ\text{C}$  and then frozen at  $-80^\circ\text{C}$  before RNA extraction. The other half-fibre was placed in  $20 \mu\text{l}$  myosin extraction solution containing (mM): NaCl 300,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  10,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1, EDTA 10 and 2- $\beta$ -mercaptoethanol 1.4; pH 6.5, for further myosin heavy chain (MHC) content analysis.

### MHC isoform analysis

Single fibres were subjected to MHC isoform analysis using SDS-PAGE as previously described (Birot *et al.* 2003). After incubation for 24 h at  $4^\circ\text{C}$ , the half-fibre was digested and the 20 ml mixture was then diluted with 20 ml glycerol. Extracts were stored at  $-20^\circ\text{C}$  until required for the separation process. Electrophoresis was performed using a Mini Protean II system (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The separating gel solution contained 30% glycerol, 8% acrylamide-bis (50 : 1), 0.2 M Tris, 0.1 M glycine and 0.4% SDS. The stacking gel was composed of 30% glycerol, 4% acrylamide-bis (50 : 1), 70 mM Tris, 4 mM EDTA and 0.4% SDS. Then 10 ml myofibril samples were denatured using 10 ml buffer containing 5% 2- $\beta$ -mercaptoethanol, 100 mM Tris base, 5% glycerol, 4% SDS and bromophenol blue, for 3 min at  $100^\circ\text{C}$ . Myofibrillar homogenates were loaded onto vertical gels, whilst two lanes were loaded with protein

extract from a control plantaris muscle known to contain the four adult MHC isoforms. Gels were run at constant voltage (72 V) for 31 h and then silver-stained (Agbulut *et al.* 1996). The MHC protein isoform bands were scanned using a densitometer system equipped with an integrator (GS-700, Biorad, Marnes-la-Coquette, France). The MHC isoforms expressed by single fibres were identified by comparing them with bands of myosin extracts from control plantaris muscle.

### RNA extraction

Muscle tissue mRNA was isolated using the MagNA Pure LC instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). We disrupted 10 mg frozen soleus and deep plantaris muscles using two tungsten carbide beads in  $100 \mu\text{l}$  MagNA Pure LC mRNA isolation kit II (Roche Applied Science) lysis buffer with a Mixer Mill MM300 (Rescht, Haan, Germany) for 40 s (30 Hz). Lysate was centrifuged ( $12\,000 g$ , 5 min, room temperature), the liquid phase was transferred in a fresh tube and lysis buffer added to a final volume of  $300 \mu\text{l}$ . Extraction was then performed following the manufacturer's protocol with an  $880 \mu\text{l}$  sample volume, a  $50 \mu\text{l}$  elution volume and no dilution.

The total RNA of the fibres was isolated using RNA Insta-pure reagent (Eurogentec, Saraing, Belgium) with a modified protocol. Samples were extracted using  $200 \mu\text{l}$  RNA Insta-pure reagent and  $20 \mu\text{l}$  chloroform (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). An additional iso-volume chloroform extraction was performed. RNA isopropanol precipitation was carried out using  $10 \mu\text{g}$  glycogen (Sigma-Aldrich) as carrier. The ethanol washing step was performed twice and the RNA pellet was dried in a vacuum for 3 min. RNA was then resuspended in  $10 \mu\text{l}$  RNase-free water.

### Reverse transcription

Muscle tissue mRNA reverse transcription was carried out using the Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Saraing, Belgium). The reaction was performed in a  $10 \mu\text{l}$  final volume following the manufacturer's instructions. The reaction mix contained  $1 \mu\text{l}$  buffer ( $10 \times$ ),  $2 \mu\text{l}$  dNTP mix (2.5 mM each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)),  $0.5 \mu\text{l}$  oligo-dT primer ( $50 \mu\text{M}$ ),  $0.2 \mu\text{l}$  RNase inhibitor ( $20 \text{ units } \mu\text{l}^{-1}$ ),  $2 \mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  ( $25 \text{ mM}$ ),  $0.25 \mu\text{l}$  Euroscript reverse transcriptase ( $50 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$ ),  $1.05 \mu\text{l}$  RNase-free water and  $3 \mu\text{l}$  template mRNA.

Fibre RNA reverse transcription was carried out using Sensiscript Reverse Transcriptase (Qiagen S.A, Courtaboeuf, France), specially designed for highly sensitive reverse transcription with small amounts of RNA. The reaction was performed in a  $20 \mu\text{l}$  final volume following the manufacturer's instructions. The mix contained  $2 \mu\text{l}$  buffer ( $10 \times$ ),  $2 \mu\text{l}$  dNTP mix

**Table 1. Primers designed for real time RT-PCR amplification and their conditions of use**

Gene	Target sequence	Primers	Primer ( $\mu\text{M}$ )	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Annealing temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Product size (bp)	Product $T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
CycA	M19533 (381–507)	F: TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R: CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	0.4	4	58	127	85.2
IL-6	E02522 (532–610)	F: TCCTACCCCAACTCCAATGCTC R: TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	0.4	3	65	79	81
MCIP-1	AB075973 (31–110)	F: GACTTTAACTACAATTTAGCTCCCTGAT R: TTGGCCCTGGTCTCACTTTC	0.4	4	60	80	83.5
PECAM	AF268593 (2985–3079)	F: TGTCTGTGCGACTGAGCAGAAATCC R: TGCAGACTGCAACAGAGCAGTTTCAG	0.3	5	65	118	87.8
CD11b	U77697 (234–351)	F: TTTGAGCAAGATTGCCGAGGAGAGG R: TTTGGAGAGCATTTCGCACACTGG	0.3	4	65	95	85.8

For each gene, table shows GenBank accession number, forward (F) and reverse (R) primer sequences, primer and MgCl<sub>2</sub> concentration in PCR mix, primer annealing temperature, product size and product melting temperature ( $T_m$ ).

(5 mM each dNTP), 2  $\mu\text{l}$  oligo-dT primer (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (10 U  $\mu\text{l}^{-1}$ ), 1  $\mu\text{l}$  Sensiscript reverse transcriptase, 4  $\mu\text{l}$  RNase-free water and 8  $\mu\text{l}$  template RNA.

### PCR primer design

All primers used in this study were designed with the MacVector software (Accelrys, Orsay, France) and synthesized at Eurogentec (Saraing, Belgium). Primer sequences and resulting amplified product characteristics are shown in Table 1.

### Real-time PCR

The PCR reactions were carried out in a 20  $\mu\text{l}$  final volume with the LC Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science) using 0.2  $\mu\text{l}$  (whole muscle) or 0.5  $\mu\text{l}$  (single-fibre) cDNA solution. Quantitative PCRs were performed using LightCycler (Roche Applied Science) for 45 amplification cycles using a 5 s annealing step and an 8 s 72 $^{\circ}\text{C}$  elongation step (detailed conditions available in Table 1). Specificity was checked for each sample by melting-curve analysis. Transcription levels were normalized using an internal control gene with the comparative threshold cycle method (Livak & Schmittgen, 2001) using RelQuant software (Roche Applied Science). A pool of 40 samples randomly chosen in the groups was used as a calibrator as previously described (Peinnequin *et al.* 2004). Cyclophyllin A (CycA) was used as reference gene because its expression is known to be unaffected at the end of an endurance exercise test in skeletal muscle (Mahoney *et al.* 2004). Furthermore, this was controlled in our experiment on whole muscle tissue.

### Purity of single fibres

The single-fibre approach we used, first described by Birot *et al.* (2003), makes it possible to remove fibroblasts, smooth muscle cells and blood mononuclear cells because conjunctive tissue and vessels are clearly visible under the

microscope. In contrast, endothelial cells and infiltrating mononuclear cells cannot be seen, can adhere to the myofibres and are capable of producing great amounts of IL-6. Before including fibres in our study, we needed to check the purity of all half-fibres and confirm the absence of endothelial cells or monocytic cells. Every half-fibre of the active group was tested by PCR amplification for platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) and cluster of differentiation 11b (CD11b). When there was a positive signal for PECAM and/or CD11b, the sample was excluded from the study.

### Immunohistochemistry and periodic acid-Schiff staining

Serial transverse sections (14  $\mu\text{m}$  thick) were cut from the mid-belly portion of soleus and plantaris muscles in a cryostat maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Plantaris sections were labelled with mouse monoclonal antibodies against myosin reacting with (1) slow type I (Novocastra, reference NCL-MHCS, Newcastle upon Tyne, UK), (2) all adult fast and developmentally regulated epitopes but not with slow myosin (MY-32, Sigma-Aldrich), or (3) fast type IIa (SC-71). Both plantaris and soleus sections were stained for glycogen content using the periodic acid-Schiff (PAS) staining system (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

### Statistics

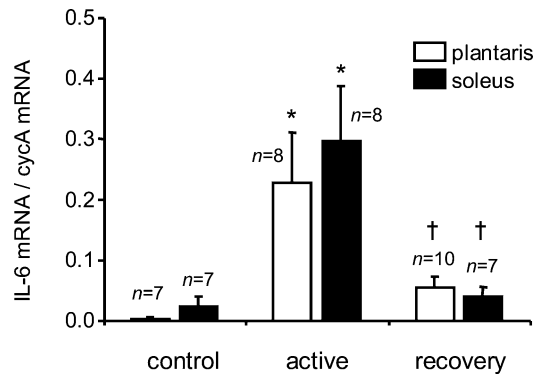
All data are presented as means  $\pm$  s.e.m. Student's unpaired *t* test was used to determine differences between groups. Statistical significance was accepted at  $P < 0.05$ .

## Results

### Running time

Both active and recovering rats performed an exhaustive running exercise. The mean duration of this exercise was  $101 \pm 13$  min.





**Figure 1. Quantitative analysis of IL-6 mRNA levels by real-time RT-PCR in whole plantaris and soleus muscles of control non-exercised, active and recovering rats (arbitrary units)**

Data are means  $\pm$  s.e.m. \*Significantly different from control values,  $P < 0.05$ ; †significantly different from active group,  $P < 0.05$ .

### Exercise-induced increase in IL-6 in whole muscle tissue

As expected, there was an increase in IL-6 mRNA levels in both plantaris and soleus muscles at the end of running exercise ( $P < 0.05$ ). IL-6 mRNA returned to baseline values approximately 2 h after exercise stopped. There was no significant difference in IL-6 transcript levels between plantaris and soleus muscles in control, active and recovery groups (Fig. 1). Because IL-6 mRNA levels decreased 2 h after the end of exercise, gene expression within single fibres was only considered in control and active groups.

### Fibre-type specificity of IL-6 mRNA expression

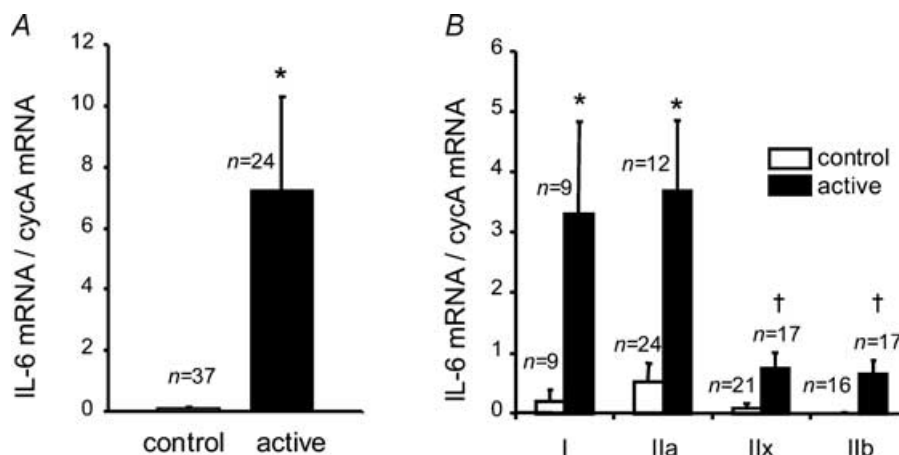
In soleus muscles, 91% of myofibres were pure type I fibres, while 9% expressed both MHC I and MHC IIa. In deep

plantaris muscles, 49% of myofibres expressed only one MHC isoform. Therefore, only 171 of the 351 successfully typed fibres were included for further study. Before IL-6 mRNA quantification, each individual fibre was tested for PECAM, CD11b and CycA mRNA expression. A negative signal for both PECAM and CD11b mRNA proved the lack of contamination by endothelial or monocytic cell material, respectively, while a positive expression of CycA gene confirmed the presence of biological material. After all these validation analyses, 37% of single, successfully typed fibres taken from soleus and plantaris muscles were used for further assays.

At the end of exercise, IL-6 mRNA levels increased significantly in myofibres of soleus muscle, which were mainly type I fibres ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2A). In myofibres taken from plantaris muscles, there was a marked and significant increase in IL-6 mRNA in only type I and type IIa fibres at the end of prolonged exercise ( $P < 0.05$ ). In contrast, acute treadmill exercise did not significantly change the IL-6 mRNA levels in type IIx and IIb fibres ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2B).

### Myofibre glycogen content at the end of exercise

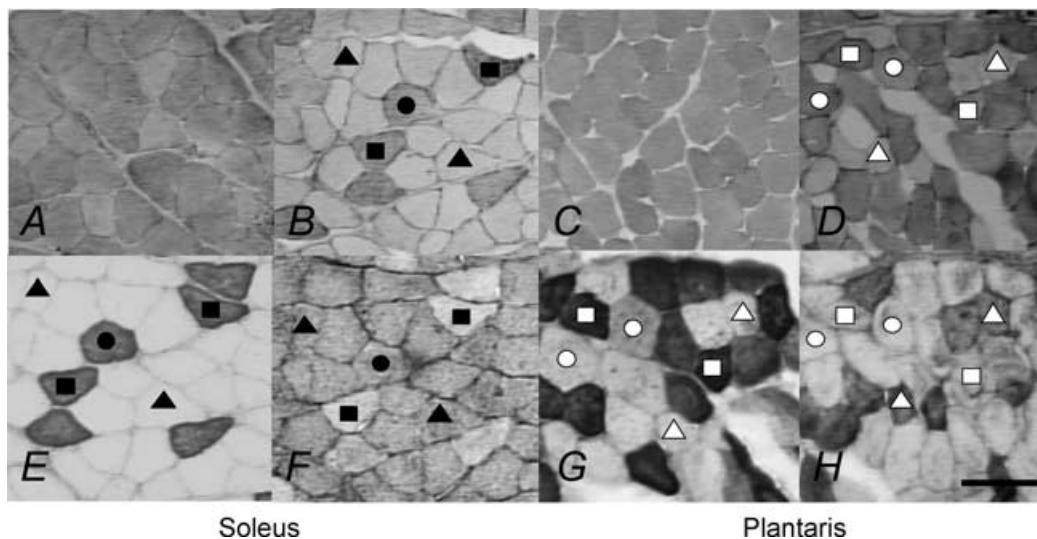
PAS staining and immunohistochemical analyses showed that in soleus muscles (Fig. 3), type I fibres were markedly glycogen depleted, whereas glycogen only slightly decreased in type IIa fibres. Likewise, all type I fibres were glycogen-depleted at the end of exercise in plantaris muscles (Fig. 3); in contrast, type IIa fibres failed to be markedly glycogen depleted. As shown in Fig. 3, there was heterogeneity of glycogen depletion within the two other fast fibre types (type IIx and IIb fibres), with some



**Figure 2. Quantitative analysis of IL-6 mRNA levels by real-time RT-PCR in soleus (A) and plantaris (B) single fibres of control non-exercised and active rats (arbitrary units)**

Plantaris fibres were categorized into four types: type I, IIa, IIx and IIb, according to their MHC isoform content. Data are means  $\pm$  s.e.m. \*Significantly different from control values,  $P < 0.05$ ; †significantly different from IIa in active group values,  $P < 0.05$ .





**Figure 3. Glycogen content in specific fibre types**

Glycogen content in specific fibre types in soleus (A, B, E and F) and plantaris (C, D, G and H), before (A and C) and after exhaustive running exercise (B, D and E–H). Glycogen content was assessed by PAS staining (A–D) and fibre type by immunohistochemistry using antibodies directed against type I (F and H) and type IIa MHC isoforms (E and G). In soleus muscles, pure type IIa fibres (■) or hybrid fibres comprising both type I and type IIa MHC isoforms (●) (E and F) are shown in B with a lower glycogen depletion than pure type I fibres (▲). In plantaris muscles, type IIa fibres (G) are shown in D with slight or no glycogen depletion (□); type I fibres (H) were markedly depleted (△), while fibres negative for antibodies (i.e. fibres comprising either type IIx and/or type IIb MHC isoforms) (G and H) show a heterogeneity of glycogen depletion (○) (D). Scale bar, 100 μm.

fibres markedly depleted, while no detectable changes were reported in the others.

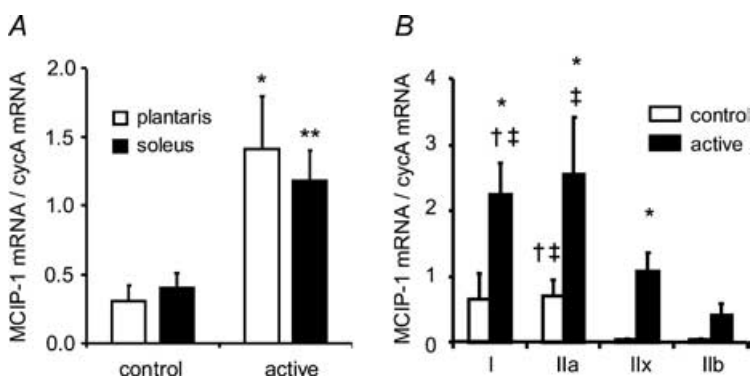
#### Fibre-type specificity of calcineurin activity at the end of exercise

The peculiar responsiveness of MCIP-1 gene expression to calcineurin activity was used to assess the activation state of calcineurin (Yang *et al.* 2000). A marked increase in MCIP-1 mRNA was shown in both plantaris and soleus muscles ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively) at the end of exercise (Fig. 4A). The exercise-induced increase in MCIP-1 mRNA was found at similar levels in slow-twitch (soleus) and fast-twitch muscles (plantaris).

As reported for IL-6 mRNA expression, there was a significant increase in MCIP-1 mRNA levels in both type I and IIa fibres at the end of prolonged exercise ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4B). Moreover, a slight but significant increase in MCIP-1 mRNA levels was shown in type IIx fibres of exercised rats ( $P < 0.05$ ).

#### Discussion

Despite emerging evidence for IL-6 production by myofibres during exercise, IL-6 mRNA levels were never quantified within individual fibres. In this study, we provide for the first time quantitative measures of IL-6 mRNA levels in muscle cells. The major and novel



**Figure 4. Quantitative analysis of MCIP-1 mRNA levels by real-time RT-PCR in whole plantaris and soleus muscles (A) and in plantaris single fibres (B) of control non-exercised and active rats (arbitrary units)**

For  $n$  and categorization of fibres see Figs 1 (A) and 2B (B). Data are means  $\pm$  s.e.m. \*Significantly different from control values ( $P < 0.05$ ); \*\*significantly different from control values ( $P < 0.01$ ); †significantly different from IIx in the same group ( $P < 0.05$ ); ‡significantly different from IIb in the same group ( $P < 0.05$ ).

observations made in the current investigation were: (1) a fibre-type specificity of IL-6 gene expression during exercise, with a marked increase in IL-6 transcripts in type I and type IIa fibres; and (2) an increase in calcineurin activity in individual muscle cells in parallel with the exercise-induced enhancement in IL-6 gene transcription.

Many recent studies showed increased levels of plasma IL-6 after exercise in humans, and demonstrated that the appearance of IL-6 in the circulation results from an increased transcription of the IL-6 gene in contracting muscles (Ostrowski *et al.* 1998; Steensberg *et al.* 2001; Keller *et al.* 2003). IL-6 is locally produced in skeletal muscle following both concentric and eccentric contractions in rats (Jonsson *et al.* 2000), but dynamic exercise such as running had never been used to examine the molecular events that control the IL-6 gene transcription in rodents. In the present study, IL-6 mRNA levels measured in whole muscle tissue before, at the end, and 2 h after running exercise in rats closely mimic the previously reported changes in human muscle biopsies after exercise. These results show that prolonged running exercise in the rat is a valid model to study contraction-induced IL-6 gene transcription in muscles.

As previously and consistently shown, contracting skeletal muscle is the main source of IL-6 production during exercise (for review see Febbraio & Pedersen, 2002). However, the issue of the cell type responsible for IL-6 production within skeletal muscle has been only recently addressed using histochemical methods or a qualitative approach of IL-6 gene transcription (Penkowa *et al.* 2003; Hiscock *et al.* 2004; Fischer *et al.* 2004). In the present study, we provide the first quantitative analysis of IL-6 gene transcription rate by RT-PCR in single myofibres. The lack of myofibre contamination by endothelial and mononuclear cells was verified by a negative signal for PECAM and CD11b, and these controls ensured that samples selected for IL-6 mRNA determination were pure single myofibres. Consistent with a previous study, our results using RT-PCR analysis definitively show that muscle fibres are a source of IL-6 in contracting muscles (Hiscock *et al.* 2004).

Because myofibres are recruited in an orderly manner and IL-6 production would be increased in glycogen-depleted fibres, it has been hypothesized that IL-6 mRNA expression could be fibre-type specific. This issue has been examined, and recent reports support the role played by the mode, intensity and duration of exercise on the fibre-type specificity of IL-6 gene transcription. Type I fibres are the main source of IL-6 during dynamic exercise at moderate intensity (Fischer *et al.* 2004), while bicycling exercise at higher intensity stimulated IL-6 synthesis in myofibres of all types (Penkowa *et al.* 2003). Surprisingly, IL-6 mRNA and protein were observed at a much greater level in type II than in type I fibres at the end of a bicycling exercise of lower intensity and

lower duration, while these fibres also had greater glycogen content (Hiscock *et al.* 2004). One of the main results of the present study is that, using real-time RT-PCR analysis, a very accurate and reproducible method to quantify mRNA levels, IL-6 gene transcription was mainly enhanced in type I and type IIa fibres, two fibre types belonging to the earlier-recruited populations of motor units during prolonged and sustained muscle contraction. In contrast, no significant change in IL-6 gene transcription rate was observed in type IIx and type IIb fibres, which are fast glycolytic fibres, recruited later during prolonged exercise (Fallentin *et al.* 1993; Houtman *et al.* 2003). As previously discussed, the exercise mode, intensity and duration affect whether IL-6 mRNA is expressed in oxidative or glycolytic fibres. Our data lend support to the hypothesis that even if both type I and type II myofibres have the capacity to synthesize IL-6, this cytokine is produced by essentially oxidative myofibres during moderate prolonged exercise.

Our histochemical analyses showed that IL-6 mRNA expression was markedly increased in type I fibres with low glycogen content, consistent with the hypothesis that this cytokine may be involved in the regulation of glucose homeostasis (Febbraio & Pedersen, 2002). However, only a limited glycogen depletion was reported in type IIa fibres, while IL-6 mRNA appeared predominantly in those fibres. Consistent with a previous study (Hiscock *et al.* 2004), our data failed to demonstrate that at the cellular level, IL-6 gene transcription was closely related to low glycogen content. This finding is not in disagreement with the possibility that IL-6 may act as an energy sensor at the whole muscle level. Some evidence clearly suggests that low pre-exercise skeletal muscle glycogen content exacerbates the IL-6 response to exercise (Keller *et al.* 2001; Steensberg *et al.* 2001; Chan *et al.* 2004). However, the lack of correlation between two biological factors at the myofibre level, does not reject the relationship at the whole muscle level, which could also result from local influences (Febbraio & Pedersen, 2002). Our findings suggest that in addition to factors related to low intramuscular glycogen stores, IL-6 gene transcription could be also enhanced by glycogen-independent mechanisms.

Therefore, molecular signals or events generated by muscle contraction probably have a key role in IL-6 gene transcription during exercise. Tonic motor nerve activity has been shown to sustain  $[Ca^{2+}]_i$  at levels sufficient to activate calcineurin, a  $Ca^{2+}$ -activated protein phosphatase involved in muscle development, adaptation and disease (Bassel-Duby & Olson, 2003). Alterations in  $[Ca^{2+}]_i$  have been implicated in several signalling cascades and as a potent signalling factor for IL-6 transcription (Febbraio & Pedersen, 2002; Keller *et al.* 2002), and recent data showed that ionomycin, a  $Ca^{2+}$  ionophore, increased IL-6 gene expression in isolated skeletal muscle (Holmes *et al.* 2004). These data support the hypothesis that increased  $[Ca^{2+}]_i$  is involved in the control of IL-6 gene expression

during exercise. Several signalling molecules are involved in transducing the calcium signal, thereby including calcineurin, and it has been proposed that activation of this phosphatase could be involved in early IL-6 gene transcription during prolonged exercise (Febbraio & Pedersen, 2002). Our results show that MCIP-1 mRNA levels significantly increased in both plantaris and soleus muscles at the end of prolonged exercise. This increase in MCIP-1 mRNA, a marker for calcineurin activation in two skeletal muscles known to be recruited during running exercise in rats, supports the notion that calcineurin is activated at the end of prolonged exercise (Norrbon *et al.* 2004).

A major finding of this study was that in parallel with IL-6 mRNA, MCIP-1 mRNA expression increased in both type I and type IIa fibres. This finding suggests that calcineurin is activated concomitant with the increase in IL-6 mRNA, mainly in the most active fibres, those expressing type I or type IIa MHC. Tonic motor nerve activity is characteristic of type I and to a lesser extent of type IIa fibres. Calcineurin activity is mainly sensitive to sustained, low-amplitude elevations of  $[Ca^{2+}]_i$  and the specific isoforms of some regulatory proteins and sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase account for the sustained elevations in  $[Ca^{2+}]_i$  (Botinelli & Reggiani, 2000; Baylor & Hollingworth, 2003). In the present study, we cannot prove whether the association between IL-6 gene transcription and enhanced calcineurin activity was causal or related to a random association. However, these data provide a new argument to suggest that calcineurin activation could be an upstream signal for IL-6 gene transcription during exercise. Calcineurin activation facilitates alterations in gene expression through several transcriptional effectors, including NFAT transcription factors (Bassel-Duby & Olson, 2003). A recent study suggested that the exercise-induced increase in IL-6 mRNA occurred through an NFAT-independent mechanism (Chan *et al.* 2004). However, calcineurin has been shown to be involved in the regulation of skeletal muscle genes, but not through NFAT (Parsons *et al.* 2003; Giger *et al.* 2004). Collectively, these results suggest that the exercise-induced increase in IL-6 gene transcription could be associated with calcineurin activation, which could control gene expression through a mechanism independent of the NFAT nuclear accumulation. Future studies need to demonstrate the causative relationship between calcineurin activity and IL-6 gene expression and determine the downstream targets of calcineurin. While it has been previously shown that low pre-exercise muscle glycogen content enhanced IL-6 gene transcription during exercise through phosphorylation of p38 MAPK in the nucleus (Chan *et al.* 2004), our results suggest that increased calcineurin activity could also account for the exercise-induced increase in IL-6 mRNA.

In summary, quantitative measures of IL-6 mRNA within muscle cells, demonstrate a fibre-type specificity of IL-6 gene expression during exercise, with a marked increase in IL-6 transcripts in type I and type IIa fibres during prolonged and sustained muscle contraction. Another major and novel finding of this study was that MCIP-1 mRNA expression also increased in both type I and type IIa fibres, suggesting that calcineurin activation is concomitant with the increase in IL-6 mRNA, mainly in the most active fibres. These data provide a new argument to suggest that calcineurin activation could be an upstream signal for IL-6 gene transcription during exercise. Our results suggest that in addition to factors related to the intracellular signalling of low intramuscular glycogen, molecular events related to contractile activity, such as increased calcineurin activity, would lead to IL-6 gene transcription.

## References

- Agbulut O, Li Z, Mouly V & Butler-Browne GS (1996). Analysis of skeletal and cardiac muscle from desmin knock-out and normal mice by high resolution separation of myosin heavy-chain isoforms. *Biol Cell* **88**, 131–135.
- Bartoccioni E, Michaelis D & Hohlfeld R (1994). Constitutive and cytokine-induced production of interleukin-6 by human myoblasts. *Immunol Lett* **42**, 135–138.
- Bassel-Duby R & Olson EN (2003). Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. *Biochem Biophys Res Commun* **311**, 1133–1141.
- Baylor SM & Hollingworth S (2003). Sarcoplasmic reticulum calcium release compared in slow-twitch and fast-twitch fibres of mouse muscle. *J Physiol* **551**, 125–138.
- Birot OJ, Koulmann N, Peinnequin A & Bigard XA (2003). Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor mRNA in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. *J Physiol* **552**, 213–221.
- Botinelli R & Reggiani C (2000). Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity. *Prog Biophys Mol Biol* **73**, 195–262.
- Chan MH, McGee SL, Watt MJ, Hargreaves M & Febbraio MA (2004). Altering dietary nutrient intake that reduces glycogen content leads to phosphorylation of nuclear p38 MAP kinase in human skeletal muscle: association with IL-6 gene transcription during contraction. *FASEB J* **18**, 1785–1787.
- Detmer K, Wang Z, Warejcka D, Leeper-Woodford SK & Newman WH (2001). Endotoxin stimulated cytokine production in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**, H661–H668.
- Fallentin N, Jorgensen K & Simosen EB (1993). Motor unit recruitment during prolonged isometric contractions. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **67**, 335–341.
- Febbraio MA & Pedersen BK (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* **16**, 1335–1347.

- Fischer CP, Hiscock N, Penkowa M, Basu S, Vessby B, Kallner A, Sjöberg LB & Pedersen BK (2004). Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle. *J Physiol* **558**, 633–645.
- Giger JM, Haddad F, Qin AX & Baldwin KM (2004). Effect of cyclosporin A treatment on the in vivo regulation of type I MHC gene expression. *J Appl Physiol* **97**, 475–483.
- Henneman E & Olson CB (1965). Relations between structure and function in the design of skeletal muscles. *J Neurophysiol* **28**, 581–598.
- Hiscock N, Chan MH, Bisucci T, Darby IA & Febbraio MA (2004). Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: evidence of fiber type specificity. *FASEB J* **18**, 992–994.
- Holmes AG, Watt MJ, Carey AL & Febbraio MA (2004). Ionomycin, but not physiologic doses of epinephrine, stimulates skeletal muscle interleukin-6 mRNA expression and protein release. *Metabolism* **53**, 1492–1495.
- Houtman CJ, Stegeman DF, Van Dijk JP & Zwarts MJ (2003). Changes in muscle fiber conduction velocity indicate recruitment of distinct motor unit populations. *J Appl Physiol* **95**, 1045–1054.
- Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA & Pedersen BK (2000). Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol* **528**, 157–163.
- Keller C, Hellsten Y, Pilegaard H, Febbraio MA & Pedersen BK (2002). Human muscle cells express IL-6 via a Ca<sup>2+</sup> dependent pathway. *J Physiol* **539P**, S096 (Abstract).
- Keller P, Keller C, Carey AL, Jauffred S, Fischer CP, Steensberg A & Pedersen BK (2003). Interleukin-6 production by contracting human skeletal muscle: autocrine regulation by IL-6. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 550–554.
- Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK & Neufer PD (2001). Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *FASEB J* **15**, 2748–2750.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* **25**, 402–408.
- Mahoney DJ, Carey K, Fu MH, Snow R, Cameron-Smith D, Parise G & Tarnopolsky MA (2004). Real-time RT-PCR analysis of housekeeping genes in human skeletal muscle following acute exercise. *Physiol Genomics* **18**, 226–231.
- Moldoveanu AI, Shephard RJ & Shek PN (2000). Exercise elevates plasma levels but not gene expression of IL-1beta, IL-6, and TNF-alpha in blood mononuclear cells. *J Appl Physiol* **89**, 1499–1504.
- Norrbom J, Sunberg CJ, Ameln H, Kraus WE, Jansson E & Gustafsson T (2004). PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol* **96**, 189–194.
- Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S & Pedersen BK (1998). Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol* **508**, 949–953.
- Parsons SA, Wilkins BJ, Bueno OF & Molkentin JD (2003). Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin Aalpha and Abeta gene-targeted mice. *Mol Cell Biol* **23**, 4331–4343.
- Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, Agay D, Chancerelle Y & Multon E (2004). Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* **5**, 3.
- Penkowa M, Keller C, Keller P, Jauffred S & Pedersen BK (2003). Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *FASEB J* **17**, 2166–2168.
- Starkie RL, Angus DJ, Rolland J, Hargreaves M & Febbraio MA (2000). Effect of prolonged, submaximal exercise and carbohydrate ingestion on monocyte intracellular cytokine production in humans. *J Physiol* **528**, 647–655.
- Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, Van Hall G, Saltin B & Pedersen BK (2001). Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol* **537**, 633–639.
- Steensberg A, Van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B & Pedersen BK (2000). Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* **529**, 237–242.
- Sterpetti AV, Cucina A, Morena AR, Di Donna S, D'Angelo LS, Cavalirro A & Tipa S (1993). Shear stress increases the release of interleukin-1 and interleukin-6 by aortic endothelial cells. *Surgery* **114**, 911–914.
- Ullum H, Haahr PM, Diamant M, Palmo J, Halkjaer-Kristensen J & Pedersen BK (1994). Bicycle exercise enhances plasma IL-6 but does not change IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6, or TNF-alpha pre-mRNA in BMNC. *J Appl Physiol* **77**, 93–97.
- Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R & Williams RS (2000). Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* **87**, E61–E68.

## Acknowledgements

This work was supported by the Centre de Recherches du Service de Santé des Armées with funding from Délégation Générale pour l'Armement (DGA/DSP/STTC/DT-SH) under contract 02CO008.



# Contraction-Induced Interleukin-6 Transcription in Rat Slow-Type Muscle is Partly Dependent on Calcineurin Activation

SÉBASTIEN BANZET, NATHALIE KOULMANN, HERVÉ SANCHEZ, BERNARD SERRURIER, ANDRÉ PEINNEQUIN, ANTONIA ALONSO, AND XAVIER BIGARD\*

Department of Human Factors, Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, La Tronche, France

The present work aimed at determining whether interleukin-6 (IL-6) produced by skeletal muscle during exercise is related, at least partly, to calcineurin activity. Rats were treated with two specific calcineurin inhibitors, cyclosporin A (CsA) and FK506, or vehicle (Vhl); they were then subjected to exhaustive treadmill running. Modulatory Calcineurin-Interacting Protein-1 (MCIP-1) mRNA levels, a reliable indicator of calcineurin activity, and IL-6 mRNA levels were measured by real-time RT-PCR in soleus muscles, and IL-6 protein concentration was measured in the plasma. Because low carbohydrates availability enhances IL-6 transcription through p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) pathway, muscle glycogen content and glycaemia were measured and p38 MAPK phosphorylation was determined in skeletal muscle by western blotting. As expected, exercise induced an increase in IL-6 ( $P < 0.01$ ) and MCIP-1 mRNA ( $P < 0.01$ ) in soleus muscle of Vhl rats, and enhanced p38 phosphorylation and plasmatic IL-6 protein ( $P < 0.05$ ). Calcineurin inhibition did not affect running time, glycemia or soleus glycogen content. CsA administration totally inhibited the exercise-induced increase in MCIP-1 mRNA ( $P < 0.01$ ), blunted the IL-6 gene transcription related to muscle activity, and suppressed the changes in IL-6 protein in plasma. In addition to its inhibition of calcineurin activity, FK506 administration totally suppressed the exercise-induced IL-6 gene transcription, likely by an inhibition of p38 activation. Taken together, these results demonstrate that in addition to p38 MAPK, increased calcineurin activity is one of the signalling events involved in IL-6 gene transcription. *J. Cell. Physiol.* 210: 596–601, 2007. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

During prolonged concentric exercise, skeletal muscles produce and release interleukin-6 (IL-6), leading to a dramatic increase in its plasma concentration (reviewed in Febbraio and Pedersen, 2002). This IL-6 production occurs only in working muscles and is mainly related to muscle glycogen stores (Keller et al., 2001; Steensberg et al., 2001), and then is thought to act as a muscle-derived endocrine signal resulting in hepatic glucose release and likely white adipose tissue lipolysis (Van Hall et al., 2003; Febbraio et al., 2004; Petersen et al., 2005).

Since muscle fibres themselves have been shown to be the main source of IL-6 production during contraction (Hiscock et al., 2004), the issue of the stimuli responsible for increased gene transcription has raised. The upstream signalling leading to IL-6 transcription within muscle cells in response to several stimuli has been studied *in vitro*. Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) p38 and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) are involved in IL-6 production in C2C12 cells stimulated by pro-inflammatory cytokines, LPS or extra-physiologic doses of epinephrine (Frost et al., 2003, 2004). Moreover, IL-6 transcription seems to be triggered by NF $\kappa$ B activation in C2C12 cells exposed to either interleukin-1 $\beta$  (Luo et al., 2003) or reactive oxygen species (ROS)-producing agents (Kosmidou et al., 2002). Yet, it is difficult to transpose those results onto exercise-induced IL-6 production because they are obtained in very stressful conditions and generally after several hours of stimulation, whereas IL-6 transcriptional rate increases rapidly after the onset of well-tolerated exercise (Keller et al., 2001).

Calcium acts as a second messenger in skeletal muscle during exercise, conveying neuromuscular activity into changes in the transcription of target genes through

Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory pathways including calcineurin signalling (reviewed in Koulmann and Bigard (2006)). Because IL-6 transcription rate increases early in contracting muscle (Keller et al., 2001), it has been hypothesized that activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory pathways could be involved in IL-6 gene transcription (Febbraio and Pedersen, 2002). This has been supported by a recent experiment showing that increased cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels leads to a rapid and important IL-6 gene transcription and protein release in rat isolated muscles (Holmes et al., 2004). Prolonged exercise preferentially recruits slow twitch/oxidative fibres characterized by slow and low amplitude Ca<sup>2+</sup> movements during contraction. This pattern of motor unit activation is well known to activate the serine-threonine phosphatase calcineurin, an enzyme involved in slow-type metabolic and contractile protein expression (Chin et al., 1998; Bigard et al., 2000). In human isolated myotubes, the pharmacological activation of the ryanodine receptor has been shown to lead to a 200% increase in IL-6 protein release (Ducreux et al., 2004). This increase was blocked by cyclosporin A (CsA) administration, a calcineurin inhibitor, suggesting that

Contract grant sponsor: Délégation Générale pour l'Armement (DGA/DSP/STTC/DT-SH); Contract grant number: 02CO008.

\*Correspondence to: Xavier Bigard, CRSSA, Department of Human Factors, BP 87, 38702 La Tronche Cedex, France.  
E-mail: xbigard@crssa.net

Received 20 February 2006; Accepted 20 July 2006

DOI: 10.1002/jcp.20854

increased  $\text{Ca}^{2+}$  release from the sarcoplasmic reticulum leads to a calcineurin-dependent IL-6 production. Moreover, we recently showed that the exercise-induced IL-6 transcription occurred preferentially in types I and IIa fibres (Banzet et al., 2005), in parallel with high MCIP-1 mRNA levels, a reliable indicator of calcineurin activity. Taken together, these results suggest that calcineurin activation could be involved in the contraction-induced IL-6 gene transcription, as previously hypothesized (Febbraio and Pedersen, 2002). Examining IL-6 production after the pharmacological inhibition of calcineurin would provide direct evidence that calcineurin activity is involved in transcription of the IL-6 gene in skeletal muscle during exercise.

In this study we tested the hypothesis that increased IL-6 gene transcription in active skeletal muscles was related, at least partly, to calcineurin activation. To address this issue, we compared soleus IL-6 mRNA and plasmatic IL-6 protein levels in rats, at the end of an exhaustive running exercise under control conditions (vehicle administration, Vhl) and after calcineurin inhibition. In the present study, we used immunosuppressive drugs cyclosporin A (CsA) and FK506, two specific inhibitors of calcineurin. Since low intramuscular glycogen stores are associated with increased p38 phosphorylation and IL-6 mRNA in response to exercise (Chan et al., 2004), we also verified the glycemic status, muscle glycogen content, and measured p38 phosphorylation in soleus muscles.

## METHODS

### Animals

Female Wistar rats were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). They were housed at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , on a 12–12 h light–dark period, and provided with food and water ad libitum. They were randomly assigned to six experimental groups, non-exercised rats treated by Vhl ( $n = 8$ ), CsA ( $n = 8$ ) or FK506 ( $n = 8$ ), and exercised animals treated by Vhl ( $n = 9$ ), CsA ( $n = 9$ ) or FK506 ( $n = 9$ ). Experiments received prior approval from the animal ethics committee of the Centre de Recherche du Service Santé des Armées (La Tronche, France).

### CsA, FK506, and Vhl administration

Animals were treated intraperitoneally twice a day with either 12.5 mg/(kg body weight) CsA (Sandimmun<sup>®</sup>, Novartis Pharma, Rueil-Malmaison, France) or the same volume of vehicle (Ricinon, Coopération pharmaceutique française, Melun, France, added with 30% ethanol). Rats treated with FK506 were injected sub-cutaneously twice a day with 1 mg/(kg body weight) Prograf<sup>®</sup> (Fujisawa, La Celle Saint Cloud, France) diluted with the same vehicle. Running exercise was performed 3 days (Vhl and CsA groups) or 1.5 day (FK506 group) after the treatment began.

### Exercise protocol

Before treatment, all animals were accustomed to running on a rodent treadmill for 15 min per day for 5 days (10–20 m/min;  $0^\circ$  grade). After 4 days at rest, active animals ran on the treadmill (22 m/min,  $5^\circ$  grade) till exhaustion.

### Tissue processing

Animals were anaesthetized with pentobarbital (70 mg/(kg body weight) *ip*) immediately at the end of exercise. Soleus muscles of both hind limbs were excised. While the left muscle was frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  for protein and glycogen quantification, the right muscle was placed in 500  $\mu\text{l}$  RNA *later* (Ambion, Austin, TX), kept at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h and then frozen at  $-20^\circ\text{C}$  for mRNA study. Whole blood was sampled, centrifuged and plasma was frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . Animals were killed by removal of the heart.

### RNA extraction

Muscle tissue mRNA were isolated using the MagNA Pure LC instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Muscle sections (10 mg) were disrupted in 200  $\mu\text{l}$  MagNA Pure LC mRNA isolation kit II lysis buffer (Roche Applied Science) with a Mixer Mill MM300 (Rescht, Haan, Germany). Lysate was centrifuged, the liquid phase was transferred in a fresh tube and completed to a 300- $\mu\text{l}$  final volume with lysis buffer. Extraction was then performed following the manufacturer's protocol.

### Reverse transcription

Reverse transcription was carried out using the Reverse Transcriptase Core Kit (Eurogentec, Saraing, Belgium). The reaction was performed following the manufacturer's instructions. The reaction mix contained 1  $\mu\text{l}$  buffer ( $10\times$ ), 2  $\mu\text{l}$  dNTP (2.5 mM each dNTP), 0.5  $\mu\text{l}$  oligo-dT primer (50  $\mu\text{M}$ ), 0.2  $\mu\text{l}$  RNase inhibitor (20 U/ $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0.25  $\mu\text{l}$  Euroscript reverse transcriptase (50 U/ $\mu\text{l}$ ), 1.05  $\mu\text{l}$  RNase free water and 3  $\mu\text{l}$  template mRNA.

### PCR primer design

Primers used in this study, Cyclophilin A (CycA), Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), MCIP-1 and IL-6 were designed with the MacVector software (Accelrys, Orsay, France) and synthesized at Eurogentec. They are described in Table 1.

### Real-time PCR

The PCR reactions were carried out in a 20- $\mu\text{l}$  final volume with the LC Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science) using 0.2  $\mu\text{l}$  cDNA solution, 4 mM  $\text{MgCl}_2$  and 0.4  $\mu\text{M}$  primers (except IL-6,

TABLE 1. Primer designed for real-time RT-PCR

Gene	Primers	Target sequence	Product size
IL-6	F: TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC R: TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	E02522 (532–610)	79
MCIP-1	F: GACTTTAACTACAATTTTAGCTCCCTGAT R: TTGGCCCTGGTCTCACTTTC	AB075973 (31–110)	80
CycA	F: TATCTGCACTGCCAAGACTGAGTG R: CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	M19533 (381–507)	127
HPRT	F: CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC R: GCAGGTCAGCAAAGAAGCTTATAGCC	S79292 (211–333)	123

For each primer pair, table shows gene name, forward (F) and reverse (R) primer sequence, Genebank accession number and product size.

0.3  $\mu$ M). Quantitative PCRs were performed using LightCycler instrument (Roche Applied Science). Specificity was checked for each sample by melting curve analysis. Transcription levels were normalized using an internal control gene with the comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen, 2001) using RelQuant software (Roche Applied Science). A pool of 28 samples randomly chosen was used as a calibrator (Peinnequin et al., 2004). *CycA* and *HPRT* were used as reference genes, final quantification being performed using the geometric averaging of the two quantifications (Vandesompele et al., 2002). All samples were treated at the same time for mRNA extraction, reverse transcription and PCR reaction.

### Western blotting

Frozen muscle sections were homogenized in ice-cold lysis buffer (20  $\mu$ l/mg) containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM EGTA, 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1  $\mu$ l/ml Protease inhibitor cocktail set III (Calbiochem, Fontenay-sous-bois, France). Samples were rotated for 1 h at 4°C and centrifuged (15,000g, 15 min, 4°C). Protein content was determined using the BCA method (Roche/Hitachi 912 instrument, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany).

Each sample (50  $\mu$ g of total proteins) was separated by SDS-PAGE (10% resolving gel). Proteins were transferred electrophoretically on nitrocellulose membranes (Hybond C-extra RPN 2020E, Amersham, Orsay, France). Membranes were blocked with non-fat milk in Tris-buffered-Saline solution added with 0.1% Tween-20 (TBST). Blots were incubated overnight at 4°C with anti-phospho-p38 MAP kinase (Thr180/182) antibody (Cell Signalling Technology, Beverly, MA), rinsed with TBST and incubated with horse radish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 1.5 h. Blots were subjected to Enhanced chemiluminescence reagent kit (Amersham) and exposed to Hyperfilm ECL RPN 3103K (Amersham). Membranes were then stripped in a solution containing 60 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5% SDS and 0.07%  $\beta$ -mercapto ethanol, for 30 min at 50°C, washed with TBST, and incubated overnight with anti p-38 MAP kinase antibody (Cell Signalling Technology) and treated as described above. The bands obtained were quantified using a densitometer (GS-700, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

### Muscle glycogen content

Muscle sections (20–30 mg) were disrupted in NaOH (2 M). Samples were submitted to amyloglucosidase (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in acetate buffer (0.3 M) for 2 h at 37°C to digest glycogen. Released glucose was quantified by spectrophotometric measurement (340 nm) of NADH production in the presence of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich), as described previously (Bergmeyer, 1983).

### Glycaemia

Glycaemia was measured according to the glucose oxidase methods with Glucose GOP-PAP kit on Roche/Hitachi 912 instrument (Roche Diagnostic).

### IL-6 protein

Plasma IL-6 levels were measured using the Quantikine colorimetric sandwich ELISA kit for rat IL-6 (R&D

systems, Lille, France), according to the manufacturer's protocol.

### Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  SEM. A two-way ANOVA was used to evaluate the main effects of exercise, pharmacological treatment, and/or interaction between main factors. When appropriate, the Newman–Keuls post-hoc test was used for inter-group comparisons. Running time were compared using a one way ANOVA to evaluate the main effect of treatment. Results were considered significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Animals body weights and running times

Administration of immunosuppressants FK506 and CsA impaired food intake and animal body weight only during the first 24 h (data not shown). Immunosuppressive agents did not affect physical performance ( $P = 0.22$ ) and exhaustion was observed after similar running times ( $93 \pm 9$ ,  $86 \pm 8$ , and  $73 \pm 8$  min for Vhl, CsA, and FK506 groups, respectively).

### Soleus MCIP-1 mRNA levels

Exercise increased (main effect,  $P < 0.01$ ) and immunosuppressive drugs decreased MCIP-1 mRNA levels (main effect,  $P < 0.001$ ), with a significant interaction ( $P < 0.05$ ). Vhl-treated animals had an approximately twofold increase in MCIP-1 mRNA at the end of exercise ( $P < 0.01$ , Fig. 1). In non-exercised rats, calcineurin inhibitors decreased MCIP-1 mRNA levels (50 and 75%, after CsA and FK506, respectively,  $P < 0.05$ ). At the end of exercise MCIP-1 mRNA was lower in CsA and FK506-treated than in Vhl-treated rats ( $P < 0.001$ ), and both drugs totally blocked the exercise-induced increase in MCIP-1 mRNA in soleus muscle (Fig. 1).

### Carbohydrates status

Neither calcineurin inhibitors (CsA or FK506) administration nor exercise had significant effects on glycaemia values (Table 2). While CsA or FK506 administration had no effect, exercise resulted in an approximately 75–80% decrease in soleus glycogen content in CsA, FK 506, and Vhl groups ( $P < 0.001$ ) (Fig. 2).

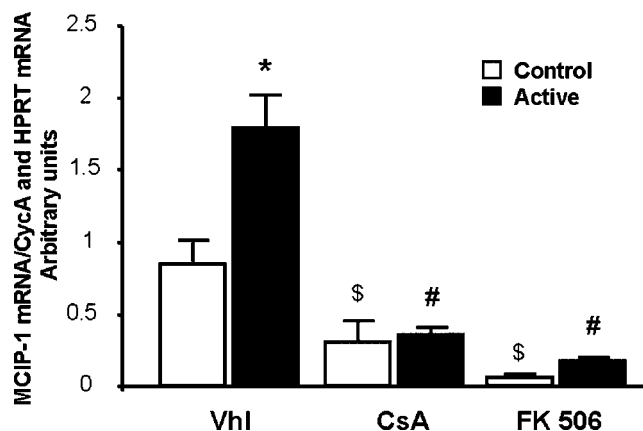


Fig. 1. Quantitative analysis of MCIP-1 mRNA levels by real-time RT-PCR in whole soleus muscles of control and active rats treated with cyclosporin A (CsA), FK506 or vehicle (Vhl) (arbitrary units). Data are mean  $\pm$  SEM. \* significantly different from control value for the same treatment,  $P < 0.01$ ; # significantly different from Vhl-treated active group,  $P < 0.001$ ; \$ significantly different from Vhl-treated control group,  $P < 0.05$ .

TABLE 2. Glycaemia values of control and active rats treated with cyclosporin A (CsA), FK506 or vehicle (Vhl) (mmol/L)

	Vhl	CsA	FK 506
Control	8.51 ± 0.25	9.52 ± 0.3	9.98 ± 0.5
Active	8.63 ± 0.94	7.68 ± 0.42	8.79 ± 0.6

Data are mean ± SEM.

Acute exercise markedly increased p38 phosphorylation (main effect  $P < 0.001$ ). However, while CsA administration did not affect the exercise-induced increase in p38 phosphorylation ( $P < 0.05$ ), FK506 suppressed this response of p38 MAPK to exercise (Fig. 3).

### Soleus IL-6 mRNA levels

Both exercise and treatment significantly affected IL-6 mRNA levels (main effects  $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ , respectively), but the effects of exercise were dependent on drug administration (interaction  $P < 0.01$ ). IL-6 mRNA levels increased 15-fold after treadmill exercise in Vhl-treated animals ( $P < 0.001$ ) (Fig. 4). In contrast, the increase in IL-6 mRNA reported in CsA-treated rats failed to reach statistical significance ( $P = 0.15$ ). The amount of IL-6 mRNA was significantly lower in CsA than in Vhl group at the end of exercise ( $P < 0.05$ ). In FK506-treated rats, IL-6 mRNA failed to increase in response to treadmill exercise.

### Plasma IL-6 protein levels

Plasmatic IL-6 protein levels increased at the end of exercise in Vhl-treated animals ( $P < 0.01$ ). In contrast, CsA and FK506 treatments fully blocked the exercise-induced increase in circulating IL-6 protein (Fig. 5).

## DISCUSSION

The main result of the present study is that calcineurin inhibition led to a blunted increase in IL-6 mRNA levels in soleus muscles and an a total blockade of IL-6 protein peak in the plasma of running rats. A total inhibition of the exercise-induced increase in MCIP-1 mRNA was reported after CsA or FK506 administration, reflecting an efficient calcineurin inhibition. These

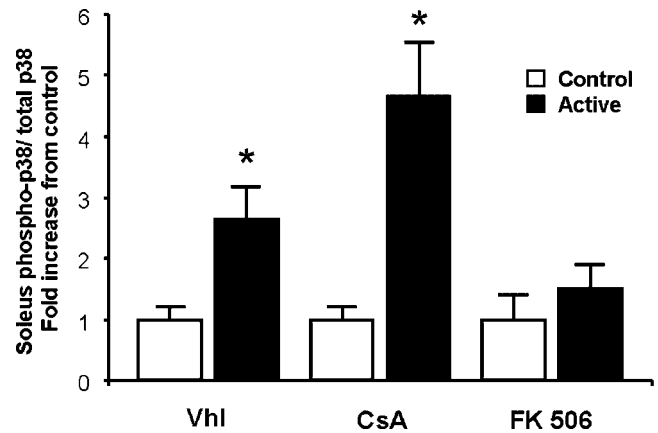


Fig. 3. Analysis of p38 MAPK phosphorylation by western-blotting in whole soleus muscles of control and active rats treated with cyclosporin A (CsA), FK506 or vehicle (Vhl) (fold increase versus control). Data are mean ± SEM. \* significantly different from control value for the same treatment,  $P < 0.05$ .

results undoubtedly demonstrate that calcineurin activity is involved in IL-6 gene transcription in exercising muscle. Moreover, FK506 was shown to block exercise-dependent p38 activation, and this finding strengthens the involvement of this MAPK in IL-6 gene transcription.

The precise signalling pathways involved in IL-6 gene transcription in skeletal muscle during exercise remain to determine. As previously suggested, changes in intracellular  $Ca^{2+}$  ion concentration and p38 MAPK activation could control IL-6 gene transcription during muscle contraction (Febbraio and Pedersen, 2002). We previously hypothesized that in addition to factors related to low intramuscular glycogen stores, increased calcineurin activity could be an upstream signal for IL-6 gene transcription (Banzet et al., 2005). Direct calcineurin activity measurement is subject to technical and theoretical shortcomings (reviewed in Molkenkin (2004)). As suggested by Yang et al. (2000), we measured MCIP-1 mRNA levels as an indicator of the calcineurin activity using real-time RT-PCR, with primers designed to detect the MCIP-1.4 variant which has been shown to be specifically modulated by calcineurin

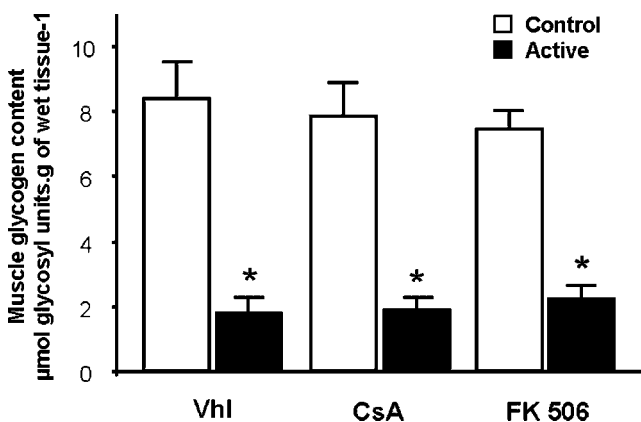


Fig. 2. Quantitative analysis of whole soleus muscle glycogen content of control and active rats treated with cyclosporin A (CsA), FK506 or vehicle (Vhl) ( $\mu\text{mol glycosyl U/g}$  of wet tissue). Data are mean ± SEM. \* significantly different from control value for the same treatment,  $P < 0.001$ .

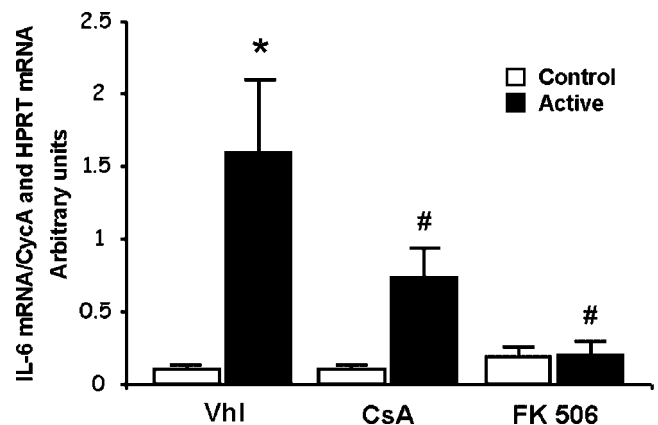


Fig. 4. Quantitative analysis of IL-6 mRNA levels by real-time RT-PCR in whole soleus muscles of control and active rats treated with cyclosporin A (CsA), FK506 or vehicle (Vhl) (arbitrary units). Data are mean ± SEM. \* significantly different from control value for the same treatment,  $P < 0.001$ ; # significantly different from Vhl-treated active group,  $P < 0.01$ .



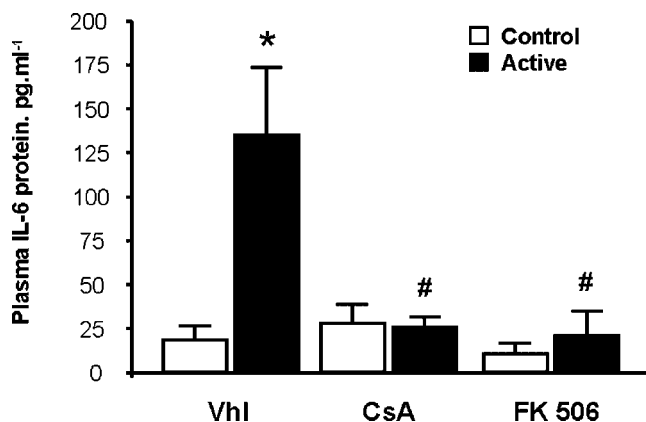


Fig. 5. Quantitative analysis of IL-6 protein concentration by ELISA in the plasma of control and active rats treated with cyclosporin A (CsA), FK506 or vehicle (Vhl) (pg/ml). Data are mean  $\pm$  SEM. \* significantly different from control value for the same treatment,  $P < 0.01$ ; # significantly different from Vhl-treated active group,  $P < 0.01$ .

(Rothermel et al., 2003). In Vhl-treated group, exercise resulted in an increase in MCIP-1 mRNA levels in soleus muscle, a result consistent with the well-known increase in calcineurin activity at the end of a single bout of exercise (Norrbon et al., 2004; Banzet et al., 2005). Moreover, we confirmed that the exercise-induced increase in calcineurin activity is associated with an increase in both IL-6 gene transcription and an IL-6 protein release in plasma.

Cyclosporin A is an immunosuppressive molecule that inactivates calcineurin. This drug has been widely used to inhibit calcineurin activity in rodent skeletal muscles, but has several adverse effects when administered for weeks, such as weight loss (Bigard et al., 2000) or impaired endurance time (Mercier et al., 1995). Here we used a treatment of short duration (2.5 days) and found no effects on body-weight and maximal running performance. CsA administration fully prevented the exercise-induced increase in calcineurin activity, blunted the associated increase in IL-6 mRNA levels and resulted in no systemic circulation of IL-6 protein. To be totally confident in these results and to reject a direct effect of CsA on IL-6 gene transcription, we used FK506 as an additional mean to inhibit calcineurin activity. In the present study, FK506 was administered in amounts largely lower than both non-toxic and prophylactic doses (Sasakawa et al., 2005). Both CsA and FK506 blocked similarly the exercise-induced increase in MCIP-1 mRNA and plasma IL-6 protein.

Because CsA administration did not affect other factors known to modify IL-6 production during exercise (i.e., glycemia, running time, muscle glycogen content, and p38 MAPK response to exercise), the present study provides the first experimental evidence that in slow oxidative muscles, prolonged exercise can trigger IL-6 gene transcription via calcineurin activation. Furthermore, since no circulating IL-6 protein was found under calcineurin blockade, our results confirm that skeletal muscle seems to be the major source of IL-6 during exercise. Calcineurin has been found in large amounts in skeletal muscles and has been implicated in many key cellular events ranging from early cell differentiation to adult muscle adaptation in response to environmental stimuli and functional demand (reviewed in Bassel-Duby and Olson (2003)). This pathway is involved in the

nerve activity-induced control of the slow phenotype by regulating the expression of both contractile and metabolic genes (Chin et al., 1998; Bigard et al., 2000). Our results suggest that the biological role of calcineurin can be extended to the control of IL-6 gene expression in response to a single bout of exercise. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) is a critical downstream effector of calcineurin involved in IL-6 transcription in smooth muscle cells (Abbott et al., 2000). Nerve activity is known to induce a calcineurin-dependent NFAT nuclear translocation (Liu et al., 2001; Shen et al., 2006), but its nuclear abundance was not altered in skeletal muscle after 1 h cycling in man (Chan et al., 2004). In the present experiment, we did not assess downstream targets of calcineurin and further experiments are required to define if IL-6 transcription occurs in a NFAT-dependent or independent manner, as described for other genes (Frantz et al., 1994; Alzuherri and Chang, 2003; Parsons et al., 2004).

It has been recently shown that in human, low intramuscular glycogen stores enhance the exercise-induced increase in IL-6 mRNA, in parallel with increased nuclear p38 phosphorylation (Chan et al., 2004). This result supports a role of p38 MAPK in modulating IL-6 gene transcription during muscle contraction. An increase in p38 phosphorylation is expected at the end of running exercise in rats, resulting from muscle glycogen depletion (Long et al., 2004). The similar rise in p38 phosphorylation reported at the end of exercise in both CsA and Vhl-treated animals is consistent with similar muscle glycogen depletion. Although not statistically significant with post-hoc test ( $P = 0.15$ ), there was a sevenfold increase in IL-6 gene transcription in response to exercise in CsA-treated animals that reached statistical significance when tested with an unpaired student *t*-test ( $P < 0.05$ ). As frequently reported, IL-6 mRNA values measured in vivo exhibit high dispersion and this methodological limit could affect the statistical analysis. It is thus likely that there is a remaining increase in IL-6 mRNA levels under calcineurin inhibition at the end of exercise, likely related to p38 phosphorylation.

This hypothesis is supported by the results obtained after FK506 administration. One interesting finding of this study was that FK506 totally blocked the exercise-induced increase in p38 phosphorylation, despite similar glycogen depletion. Such an inhibition has been previously shown in mammalian cells (Sanchez-Perez et al., 2004), but never reported in skeletal muscle after therapeutic treatment. In parallel with this inhibition of p38 phosphorylation, FK506 blocked the exercise-dependent increase in IL-6 mRNA levels, supporting the hypothesis that IL-6 gene transcription is also controlled by p38 MAPK. However, because exercising muscle is exposed to number of local and systemic stimuli, other endogenous signals can participate to the control of IL-6 gene transcription, together with calcineurin and p38 MAPK. Further experiments are clearly needed to explore both other stimuli leading to IL-6 gene transcription than calcineurin activation and glycogen availability, and intracellular pathways that could be involved in transducing these stimuli (Febbraio and Pedersen, 2002; Chan et al., 2004).

In conclusion, we have shown that while IL-6 mRNA levels increased in parallel with calcineurin activity in skeletal muscle at the end of prolonged running exercise in rat, this increase was blunted by two specific inhibitors of calcineurin. Inhibition of the exercise-induced increase in p38 phosphorylation after FK506

administration supports a role of this MAPK on IL-6 gene transcription. Collectively, these results demonstrate that in addition to p38 MAPK, increased calcineurin activity is one of the signalling events that controls IL-6 gene transcription. The downstream targets of calcineurin involved in IL-6 gene transcription need to be determined.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre de Recherches du Service de Santé des Armées with funding from Délégation Générale pour l'Armement (DGA/DSP/STTC/DT-SH) under contract 02CO008. We wish to acknowledge Josiane DENIS and Valérie LEROUX for technical support and Dr. David ALMERAS for providing drugs.

### LITERATURE CITED

- Abbott KL, Loss JR, II, Robida AM, Murphy TJ. 2000. Evidence that Galpha(q)-coupled receptor-induced interleukin-6 mRNA in vascular smooth muscle cells involves the nuclear factor of activated T cells *Mol Pharmacol* 58:946–953.
- Alzuhri H, Chang KC. 2003. Calcineurin activates NF $\kappa$ B in skeletal muscle C2C12 cells. *Cell Signal* 15:471–478.
- Banzet S, Koulmann N, Simler N, Birot O, Sanchez H, Chapot R, Peinnequin A, Bigard X. 2005. Fibre-type specificity of interleukin-6 gene transcription during muscle contraction in rat: Association with calcineurin activity. *J Physiol* 566:839–847.
- Bassel-Duby R, Olson EN. 2003. Role of calcineurin in striated muscle: Development, adaptation, and disease. *Biochem Biophys Res Commun* 311:1133–1141.
- Bergmeyer HU. 1983. *Methods of enzymatic analysis*, Vol. VI. New York: Academic, pp 11–18.
- Bigard X, Sanchez H, Zoll J, Mateo P, Rousseau V, Veksler V, Ventura-Clapier R. 2000. Calcineurin co-regulates contractile and metabolic components of slow muscle phenotype. *J Biol Chem* 275:19653–19660.
- Chan MH, McGee SL, Watt MJ, Hargreaves M, Febbraio MA. 2004. Altering dietary nutrient intake that reduces glycogen content leads to phosphorylation of nuclear p38 MAP kinase in human skeletal muscle: Association with IL-6 gene transcription during contraction. *FASEB J* 18:1785–1787.
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* 12:2499–2509.
- Ducreux S, Zorzato F, Muller C, Sewry C, Muntoni F, Quinlivan R, Restagno G, Girard T, Treves S. 2004. Effect of ryanodine receptor mutations on interleukin-6 release and intracellular calcium homeostasis in human myotubes from malignant hyperthermia-susceptible individuals and patients affected by central core disease. *J Biol Chem* 279:43838–43846.
- Febbraio MA, Pedersen BK. 2002. Muscle-derived interleukin-6: Mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 16:1335–1347.
- Febbraio MA, Hiscock N, Sacchetti M, Fischer CP, Pedersen BK. 2004. Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction. *Diabetes* 53:1643–1648.
- Frantz B, Nordby EC, Bren G, Steffan N, Paya CV, Kincaid RL, Tocci MJ, O'Keefe SJ, O'Neill EA. 1994. Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I $\kappa$ B/MAD3, an inhibitor of NF- $\kappa$ B. *EMBO J* 13:861–870.
- Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. 2003. Lipopolysaccharide and proinflammatory cytokines stimulate interleukin-6 expression in C2C12 myoblasts: Role of the Jun NH2-terminal kinase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R1153–R1164.
- Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. 2004. Epinephrine stimulates IL-6 expression in skeletal muscle and C2C12 myoblasts: Role of c-Jun NH2-terminal kinase and histone deacetylase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E809–E817.
- Hiscock N, Chan MH, Bisucci T, Darby IA, Febbraio MA. 2004. Skeletal myocytes are a source of interleukin-6 mRNA expression and protein release during contraction: Evidence of fiber type specificity. *FASEB J* 18:992–994.
- Holmes AG, Watt MJ, Carey AL, Febbraio MA. 2004. Ionomycin, but not physiologic doses of epinephrine, stimulates skeletal muscle interleukin-6 mRNA expression and protein release. *Metabolism* 53:1492–1495.
- Keller C, Steensberg A, Pilegaard H, Osada T, Saltin B, Pedersen BK, Neufer PD. 2001. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: Influence of muscle glycogen content. *FASEB J* 15:2748–2750.
- Kosmidou I, Vassilakopoulos T, Xagorari A, Zakyntinos S, Papapetropoulos A, Rousos C. 2002. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: Role of reactive oxygen species. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:587–593.
- Koulmann N, Bigard AX. 2006. Interaction between signalling pathways involved in skeletal muscle responses to endurance exercise. *Pflug Arch* 452:125–139.
- Liu Y, Cseresnyés Z, Randall WR, Schneider MF. 2001. Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 155:27–39.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta-Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- Long YC, Widegren U, Zierath JR. 2004. Exercise-induced mitogen-activated protein kinase signalling in skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 63:227–232.
- Luo G, Hershko DD, Robb BW, Wray CJ, Hasselgren PO. 2003. IL-1beta stimulates IL-6 production in cultured skeletal muscle cells through activation of MAP kinase signaling pathway and NF-kappa B. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284:R1249–R1254.
- Mercier JG, Hokanson JF, Brooks GA. 1995. Effects of cyclosporine A on skeletal muscle mitochondrial respiration and endurance time in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1532–1536.
- Molkentin JD. 2004. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovasc Res* 63:467–475.
- Norrbom J, Sundberg CJ, Ameln H, Kraus WE, Jansson E, Gustafsson T. 2004. PGC-1alpha mRNA expression is influenced by metabolic perturbation in exercising human skeletal muscle. *J Appl Physiol* 96:189–194.
- Parsons SA, Millay DP, Wilkins BJ, Bueno OF, Tsika GL, Neilson JR, Liberatore CM, Yutzey KE, Crabtree GR, Tsika RW, Molkentin JD. 2004. Genetic loss of calcineurin blocks mechanical overload-induced skeletal muscle fiber type switching but not hypertrophy. *J Biol Chem* 279:26192–26200.
- Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. 2004. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 5:3.
- Petersen EW, Carey AL, Sacchetti M, Steinberg GR, Macaulay SL, Febbraio MA, Pedersen BK. 2005. Acute IL-6 treatment increases fatty acid turnover in elderly humans in vivo and in tissue culture in vitro. *Am J Physiol* 288:E155–E162.
- Rothermel BA, Vega RB, Williams RS. 2003. The role of modulatory calcineurin interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med* 13:15–21.
- Sanchez-Perez I, Rodriguez-Hernandez CJ, Manguan-Garcia C, Torres A, Perona R, Murgia JR. 2004. FK506 sensitizes mammalian cells to high osmolarity by modulating p38 MAP kinase activation. *Cell Mol Life Sci* 61:700–708.
- Sasakawa T, Sasakawa Y, Ohkubo Y, Mutoh S. 2005. FK506 ameliorates spontaneous locomotor activity in collagen-induced arthritis: Implication of distinct effect from suppression of inflammation. *Int Immunopharmacol* 5:503–510.
- Shen T, Liu Y, Cseresnyés Z, Hawkins A, Randall WR, Schneider MF. 2006. Activity- and calcineurin-independent nuclear shuttling of NFATc1, but not NFATc3, in adult skeletal muscle fibers. *Mol Biol Cell* 17:1570–1582.
- Steenberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, van Hall G, Saltin B, Pedersen BK. 2001. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol* 537:633–639.
- Van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Moller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK. 2003. Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3005–3010.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research 0034.1–0034.11.
- Yang J, Rothermel B, Vega RB, Frey N, McKinsey TA, Olson EN, Bassel-Duby R, Williams RS. 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res* 87:E61–E68.

## RESUME

Lors d'un exercice physique prolongé, les muscles produisent et libèrent de l'interleukine-6 (IL-6). Cette production est corrélée à l'intensité de l'exercice et à la baisse des réserves musculaires en glycogène. L'IL-6 agirait par voie endocrine en favorisant la production endogène de glucose par le foie.

**Notre premier objectif** était d'étudier le contrôle de l'expression du gène IL-6 dans le muscle squelettique à l'exercice chez le rat et plus particulièrement l'importance de la voie de signalisation de la calcineurine, activée par la contraction musculaire. Nous avons d'abord montré que la transcription du gène IL-6 avait lieu dans les fibres musculaires oxydatives (I et IIa) et était associée à une activité importante de la voie de la calcineurine. Nous avons ensuite montré que l'administration d'inhibiteurs pharmacologiques de la calcineurine (ciclosporine A ou FK506) diminuait significativement la transcription du gène IL-6 dans les muscles lents/oxydatifs, prévenant ainsi l'apparition de la protéine dans le plasma. Nous avons ainsi démontré l'implication de la voie de la calcineurine dans le contrôle du gène codant IL-6 dans le muscle en réponse à un exercice unique.

**Notre deuxième objectif** était d'étudier l'action d'IL-6 sur le foie à l'exercice, plus particulièrement sur le contrôle du gène codant une enzyme clé de la néoglucogénèse, la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). Nous apportons des arguments expérimentaux en faveur d'un effet direct d'IL-6 sur le tissu hépatique et d'un contrôle possible de la transcription du gène codant PEPCK par l'IL-6 circulante. D'autre part nous suggérons l'implication d'acteurs moléculaires nouveaux, Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator alpha (PGC-1 $\alpha$ ) et Farnesoid X receptor (FXR), dans le contrôle de la néoglucogénèse à l'exercice.

---

**Mots clés** : muscle squelettique, exercice, cytokines, IL-6, calcineurine, substrats énergétiques, foie, néoglucogénèse, PEPCK.

---

## ABSTRACT

During prolonged exercise, skeletal muscles produce and release interleukin-6 (IL-6). This production correlates with both exercise intensity and decrease in muscle glycogen stores. IL-6 is thought to act, in an hormone-like manner, to increase endogenous glucose production by the liver.

**Our first aim** was to investigate the control of IL-6 gene expression in rat skeletal muscle at the end of exercise, focusing on the calcineurin signaling, an important contraction-responsive pathway. We first showed that IL-6 gene transcription occurred in oxidative muscle fibers (I and IIa) and was associated with a high calcineurin activity. In a second experiment we have shown that calcineurin inhibitors administration (ciclosporin A or FK506) significantly blunted IL-6 gene transcription in slow/oxidative muscles, resulting in no protein trafficking in the plasma. Thus, we demonstrated that calcineurin pathway is involved in IL-6 gene control in contracting skeletal muscle.

**Our second aim** was to study IL-6 action in the liver during exercise, especially IL-6 involvement in phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene control, a key enzyme of hepatic gluconeogenesis. We provide new arguments to think that circulating IL-6 acts directly on hepatic tissue and possibly contributes to PEPCK gene transcription regulation during exercise. We also suggest that new protagonists, Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator alpha (PGC-1 $\alpha$ ) and Farnesoid X receptor (FXR), may be involved in gluconeogenesis control during exercise.

---

**Key words**: skeletal muscle, exercise, cytokines, IL-6, calcineurin, energetic substrats, liver, gluconeogenesis, PEPCK.

---

**Laboratoire** : **Biomécanique muscle et nutrition**  
**Département des Facteurs Humains**  
**Centre de Recherches du Service de Santé des Armées**  
**24 avenue des maquis du Grésivaudan**  
**38702 La Tronche**